

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 1월 4일 (04.01.2024)



(10) 국제공개번호
WO 2024/005457 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 39/39 (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/008736

(22) 국제출원일:

2023년 6월 23일 (23.06.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0079941 2022년 6월 29일 (29.06.2022) KR

(71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 06951 서울특별시 서초구 반포대로 222, (반포동), Seoul (KR).

(72) 발명자: 남재환 (NAM, Jae Hwan); 14662 경기도 부천시 지봉로 43, 성심교정 506호, Gyeonggi-do (KR). 방유진 (BANG, Yoo Jin); 15821 경기도 군포시 고산로539번길 6, 967동 303호, Gyeonggi-do (KR). 박효정 (PARK, Hyo Jung); 08770 서울특별시 관악구 남부순환로 1430, 111동 501호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 네이트 특허법인 (NEIT INTERNATIONAL PATENT & LAW FIRM); 06251 서울특별시 강남구 역삼로 122, 401호 (역삼동, 하나빌딩), 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

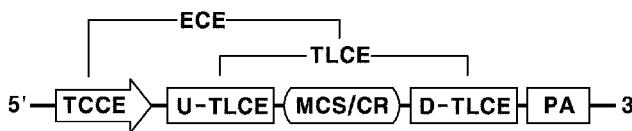
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, 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))

(54) Title: NUCLEIC ACID-BASED IMMUNE ENHANCER FORMING SECONDARY STRUCTURE

(54) 발명의 명칭: 2차 구조체를 형성하는 핵산 기반의 면역증강제



(57) Abstract: The present disclosure relates to an immune enhancer comprising a nucleic acid molecule, the enhancer including an expression control element with Solenopsis invicta virus (SINV)-derived internal ribosomal entry site (IRES) activity. By using the nucleic acid-based immune enhancer, both Th₁ and Th₂ immune responses can be induced. A nucleic acid-based immunoadjuvant can be used in drugs such as vaccines.

(57) 요약서: 본 개시는 솔레놉시스 인빅타 바이러스(Solenopsis invicta virus, SINV) 유래의 내부리보솜결합부위(Internal Ribosomal Entry Site, IRES) 활성을 갖는 발현 조절 요소를 가지는 핵산 분자를 포함하는 면역증강제에 관한 것이다. 핵산 기반의 면역증강제를 사용하여, Th₁ 면역 반응 및 Th₂ 면역 반응을 모두 유도할 수 있다. 핵산 기반 면역보강제는 백신과 같은 약품에 활용될 수 있다.



WO 2024/005457 A1

명세서

발명의 명칭: 2차 구조체를 형성하는 핵산 기반의 면역증강제 기술분야

- [1] 본 출원은 2022.06.29. 대한민국에서 출원된 특허출원 제10-2022-0079941호의 우선권의 이익을 주장한다.
- [2] 본 특허출원은 대한민국 정부 보건복지부의 "RNA 기반 기술을 활용한 SFTSV 백신 면역 증강 물질 적용 연구" (주관기관: 가톨릭대학교 산학협력단; 과제번호: M2022A008200001), "새로운 mRNA 백신용 플랫폼 개발" (주관기관: 가톨릭대학교 산학협력단; 과제번호: 2021M3E5E3080558), "mRNA 백신 등의 독성평가기술개발 연구(1)" (주관기관: 가톨릭대학교 산학협력단; 과제번호: DY0002259284-22213백신독421-1) 및 "RNA 면역증강제의 품질 및 효능 평가기술 개발 연구" (주관기관: 가톨릭대학교 산학협력단; 과제번호: DY0002259426-22203백신안404-1) 과제의 수행 결과물에 관한 것이다.
- [3] 본 개시는 면역증강제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 발현 조절 요소가 삽입된 핵산 기반의 면역증강제 및 이를 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [4] 면역 체계(immune system)는 생명체 내에서 병원체와 종양 세포 등을 탐지하고, 이들을 제거하여, 질병으로부터 생명체를 보호하는 생물학적인 구조 및 과정을 의미한다. 면역 체계는 크게 내재 면역 체계(선천 면역 체계, 자연 면역 체계; innate immune system)과 적응 면역 체계(후천 면역 체계, 획득 면역 체계; adaptive immune system)으로 구분될 수 있다.
- [5] 내재 면역 체계는 비-특이적인 방법으로 숙주가 감염되지 않도록 방어하는 세포나 기전으로서, 특정의 병원체 등을 기억하지 않고 즉각적으로 반응하는 면역 체계다. 모든 종류의 동물과 식물은 내재 면역 체계를 가지고 있으며, 식물, 곰팡이, 곤충 등은 내재 면역 체계만을 가지고 있다. 반면, 적응면역 체계는 항원이나 병원체에 특이적이며 항원 제시 과정을 통한 비-자기 항원의 인지가 필요하다. 이에 따라, 적응 면역 체계에서 특정 항원 또는 항원에 감염된 세포에 대한 특이적인 면역 반응이 가능하다. 또한, 적응 면역 체계를 구성하는 기억 세포 (memory cell)는 이미 수행된 면역 반응을 불러들일 수 있기 때문에, 동일한 병원체가 여러 번 체내에 침입하였을 때, 이들을 신속하게 제거할 수 있다.
- [6] 또한, 면역 체계는 체액성 면역과 세포성 면역으로 구분될 수 있다. 체액성 면역(항체성 면역; humoral immunity)에서 골수에서 유래한 B 림포사이트가 항원을 인지한 후 분화되어 면역글로불린(Ig)이라는 당-단백질로 이루어지는 항체를 분비하고, 분비된 항체에 의하여 감염된 병원균이 제거되는 면역 반응이 일어난다. 반면, 세포성 면역(cell mediated immunity, CMI)은 흉선에서 유래한 T 림포사이트

가 항원을 인지하여 림포카인(lymphokine)을 분비하거나 직접 감염된 세포를 죽이는 면역 반응이다.

- [7] 병원균 등에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 병원균의 전체 또는 일부를 항원으로 접종하는 백신이 다양한 질병의 예방이나 치료에 사용된다. 이때, 백신 항원에 의하여 야기될 수 있는 다양한 면역 반응이 유도될 수 있다. 초기에 개발된 약독화 생균 백신이나 불활화 사균 백신을 대신하여 최근에는 구조와 성분이 명확한 서브-유닛 백신이 주로 개발되고 있는데, 서브-유닛 백신은 기존 백신에 비하여 면역원성이 낮기 때문에 면역 반응을 증가시키기 위하여 면역증강제(adjuvant)를 사용한다.
- [8] 대부분의 병원성 세균이나 바이러스 감염에는 항체가 기본적인 방어 작용을 담당하므로 백신 항원에 의해 유도되는 항체만으로도 예방 효과가 충분한 경우가 많다. 그러나 지금까지 백신이 개발되지 못한 감염병은 예방이나 치료에 세포성 면역 반응이 중요한 작용을 하는 경우가 많으므로 세포성 면역반응을 유도하는 면역증강제를 사용하면 개발 성공가능성을 높일 수 있다.
- [9] 현재, 질병을 예방하기 위한 인간 백신에 사용되고 있는 면역증강제는 1) 수산화알루미늄/인산알루미늄/수산화인산황산 알루미늄과 같은 금속 염인 alum, 2) 스쿠알렌을 기반으로 하는 oil in water emulsion 형태의 면역증강제인 MF59 등이 사용되고 있다. 하지만, 종래의 면역증강제는 주로 체액성 면역 반응 활성화는 우수한 반면, 세포성 면역 유도 활성화는 매우 낮다. 따라서, 종래의 면역증강제는 항체만으로도 감염 방어가 가능한 경우에만 활용될 수 있을 뿐이고, 세포성 면역 반응이 요구되는 백신에 사용하기는 적합하지 못하다는 한계가 있다.
- [10] 대표적인 병원체인 미생물의 세포벽에는 지질다당류(lipopolysaccharides; LPS), 베타-1,3-글루칸 (β -1,3-glucan) 및 펩티도글리칸(peptidoglycans)과 같은 당단백질로 이루어진 병원성 관련 분자 유형(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)을 가지고 있다. 이러한 PAMPs는 숙주의 면역 체계를 구성하는 특정 단백질, 예를 들어 유형인식수용체(PRRs, pattern recognition receptors) 또는 유형인식단백질(PRP, pattern recognition proteins)에 의해 인식된다.
- [11] 각각의 PRPs는 병원체 표면에 존재하는 적절한 PAMPs를 인식하여 복합체를 형성하여, 식균작용(phagocytosis), 노듈 형성(nodule formation), 피포화(encapsulation), 단백질분해효소 캐스케이드(proteinase cascade) 활성화, 및 항균 펩타이드의 합성 등과 같은 일련의 면역 반응을 유발시킨다. Toll-유사 수용체(Toll-like receptors, TLRs)은 대표적인 PRRs이다. TLR agonist는 면역 세포에 대한 활성이 강하기 때문에 백신 면역증강제로 개발되고 있다. 예를 들어, 내독소인 LPS는 면역 세포의 TLR4에 작용하여 강력한 면역 활성을 보이고 있다.
- [12] 인간과 같은 고등 생명체의 게놈 DNA와 달리, 세균의 DNA는 CpG motif의 사이토신이 메틸화되어 있지 않다. 따라서 고등 생명체의 면역 세포는 CpG motif의 사이토신이 메틸화되지 않은 세균의 DNA를 비-자기 항원으로 인식할 수 있는데, 이를 인식하는 수용체가 TLR9이다. TLR9 agonist는 다양한 면역 반응을 증

강시킬 수 있는데, TLR9 agonist로서 CpG motif를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 면역증강제로 개발되고 있다. 하지만, TLR agonist로 사용되는 LPS와 CpG motif는 독성이 매우 강하고 생체 내에서 염증 반응을 야기하는 등의 부작용이 있어서 안전성이라는 측면에서 문제가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 본 개시의 목적은 체액성 면역 및 세포성 면역을 균형 있게 유도할 수 있도록 설계된 핵산 기반 면역증강제 및 이를 포함하는 백신 조성물을 제공하고자 하는 것이다.
- [14] 본 개시의 다른 목적은 생체에 주입되었을 때, 생체에 대한 독성 및 부작용을 야기하지 않는 면역증강제 및 이를 포함하는 백신 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 일 측면에 따르면, 본 개시는 솔레놉시스 인빅타 바이러스(Solenopsis invicta virus, SINV)에서 유래한 내부리보솜결합부위(Internal Ribosomal Entry Site, IRES) 활성을 갖는 발현 조절 요소를 가지는 핵산 분자를 포함하는 면역증강제를 제공한다.
- [16] 일례로, 상기 핵산 분자는 상기 발현 조절 요소와 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 제한효소 인식 서열 또는 제한효소 절단 서열을 더욱 포함할 수 있다.
- [17] 선택적으로, 상기 핵산 분자는 상기 발현 조절 요소와 작동 가능하게 연결되는 코딩 영역을 더욱 포함할 수 있다.
- [18] 상기 발현 조절 요소는 제 1 번역 조절 요소와, 상기 제 1 번역 조절 요소의 하류에 위치하는 제 2 번역 조절 요소를 포함할 수 있다.
- [19] 예를 들어, 상기 제 1 번역 조절 요소는 서열식별번호: 1 또는 이의 전사체 서열을 포함할 수 있다.
- [20] 상기 제 2 번역 조절 요소는 서열식별번호: 2 또는 이의 전사체 서열을 포함할 수 있다.
- [21] 필요한 경우, 상기 발현 조절 요소는 상기 제 1 번역 조절 요소의 상류에 위치하는 전사 조절 요소를 더욱 포함할 수 있다.
- [22] 또한, 상기 핵산 분자는 상기 발현 조절 요소의 하류에 위치하는 제 1 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 제 1 폴리아데노신 서열 중에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드 서열을 더욱 포함할 수 있다.
- [23] 선택적으로, 상기 핵산 분자는 상기 제 1 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 상기 제 1 폴리아데노신 서열의 하류에 위치하는 제 2 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 제 2 폴리아데노신 서열을 더욱 포함할 수 있다.

- [24] 필요한 경우, 상기 핵산 분자는 상기 제 2 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 상기 제 2 폴리아데노신 서열의 하류에 위치하며, 하기 식 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 전사체 서열을 더욱 포함할 수 있다.
- [25] [식 1]
- [26] $5'-G_mX_nG_pX_qG_rX_sG_t-3'$
- [27] 식 1에서, G는 구아노신을 나타내고, X는 아데노신, 사이티닌 및 티미딘 중 하나임; m, p, r 및 t는 각각 독립적으로 1 내지 10의 정수임; n, q 및 s는 각각 독립적으로 0 내지 10의 정수임.
- [28] 예를 들어, 상기 발현 조절 요소는 솔레놉시스 인빅타 바이러스 1 (SINV-1)에서 유래한 IRES 활성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [29] 다른 측면에서, 본 개시는 면역원 및 약학적 유효량의 전술한 핵산 분자를 포함하는 면역증강제를 포함하는 백신 조성물을 제공한다.
- [30] 상기 백신 조성물은 지질나노입자, 핵산 안정화제 및 다른 면역증강제 중에서 적어도 하나를 더욱 포함할 수 있다.
- [31] 또 다른 측면에서, 본 개시는 대상체에 약학적 유효량의 전술한 핵산 분자를 투여하는 단계를 포함하는 대상체에 면역 활성을 증진시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [32] 솔레놉시스 인빅타 바이러스 (SINV) 유래의 발현 조절 서열과, 선택적으로 적어도 하나의 제한효소 인식 서열 또는 제한효소 절단 서열 및/또는 코딩 영역을 포함하는 핵산 분자는 효율적으로 면역 반응을 유도한다. 핵산 분자는 면역원성 물질에 의한 면역 반응을 증대시키는 면역증강제로 활용될 수 있다.
- [33] 핵산 분자는 면역원성 물질에 의해 야기되는 면역 반응과 다른 경로의 면역 반응을 유도할 수 있다. 핵산 분자를 면역증강제로 사용하면, 면역원성 물질에 의해 야기되는 전체 면역 반응이 생체 내에서 균형 있게 일어날 수 있다. 또한, 핵산 분자는 생체 내에서 독성이나 부작용이 없어 안전성이 담보된다.
- [34] 따라서 핵산 분자를 면역증강제로 사용하여, 다양한 질병을 예방하기 위한 백신 조성물로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [35] 도 1은 본 개시의 예시적인 실시형태에 따른 핵산 분자의 구조를 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- [36] 도 2는 본 개시의 다른 예시적인 실시형태에 따른 핵산 분자의 구조를 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- [37] 도 3 및 도 4는 각각 본 개시의 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스의 혈청에서 생성된 면역글로불린을 ELISA를 이용하여 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.
- [38] 도 5 및 도 6는 각각 본 개시의 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스에서 중화항체 역가를 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

- [39] 도 7 및 도 8은 각각 본 개시의 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스에서 분비된 사이토카인을 ELISPOT으로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [40] 도 9 내지 도 11은 각각 본 개시의 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스에서 생성된 사이토카인을 FACS로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [41] 도 12 및 도 13은 각각 본 개시의 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스에서 생성된 사이토카인을 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [42] 도 14 및 도 15는 각각 본 개시의 다른 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스의 혈청에서 생성된 면역글로불린을 ELISA를 이용하여 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [43] 도 16 및 도 17은 각각 본 개시의 다른 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스에서 중화항체 역가를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [44] 도 18 및 도 19는 각각 본 개시의 다른 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스의 혈청에서 생성된 면역글로불린을 ELISA를 이용하여 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [45] 도 20 및 도 21은 각각 본 개시의 다른 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스에서 중화항체 역가를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [46] 도 22 및 도 23은 각각 본 개시의 다른 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스의 혈청에서 생성된 면역글로불린을 ELISA를 이용하여 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [47] 도 24 및 도 25는 각각 본 개시의 다른 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스에서 중화항체 역가를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [48] 도 26은 본 개시의 다른 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스에서 분비된 사이토카인을 ELISPOT으로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [49] 도 27 내지 도 29는 각각 본 개시의 다른 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스에서 생성된 사이토카인을 FACS로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [50] 도 30 내지 도 32는 각각 본 개시의 다른 예시적인 실시예에 따라, 핵산 분자를 주입하여 면역시킨 마우스에서 생성된 사이토카인을 ELISA로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

- [51] 도 33 내지 도 35는 각각 본 개시의 다른 예시적인 실시예에 따라, 인간 세포주를 핵산 분자로 stimulation하여 배양한 인간 세포주에서 수지상세포 및 수지상세포의 활성화 정도를 FACS를 이용하여 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [52] 도 36 내지 도 40은 각각 본 개시의 다른 예시적인 실시예에 따라, 인간 세포주를 핵산 분자로 stimulation하여 배양한 인간 세포주에서 사이토카인의 분비를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [53] 이하, 필요한 경우에 첨부하는 도면을 참조하면서 본 개시를 설명한다.
- [54] 용어의 정의
- [55] 본 명세서에서 용어 "아미노산"은 가장 넓은 의미로 사용되고, 자연-발생 L-아미노산 또는 잔기를 포함하는 것으로 의도된다. 자연-발생 아미노산에 대해 통상적으로 사용되는 1-문자 약어 및/또는 3-문자 약어가 본 명세서에 사용될 수 있다. 아미노산은 D-아미노산뿐만 아니라 화학적으로-변형된 아미노산, 예컨대 아미노산 유사체, 단백질에 통상적으로 혼입되지 않는 자연-발생 아미노산, 예컨대 노르류신, 및 아미노산의 특징인 것으로 당업계에 공지된 특성을 갖는 화학적으로-합성된 화합물을 포함한다. 예를 들어, 천연 Phe 또는 Pro와 동일한 펩타이드 화합물의 입체형태 제한을 허용하는 페닐알라닌 또는 프롤린의 유사체 또는 모방체가 아미노산의 정의 내에 포함된다. 이러한 유사체 및 모방체는 본 명세서에서 아미노산의 "기능적 균등물"로서 지칭된다.
- [56] 예를 들어, 표준 고체-상 합성 기술에 의해 합성된 합성 펩타이드는 유전자에 의해 암호화되는(encoding) 아미노산으로 제한되지 않으며, 이에 따라 주어진 아미노산에 대해 보다 광범위하게 다양한 치환을 허용한다. 유전자 코드에 의해 암호화되지 않은 아미노산은 본 명세서에서 "아미노산 유사체"로서 지칭될 수 있다. 예를 들어, 아미노산 유사체는 Glu 및 Asp에 대한 2-아미노 아디프산(Aad); Glu 및 Asp에 대한 2-아미노피멜산(Apm); Met, Leu 및 다른 지방족 아미노산에 대한 2-아미노부티르산(Abu); Met, Leu 및 다른 지방족 아미노산에 대한 2-아미노헵탄산(Ahe); Gly에 대한 2-아미노부티르산(Aib); Val, Leu 및 Ile에 대한 시클로헥실알라닌(Cha); Arg 및 Lys에 대한 호모아르기닌(Har); Lys, Arg 및 His에 대한 2,3-디아미노프로피온산(Dap); Gly, Pro 및 Ala에 대한 N-에틸글리신(EtGly); Gly, Pro 및 Ala에 대한 N-에틸글리신(EtGly); Asn 및 Gln에 대한 N-에틸아스파라긴(EtAsn); Lys에 대한 히드록시리신(Hyl); Lys에 대한 알로히드록시리신(AHyl); Pro, Ser 및 Thr에 대한 3-(및 4-)히드록시프롤린(3Hyp, 4Hyp); Ile, Leu 및 Val에 대한 알로-이소류신(AlIle); Arg에 대한 4-아미디노페닐알라닌; Gly, Pro 및 Ala에 대한 N-메틸글리신(MeGly, 사르코신); Ile에 대한 N-메틸이소류신(MeIle); Met 및 다른 지방족 아미노산에 대한 노르발린(Nva); Met 및 다른 지방족 아미노산을 위한 노르류신(Nle); Lys, Arg 및 His에 대한 오르니틴(Orn); Thr, Asn 및 Gln에 대한 시트룰린(Cit) 및 메티오닌 술폭시드(MSO); 및 Phe에 대한 N-메틸페닐알라닌

(MePhe), 트리메틸페닐알라닌, 할로-(F-, Cl-, Br- 또는 I-)페닐알라닌 또는 트리플루오릴페닐알라닌을 포함한다.

- [57] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 자연적으로 존재하는 것으로부터 분리하였거나, 재조합 기술(recombinant technique)에 의하여 또는 화학적으로 합성된 단백질, 단백질 단편 및 펩타이드를 모두 포함한다. 예를 들어 본 개시의 펩타이드는 적어도 5개, 예를 들어, 적어도 10개의 아미노산으로 구성되어 있다.
- [58] 특정 실시 형태에서, 화합물의 변이체, 예컨대 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 펩타이드 변이체가 제공된다. 본 명세서에서 "펩타이드 변이체(peptide variants)"란 하나 또는 그 이상의 아미노산이 펩타이드의 아미노산 서열에 치환(substitutions), 결실(deletions), 첨가(additions) 및/또는 삽입(insertions)되어 있으면서, 원래의 아미노산으로 구성된 펩타이드와 거의 동일한 생물학적 기능을 발휘하는 것을 말한다. 펩타이드 변이체는 원래의 펩타이드와 70% 이상, 예를 들어, 90% 이상, 또는 95% 이상의 동일성(identity)을 가지고 있어야 한다.
- [59] 이러한 치환체로서 "보존성"이라고 알려진 아미노산 치환체가 포함될 수 있다. 변이체는 또한 비보존성(nonconservative)의 변화를 포함할 수도 있다. 일례로, 변이체 폴리펩타이드의 서열은 5개 또는 그 이하의 아미노산이 치환, 결실, 부가 또는 삽입됨으로서 원래의 서열과 달라진다. 변이체들은 또한 펩타이드의 면역원성(immunogenicity), 2차 구조(secondary structure)에 최소한의 영향을 주는 아미노산들의 결실 또는 부가에 의해 변화될 수 있다.
- [60] "보존성" 치환이란 하나의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되었을 때에도 폴리펩타이드의 2차구조 및 수치료성(hydrophobic nature) 등의 특성에 큰 변화가 없는 것을 의미한다. 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대 극성(polarity), 전하(charge), 수용성(solubility), 소수성(hydrophobicity), 친수성(hydrophilicity) 및/또는 양친화성(amphipathic nature) 등의 유사성을 기초로 하여 얻어질 수 있다.
- [61] 예를 들어, 아미노산은 공통적인 결사슬 특성에 따라 1) 소수성(노르류신, 메티오닌, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신) 2) 중성 친수성(시스테인, 세린, 트레오닌, 아스파라진, 글루타민), 3) 산성(아스파르트산, 글루탐산), 4) 염기성(히스티딘, 리신, 아르기닌), 5) 쇠 방향에 영향을 미치는 잔기 (글리신, 프롤린), 6) 방향족 (트립토판, 티로신, 페닐알라닌)으로 분류될 수 있다. 보존적 치환은 이들 각각의 클래스 중 하나의 구성원을 동일한 클래스의 다른 구성원으로 교환하는 것을 수반할 것이다.
- [62] 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 리신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글리신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 티로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글리신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 티로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

- [63] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 이소류신 (+4.5); 발린 (+4.2); 류신 (+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스타인 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글리신 (-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 티로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루탐산 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파르트산 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5).
- [64] 단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유했을 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 예를 들어, ± 2 이내, ± 1 이내, 또는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [65] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌 (+3.0); 리신 (+3.0); 아스파르트산(+3.0 $\pm$ 1); 글루탐산(+3.0 $\pm$ 1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글리신 (0); 트레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5 $\pm$ 1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 리신(-1.8); 이소류신 (-1.8); 티로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4). 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, ± 2 이내, 예를 들어, ± 1 이내 또는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.
- [66] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.
- [67] 일반적으로, 본 명세서상에 언급되어 있는 펩타이드들(융합 단백질 포함) 및 폴리뉴클레오타이드들은 분리된(isolated) 것이다. "분리된(isolated)" 펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드란 원래의 환경으로부터 제거된 것이다. 예를 들어, 자연 상태로 존재하는 단백질은 그 상태에서 함께 존재하는 물질들 전부 혹은 일부를 제거함으로써 분리되는 것이다. 이러한 폴리펩타이드는 적어도 90% 이상의 순도를 지녀야 하며, 예를 들어, 95% 이상 또는 99% 이상의 순도를 가져야 한다. 폴리뉴클레오타이드는 벡터 내에서 클로닝 시킴으로써 분리된다.
- [68] 본 명세서에서 용어 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 교환 가능하게 사용되며, 임의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭하고 DNA(예컨대 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함한다. 핵산 분자의 구성 단위인 "뉴클레오타이드"

드"는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 그 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해, 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드, 당 또는 염기가 변형된 유사체(analogue), 예컨대 메틸화 뉴클레오타이드 및 그 유사체를 포함할 수 있다.

[69] 예를 들어, 뉴클레오타이드는 5-변형된 사이티딘 및/또는 5-변형된 우리딘을 포함할 수 있다. 5-변형된 사이티딘은 5-할로사이티딘(예를 들어, 5-요오도사이티딘 또는 5-브로모사이티딘), 5-알킬닐사이티딘 및 또는 5-헤테로사이클릴우리딘을 포함한다. 5-변형된 우리딘은 5-할로우리딘(예를 들어, 5-요오도우리딘 또는 5-브로도우리딘), 5-알킬닐우리딘 및/또는 5-헤테로사이클릴우리딘을 포함할 수 있다. 선택적으로, 5-변형된 우리딘은 2-디옥시리보오스를 함유하는 뉴클레오타이드이다.

[70] 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변이를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 암호화하는 코돈(예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 암호화하는 코돈을 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 또한, 뉴클레오타이드에서의 변이가 단백질 자체에 변화를 가져올 수도 있다. 단백질의 아미노산에 변화를 가져오는 변이인 경우에도 본 개시의 단백질과 거의 동일한 활성을 나타내는 것이 얻어질 수 있다.

[71] 본 개시의 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오타이드가 가지는 특징, 예를 들어 면역 증강제로서의 효과를 갖는 범위에서, 본 개시의 펩타이드 및 핵산 분자는 서열 목록에 기재된 아미노산 서열 또는 염기 서열에 한정되지 않는다는 것은 통상의 기술자에게 명확하다. 예를 들어, 발현 조절 서열과 작동 가능하게 연결되는 코딩 영역 및/또는 이로부터 발현되는 재조합 단백질/펩타이드에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 전술한 코딩 영역 및/재조합 단백질과 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 염기 서열의 변이를 가지는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 아미노산 서열의 변이를 가지는 단백질/펩타이드일 수 있다.

[72] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 개시에 따른 펩타이드 및/또는 단백질을 암호화하는 핵산 분자는 서열 목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 개시의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 61%의 상동성, 예를 들어, 최소 70%의 상동성, 최소 80%의 상동성, 또는 최소 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[73] 본 명세서에서 사용된 용어 "벡터"는 숙주 세포에 전달이 가능하며, 예를 들어, 하나 이상의 목적 유전자 또는 서열의 발현이 가능하도록 만들어진 구조물을 의미한다. 또한, 특정 벡터는 벡터가 작동 가능하게 연결된 ORF 형태의 유전자의

발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터가 본 명세서에서 "재조합 발현 벡터" (또는 간단히, "재조합 벡터")로서 지칭된다.

[74] 본 명세서에서 용어 "발현 조절 서열(expression control/regulation sequence)" 또는 "발현 조절 요소(expression control/regulation element)"는 핵산의 전사(transcription) 및/또는 전사체 형태의 핵산으로부터 번역(translation)을 조절하는 핵산 서열을 의미할 수 있다. 한편, 용어 "전사 조절 서열(transcription control/regulation sequence)" 또는 "전사 조절 요소(transcription control/regulation element)"는 핵산의 전사를 조절하는 핵산 서열을 의미한다. 전사 조절 서열은 구조 프로모터(constitutive promoter) 또는 유도 프로모터(inducible promoter)와 같은 프로모터 또는 인핸서(enhancer) 등이 있다.

[75] 또한, 전사체 형태의 핵산으로부터 단백질 또는 펩타이드로의 번역을 조절하는 핵산 서열에 대해서 "번역 조절 서열(translation control/regulation sequence)" 또는 "번역 조절 요소(translation control/regulation element)"라는 용어가 사용될 수 있다. 이들 발현 조절 서열/요소, 전사 조절 서열/요소 및/또는 번역 조절 서열/요소는 발현될 서열, 예를 들어 전사 또는 번역될 핵산 서열에 작동적으로 연결(operatively linked)되어 있다.

[76] 본 명세서에서 용어 "작동 가능하게 연결된 (operatively linked)"은 핵산의 발현 조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 라이보솜 결합부위, 전사 종결서열 등)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.

[77] 핵산 분자

[78] 본 개시는 발현 조절 서열과 작동 가능하게 연결된 번역원성 표적 서열을 포함하는 핵산 분자가 번역원에 의한 번역 반응을 효율적으로 향상시켜 번역증강제로서 활용될 수 있다는 점에 근거한다. 도 1은 본 개시의 예시적인 실시형태에 따라, 번역증강제로 활용될 수 있는 핵산 분자의 구성을 개략적으로 나타낸 모식도이다.

[79] 도 1에 나타낸 바와 같이, 핵산 분자는 발현 조절 요소(expression control element, ECE)를 포함한다. 핵산 분자는 발현 조절 요소(ECE)와 작동 가능하게 연결되며 적어도 하나의 제한효소 인식 서열 또는 제한효소 절단 서열을 포함할 수 있다. 일례로, 핵산 분자는 다수의 제한효소 인식 서열 또는 제한효소 절단 서열을 포함하는 멀티플 클로닝 사이트(MCS)를 포함할 수 있다. 선택적으로, 핵산 분자는 발현 조절 요소(ECE)와 작동 가능하게 연결되는 코딩 영역(CR)을 포함할 수 있다. 일례로, 코딩 영역(CR)은 번역원성 및/또는 종양성 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 열린해독틀(ORF) 형태의 유전자를 포함할 수 있다.

[80] 발현 조절 요소(ECE)는 솔레놉시스 인빅타 바이러스(Solenopsis invicta virus, SINV)에서 유래한 내부리보솜결합부위(Internal Ribosomal Entry Site; IRES) 활성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 예를 들어, 발현 조절 요소는 솔레놉시스 인빅타 바이러스 1 (SINV-1)에서 유래한 내부리보솜결합 부위 활성

을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 일례로, 발현 조절 요소(ECE)는 멀티플 클로닝 사이트(MCS) 및/또는 코딩 영역(CR)과 작동 가능하게 연결되며, SINV, 예를 들어, SINV-1에서 유래한 IRES 활성을 갖는 번역 조절 요소(translation control element, TLCE)를 포함한다.

- [81] 일 측면에서, 발현 조절 요소(ECE)는 멀티 클로닝 사이트(MCS) 및/또는 코딩 영역(CR)과 작동 가능하게 연결되며, 번역 조절 요소(TLCE)의 상류에 위치하는 전사 조절 요소(transcription control element, TCCE)를 더욱 포함할 수 있다. 또한 핵산 분자는 발현 조절 요소(ECE)의 하류, 예를 들어 번역 조절 요소(TLCE)의 하류에 위치하는 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 폴리아데노신 서열 중에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드 서열(PA)을 더욱 포함할 수 있다.
- [82] 번역 조절 요소(TLCE)는 멀티플 클로닝 사이트(MCS) 및/또는 코딩 영역(CR)과 작동 가능하게 연결되는 SINV 유래의 IRES 활성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 번역 조절 요소(TLCE)는 멀티플 클로닝 사이트(MCS) 및/또는 코딩 영역(CR)의 상류에 위치하는 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE) 및/또는 멀티플 클로닝 사이트(MCS) 및/또는 코딩 영역(CR)의 하류에 위치하는 제 2 번역 조절 요소(D-TLCE)를 포함할 수 있다.
- [83] 일례로, 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)는 SINV 유래의 IRES 활성을 갖는 5'-비번역영역(5'Untranslated Region, 5'-UTR)의 전부 또는 일부일 수 있고, 제 2 번역 조절 요소(D-TLCE)는 SINV-1 유래의 3'-UTR의 전부 또는 일부일 수 있다. 선택적으로, 번역 조절 요소(TLCE)는 SINV의 Intergenic Region (IGR)의 IRES 활성을 가지는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 전사체 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)는 SINV의 IGR IRES 활성을 가지는 뉴클레오타이드 서열 중에서 상류 쪽 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 전사체 서열일 수 있다. 제 2 번역 조절 요소(D-TLCE)는 SINV의 IRES 활성을 가지는 뉴클레오타이드 서열 중에서 하류 쪽 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 전사체 서열일 수 있다. 일례로, 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)는 서열식별번호: 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 전사 서열을 포함할 수 있고, 제 2 번역 조절 요소(D-TLCE)는 서열식별번호: 2의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 전사 서열을 포함할 수 있으나, 본 개시가 시가 이에 한정되지 않는다.
- [84] 일례로, 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)는 코딩 영역(CR)으로부터 발현되는 펩타이드 및/또는 단백질의 번역 과정에서 번역개시복합체(translational initiation complex)가 결합하는 영역이며, IRES는 2차 및 3차 구조를 복잡하게 형성하여 목적 유전자의 번역을 유도하는 cis-acting 염기 서열이다.
- [85] IRES는 독특한 2차 구조(secondary structure) 또는 3차 구조(tertiary structure)를 가지고 있으며, 번역에 필요한 특별한 번역 인자의 필요 유무 및 번역 개시 코돈(codon)의 위치 등을 기준으로 Group 1 내지 Group 4로 구분될 수 있다. SINV-1에서 유래한 IRES는 Group 1에 속하는데, Group 1 IRES는 리보솜이 바로 결합하고 번역개시인자를 필요로 하지 않는다.

- [86] 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)가 SINV 유래의 IRES 활성을 갖는 뉴클레오타이드 서열의 전부 또는 일부인 경우, 예를 들어, 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)의 IGR IRES 활성을 가지는 뉴클레오타이드 서열 중에서 상류 쪽 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 경우, 핵산 분자는 선택적으로 멀티플 클로닝 사이트(MCS) 및/또는 코딩 영역(CR)을 구성하는 ORF 형태로 암호화된 목적 유전자의 발현 효율을 향상시키기 위하여 제 2 번역 조절 요소(D-TLCE)는 SINV의 IRES 활성을 가지는 뉴클레오타이드 서열 중에서 하류 쪽 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 전사체 서열을 포함할 수 있다.
- [87] 선택적인 실시형태에서, 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)가 SINV 유래의 IRES 활성을 갖는 5'-UTR의 전부 또는 일부인 경우, 핵산 분자는 SINV 유래의 3'-UTR의 전부 또는 일부일 수 있는 제 2 번역 조절 요소(D-TLCE)를 포함할 수 있다.
- [88] 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)과 제 2 번역 조절 요소(D-TLCE)는 멀티플 클로닝 사이트(MCS) 및/또는 코딩 영역(CR)에 위치하는 ORF 또는 이의 전사체(transcript)의 번역 효율을 향상시키고, 전사체인 mRNA가 세포 내에서 파괴되지 않고 안정적으로 유지되는데 중요한 역할을 한다.
- [89] 일례로, 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)는 멀티플 클로닝 사이트(MCS) 및/또는 코딩 영역(CR)의 상류에 위치할 수 있고, 제 2 번역 조절 요소(D-TLCE)는 멀티플 클로닝 사이트(MCS) 및/또는 코딩 영역(CR)의 하류에 위치할 수 있다. 다시 말하면, 멀티플 클로닝 사이트(MCS) 및/또는 코딩 영역(CR)은 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)와 제 2 번역 조절 요소(D-TLCE2) 사이에 위치할 수 있다.
- [90] 핵산 분자에 코딩 영역(CR)을 삽입하기 위하여 핵산 분자는 하나 이상의 클로닝 사이트, 예를 들어, 멀티플 클로닝 사이트(MCS)를 포함할 수 있다. 하나 이상의 클로닝 사이트는 하나 이상의 제한효소(restriction endonuclease) 인식 서열(recognition site) 및/또는 제한효소에 의해 절단되는 서열을 포함할 수 있다. 제한효소는 박테리아나 고세균 등에서 발견되는 자연적인 제한효소는 물론이고, 인위적으로 제조된 제한효소(예를 들어, Zinc finger nuclease이나 TAL effector의 DNA 결합 부위에 근거한 제한효소 또는 PNA-기반의 PNAzymes 등)를 포함할 수 있다.
- [91] 예를 들어, 자연적으로 일어나는 제한효소는 1) Type I 제한효소(인식 부위와 떨어지는 부위를 절단하고, ATP, S-adenoxyl-L-methionine 및 마그네슘 이온을 필요로 함), 2) Type II 제한효소(인식부위 내부 또는 인식부위에서 약간 떨어진 특정 부위를 절단하며, 대부분 마그네슘 이온을 필요로 함), 3) Type III 제한효소(인식 부위로에서 약간 떨어진 부위를 절단하며, ATP는 필요하지만, ATP의 가수분해는 필요 없음), 4) Type IV 제한효소(메틸화, 하이드록시메틸화 또는 글루코실-하이드록시메틸화 등 변형된 부위를 표적으로 함), 5) Type V 제한효소(CRISPRsdml cas9-gRNA complex) 등으로 구분될 수 있다.
- [92] 예를 들어, 멀티플 클로닝 사이트(MCS)는 아래의 제한효소에 의해 인식되는 부위 및/또는 제한효소 절단 부위를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

AngI, AatI, AbaI, BamHI, BbvI, BcgI, BpII, BsmAI, Alw26I, BsrI, ClaI, EarI, Eco57I, EcoRI, EcoRII, EcoRV, FokI, HaeIII, HindIII, HpaIII, HphI, KpnI, MboI, MluI, NaeI, NdeII, NgoMIV, NlaIII, NotI, PacI, PstI, SacI, SacII, SalI, SfaNI, SmaI, TaqI, XbaI, XhoI, PvuI 및 이들의 조합. 하나의 예시적인 측면에서, 멀티플 클로닝 사이트 (MCS)는 서열식별번호: 11 내지 서열식별번호: 20 중에서 적어도 하나인 제한효소 인식 부위 및/또는 제한효소 절단 부위를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [93] 코딩 영역(CR)은 후술하는 번역원을 암호화하는 ORF 형태의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 전사 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [94] 코딩 영역(CR)을 구성하는 ORF의 길이는 제한이 없으며, ORF의 길이에 따른 발현 효율은 본 개시에 따른 핵산 분자, 이를 이용한 발현 벡터 및 치료 또는 예방을 위한 핵산 백신 또는 번역증강제 등의 개발에서 큰 고려 대상이 아니다. Codon usage는 보통 다양한 종에서 단백질/펩타이드 발현에 영향을 미칠 수 있으나, 인간의 codon usage bias는 보통 단백질/펩타이드 발현에 큰 영향을 미치지 않는다고 알려져 있으므로, 인간을 대상으로 하는 핵산 백신이나 유전자 치료제를 개발할 때 고려 대상이 아니다.
- [95] 필요한 경우, 개시 코돈(initial codon)은 Kozak 서열을 가질 수 있으며, 종결 코돈 근처의 뉴클레오타이드 서열도 최적화할 필요가 있다. 필요한 경우, 코딩 영역(CR)에서 발현하고자 하는 유전자 또는 이의 전사체인 mRNA의 코돈 서열 중 세 번째 부분을 GC로 바꾸어 아미노산의 변화 없이 표적 유전자의 GC%를 증가시켜 mRNA의 안정성을 높일 수 있다.
- [96] 선택적인 실시형태에서, 핵산 분자는 ORF 형태로 삽입되는 코딩 영역(CR)의 발현 효율을 증가시킬 수 있는 뉴클레오타이드 서열이 더욱 삽입될 수 있다. 일례로, 핵산 분자는 번역 조절 요소(TLCE), 예를 들어 제 1 번역 조절 요소(UTLCE)에 인접하여 핵산 분자의 전사를 촉진하는 전사 조절 요소(TCCE)를 가질 수 있다. 일례로, 전사 조절 요소(TCCE)는 제 1 번역 조절 요소(TECS1)의 상류에 위치할 수 있다. 이러한 전사 조절 요소(TCCE)은 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [97] 예시적인 측면에서, 전사 조절 요소(TCCE)는 코딩 영역(CR)에 ORF 형태로 암호화된 사이토카인의 전사를 촉진하는 프로모터일 수 있다. 전사 조절 요소(TCCE)는 동물세포, 보다 구체적으로는 포유동물 세포에서 작동하여 코딩 영역(CR)에 암호화된 유전자 또는 이의 단편의 전사를 조절할 수 있다.
- [98] 일례로, 전사 조절 요소(TCCE)는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터, 또는 박테리오파지에서 유래한 프로모터를 포함한다. 예를 들어, 전사 조절 요소(TCCE)는 CMV(cytomegalovirus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, T7 박테리오파지 프로모터, T3 박테리오파지 프로모터, SM6 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의

프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, 암세포 특이적 프로모터(예컨대, TERT 프로모터, PSA 프로모터, PSMA 프로모터, CEA 프로모터, E2F 프로모터 및 AFP 프로모터) 및 조직 특이적 프로모터(예컨대, 알부민 프로모터)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [99] 예시적인 측면에서, T7 박테리오파지 프로모터, T3 박테리오파지 프로모터, SP6 박테리오파지 프로모터 등 선형화된 DNA 주형으로부터 mRNA를 전사할 수 있는 임의의 전사 조절 요소(TCCE)가 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)의 인근, 구체적으로 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)의 상류에 위치할 수 있다.
- [100] 그 외에도 핵산 분자는 전술한 번역 조절 요소(TLCE), 코딩 영역 (CR) 및 전사 조절 요소(TCCE) 이외에도 코딩 영역(CR)에 암호화된 유전자 또는 이의 전사 서열로 이루어진 ORF의 발현을 유도할 수 있는 뉴클레오타이드 서열이 삽입될 수 있다. 하나의 예시적인 실시형태에서, 핵산 분자는 전사 조절 요소(TCCE) 또는 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)와, 멀티플 클로닝 사이트(MCS) 및/또는 코딩 영역 (CR)의 개시 코돈 사이에 삽입되는 Kozak 서열을 포함할 수 있다.
- [101] 선택적으로, 코딩 영역(CR)의 하류, 보다 구체적으로는 제 2 번역 조절 요소(D-TLCE)의 하류에, 전사된 핵산 분자를 안정화시키면서, 코딩 영역(CR)에 존재하는 유전자 또는 이의 전사 서열로 이루어지는 ORF의 번역 효율을 더욱 향상시킬 수 있는 폴리아데닐레이션 신호 서열 및/또는 폴리아데노신 서열(PA)이 더욱 삽입될 수 있다.
- [102] 예를 들어, 본 개시의 핵산 분자가 RNA 형태의 전사 서열로 이루어지는 경우, 폴리아데노신 서열(PA)은 대략 25개 내지 대략 400개, 예를 들어, 30개 내지 400개, 50 내지 250개 또는 60 내지 250개의 아데노신으로 이루어진 핵산 서열일 수 있다.
- [103] 다른 예시적인 측면에서, 본 개시의 핵산 분자가 DNA 형태인 경우, 폴리아데닐레이션 신호 서열(PA)이 멀티플 클로닝 사이트(MCS) 및/또는 코딩 영역(CR)의 하류에 위치할 수 있다. 일례로, 폴리아데닐레이션 신호 서열(PA)은 SV40, 인간 성장호르몬(human growth factor, hGH), 소 성장 호르몬 (Bovine Growth hormone, BGH) 또는 토끼 베타-글로빈 (rabbit beta-globine, rbGlob) 등에서 유래한 것을 사용할 수 있지만, 본 개시가 이에 한정되지 않는다.
- [104] 선택적으로, 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 폴리아데노신 서열(PA)은 다수의 아데노신, 예를 들어, 25개 내지 대략 400개, 예를 들어, 30개 내지 400개, 50 내지 250개, 또는 60 내지 250개의 아데노신 또는 이의 전사체 서열로 이루어진 2개의 뉴클레오타이드 사이에 5'- GATCATCAGT - 3'과 같은 신호 서열이 삽입된 서열로 이루어질 수도 있다.
- [105] 핵산 분자는 DNA 핵산 분자 또는 RNA 핵산 분자일 수 있다. 예시적인 실시형태에 따르면, 본 개시에 따른 핵산 분자는 RNA 형태를 가질 수 있다. 핵산 분자가 RNA 형태로 이루어지는 경우, DNA 형태의 핵산 분자에 비하여 유리하다.

- [106] DNA 형태의 핵산 분자와 달리, RNA 형태의 핵산 분자는 mRNA로의 전사를 위해서 숙주 세포의 핵 안으로 진입할 필요가 없다. RNA 형태의 핵산 분자는 핵 내에서 숙주의 염색체 내로 끼어들어갈 가능성이 없으며, 숙주 세포에서 선별 생산하기 위해 사용하는 선별 마커인 항생제 저항 유전자가 RNA 핵산 분자의 제작에 불필요하고, RNA는 DNA에 비하여 반감기가 짧기 때문에 장기 유전자 변형(persistence genetic transformation)을 유도하지 않는다.
- [107] RNA 형태의 핵산 분자는 상대적으로 DNA 형태의 핵산 분자에 비하여 적은 양을 사용하더라도 원하는 생체내 면역 반응을 유도할 수 있다. 또한, RNA 형태의 핵산 분자를 제작할 때, 모든 제작 공정을 인공적으로 제어할 수 있기 때문에, 생물학적 오염에 대한 위험 없이 소규모 GMP(good manufacturing practice) 생산 시설에서 안전하게 생산할 수 있다. RNA 핵산 분자를 생산할 때 감염원을 직접 다룰 필요가 없으며, 대신 발현하고자 하는 감염원의 중화항체 유도 관련 부분(중화 epitope)의 핵산 서열만을 인공적으로 합성하고, 시험관내 전사(*in vitro* transcription, IVT)만으로 대량의 RNA 핵산 분자를 생산할 수 있다. 최근에는 IVT 반응과 관련된 시약, 특히 DNA-의존성 RNA 중합효소가 개선되어 소량의 DNA 주형(template)을 이용하여 대량의 RNA를 1~2주 안에 신속하게 생산할 수 있다.
- [108] RNA 형태의 핵산 분자는 naked DNA 핵산 분자에 비하여 더욱 강한 면역 반응을 유도할 수 있고, RNA 핵산 분자 자체가 세포 내에서 복잡한 항원 복합체(complex antigen)를 생산하고 이것이 항원 제시 세포의 MHC(major histocompatibility complex; 구조적 적합성 복합체) class II에 접근하여 이상적인 면역증강제로 기능할 수 있다. 또한, 면역 반응을 유도하고자 하는 다수의 항원을 동시에 제작하여 혼합한 후 면역할 수 있으며, 발현하고자 하는 항원의 유전자 길이에 특별한 제약이 없어 RNA 핵산 분자 제작의 응용성 및 간편성이 증가할 수 있다.
- [109] RNA 형태일 수 있는 핵산 분자를 활용하고자 하는 경우, 제 1 번역 조절 요소(U-TLCE)의 상류에 IVT를 가능하게 하는 적절한 전사 조절 요소(TCCE)가 위치할 수 있다. RNA 형태의 핵산 분자는 IVT 과정을 통해서 합성될 수 있기 때문에, 일반적인 생백신이나 사백신 제조에 사용되는 살아 있는 바이러스나 병원성 미생물을 직접 다룰 필요가 없으며, 제조합 단백질/펩타이드를 생산하기 위하여 반드시 사용해야 하는 효모, 대장균, 곤충 세포와 같은 숙주 세포의 배양 등이 불필요하다.
- [110] 벡터에 삽입된 DNA 형태의 핵산 분자를 IVT 과정을 통해 mRNA 형태로 전사할 때, 제한효소 등으로 말단이 전달되어 선형화된 DNA를 주형으로 이용하여 RNA 중합효소(RNA polymerase)에 의해 RNA 형태의 핵산 분자를 시험관에서 합성할 수 있다. 선형화된 DNA로부터 RNA로의 전사를 위해서 예를 들어 박테리오파지 등에서 유래한 프로모터 서열과 같은 전사 조절 요소(TCCE)가 번역 조절 요소(TLCE)의 상류에 위치할 수 있다.
- [111] 발현 컨스트럭트 및 핵산 분자 주입

- [112] 핵산 분자는 자체적으로 생체 내에 주입되거나, 선택적으로 핵산 분자는 벡터 내에 삽입되어, 유전자 전달체인 발현 컨스트럭트(expression construct) 또는 벡터 형태로 생체 내에 주입될 수 있다.
- [113] 유전자 전달체로 사용될 수 있는 벡터는 다양한 형태로 제작될 수 있으며, 바이러스 벡터(viral vectors), DNA 또는 RNA 발현 벡터(expression vectors), 플라스미드(plasmid), 코스미드(cosmid) 또는 파지벡터(phage vectors), CCA(cationic condensing agents)와 연결된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 예를 들어, 플라스미드를 내포하는 리포솜(liposomes) 또는 니오솜으로 포장된 포장된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 프로듀서 세포(producer cells)와 같은 특정 진핵세포(eukaryotic cells) 등이 포함된다.
- [114] 예시적으로, 본 개시의 핵산 분자는 포유동물 세포 내로 들어가서 발현되도록 구성되어 있다. 이러한 조성은 질병의 치료 및/또는 예방 목적에 사용하는 데에 특히 유용할 수 있다. 핵산 분자를 숙주 세포 내에서 발현시키는 데에는 많은 방법이 있으며 적절한 어느 방법도 사용 가능하다. 예를 들어, 본 개시에 따른 핵산 분자는 임의의 발현 컨스트럭트 또는 유전자 전달 시스템에 적용될 수 있다.
- [115] 벡터의 한 유형은 벡터의 한 유형은 추가의 DNA 절편이 그 내부에 라이게이션될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 또 다른 유형의 벡터는 파지 벡터이다. 또 다른 유형의 벡터는 추가의 DNA 절편이 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있는 바이러스 벡터이다. 한 특정 벡터는 그것도 도입된 숙주 세포 내에서 자율 복제가 가능하다 (예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입 시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주의 게놈과 함께 복제된다. 또 일반적으로, 제조할 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태로 존재한다.
- [116] 일례로, 핵산 분자는 바이러스 유전자 전달 시스템을 이용하여 숙주 세포로 삽입될 수 있다. 핵산 분자가 삽입될 수 있는 바이러스 벡터는 아데노바이러스(adenovirus), 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus, AAV), 레트로바이러스(retrovirus), 백신시아 (vaccinia) 또는 다른 폭스 바이러스 (e.g., avian pox virus), 렌티바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 유래의 벡터를 포함할 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터는 인간면역결핍바이러스(HIV), 원숭이면역결핍바이러스(SIV)와 같은 렌티바이러스 유래의 벡터; 설치류 레트로바이러스(murine reteroviruses), 기본 백혈병 바이러스 (gibbon ape leukemia virus), AAVs (adenovirus-associated viruses) 및 아데노바이러스 (adenoviruses) 등에서 유래된 레트로 바이러스 벡터가 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 그 외에도, 설치류 백혈병 바이러스 (murine leukemia virus, MuLV), 기본 백혈병 바이러스 (gibbon ape leukemia virus, GaLV), 에코트로픽 레트로바이러스 (ecotropic retroviruses) 등에서 유래된 레트로 바이러스 벡터들이 널리 사용되고 있다. 본 개시에 따른 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

- [117] 필요한 경우, 전술한 핵산 분자를 적절한 벡터에 삽입한 뒤에 시험관내 전사(*in vitro* transcription, IVT)를 통하여 RNA 형태의 핵산 분자로 변형될 수 있다.
- [118] 핵산 분자, 예컨대 DNA를 이러한 벡터에 삽입시키는 기술에 관해서는 이미 잘 알려져 있다. 레트로 바이러스 벡터에는 형질도입된 세포들의 확인 또는 선택을 쉽게 해 주는 선택 마커(selectable marker)에 대한 유전자 및/또는 특정한 타겟 세포에 대한 수용체 역할을 하는 리간드(ligand)를 암호화하는 유전자와 같은 표적 부위(targeting moiety)를 부가적으로 삽입시킬 수 있다. 표적은 또한 항체를 이용한 공지의 방법에 의해서도 이루어질 수 있다.
- [119] 입수 가능하고 당업계에 공지된 다수의 벡터를 본 개시의 목적에 사용할 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터에 삽입되는 핵산 분자의 크기 및 벡터로 형질전환되는 특정한 숙주 세포에 따라 달라질 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능(이중 폴리뉴클레오타이드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 다) 및 벡터가 존재하는 특정한 숙주 세포와의 상용성에 따라 다양한 성분을 함유한다. 벡터 성분은 일반적으로 복제 기점(특히 벡터가 원핵세포에 삽입되는 경우), 선별 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위(RBS), 신호 서열, 이중 핵산 삽입물 및/또는 전사 종결 서열을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [120] 예를 들어, 본 개시에 따른 발현 벡터는 코딩 영역(CR) 내에 암호화된 ORF 형태의 유전자 또는 이의 전사 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있는 발현 조절 서열, 예를 들어, 개시 코돈, 종결 코돈, 인핸서, 막 표적화 또는 분비를 위한 신호서열 등을 포함할 수 있다. 인핸서 서열은 프로모터에서 다양한 부위에 위치하여 인핸서 서열이 없을 때의 프로모터에 의한 전사 활성과 비교하여, 전사 활성을 증가시키는 핵산 염기서열이다.
- [121] 숙주가 에스케리키아(*Escherichia*) 속 균인 경우에는 신호 서열은 PhoA 신호서열, OmpA 신호서열 등이, 숙주가 바실러스(*Bacillus*)속 균인 경우에는 α -아밀라아제 신호서열, 서브틸리신 신호서열 등을 이용할 수 있다. 숙주가 효모인 경우에는 신호 서열은 MF- α 신호서열, SUC2 신호서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 신호서열, α -인터페론 신호서열, 항체 분자 신호서열 등을 이용할 수 있으나
- [122] 예를 들어, 본 개시의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 개시의 벡터는 원핵세포 또는 진핵세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 개시에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHc79, pUC19, pET 등), 파지(예: λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1, λ GEM.TM.-11 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [123] 구성적 또는 유도성 프로모터는 당업자에 의해 확인될 수 있는 특정한 상황의 필요에 따라 본 개시에 사용될 수 있다. 다양한 가능한 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터가 널리 공지되어 있다. 선택된 프로모터는 제한 효소 소화를 통해 공급원 핵산 분자로부터 프로모터를 제거하고 단리된 프로모터 서열을 선

택 벡터 내로 삽입함으로써, 면역원성 펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 유전자 또는 전사체의 ORF로 이루어진 코딩 영역(CR)을 가지는 핵산 분자에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열 및 다수의 이중 프로모터를 둘 다 사용하여 코딩 영역(CR)을 구성하는 유전자 또는 전사체의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 이중 프로모터는 일반적으로 천연 프로모터와 비교하여 발현된 관심유전자의 보다 큰 전사 및 보다 높은 수율을 허용한다.

- [124] 예를 들어, 본 개시의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 번역을 개시하기 위한 IRES를 가지는 발현 조절 서열 (ECS) 및 전사/번역 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 E. coli가 이용되는 경우, E. coli 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 파지 λ 의 좌향 프로모터 (pL λ 프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.
- [125] 한편, 본 개시의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터) 또는 박테리오파지에서 유래한 프로모터(예: T7 프로모터, T3 프로모터, SM6 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리 아데닐레이션 신호 서열 및/또는 폴리아데노신 서열(PA)을 일반적으로 갖는다.
- [126] 또한, 본 개시의 재조합 벡터가 복제 가능한 발현 벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제원점(replication origin)을 포함할 수 있다. 또한, 재조합 벡터는 선별 마커(selection marker)를 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 본 개시의 벡터는 선별 표지로서, 해당 기술분야에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다. 선별제(selective agent)로 처리된 환경에서 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질전환된 세포를 선별할 수 있다. 선별 마커의 대표적인 예로써, 영양 요구 마커(auxotrophic marker)인 ura4, leu1, his3 등을 들 수 있으나, 상기 예에 의해 본 개시에서 사용될 수 있는 선별 마커의 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [127] 발현 벡터에 서브클론된 서열을 증폭시키는 여러 가지 시험관내 증폭 기법들(*in vitro* amplification techniques)이 알려져 있다. 이러한 기법에는 PCR (polymerase chain reaction), LCR(ligase chain reaction), Q β -복제효소 증폭 (replicase amplification) 및 다른 RNA 중합효소를 이용한 기법들이 있다

- [128] 본 개시의 벡터는 그로부터 발현되는 재조합 단백질 또는 펩타이드의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질 (NEB, USA), FLAG (IBI, USA) 및 6 x His (hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다. 상기 정제를 위한 추가적인 서열 때문에, 숙주에서 발현된 단백질은 친화성 크로마토그래피를 통하여 신속하고, 용이하게 정제된다. 필요한 경우에 이들 재조합 단백질의 세포외 분비를 촉진할 수 있도록 Fc 절편을 암호화하는 서열이 융합될 수도 있다.
- [129] 본 개시의 예시적인 실시형태에 따르면, 상기 융합 서열이 포함되어 있는 벡터에 의해 발현된 융합 단백질은 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된다. 예컨대, 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, 6 x His이 이용된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 컬럼 (Novagen, USA)을 이용하여 소망하는 재조합 단백질을 신속하고 용이하게 얻을 수 있다.
- [130] 전술한 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다. 또한, 본 개시의 벡터를 진핵세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 이스트 (*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포(예컨대 SF9 세포) 및 사람 세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 등이 이용될 수 있다.
- [131] 본 개시의 벡터는 세포를 세포내외 (*in vivo*, *ex vivo*) 또는 시험관 내 (*in vitro*)에서 유전적으로 변형시키는데 이용될 수 있다. 세포를 유전적으로 변형시키는 방법으로는 세포를 바이러스 벡터로 감염 또는 형질도입시키는 방법, 인산칼슘 침전법(calcium phosphate precipitation), 수용체 세포 (recipient cells)를 DNA를 포함하는 세균 프로토플라스트 (bacterial protoplasts)와 융합시키는 방법, 수용체 세포에 DNA를 포함하고 있는 리포솜 (liposome) 또는 미세소구 (microspheres)를 처리하는 방법, 엔도사이토시스 (DEAE dextran, receptor-mediated endocytosis), 일렉트로포레이션 (electroporation), 마이크로 인젝션 (micro-injection) 등을 포함한 여러 가지 방법이 알려져 있다.
- [132] 예를 들어 숙주 세포가 원핵세포인 경우, CaCl_2 방법, 하나한 방법 및/또는 전기 천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및/또는 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다. 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 재조합 단백질 또는 재조합 펩타이드를 얻게 된다.

다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 lac 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.

[133] 한편, 본 개시의 핵산 분자는 전술한 구성 이외에도, 목적하는 유전자 또는 이의 전사 서열이 안정적이고 효율적으로 발현될 수 있는 다른 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 도 2는 본 개시의 다른 예시적인 실시형태에 따른 핵산 분자의 구성을 개략적으로 도시한 모식도이다.

[134] 도 1에 나타낸 핵산 분자와 비교하면, 도 2에 예시된 핵산 분자는 발현 조절 요소(ECE), 구체적으로 제 2 번역 조절 요소(D-TLCE)의 하류에 제 1 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 제 1 폴리아데노신 서열(PA1)과, 링커(linker)를 경유하여 제 1 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 제 1 폴리아데노신 서열(PA1)의 하류에 위치하는 제 2 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 제 2 폴리아데노신 서열(PA)을 포함한다. 선택적으로, 핵산 분자는 제 2 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 제 2 폴리아데노신 서열(PA2)의 하류에 위치하는 G-Quadruplex 서열을 더욱 포함할 수 있다.

[135] 제 1 및 제 2 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 제 1 및 제 2 폴리아데노신 서열(PA1, PA2)은 각각 도 1에서 설명한 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 폴리아데노신 서열(PA)과 동일한 구성을 가질 수 있다. 제 1 및 제 2 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 제 1 및 제 2 폴리아데노신 서열(PA1, PA2) 사이에 위치하는 링커는 대략 3개 내지 20개인 임의의 뉴클레오타이드로 이루어질 수 있다.

[136] G-Quadruplex 서열은 하기 식 1의 염기 서열 또는 이의 전사 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[137] [식 1]

[138] $5'-G_mX_nG_pX_qG_rX_sG_t-3'$

[139] 식 1에서, G는 구아닌을 나타내고, X는 아데닌, 사이토신, 구아닌 및 티민 중 어느 하나임; m, p, r 및 t는 각각 독립적으로 1 내지 10의 정수임; n, q 및 s는 각각 독립적으로 0 내지 10의 정수임.

[140] 예시적인 측면에 따르면, 식 1에서 m, p, r 및 t는 각각 독립적으로 2 내지 5의 정수, 예를 들어 3 내지 5의 정수이고, n, q 및 s는 각각 독립적으로 1 내지 7의 정수일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 식 1의 염기 서열을 갖는 G-Quadruplex 서열은 *candida*속 효모의 telomeric repeat 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[141] 백신 조성물

[142] 다른 측면에 따르면, 본 개시는 면역증강제로서 약학적 유효량의 전술한 핵산 분자 또는 전술한 핵산 분자를 포함하는 유전자 전달체를 포함하는 백신 조성물과 같은 면역 활성 증진용 조성물에 관한 것이다. 또 다른 측면에 따르면, 본 개시는 면역증강제로서 약학적 유효량의 전술한 핵산 분자 또는 전술한 핵산 분자를 포함하는 유전자 전달체와, 약학적으로 허용되는 담체(carrier)를 포함하고, 선택적으로 약학적으로 활성인 물질을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다. 본 명세

서에서 "약학적 유효량"이란, 본 개시에 따른 핵산 분자의 효능 또는 활성을 달성하는데 충분한 양을 의미한다.

- [143] 일례로, 전술한 핵산 분자는 직접적으로 피대상체에 투여되거나 또는 유전자 전달체의 형태로 투여될 수 있다. 또 다른 측면에 따르면 본 개시는 약학적 유효량의 전술한 핵산 분자를 피대상체에게 투여하는 단계를 포함하여, 피대상체의 생체 내에서 면역 활성을 증진시키는 방법에 관한 것이다.
- [144] 하나의 예시적인 측면에서, 백신 조성물은 핵산 안정화제를 포함할 수 있다. 일례로, 전술한 핵산 분자는 양이온성 폴리머, 양이온성 펩타이드 또는 양이온성 선 폴리펩타이드를 이용하여 백신 조성물 중에 안정화될 수 있다. 안정화제로 사용될 수 있는 양이온성 (폴리)펩타이드는 폴리라이신 또는 폴리아르기닌과 같은 다중 양이온성 폴리머, 양이온성 지질 또는 리포펙턴트 (lipofectant)일 수 있다. 보다 구체적으로, 안정화제는 히스톤, 뉴클레오린, 프로타민, 올리고펙타민, 스페르민 또는 스페르미딘 및 양이온성 다당류, 특히 키토산, TDM, MDP, 뮤라밀 디펩타이드, 플루로닉 및/또는 이들의 유도체일 수 있다. 히스톤 및 프로타민은 DNA를 천연적으로 컴팩트하게 하는 양이온성 단백질이다. 본 개시에 따라 면역증강제로 사용되는 핵산 분자와 함께 복합체를 형성할 수 있는 히스톤은 히스톤 H1, H2a, H3 및 H4를 포함하며, 프로타민은 프로타민 P1 또는 P2, 특히 프로타민의 양이온성 부분 서열일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [145] 필요한 경우, 백신 조성물은 다른 화합물을 더욱 포함할 수 있다. 본 개시에 따른 핵산 분자와 함께 복합체를 형성할 수 있는 다른 화합물은 추가적으로 사용되는 다른 면역증강제일 수 있다. 추가적인 면역증강제는 약학적으로 활성인 물질 및/또는 면역증강제로서 사용된 핵산 분자의 면역학적 활성을 강화시킨다.
- [146] 일례로, 백신 조성물 중에 포함되는 다른 면역증강제는 프로타민, 뉴클레오린, 스페르민, 스페르미딘 및 양이온성 다당류와, 안정화 양이온성 펩타이드 또는 폴리펩타이드, 특히 키토산, TDM, MDP, 뮤라밀 디펩타이드, 플루로닉, 백반 (alum) 용액, 알루미늄 히드록시드, ADJUMER (폴리포스파젠); 알루미늄 포스페이트 겔; 조류 (algae)의 글루칸; 알가물린 (algammulin); 알루미늄 히드록시드 겔 (백반(alum)); 높은 단백질-흡착성 알루미늄 히드록시드 겔; 낮은 점성의 알루미늄 히드록시드 겔; AF 또는 SPT (스쿠알란(5%)의 에멀전, Tween-80(0.2%), PLURONIC-L121(1.25%), 포스페이트-완충 식염수, pH 7.4); AVRIDINE (프로판디아민); BAY R1005 ((N-(2-데옥시-2-L-류실아미노-b-D-글루코피라노실)-N-옥타데실도데카노일-아미드 히드로아세테이트); CALCITRIOL (1 α ,25-디히드록시-비타민 D3); 칼슘 포스페이트 겔; CAPTM (칼슘 포스페이트 나노입자); 콜레라홀로톡신, 콜레라-독소-A1-단백질-A-D-절편 융합 단백질, 콜레라 독소의 서브 유닛 B; CRL 1005 (블록 코폴리머 P1205); 사이토카인-포함 리포솜; DDA (디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드); DHEA (디히드로에피안드로스테론); DMPC (디미리스토일 포스파티딜콜린); DMPG (디미리스토일 포스파티딜글리세롤); DOC/백반 (alum) 복합체 (데옥시콜린산 소듐염); Freund 완전 애주번트; Freund 불완

전 애주번트; 감마 이눌린; Gerbu 애주번트(N-아세틸글루코사미닐-(P1-4)-N-아세틸뮤라밀-L-알라닐-D-글루타민(GMDP), 디메틸디옥타데실암모늄 클로라이드(DDA), 징크-L-프롤린염 복합체 (ZnPro-8)의 혼합물; GM-CSF); GMDP (N-아세틸글루코사미닐-(b1-4)-N-아세틸뮤라밀-L-알라닐-D-이소글루타민); 마퀴모드 (1-(2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민); (N-아세틸글루코사미닐-N-아세틸뮤라밀-L-Ala-D-이소Glu-L-Ala-글리세롤디팔미테이트); DRV(탈수-재수화 (re-hydration)비히클 (vesicle)로부터 제조된 면역리포솜); 인터페론-감마; 인터류킨-1베타; 인터류킨-2; 인터류킨-7; 인터류킨-12; ISCOMS("면역증강 복합체 (Immunostimulating Complexes)"); ISCOPREP 7.0.3.; 리포솜; LOXORIBINE (7-알릴-8-옥소구아노신(구아닌)); LT 경구 애주번트 (*E.coli* 라이어블(labile) 엔테로톡신-프로톡신); 마이크로스피어 및 마이크로입자; MF59; (스쿠알렌-물의 에멀전); MONTANIDE ISA 51 (정제된 불완전 Freund 애주번트); MONTANIDE ISA 720 (대사작용이 가능한 오일 애주번트); MPL (3-Q-데사실(desacyl)-4'-모노포스포릴 지질 A); MTP-PE 및 MTP-PE 리포솜 ((N-아세틸-L-알라닐-D-이소글루타민-L-알라닌-2-(1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-(히드록시포스포릴옥시))-에틸아미드, 모노소듐염); MURAMETIDE (Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-OCH₃); MURA PALMITINE 및 D-MURAPALMITINE (Nac-Mur-L-Thr-D-이소Gln-sn-글리세롤디팔미토일); NAGO (뉴라미니다아제-갈락토오스 옥시다아제); 나노스피어 또는 나노 입자; NISV (비이온성 계면활성제 비히클(vesicle)); PLEURAN (베타-글루칸); PLGA, PGA 및 PLA (젖산과 글리콜산의 호모폴리머 및 코폴리머; 마이크로스피어/나노스피어); PLURONIC L121; PMMA (폴리메틸 메타크릴레이트); PODDS (프로테노이드 마이크로스피어); 폴리에틸렌 카바메이트 유도체; 폴리-rA: 폴리-rU (폴리아데닐산-폴리우리딜산 복합체); 폴리소르베이트 80 (Tween 80); 단백질 코크리트 (cochleate)(Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL); STIMULON (QS-21); Quil-A (Quil-A 사포닌); S-28463 (4-아미노-otec-디메틸-2-에톡시메틸-1H-이미다조[4,5-c]-퀴놀린-1-에탄올); SAF-1 ("신텍스 애주번트(adjuvant) 제제"); 센다이 (Sendai) 프로테오리포솜 및 센다이 (Sendai)-함유 지질 매트릭스; Span-85 (소르비탄 트리올레이트); Specol (Marcol 52, Span 85 및 Tween 85의 에멀전); 스쿠알렌 또는 Robane (2,6,10,15,19,23-헥사메틸테트라코산 및 2,6,10,15,19,23-헥사메틸-2,6,10,14,18,22-테트라코사헥산); 스테아릴티로신 (옥타데실티로신 히드로클로라이드); Theramid (N-아세틸글루코사미닐-N-아세틸뮤라밀-L-Ala-D-이소Glu-L-Ala-디팔미톡시프로필아미드); 트레오닐-MDP (Termurtide 또는 [thr-1]-MDP; N-아세틸뮤라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민); Ty 입자 (Ty-VLP 또는 바이러스-유사 입자); Walter-Reed 리포솜 (수산화 알루미늄에 흡착된 지질 A를 포함하는 리포솜), 및 이와 유사한 것 등을 포함한다.

- [147] 일례로, 백신 조성물에 포함될 수 있는 다른 면역증강제는 alum(Th₂ 면역 반응을 유도하여 체액성 면역 반응 강화); MF59, AS03, AS04 (TLR-4 agonist인 MPL과 alum 혼합, GSK), AddaVax (스쿠알렌 기반; InvivoGen)과 같은 oil-in-water

에멀션형 면역증강제(항원성 면역 반응 강화하고, Th₁ 면역 반응을 균형 있게 유도); Toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors (RLRs), NOD-like receptors (NLRs)와 같은 pattern recognition receptors (PRRs) 등의 agonist인 LPS (지방다당류), Poly:C, imidazoquinolines (imiquinod나 R848), CpG oligonucleotides 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [148] 필요한 경우, 백신 조성물은 지속-방출 제제를 제조할 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 핵산 분자 또는 유전자 전달체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속-방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 하이드로겔 (예를 들어, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드, L-글루탐산 및 감마-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산을 포함한다.
- [149] 선택적인 측면에서, 백신 조성물은 유효 성분으로 사용되는 핵산 분자를 보호하고, 생체 주입 활성을 향상시킬 수 있는 지질나노입자(lipid nano particle, LNP)를 포함할 수 있다. 지질나노입자는 서로 물리적으로 회합된 다수의 지질 분자를 포함하는데, 마이크로스피어(단일층 및 다중층 소포, 예컨대 리포솜을 포함), 에멀션에 분산된 상, 미셀, 또는 현탁액의 내부 상을 포함한다. 지질나노입자는 전달을 위해 본 개시의 핵산 분자 또는 핵산 분자로부터 발현된 펩타이드(단백질)을 캡슐화하기 위해 사용될 수 있다.
- [150] 양이온성 지질을 함유한 제제는 핵산 분자와 같은 다가음이온을 전달하는 데 유용하다. 포함될 수 있는 다른 지질은 중성 지질(즉, 하전되지 않은 또는 양성이온성 지질), 음이온성 지질, 트랜스펙션을 증강시키는 헬퍼 지질, 및 나노입자가 생체 내에서 존재할 수 있는 시간의 길이를 증가시키는 스텔스 지질 (stealth lipid)이다. 적합한 양이온성 지질, 중성 지질, 음이온성 지질, 헬퍼 지질, 및 스텔스 지질의 예는, 본 명세서에 참조로 병합된 WO 2016/010840 A1에 개시되어 있다.
- [151] 예를 들어, 캡슐화를 위한 지질은 양이온성 지질, 생분해성 지질일 수 있다. 일례로, 이러한 지질은 (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-(((3-(다이메틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필옥타데카-9,12-다이에노에이트, ((5-((다이메틸아미노)메틸)-1,3-페닐렌)비스(옥시))비스(옥탄-8,1-다이일)비스(데카노에이트), 2-((4-(((3-(다이메틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)헥사데카노일)옥시)프로판-1,3-다이일(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-비스(옥타데카-9,12-다이에노에이트), 3-(((3-(다이메틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)-13-(옥타노일옥시)트라이데실 3-옥틸운데카노에이트, 헵타트라이아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(다이메틸아미노)부타노에이트(Dlin-MC3-DMA (MC3)으로도 알려져 있음)를 들 수 있다.
- [152] 적합한 중성 지질은 중성, 비전하 또는 양성이온성 지질을 포함할 수 있다. 중성 인지질은 5-헵타데실벤젠-1,3-다이올(레조르시놀), 다이팔미토일포스파티딜

콜린(DPPC), 다이스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 포스포콜린(DOPC), 다이미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 포스파티딜콜린(PLPC), 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DAPC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 난포스파티딜콜린(EPC), 다이라우로일포스파티딜콜린(DLPC), 다이미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 1-미리스토일-2-팔미토일 포스파티딜콜린(MPPC), 1-팔미토일-2-미리스토일포스파티딜콜린(PMPC), 1-팔미토일-2-스테아로일포스파티딜콜린(PSPC), 1,2-다이아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DBPC), 1-스테아로일-2-팔미토일 포스파티딜콜린(SPPC), 1,2-다이에이코세노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DEPC), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린(POPC), 리소포스파티딜콜린, 다이올레오일 포스파티딜에탄올아민 (DOPE) 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [153] 헬퍼 지질은 트랜스펙션을 증강시키고/거나, 막 융합생성성(fusogenicity)을 증강시킬 수 있다. 헬퍼 지질은 스테로이드, 스테롤, 및 알킬 레조르시놀을 포함한다. 구체적으로, 헬퍼 지질은 콜레스테롤, 5-헵타데실 레조르시놀, 및 콜레스테롤 헤미석시네이트를 포함할 수 있다.
- [154] 스텔스 지질은 입자 응집을 감소시키고 입자 크기를 제어함으로써 제제화 과정을 보조하거나, LNP의 약동학적 특성을 조절할 수 있다. 일례로, 스텔스 지질은 PEG(폴리에틸렌글리콜 또는 폴리에틸렌 옥사이드), 폴리(옥사졸린), 폴리(비닐 알코올), 폴리(글리세롤), 폴리(N-비닐피롤리돈), 폴리아미노산, 및 폴리 N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아미드와 같은 친수성 헤드를 가지는 중합체를 포함할 수 있다. 구체적으로, 스텔스 지질은 PEG-다이라우로일글리세롤, PEG-다이미리스토일글리세롤(PEG-DMG), PEG-다이팔미토일글리세롤, PEG-다이스테아로일글리세롤(PEG-DSPE), PEG-다이라우릴글리카미드, PEG-다이미리스틸글리카미드, PEG-다이팔미토일글리카미드, PEG-다이스테아로일글리카미드, PEG-콜레스테롤(1-[8'-(콜레스트-5-엔3[베타]-옥시)카르복사미도-3',6'-다이옥사옥타닐]카바모일-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌글리콜), PEG-DMB(3,4-다이에트라데코실벤질-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌글리콜)에테르) 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [155] 면역증강제로서 사용될 수 있는 본 개시의 핵산 분자는 비-항원 특이적인 면역 반응을 유발할 수 있다. 면역 반응과 관련하여 T-림포사이트는 T-헬퍼 1(Th₁) 세포 및 T-헬퍼 2(Th₂) 세포로 분화되며, 면역 체계는 세포내 (Th1) 및 세포외 (Th2) 병원균 (예를 들면 항원)을 파괴할 수 있다. Th₁ 세포는 대식세포 및 세포독성 T-세포의 활성화에 의해 세포성 면역 반응을 돕는다. 한편, Th₂ 세포는, 원형질 세포로의 전환을 위한 B-세포의 증강 및 항체 (예를 들면 항원에 대항하는)의 형성에 의해 체액성 면역 반응을 촉진한다.
- [156] Th₁/Th₂ 비율은 면역 반응에서 매우 중요한데, 본 개시의 핵산 분자는 Th₁ 면역 반응, 즉 세포 매개성 면역 반응을 강화, 유도한다. 따라서 본 개시에 따른 핵산

분자가 약학적으로 활성인 물질, 예를 들어 면역 증강 성분과 함께 생체에 투여 되면, 본 개시의 핵산 분자는 약학적으로 활성인 물질에 의해 유발된 특정한 면역 반응을 강화하는 면역증강제로서의 역할을 수행할 수 있다.

[157] 하나의 예시적인 측면에서, 백신 조성물은 면역증강제로서의 전술한 핵산 분자 이외에 약학적으로 활성인 물질을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 약학적으로 활성인 물질은 면역원과 같은 면역 증강 성분이다. 일례로, 약학적으로 활성인 물질은 암, 전염병, 자가면역 질환 또는 알레르기에 대한 치료 및/또는 예방 효과를 가지는 화합물일 수 있다. 예를 들어, 약학적으로 활성인 물질은 펩타이드, 단백질, 핵산, 치료적으로 활성 있는 저분자량의 유기 또는 무기 화합물, 당, 항원 또는 항체, 당업계에서 공지된 치료제, 항원 세포, 항원 세포의 절편, 세포 조각, 화학적 또는 광선 조사에 의하여 변형된 (예를 들어 약독화되거나 비활성화된) 병원균 (바이러스 또는 박테리아 등)을 포함한다.

[158] 일례로, 약학적으로 활성인 물질의 하나인 항원은 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 세포, 세포 추출물, 다당류, 복합 다당류, 지질, 글리코리피드 및 탄수화물일 수 있다. 예를 들어, 종양 세포의 표면 항원 및 표면 항원, 특히, 바이러스 병원균, 박테리아 병원균, 곰팡이 병원균 또는 원생 동물 병원균의, 분비된 형태일 수 있다. 물론 항원은, 예를 들어 본 개시에 따른 핵산 분자 내부에 존재할 수 있고, 또한, 적당한 담체(carrier)에 결합된 햅텐(haptene)으로 존재할 수 있다. 다른 항원 성분, 비활성화되거나 약독화된 병원균이 또한 사용될 수 있다.

[159] 종양(tumor) 항원의 특정한 예는 그 중에서도 종양-특이성 표면 항원(TSSA)이며, 예를 들어 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, 알파-5-베타-1-인테그린, 알파-5-베타-6-인테그린, 알파-액티닌-4/m, 알파-메틸아실-코엔자임 A 라세미화 효소(racemase), ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, 베타-카테닌/m, BING-4, BRCA1/m, BRCA2/m, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA72-4, CA125, 칼레티쿨린(calreticulin), CAMEL, CASP-8/m, 카텝신 B, 카텝신 L, CD19, CD20, CD22, CD25, CDE30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CEA, CLCA2, CML28, CML66, COA-1/m, 코엑토신(coactosin)-유사 단백질, 콜라주 XXIII, COX-2, CT-9/BRD6, Cten, 싸이클린 B1, 싸이클린 D1, cyp-B, CYPB1, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EFTUD2/m, EGFR, ELF2/m, EMMPRIN, EpCam, EphA2, EphA3, ErbB3, ETV6-AML1, EZH2, FGF-5, FN, Frau-1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE7b, GAGE-8, GDEP, GnT-V, gp100, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, 햅신, Her2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A*0201-R17I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HNE, 호메오박스 NKX3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, iCE, IGF-1R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, 미성숙 라미닌 수용체, 칼리크레인-2, 칼리크레인-4, Ki67, KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC-1, K-Ras/m, LAGE-A1, LDLR-FUT, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-

B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, 마마글로빈 A, MART-1/멜란(melan)-A, MART-2, MART-2/m, 바탕질 단백질(matrix protein) 22, MC1R, M-CSF, ME1/m, 메소텔린, MG50/PXDN, MMP11, MN/CA IX-항원, MRP-3, MUC-1, MUC-2, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, myosin class I/m, NA88-A, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제-V(글루코사미닐transferase-V), Neo-PAP, Neo-PAP/m, NFYC/m, NGEP, NMP22, NPM/ALK, N-Ras/m, NSE, NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1, OFA-iLRP, OGT, OGT/m, OS-9, OS-9/m, 오스테오칼신, 오스테오폰틴, p15, p190 minor bcr-abl, p53, p53/m, PAGE-4, PAI-1, PAI-2, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-키나아제, Pin-1, Pml/PAR알파, POTE, PRAME, PRDX5/m, 프로스테인, 프로테이나아제-3, PSA, PSCA, PSGR, PSM, PSMA, PTPRK/m, RAGE-1, RBAF600/m, RHAMM/CD168, RU1, RU2, S-100, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SCC, SIRT2/m, Sp17, SSX-1, SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1, STEAP, 서바이빈, 서바이빈-2B, SYT-SSX-1, SYT-SSX-2, TA-90, TAG-72, TARP, TEL-AML1, TGF베타, TGF베타RII, TGM-4, TPI/m, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2/6b, TRP/INT2, TRP-p8, 티로시나아제, UPA, VEGF, VEGFR-2/FLK-1 및 WT1이다. 종양(tumor) 항원의 계열은 본 개시의 목적, 예를 들면, 세포외 매트릭스(matrix) 구조 등에 영향을 미치는, 신혈관형성(neovascularization)에 관여하는 것으로 알려진 종양(tumor) 항원에 적당하다. 종양(tumor) 항원은 단백질 또는 펩타이드 항원으로서, 또는 종양(tumor) 항원 또는 이의 에피토프, 또는 상기 종양(tumor) 항원을 암호화하는(encoding) mRNA 또는 DNA로서, 백신 조성물에 제공될 수 있다.

[160] 예를 들어, 병원성 항원은 개체, 예를 들어 포유류 개체, 특히 인간에 의해 면역 반응을 유도하는 병원성 유기체로부터 유래될 수 있다. 일례로, 병원성 항원은 박테리아성, 바이러스성 또는 원생동물학적(다세포성) 병원성 유기체들로부터 유래될 수 있다. 하나의 예시적인 실시형태에서, 병원성 항원은 바이러스, 박테리아 또는 원생동물과 같은 유기체의 표면에 위치한 표면 항원(surface antigens), 예를 들어 단백질(또는 단백질의 단편, 예를 들어 표면 하위의 외부 일부분)일 수 있다.

[161] 병원성 항원은 감염성 질병(infectious disease)와 관련된 병원균으로부터 유래되는 단백질 또는 펩타이드 항원이다. 감염성 질병과 관련된 병원균의 비제한적인 예는 다음과 같다: 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 아나플라스마 속(*Anaplasma* genus), 아나플라스마 파고사이토펜(*Anaplasma phagocytophilum*), 브라질 구충(*Ancylostoma braziliense*), 십이지장충(*Ancylostoma duodenale*), 용혈성 아카노박테리아균(*Arcanobacterium haemolyticum*), 아스카리스 룬브리코이데스(*Ascaris lumbricoides*), 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* genus), 아스트로비리다에(*Astroviridae*), 바베시아 속(*Babesia* genus), 바실러스 앤스래시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바르토넬라 헨셀

라에(*Bartonella henselae*), BK 바이러스(BK virus), 블라스토시스티스 호미니스(*Blastocystis hominis*), 블라스토미세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 보르데텔라 퍼터시스(*Bordetella pertussis*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 보렐리아 속(*Borrelia* genus), 보렐리아 종들(*Borrelia* spp), 브루셀라 속(*Brucella* genus), 말레이 사상충(*Brugia malayi*), 분야비리대 과(*Bunyaviridae* family), 부르크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*) 및 다른 부르크홀데리아 종들, 부르크홀데리아 말레이(*Burkholderia mallei*), 부르크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*), 칼리시비리다에 과(*Caliciviridae* family), 캄필로박터 속(*Campylobacter* genus), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 종들(*Candida* spp), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 클라미도필라 뉴모니아(*Chlamydophila pneumonia*), 클라미도필라 프시타시(*Chlamydophila psittaci*), CJD 프리온(CJD prion), 간흡충(*Clonorchis sinensis*), 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리듐 디피실레(*Clostridium difficile*), 클로스트리듐 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 종들(*Clostridium* spp), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 콕시디오이데스 종들(*Coccidioides* spp), 코로나바이러스(coronaviruses), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheria*), 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*), 크리민 콩고 출혈열 바이러스(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus), 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 크립토스포리디움 속(*Cryptosporidium* genus), 거대세포바이러스(Cytomegalovirus (CMV)), 뎅기열 바이러스(Dengue viruses (DEN-1, DEN-2, DEN-3 및 DEN-4)), 이핵아메바(*Dientamoeba fragilis*), 에볼라바이러스(Ebolavirus (EBOV)), 에키노코쿠스(*Echinococcus* genus), 에를리키아 샤펜시스(*Ehrlichia chaffeensis*), 에를리키아 에인지(*Ehrlichia ewingii*), 에를리키아 속(*Ehrlichia* genus), 이질아메바(*Entamoeba histolytica*), 엔테로코쿠스 속(*Enterococcus* genus), 엔테로바이러스 속(*Enterovirus* genus), 엔테로바이러스(Enteroviruses), 주로 콕사키 A 바이러스 및 엔테로바이러스 71(Coxsackie A virus 및 Enterovirus 71 (EV71)), 에피더모파이톤 종들(*Epidermophyton* spp), 에프스타인-바바이러스(Epstein-Barr Virus (EBV)), 대장균 O157:H7, O111 및 O104:H4(*Escherichia coli* O157:H7, O111 and O104:H4), 파시올라 헤파티카(*Fasciola hepatica*) 및 파시올라 기간티카(*Fasciola gigantica*), FFI 프리온(FFI prion), 필라리오데아상과(*Filarioidea* superfamily), 플라비바이러스(Flaviviruses), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 푸소박테륨 속(*Fusobacterium* genus), 게오텐리움 칸디둠(*Geotrichum candidum*), 기아르디아 인테스티날리스(*Giardia intestinalis*), 악구충 종들(*Gnathostoma* spp), GSS 프리온(GSS prion), 구아나리토 바이러스(*Guanarito virus*), 헤모필러스 듀크레이(*Haemophilus ducreyi*), 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*), 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*), 헤니파바이러스(Henipavirus (헨드라 바이러스 니파바이러스(Hendra virus Nipah virus))), A

형 간염 바이러스(Hepatitis A Virus), B형 간염 바이러스(Hepatitis B Virus (HBV)), C형 간염 바이러스(Hepatitis C Virus (HCV)), D형 간염 바이러스(Hepatitis D Virus), E형 간염 바이러스(Hepatitis E Virus), 헤르페스 심플렉스 바이러스 1 및 2(Herpes simplex virus 1 and 2 (HSV-1 및 HSV-2)), 히스토플라스마 캡슐라툼(Histoplasma capsulatum), HIV (인간 면역결핍 바이러스(Human immunodeficiency virus)), 호르테아 워네키(Hortaea werneckii), 인간 보카바이러스(Human bocavirus (HBoV)), 인간 헤르페스바이러스 6(Human herpesvirus 6 (HHV-6)) 및 인간 헤르페스바이러스 7(Human herpesvirus 7 (HHV-7)), 인간 메타뉴모바이러스(Human metapneumovirus (Hmpv)), 인유두종 바이러스(Human papillomavirus (HPV)), 인간 파라인플루엔자 바이러스(Human parainfluenza viruses (HPIV)), 일본 뇌염 바이러스(Japanese encephalitis virus), JC 바이러스(JC virus), 후닌 바이러스(Junin virus), 킨젤라 킹가에(Kingella kingae), 클렙시엘라 그라눌로마티스(Klebsiella granulomatis), 쿠루 프리온(Kuru prion), 라사 바이러스(Lassa virus), 레지오넬라 뉴모필라(Legionella pneumophila), 리슈마니아 속(Leishmania genus), 렵토스피라 속(Leptospira genus), 리스테리아 모노사이토제니스(Listeria monocytogenes), 림프구성 맥락수막염 바이러스(Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)), 마추포 바이러스(Machupo virus), 말라세지아 종들(Malassezia spp), 마부르크 바이러스(Marburg virus), 홍역 바이러스(Measles virus), 요코가와 흡충(Metagonimus yokagawai), 마이크로스포리디아 필룸(Microsporidia phylum), 중동호흡기증후군 코로나바이러스(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV), 몰루스쿰 콘타기오숨 바이러스(Molluscum contagiosum virus (MCV)), 유행성이하선염 바이러스(Mumps virus), 미코박테리움 레프라에(Mycobacterium leprae) 및 미코박테리움 레프로마토시스(Mycobacterium lepromatosis), 미코박테리움 튜버쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis), 미코박테리움 울서란스(Mycobacterium ulcerans), 폐렴 미코플라스마(Mycoplasma pneumonia), 네글레리아 파울러리(Naegleria fowleri), 아메리카 구충(Necator americanus), 임균(Neisseria gonorrhoeae), 나이세리아 메닝지티디스(Neisseria meningitides), 노카디아 아스테로이드(Nocardia asteroides), 노카디아 종들(Nocardia spp), 온코세르카 볼부루스(Onchocerca volvulus), 오리엔티아 쓰쯔가무시(Orientia tsutsugamushi), 오르소믹소 바이러스과(Orthomyxoviridae family (인플루엔자(Influenza)), 브라질 파라콕시디오이디즈(Paracoccidioides brasiliensis), 폐흡충 종들(Paragonimus spp), 웨스터만 폐흡충(Paragonimus westermani), 파보바이러스 B19(Parvovirus B19), 파스튜렐라 속(Pasteurella genus), 플라스모디움 속(Plasmodium genus), 뉴모시스티스 지로베시(Pneumocystis jirovecii), 폴리오바이러스(Poliiovirus), 광견병 바이러스(Rabies virus), 호흡기 세포 융합 바이러스(Respiratory syncytial virus(RSV)), 리노바이러스(Rhinovirus), 리노바이러스들(rhinoviruses), 리케치아 아카리(Rickettsia akari), 리케치아 속(Rickettsia genus), 리케치아 프로바제키(Rickettsia prowazekii), 리케치아 리케치(Rickettsia rickettsia), 리케치아 티피(Rickettsia typhi), 리프트

벨리 열 바이러스(Rift Valley fever virus), 로타바이러스(Rotavirus), 루벨라 바이러스(Rubella virus), 사비아 바이러스(Sabia virus), 살모넬라 속(*Salmonella* genus), 사콥테스 스카비에이(*Sarcoptes scabiei*), SARS 코로나바이러스(SARS coronavirus), 주혈흡충 속(*Schistosoma* genus), 쉬겔라 속(*Shigella* genus), 신 놉브레 바이러스(*Sin Nombre virus*), 한타바이러스(Hantavirus), 스포로트릭스 쉐키(*Sporothrix schenckii*), 스타필로코쿠스 속(*Staphylococcus* genus), 스타필로코쿠스 속(*Staphylococcus* genus), 스트렙토코쿠스 아갈락티아(*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*), 스트렙토코쿠스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트롱일로이드 스테콜라리스(*Strongyloides stercoralis*), 타이니아 속(*Taenia* genus), 타이니아 솔리움(*Taenia solium*), 진드기 매개 뇌염 바이러스(Tick-borne encephalitis virus (TBEV)), 개회충(*Toxocara canis*) 또는 고양이 회충(*Toxocara cati*), 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 트리키넬라 스피랄리스(*Trichinella spiralis*), 트리코모나스 바지날리스(*Trichomonas vaginalis*), 트리코파이톤 종들(*Trichophyton* spp), 트리쿠리스 트리치우라(*Trichuris trichiura*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 우레아플라즈마 우레알리티쿰(*Ureaplasma urealyticum*), 수두 대상 포진 바이러스(*Varicella zoster virus* (VZV)), 수두 대상 포진 바이러스(*Varicella zoster virus* (VZV)), 대두창(*Variola major*) 또는 소두창(*Variola minor*), vCJD 프리온(vCJD prion), 베네주엘라 이콰인 뇌염 바이러스(Venezuelan equine encephalitis virus), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholera*), 웨스트 나일 바이러스(West Nile virus), 웨스턴 말 뇌염 바이러스(Western equine encephalitis virus), 반크로프트 사상충(*Wuchereria bancrofti*), 황열병 바이러스(Yellow fever virus), 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 여시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 여시니아 슈도투베르쿨로시스(*Yersinia pseudotuberculosis*) 및 지카바이러스(Zika virus).

[162] 이와 관련하여 특히 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포 융합 바이러스(RSV), 헤르페스 심플렉스바이러스(HSV), 인유두종 바이러스(HPV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 플라스모디움, 스타필로코쿠스 아우레우스, 탕기열 바이러스, 클라미디아 트라코마티스, 거대세포바이러스 (CMV), B형 간염 바이러스(HBV), 미코박테리움 튜버쿨로시스, 광견병 바이러스, 황열병 바이러스, 중동호흡기증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 지카바이러스 및 코로나바이러스로부터 선택된 병원균으로부터 유래한 항원들이다.

[163] 본 개시에 따른 백신 조성물은 면역증강제로서 사용되는 핵산 분자, 약학적으로 활성인 물질 이외에 약학적으로 허용되는 담체(carrier)를 포함할 수 있다. 하나의 예시적인 측면에서, 백신 조성물이 액체 형태인 경우, 약학적으로 허용되는 담체는 예를 들어, 발열원이 없는 물(pyrogen-free water); 예를 들어 포스페이트, 시트레이트 등등, 완충 용액과 같은 등장액(isotonic saline) 또는 완충 (수)용액, 예를 들어, 땅콩유, 면실유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 카카오 열매의 오일과

같은 식물성 기름; 예를 들어, 폴리프로필렌 글리콜, 글리세롤, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 알기닌산 등과 같은 폴리올을 포함할 수 있다. 액체의 백신 조성물을 생체에 주입하기 위하여 나트륨염, 칼슘염 및 선택적으로 칼륨염을 포함하는 수성 버퍼가 사용될 수 있다. 나트륨염, 칼슘염 및 칼륨염은 염소, 요오드 또는 브롬과 같은 할로겐의 형태, 또는 수산화물, 탄산염, 탄산수소염, 또는 황산염 등의 형태로 존재할 수 있다.

- [164] 또한, 백신 조성물이 고체 형태인 경우, 약학적으로 허용되는 담체는 고체 필터, 액체 필터 또는 희석제와 같은 고체 담체를 포함할 수 있으며, 생체에 투여하기 적당한 캡슐화 (encapsulating) 화합물이 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 약학적으로 허용되는 고체 담체는, 락토오스, 글루코오스 및 수크로오스와 같은 당; 예를 들어, 옥수수 전분 또는 감자 전분과 같은 전분; 예를 들어, 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트와 같은 셀룰로오스 및 이의 유도체; 분말화된 트래거캔스; 엿기름 (malt); 젤라틴; 수지 (tallow); 예를 들어, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트와 같은 고체 활택제; 칼슘 스테arate 등등.
- [165] 약학적으로 허용되는 담체는 본 개시에 따른 백신 조성물이 투여되는 방식에 따라 선택될 수 있다. 본 개시에 따른 백신 조성물은, 예를 들어, 전신으로 (systemically) 투여될 수 있다. 투여 경로는, 예를 들어, 경구 (oral), 피하내, 정맥내, 근육내, 관절내 (intra-articular), 활액내 (intrasynovial), 흉골내, 경막내 (intrathecal), 간내 (intrahepatic), 병변내 (intralesional), 두개내 (intracranial), 경피 (transdermal), 진피내 (intradermal), 폐내 (intrapulmonal), 복강내 (intrapertoneal), 심장내 (intracardial), 동맥내 (intraarterial), 및 설하 국소 (sublingual topical) 및/또는 비강내 (intranasal) 경로를 포함한다.
- [166] 사용되어야 하는 백신 조성물의 적당한 양은 동물 모델을 이용한 통상의 실험에 의해 결정될 수 있다. 그러한 모델은, 어떠한 제한을 내포함이 없이, 토끼, 양, 마우스, 쥐, 개 및 인간이 아닌 영장류 모델을 포함한다. 주사용 단위 투여 형태는 멸균 수용액, 생리 식염수, 또는 이의 혼합물을 포함한다. 그러한 용액의 pH는 약 7.4로 조정되어야 한다.
- [167] 주사용으로 적당한 담체는 히드로젤, 조절된 방출용 장치, 지연된 방출용 (delayed release) 장치, 폴리젯산 (polylactic acid) 및 콜라겐 매트릭스를 포함한다. 국소 용도로 적당한 약학적으로 허용되는 담체는 로션, 크림, 젤 및 이와 유사한 것에 사용되는데 적당한 것을 포함한다. 만약 화합물이 경구로 (perorally) 투여된다면, 태블릿, 캡슐 및 이와 유사한 것은 단위 투여 형태이다. 구강 투여를 위하여 사용될 수 있는, 단위 투여 형태의 제조를 위한 약학적으로 허용되는 담체는 당 업계에 잘 알려져 있다.
- [168] 필요한 경우, 약학적으로 활성인 물질 및/또는 면역증강제로서의 핵산 분자에 의하여 유도되는 면역원성을 더욱 증가시키기 위하여, 본 개시에 따른 백신 조성물은 하나 이상의 보조 물질을 추가적으로 포함할 수 있다. 이러한 보조 물질의 비제한적인 예는 수지상 세포(DC)의 성숙을 허용하는 화합물, 예를 들어 리포다

당질, TNF-알파 또는 CD40 리간드, GM-CSF 및/또는 사이토카인이다. 구체적으로, 다양한 인터루킨류, 인터페론류, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-베타, TNF-알파, hGH와 같은 성장 인자와 같은, 면역 반응을 촉진하는, 모노킨, 림포킨, 인터루킨 또는 케오카인과 같은 사이토카인이다.

[169] 본 개시에 따른 백신 조성물에 추가적으로 하나 이상의 완충제, 안정화제, 계면활성제, 습윤제, 윤활제, 유화제, 현탁화제, 보존제, 항산화제, 불투명화제, 활택제, 가공 보조제, 착색제, 감미제, 향료, 향미제, 희석제, 및 약물 (즉, 본 개시의 유효 성분인 핵산 분자, 유전자 전달체 또는 백신 조성물)의 멋진 외양을 제공하거나 제약 제품 (즉, 의약)의 제조에 도움이 되는 다른 공지된 첨가제를 포함할 수 있다. 일례로, Tween과 같은 유화제; 예를 들어, 소듐 라우릴 설페이트와 같은 습윤제; 착색제; 맛을 부여하는 제제 (taste-imparting agent), 태블릿을 형성하는 제제; 안정화제; 항산화제; 보존제이다.

[170] 본 개시에 따라 면역증강제로 사용되는 핵산 분자의 함량이나 농도는 특별히 제한되지 않는다. 특히, RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자를 사용하는 경우, 생체 내에서 신속하게 분해되기 때문에 안전성 및 안정성을 확보할 수 있다. 하나의 예시적인 실시형태에서, 본 개시에 따른 핵산 분자는 백신 조성물 중에 약 1 내지 약 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 예를 들어, 약 10 내지 약 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[171] 적절한 면역 반응에 중요한 요인은 다른 T-세포 아집단(sub-population)의 증강이다. T-림프구는 전형적으로 2개의 아집단, 즉 T-헬퍼 1(Th_1) 세포 및 T-헬퍼 2(Th_2) 세포로 분화되며, 상기 아집단은 세포내 (Th_1) 병원균 및 세포외 (Th_2) 병원균 (예를 들면, 항원)을 파괴할 수 있는 면역계를 가지고 있다. 상기 2개의 Th 세포 집단은, 그들에 의해 생산된 이펙터 단백질(사이토카인)의 패턴에 있어서 차이가 있다. 일반적으로, Th_1 세포는 주로 체액성 면역과 관련하여 대식세포 및 세포독성이 있는 T-세포의 활성화에 의한 세포 면역 반응을 돕는다. 한편, Th_2 세포는 주로 세포성 면역과 관련하여 원형질 세포로의 전환을 위한 B-세포의 증강에 의해, 그리고 항체 (예를 들면, 항원에 대한 항체)의 형성에 의해, 체액성 면역 반응을 촉진시킨다. 따라서 Th_1/Th_2 비율은 면역 반응에서 상당히 중요하다. 본 개시에 따른 핵산 분자는 Th_1 면역 반응 및 Th_2 면역 반응을 모두 강화한다.

[172] 일례로, 본 개시에 따른 백신 조성물은 종양-특이성(tumour-specific) 또는 병원균-특이성 면역 반응을 유발하여, 종양 및 전염성 질병을 예방하기 위하여 사용될 수 있다. 선택적으로, 백신 조성물은 알레르기성 장애 또는 질병, 자가면역성 질병의 예방을 위해 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[173] 본 개시에 따른 백신 조성물은 임의의 편리한 투여 형태, 예를 들어 정제, 분말, 캡슐, 용액, 분산액, 현탁액, 시럽, 분무제, 좌제, 겔, 에멀전, 패치 등으로 투여될 수 있다. 이러한 백신 조성물은 제약 제제에 통상적인 성분, 예를 들어 희석제, 담체, pH 조정제, 감미제, 벌킹제 및 추가의 활성제를 함유할 수 있다.

- [174] 본 개시의 백신 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [175] 한편, 본 명세서에서 제제는 또한 치료할 특정한 적응증에 필요한 경우에는 하나 초과로 활성 화합물, 예를 들어, 서로 유해한 영향을 미치지 않는 보완적 활성을 갖는 화합물을 함유할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 백신 조성물은 그의 기능을 증진시키는 작용제, 예컨대 예를 들어 세포독성제, 사이토카인, 화학요법제, 또는 성장-억제제, 또는 성장-증진제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.
- [176] 선택적인 측면에서, 본 개시의 핵산 분자를 포함하는 유전자 전달체가 백신 조성물에 포함될 수 있다. 유전자 전달체는 목적하는 사이토카인을 암호화하는 뉴클레오타이드를 운반 및 발현시키기 위하여 제작된 것이다. 유전자 전달체를 제조하기 위해, 관심 유전자의 전사체는 적합한 발현 컨스트럭트(expression construct) 내에 존재할 수 있다. 발현 컨스트럭트에서, 사이토카인을 암호화하는 관심 유전자의 전사체는 전사 조절 요소(TCCE)에 작동 가능하게 연결될 수 있다.
- [177] 예를 들어, 발현 컨스트럭트는 전술한 핵산 분자가 삽입된 발현 벡터일 수 있다. 이때, 벡터는 핵산 분자를 포함할 수 있으며, 핵산 분자는 다른 뉴클레오타이드 서열과 결합하여, 융합 단백질 또는 융합 펩타이드를 암호화할 수도 있다.
- [178] 한편, 상술한 유전자 전달체를 세포내로 도입하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 본 개시에서, 유전자 전달체가 바이러스 벡터에 기초하여 제작된 경우에는, 당업계에 공지된 바이러스 감염 방법에 따라 실시된다. 또한, 본 개시에서 유전자 전달 시스템이 naked 재조합 DNA 분자 또는 플라스미드인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법), 및 유전자 밤바드먼트 방법에 의해 유전자를 세포내로 이입시킬 수 있다.
- [179] 이하, 예시적인 실시형태를 통하여 본 개시를 설명하지만, 본 개시가 하기 실시예에 기재된 기술사상으로 한정되지 않는다.
- [180] 실시예 1: RNA 플랫폼의 핵산 분자 제작
- [181] SINV-1 유래의 IRES 활성을 갖는 RNA 핵산 분자를 제작하였다. 주형 DNA는 다음과 같이 설계하였다.
- [182] 5'- KpnI 인식서열(GGTACC) - T₇ promoter (서열식별번호: 3) - SINV-1 유래의 IRES 활성을 갖는 IGR (서열식별번호: 1) - MCS(EcoRI 인식서열(GAATTC) - ClaI 인식서열(ATCGAT) - PacI 인식서열(TTAATTAA) - SacI 인식서열(GAGCTC) -

SINV-1 유래의 IRES 활성을 갖는 IGR (서열식별번호: 2) -50개의 아데노신 - NotI 인식서열(GCGGCCGC) - 3'.

[183] 주형 DNA를 pGH 벡터에 클로닝하고 제한효소로 linearization시켜, *in vitro* transcription(IVT)을 통해 RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자(SINV-1-MCS)를 제작하였다.

[184] 비교예 1: RNA 플랫폼의 핵산 분자 제작

[185] 주형 DNA의 설계를 아래와 같이 변형한 것을 제외하고, 실시예 1의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자(CrPV-MCS)를 제작하였다:

[186] 5'- KpnI 인식서열(GGTACC) - T₇ promoter (서열식별번호: 3) - 귀뚜라미마비바이러스(CrPV) 유래의 IRES 활성을 갖는 5'-UTR(서열식별번호: 6) - MCS (BamHI 인식서열(GGATCC) - EcoRI 인식서열(GAATTC) - PacI 인식서열(TTAATTAA) - SacI 인식서열(GAGCTC)) - SV40 polyadenylation signal sequence(서열식별번호: 7) - NotI 인식서열(GCGGCCGC) - 3'.

[187] 비교예 2: RNA 플랫폼의 핵산 분자 제작

[188] 주형 DNA의 설계를 아래와 같이 변형한 것을 제외하고, 실시예 1의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자(EMCV-MCS)를 제작하였다:

[189] 5'- EcoRI 인식서열(GAATTC) - T₇ promoter (서열식별번호: 3) - 뇌심근염바이러스(EMCV) 유래의 IRES 활성을 갖는 5'-UTR(서열식별번호: 8) - MCS(BamHI 인식서열(GGATCC) - SacII 인식서열(CCGCGG) - SalI 인식서열(GTCGAC) - PvuI 인식서열(CGATCG)) - EMCV 유래의 3'-UTR(서열식별번호: 9) -50개의 아데노신 - NotI 인식서열(GCGGCCGC) - 3'

[190] 실험예 1: 핵산 분자 주입, 마우스 면역

[191] Wild type Balb/c 마우스(그룹당 5)에 면역원인 Influenza subunit vaccine(SKY cell flu, 0.6 µg), 실시예 1 및 비교예 1-2에서 제작한 각각의 핵산 분자(각각 20 µg)를 근육 주사하여, 면역하였다. 핵산 분자는 내독소를 제거하지 않고, cellulose로 정제하였다. 1차 면역 2주 후에 2차 면역을 수행하였다. 1차 면역 후 2주 후와 2차 면역 후 1주 후에 면역글로불린의 생성을 측정하였고, 2차 면역 후 1주일 후에 마우스의 혈액 채취하고, 이산화탄소를 이용하여 마우스를 안락사 시킨 후, 부검하여 복대 정맥에서 혈액 및 장기를 적출하여 분석하였다. 대조군과 실험군은 하기 표 1과 같이 구분하였다.

[192] [표1]

마우스 면역 실험군 및 대조군

n = 5	Group
G1	Saline
G2	Influenza subunit vaccine
G3	Influenza subunit vaccine + CrPV-MCS

G4	Influenza subunit vaccine + EMCV-MCS
G5	Influenza subunit vaccine + SINV-1-MCS

[193] 실험예 2: 면역글로불린 생성

[194] 실험예 1에 따라, 1차 면역 2주 후, 2차 면역 1주 후에 마우스에서 채취한 혈액에서 면역글로불린의 생성을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 마우스에서 채취한 혈액은 상온에 2시간 이상 방치하여, 혈구를 응집시킨 후 4,000g 에서 15분 동안 원심분리 하여 혈청을 따로 분리하였다. 96-well plate에 면역에 사용한 면역원 100 ng/well을 코팅한 후 1% in BAS in PBS로 1시간 blocking 후 1차 항체로서 1% BSA in PBS에 혈청을 희석하여 50 μ l씩 넣었다. 4°C에서 overnight 반응시킨 후, 0.05% PBST 200 μ l로 3번 씻고, 2차 항체로 goat anti-mouse IgG1 H+I HRP conjugated 또는 goat anti-mouse IgG2a H+I HRP conjugated를 1% BSA in PBS에 1:5000으로 희석하여 100 μ l씩 넣었다. 상온에서 1시간 반응 후 0.05% PBST 200 μ l로 5번 씻어준 뒤, TMB 용액을 100 μ l씩 넣어 발색을 확인하였다. 발색이 충분히 진행되었으면 2N 황산을 50 μ l씩 넣어 반응을 멈추고, 흡광도를 측정할 수 있는 spectrophotometer를 이용해 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[195] 1차 면역 2주 후에 마우스 혈액에서 생성된 면역글로불린을 측정한 결과를 도 3에, 2차 면역 1주 후에 마우스 혈액에서 생성된 면역글로불린을 측정한 결과를 도 4에 나타낸다. 2차 면역 후에 실시예 1에서 제작한 핵산 분자로 면역한 마우스에서 Th₂ 면역 반응과 관련한 면역글로불린인 IgG1 및 Th₁ 면역 반응과 관련한 면역글로불린인 IgG2a의 생성이 모두 증가하였다.

[196] 실험예 3: 중화항체 확인

[197] 실험예 1에 따라, 2차 면역 1주 후, 인플루엔자 백신주 중에서 H1N1에 homologous한 바이러스인 A/California/04/2009 (H1N1)에 대한 중화항체를 측정하였다.

[198] (1) HI Assay

[199] 마우스 혈청을 RDE(receptor destroy enzyme)에 1:3의 비율로 섞고 37°C에서 overnight 반응시켰다. 56°C에서 30분 동안 불활성화한 후, PBS를 넣어 1/10으로 희석하였다. 96-well v-bottom 플레이트에 25 μ l의 PBS를 넣었다. 첫 번째 column에 1/10으로 희석된 25 μ l의 마우스 혈청을 넣고, 옆의 column으로 순차적으로 2배씩 희석하였다. Influenza subunit vaccine 백신주에 homologous한 인플루엔자 바이러스(A/California/04/2009)를 8 HAU(hemagglutinating unit)/50 μ l로 희석한 후, 25 μ l씩 모든 well에 넣어준 후 30분 동안 반응시켰다. 이후, 1%의 닭 적혈구를 50 μ l씩 넣고, 적혈구가 응집될 때까지 기다렸다. 적혈구가 응집된 것은 바이러스의 HA 항원 때문이며, 적혈구가 응집되지 않은 것은 혈청에 HA 항체가 있기 때문이다.

[200] (2) MN Assay

- [201] 96-well 플레이트에 MDCK 세포를 3×10^4 cells/well이 되게 깔았다. 마우스 혈청을 $12 \mu\text{l}$ 씩 준비하여 56°C 에서 30분 동안 불활성화하였다. 불활성화한 혈청을 배지로 10배 희석하여 $80 \mu\text{l}$ 씩 비어있는 96-well 플레이트의 첫 줄에 넣었다. 다른 well에는 $40 \mu\text{l}$ 씩 배지를 넣고 첫 줄의 혈청을 $40 \mu\text{l}$ 씩 2배씩 희석하였다. 각 well에 100 TCID₅₀(Tissue Culture Infective Does 50%)의 바이러스를 $40 \mu\text{l}$ 씩 넣어주고 37°C 인큐베이터에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응한 바이러스와 혈청은 $50 \mu\text{l}$ 씩 배지를 제거한 96-well 플레이트의 MDCK 세포 위에 넣고, 37°C 인큐베이터에서 2시간 동안 감염시켰다. 2시간 후 2% FBS를 포함하는 MEM 완전배지 $50 \mu\text{l}$ 를 각 well에 넣어주고 37°C 인큐베이터에 넣었다. 시간대별로 세포를 관찰하여 세포 병변이 발생하면 상층액을 모두 제거하고, 4% 포름알데히드 용액을 넣고 3시간 이상 고정하였음. 그 후 2% 크리스탈 바이올렛 용액을 각 well에 넣어 30분 이상 염색하고, 물로 씻어내어 중화항체 역가를 측정하였다.
- [202] HI 분석 결과를 도 5, MN 분석 결과를 도 6에 각각 나타낸다. 실시예 1에서 제작한 핵산 분자로 면역시킨 마우스에서 중화항체가 높게 측정되었다.
- [203] 실험예 4: ELISPOT을 이용한 사이토카인 분비 측정
- [204] 실험예 1에 따라, 2차 면역 1주 후에 마우스에서 적출한 비장을 $40 \mu\text{m}$ strainer를 이용하여 최대한 단일 세포가 될 수 있게 갈았다. 갈아준 비장 세포를 pre-coating ELISpot plate에 5×10^5 cells/well의 개수로 $50 \mu\text{l}$ 씩 넣었다. Non-stimulation의 경우 10% FBS와 1% antibiotics를 포함하는 RPMI-1640 완전배지를 $50 \mu\text{l}$, protein stimulation의 경우 완전배지에 500 ng/well의 농도로 면역에 사용한 백신을 넣어 $50 \mu\text{l}$ 씩 넣고, 각각 37°C 인큐베이터에서 48시간 배양하였다. 배지 상층액을 제거하고, PBS로 5번 washing하였다. IFN-감마, IL-4, specific antibody(1st antibody)를 1:1000으로 FBS 0.5% PBS에 희석한 후, $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 로 넣고, 상온에서 2시간 incubation하였다. PBS로 5번 washing하고, Strataavidin 항체를 1:1000으로 FBS 0.5% PBS로 희석한 후 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 로 넣었다. 상온에서 1시간 동안 incubation한 후, PBS로 5번 washing하였다. BCIP/NBT (substrate solution)을 filter후 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 넣어주어 발색 진행하고, 흐르는 수돗물로 세척하여 반응을 중지하였다.
- [205] ELISPOT 분석 결과를 도 7 및 도 8에 나타낸다. 실시예 1에서 제작한 핵산 분자로 면역시킨 마우스의 비장세포에서 IFN-감마 및 IL-4 사이토카인의 생성이 촉진된 것을 확인하였다.
- [206] 실험예 5: FACS 분석
- [207] 실험예 1에 따라, 2차 면역 1주 후에 마우스에서 적출한 마우스의 비장을 $40 \mu\text{m}$ strainer를 이용하여 최대한 단일 세포가 될 수 있게 갈았다. 96-well round bottom plate에 1×10^6 cells/well의 개수로 넣어준 뒤, 완전배지에 500 ng/well의 농도로 면역에 사용한 백신을 넣어 $50 \mu\text{l}$ 씩 넣어주어 stimulation 한 후 16시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. T 세포 특이적인 항체와 IFN-감마, IL-2, TNF-알파 특이적인 항체를 이용하여 염색한 후, 유세포분석기를 통하여 IFN-감마, IL-2, TNF-

알파를 생성하는 T 세포의 개수를 측정하였다. 측정 결과를 도 9 내지 도 11에 나타낸다. 실시예 1에서 제조된 핵산 분자로 면역시킨 마우스에서 특정 사이토카인을 분비하는 T 세포의 개수가 향상되었다.

[208] 실험예 6: Cytokine ELISA

[209] 실험예 1에 따라, 2차 면역 1주 후에 마우스에서 적출한 마우스의 비장을 40 μ m strainer를 이용하여 최대한 단일 세포가 될 수 있게 갈았다. 96-well plate에 5×10^5 cells/well의 개수로 넣어준 뒤 완전배지에 500 ng/well의 농도로 면역에 사용한 백신을 넣어 50 μ l씩 넣어주어 stimulation 한 후 72시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 그 후 세포배양 상층액을 확보하여 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 실험을 진행하였다. 분석 결과를 도 12 및 도 13에 나타낸다. 실시예 1에서 제조한 핵산 분자로 면역시킨 마우스의 비장에서 IFN-감마, TNF-알파, IL-2 및 IL-6 사이토카인의 분비가 크게 향상된 것을 확인하였다.

[210] 실시예 2: RNA 플랫폼의 핵산 분자 제작

[211] 실시예 1의 핵산 분자를 구성하는 50개의 아데노신과, 3' 말단의 Not1 인식서열 사이에 링커(서열식별번호: 4)와 50개의 아데노신을 추가로 삽입한 주형 DNA를 설계한 것을 제외하고, 실시예 1의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자(SINV-1L-MCS)를 제작하였다.

[212] 실시예 3: RNA 플랫폼의 핵산 분자 제작

[213] 실시예 1의 핵산 분자를 구성하는 50개의 아데노신과, 3' 말단의 Not1 인식서열 사이에 링커(서열식별번호: 4), 50개의 아데노신 및 G-quadruplex (서열식별번호: 5)를 추가로 삽입한 주형 DNA를 설계한 것을 제외하고, 실시예 1의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자(SINV-1LG-MCS)를 제작하였다.

[214] 비교예 3: RNA 플랫폼의 핵산 분자 제작

[215] 비교예 2의 핵산 분자를 구성하는 핵산 분자 중에서 50개의 아데노신과, 3' 말단의 Not1 인식서열 사이에 링커(서열식별번호: 5) 및 50개의 아데노신을 추가로 삽입한 주형 DNA를 설계한 것을 제외하고, 비교예 2의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자(EMCVL-MCS)를 제작하였다.

[216] 비교예 4: RNA 플랫폼의 핵산 분자 제작

[217] 비교예 2의 핵산 분자를 구성하는 핵산 분자 중에서 50개의 아데노신과, 3' 말단의 NotI 인식 서열 사이에 링커(서열식별번호: 5), 50개의 아데노신 및 G-quadruplex (서열식별번호: 5)를 추가로 삽입한 주형 DNA를 설계한 것을 제외하고, 비교예 2의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자(EMCVLG-MCS)를 제작하였다.

[218] 실험예 7: 핵산 분자 주입, 마우스 면역

[219] Wild type Balb/c 마우스(그룹당 5)에 면역원인 Influenza subunit vaccine(SKY cell flu, 1.0 μ g), 실시예 2-3 및 비교예 3-4에서 제작한 각각의 핵산 분자(각각 20 μ g)를 근육 주사하여, 면역하였다. 핵산 분자의 내독소를 제거한 것을 cellulose로 정제하였다. 1차 면역 2주 후에 2차 면역을 수행하였다. 1차 면역 후 2주 후와 2차

면역 후 2주 후에 면역글로불린의 생성을 측정하였고, 2차 면역 후 2주일 후에 마우스의 혈액 채취하고, 이산화탄소를 이용하여 마우스를 안락사 시킨 후, 부검하여 복대 정맥에서 혈액 및 장기를 적출하여 분석하였다. 대조군과 실험군은 하기 표 2와 같이 구분하였다.

[220] [표2]

마우스 면역 실험군 및 대조군

n = 5	Group
G1	Saline
G2	Influenza subunit vaccine
G3	Influenza subunit vaccine + EMCVL-MCS
G4	Influenza subunit vaccine + EMCVLG-MCS
G5	Influenza subunit vaccine + SINV-1L-MCS
G6	Influenza subunit vaccine + SINV-1LG-MCS

[221] 실험예 8: 면역글로불린 생성

[222] 실험예 7에 따라, 1차 면역 2주 후, 2차 면역 2주 후에 각각 마우스에서 채취한 혈액에서 면역글로불린의 생성을 실험예 2와 동일한 절차에 따라 ELISA를 이용하여 측정하였다. 1차 면역 2주 후에 마우스 혈액에서 생성된 면역글로불린을 측정한 결과를 도 14에, 2차 면역 2주 후에 마우스 혈액에서 생성된 면역글로불린을 측정한 결과를 도 15에 나타낸다. 1차 및 2차 면역 후에 실시예 2 및 실시예 3에서 제작한 핵산 분자로 면역한 마우스에서 Th₂ 면역 반응과 관련한 면역글로불린인 IgG1 및 Th₁ 면역 반응과 관련한 면역글로불린인 IgG2a의 생성이 모두 증가하였다.

[223] 실험예 9: 중화항체 확인

[224] 실험예 7에 따라, 2차 면역 2주 후, A/California/04/2009 (H1N1)에 대한 중화항체를 실험예 3과 동일한 절차에 따라 HI assay 및 MN assay를 이용하여 측정하였다. HI 분석 결과를 도 16에, MN 분석 결과를 도 17에 나타낸다. 실시예 2 및 실시예 3에서 제작한 핵산 분자로 면역시킨 마우스에서 중화항체가 높게 측정되었다.

[225] 실시예 4: RNA 플랫폼의 핵산 분자 제작

[226] 실시예 2의 핵산 분자 중에 MCS를 구성하는 ClaI 인식서열(ATCGAT)과 PacI 인식서열(TTAATTAA) 사이에, influenza virus의 type A Hemagglutinin(서열식별번호: 10)을 암호화하는 ORF 형태의 코딩 영역(서열식별번호: 11)을 추가로 삽입한 주형 DNA를 설계한 것을 제외하고, 실시예 2의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자(SINV-1L-FluA)를 제작하였다.

[227] 실시예 5: RNA 플랫폼의 핵산 분자 제작

[228] 실시예 2의 핵산 분자 중에 MCS를 구성하는 ClaI 인식서열과 PacI 인식서열 사이에, influenza virus의 type B Hemagglutinin(서열식별번호: 12)을 암호화하는

ORF 형태의 코딩 영역(서열식별번호: 13)을 추가로 삽입한 주형 DNA를 설계한 것을 제외하고, 실시예 2의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자(SINV-1L-FluB)를 제작하였다.

[229] 비교예 5: RNA 플랫폼의 핵산 분자 제작

[230] 비교예 1의 핵산 분자 중에 MCS를 구성하는 BamHI 인식서열(GGATCC)과 PacI 인식서열(TTAATTAA) 사이에, influenza virus의 type A Hemagglutinin(서열식별번호: 10)을 암호화하는 ORF 형태의 코딩 영역(서열식별번호: 11)을 추가로 삽입한 주형 DNA를 설계한 것을 제외하고, 실시예 2의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자(CrPV-FluA)를 제작하였다.

[231] 비교예 6: RNA 플랫폼의 핵산 분자 제작

[232] 비교예 1의 핵산 분자 중에 MCS를 구성하는 BamHI 인식서열과 PacI 인식서열 사이에, influenza virus의 type B Hemagglutinin(서열식별번호: 12)을 암호화하는 ORF 형태의 코딩 영역(서열식별번호: 13)을 추가로 삽입한 주형 DNA를 설계한 것을 제외하고, 실시예 2의 절차를 반복하여 RNA 플랫폼 형태의 핵산 분자(CrPV-FluB)를 제작하였다.

[233] 실험예 10: 핵산 분자 주입, 마우스 면역

[234] Wild type Balb/c 마우스(그룹당 5)에 면역원인 Influenza subunit vaccine(SKY cell flu, 1.0 μ g), 실시예 4-5 및 비교예 5-6에서 제작한 각각의 핵산 분자(각각 20 μ g)를 근육 주사하여, 면역하였다. 핵산 분자의 내독소를 제거한 것을 cellulose로 정제하였다. 면역 스케줄은 실험예 7과 동일한 절차에 따라 진행하였다. 대조군과 실험군은 하기 표 3과 같이 구분하였다.

[235] [표3]

마우스 면역 실험군 및 대조군

n = 5	Group
G1	Saline
G2	Influenza subunit vaccine
G3	Influenza subunit vaccine + CrPV-FluA + CrPV-FluB
G4	Influenza subunit vaccine + SINV-1L-FluA + SINV-1L-FluB

[236] 실험예 11: 면역글로불린 생성

[237] 실험예 10에 따라, 1차 면역 2주 후, 2차 면역 2주 후에 각각 마우스에서 채취한 혈액에서 면역글로불린의 생성을 실험예 2와 동일한 절차에 따라 ELISA를 이용하여 측정하였다. 1차 면역 2주 후에 마우스 혈액에서 생성된 면역글로불린을 측정한 결과를 도 18에, 2차 면역 2주 후에 마우스 혈액에서 생성된 면역글로불린을 측정한 결과를 도 19에 나타낸다. 1차 및 2차 면역 후에 실시예 4 및 실시예 5에서 제작한 핵산 분자로 면역한 마우스에서 Th₂ 면역 반응과 관련한 면역글로불

린인 IgG1 및 Th₁ 면역 반응과 관련한 면역글로불린인 IgG2a의 생성이 모두 증가하였다.

[238] 실험예 12: 중화항체 확인

[239] 실험예 10에 따라, 2차 면역 2주 후, A/California/04/2009 (H1N1)에 대한 중화항체를 실험예 3과 동일한 절차에 따라 HI assay 및 MN assay를 이용하여 측정하였다. HI 분석 결과를 도 20에, MN 분석 결과를 도 21에 나타낸다. 실시예 4 및 실시예 5에서 제작한 핵산 분자로 면역시킨 마우스에서 중화항체가 높게 측정되었다.

[240] 실험예 13: 핵산 분자 주입, 마우스 면역

[241] Wild type Balb/c 마우스(그룹당 5)에 면역원인 Influenza split vaccine(코박스플루4가PF주, 1.0 μ g), 실시예 3에서 제작한 핵산 분자(20 μ g)를 근육 주사하여, 면역하였다. 핵산 분자의 내독소를 제거한 것을 cellulose로 정제하였다. 면역 스케줄은 실험예 7과 동일한 절차에 따라 진행하였다. 대조군과 실험군은 하기 표 4와 같이 구분하였다.

[242] [표4]

마우스 면역 실험군 및 대조군

n = 5	Group
G1	Saline
G2	Influenza split vaccine
G3	Influenza split vaccine + SINV-1LG-MCS

[243] 실험예 14: 면역글로불린 생성

[244] 실험예 13에 따라, 1차 면역 2주 후, 2차 면역 2주 후에 각각 마우스에서 채취한 혈액에서 면역글로불린의 생성을 실험예 2와 동일한 절차에 따라 ELISA를 이용하여 측정하였다. 1차 면역 2주 후에 마우스 혈액에서 생성된 면역글로불린을 측정한 결과를 도 22에, 2차 면역 2주 후에 마우스 혈액에서 생성된 면역글로불린을 측정한 결과를 도 23에 나타낸다. 1차 및 2차 면역 후에 실시예 3에서 제작한 핵산 분자로 면역한 마우스에서 Th₂ 면역 반응과 관련한 면역글로불린인 IgG1 및 Th₁ 면역 반응과 관련한 면역글로불린인 IgG2a의 생성이 모두 크게 증가하였다.

[245] 실험예 15: 중화항체 확인

[246] 실험예 13에 따라, 2차 면역 2주 후, A/California/04/2009 (H1N1)에 대한 중화항체를 실험예 3과 동일한 절차에 따라 HI assay 및 MN assay를 이용하여 측정하였다. HI 분석 결과를 도 24에, MN 분석 결과를 도 25에 나타낸다. 실시예 3에서 제작한 핵산 분자로 면역시킨 마우스에서 중화항체가 크게 증가하였다.

[247] 실험예 16: ELISPOT을 이용한 사이토카인 측정

[248] 실험예 13에 따라, 2차 면역 2주 후에 마우스 비장에서 분비되는 사이토카인을 실험예 4와 동일한 절차에 따라 ELISPOT을 이용하여 분석하였다. 분석 결과를

도 26에 나타낸다. 실시예 3에서 제작한 핵산 분자로 면역시킨 마우스의 비장에서 IFN-감마의 분비가 크게 증가하였다.

[249] 실험예 17: FACS 분석

[250] 실험예 13에 따라, 2차 면역 2주 후에 마우스 비장에서 분비되는 사이토카인을 실험예 5와 동일한 절차에 따라 FACS를 이용하여 분석하였다. 분석 결과를 도 27 내지 도 29에 나타낸다. 실시예 3에서 제작한 핵산 분자로 면역시킨 마우스의 비장에서 CD4 effector/memory T 세포, memory B 세포는 물론이고, IFN-감마, TNF-알파, IL-2 및 IL-4와 같이 특정 사이토카인을 분비하는 T 세포가 크게 증가하였다.

[251] 실험예 18: Cytokine ELISA

[252] 실험예 13에 따라, 2차 면역 2주 후에 마우스 비장에서 분비되는 사이토카인을 실험예 6과 동일한 절차에 따라 ELISA를 이용하여 분석하였다. 분석 결과를 도 30 내지 도 32에 나타낸다. 실시예 3에서 제작한 핵산 분자로 면역시킨 마우스의 비장에서 사이토카인의 분비가 크게 증가한 것을 확인하였다.

[253] 실험예 19: FACS 분석

[254] 인간 말초혈액단핵세포를 96-well plate에 5×10^5 cells/well의 개수로 넣은 완전배지에 $20 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 실시예 3에서 제조한 핵산 분자를 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣어, stimulation 하고, 48시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 양성 대조군으로 LPS를 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣어 주었다. 각각의 배양시간 후 수지상세포와 활성화 마커에 특이적인 항체를 이용하여 염색한 후 유세포분석기를 통하여 수지상세포의 개수를 측정하고 활성화된 정도를 확인하였다. 48 시간 배양 후의 측정 결과를 도 33 내지 도 35에 나타낸다. 48 시간 배양한 후, 실시예 3에서 제작한 핵산분자로 자극한 세포에서 수지상세포의 개수와 활성화 정도가 크게 증가하였다.

[255] 실험예 20: 사이토카인 분비 측정

[256] 인간 말초혈액단핵세포를 96-well plate에 5×10^5 cells/well의 개수로 넣고, 완전배지에 $20 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 실시예 3에서 제조한 핵산 분자를 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣어, stimulation 한 후 48시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 양성대조군으로 LPS를 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 $200 \mu\text{l}$ 씩 넣어 주었다. 48시간 후 세포배양 상층액을 확보하여 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 실험을 진행하였다. 배양한 세포주에서 사이토카인의 분비를 측정한 결과를 도 36 내지 도 40에 나타낸다. 48시간 배양후, 실시예 3에서 제작한 핵산분자로 자극한 세포에서 Th_1 와 Th_2 면역 반응과 관련된 사이토카인인 IFN-감마, IL-2, IL-6, IL-10 및 TNF-알파의 분비가 크게 증가되어 유지되었다.

[257] 상기에서는 본 개시의 예시적인 실시형태 및 실시예에 기초하여 본 개시를 설명하였으나, 본 개시가 상기 실시형태 및 실시예에 기재된 기술사상으로 한정되는 것은 아니다. 오히려 본 개시가 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자

라면 전술한 실시형태 및 실시예를 토대로 다양한 변형과 변경을 용이하게 추고 할 수 있다. 하지만, 이러한 변형과 변경은 모두 본 개시의 권리범위에 속한다는 점은, 첨부하는 청구범위에서 분명하다.

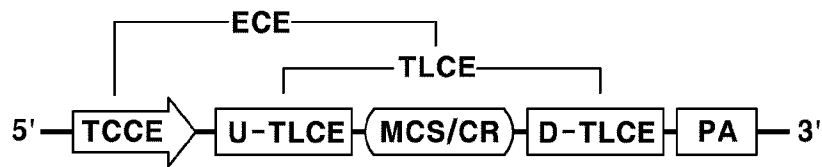
청구범위

- [청구항 1] 솔레놉시스 인빅타 바이러스(Solenopsis invicta virus, SINV)에서 유래한 내부리보솜결합부위(Internal Ribosomal Entry Site, IRES) 활성을 갖는 발현 조절 요소를 가지는 핵산 분자를 포함하는 면역증강제.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 발현 조절 요소와 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 제한효소 인식 서열 또는 제한효소 절단 서열을 더욱 포함하는 면역증강제.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 발현 조절 요소와 작동 가능하게 연결되는 코딩 영역을 더욱 포함하는 면역증강제.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 발현 조절 요소는 제 1 번역 조절 요소와, 상기 제 1 번역 조절 요소의 하류에 위치하는 제 2 번역 조절 요소를 포함하는 면역증강제.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 제 1 번역 조절 요소는 서열식별번호: 1 또는 이의 전사체 서열을 포함하는 면역증강제.
- [청구항 6] 제 4항에 있어서, 상기 제 2 번역 조절 요소는 서열식별번호: 2 또는 이의 전사체 서열을 포함하는 면역증강제.
- [청구항 7] 제 4항에 있어서, 상기 발현 조절 요소는 상기 제 1 번역 조절 요소의 상류에 위치하는 전사 조절 요소를 더욱 포함하는 면역증강제.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 발현 조절 요소의 하류에 위치하는 제 1 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 제 1 폴리아데노신 서열 중에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드 서열을 더욱 포함하는 면역증강제.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 제 1 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 상기 제 1 폴리아데노신 서열의 하류에 위치하는 제 2 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 제 2 폴리아데노신 서열을 더욱 포함하는 면역증강제.
- [청구항 10] 제 9항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 제 2 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 상기 제 2 폴리아데노신 서열의 하류에 위치하며, 하기 식 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 전사체 서열을 더욱 포함하는 면역증강제.
- [식 1]
- $$5'\text{-G}_m\text{X}_n\text{G}_p\text{X}_q\text{G}_r\text{X}_s\text{G}_t\text{-}3'$$
- 식 1에서, G는 구아노신을 나타내고, X는 아데노신, 사이티닌 및 티미딘 중 하나임; m, p, r 및 t는 각각 독립적으로 1 내지 10의 정수임; n, q 및 s는 각각 독립적으로 0 내지 10의 정수임.
- [청구항 11] 제 1항에 있어서, 상기 발현 조절 요소는 솔레놉시스 인빅타 바이러스 1 (SINV-1)에서 유래한 IRES 활성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 면역증강제.
- [청구항 12] 면역원; 및

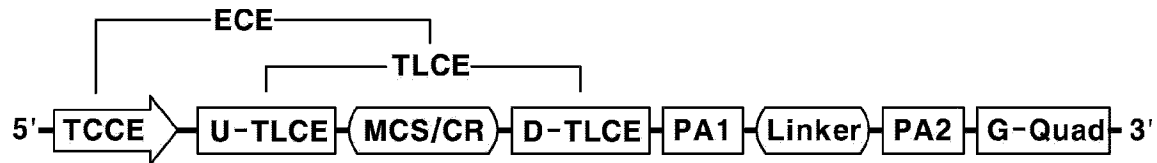
- 약학적 유효량의 제 1항에 기재된 면역증강제를 포함하는 백신 조성물.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서,
상기 핵산 분자는 상기 발현 조절 요소와 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 제한효소 인식 서열 또는 제한효소 절단 서열, 또는 상기 발현 조절 요소와 작동 가능하게 연결되는 코딩 영역을 더욱 포함하는 백신 조성물.
- [청구항 14] 제 12항에 있어서, 상기 발현 조절 요소는 제 1 번역 조절 요소와, 상기 제 1 번역 조절 요소의 하류에 위치하는 제 2 번역 조절 요소를 포함하는 백신 조성물.
- [청구항 15] 제 14항에 있어서, 상기 발현 조절 요소는 상기 제 1 번역 조절 요소의 상류에 위치하는 전사 조절 요소를 더욱 포함하는 백신 조성물.
- [청구항 16] 제 12항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 발현 조절 요소의 하류에 위치하는 제 1 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 제 1 폴리아데노신 서열 중에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드 서열을 더욱 포함하는 백신 조성물.
- [청구항 17] 제 16항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 제 1 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 상기 제 1 폴리아데노신 서열의 하류에 위치하는 제 2 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 제 2 폴리아데노신 서열을 더욱 포함하는 백신 조성물.
- [청구항 18] 제 17항에 있어서, 상기 핵산 분자는 상기 제 2 폴리아데닐레이션 신호 서열 또는 상기 제 2 폴리아데노신 서열의 하류에 위치하며, 하기 식 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 전사체 서열을 더욱 포함하는 백신 조성물.
- [식 1]

$$5'\text{-G}_m\text{X}_n\text{G}_p\text{X}_q\text{G}_r\text{X}_s\text{G}_t\text{-}3'$$
식 1에서, G는 구아노신을 나타내고, X는 아데노신, 사이티딘 및 티미딘 중 하나임; m, p, r 및 t는 각각 독립적으로 1 내지 10의 정수임; n, q 및 s는 각각 독립적으로 0 내지 10의 정수임.
- [청구항 19] 제 12항에 있어서, 상기 발현 조절 요소는 솔레놉시스 인빅타 바이러스 1 (SINV-1)에서 유래한 IRES 활성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 백신 조성물.
- [청구항 20] 제 11항에 있어서,
상기 백신 조성물은 지질나노입자, 핵산 안정화제 및 다른 면역증강제 중에서 적어도 하나를 더욱 포함하는 백신 조성물.

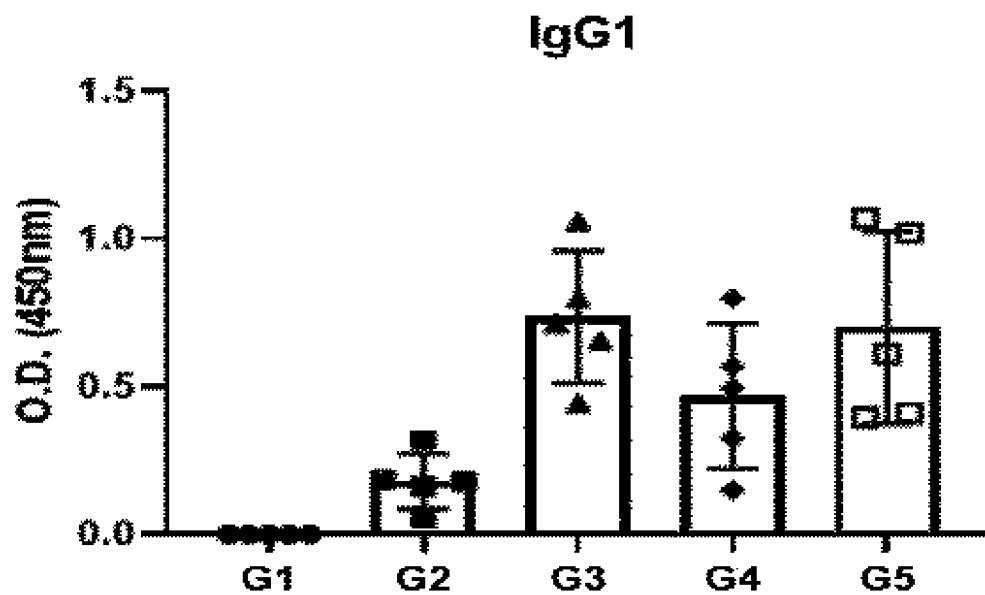
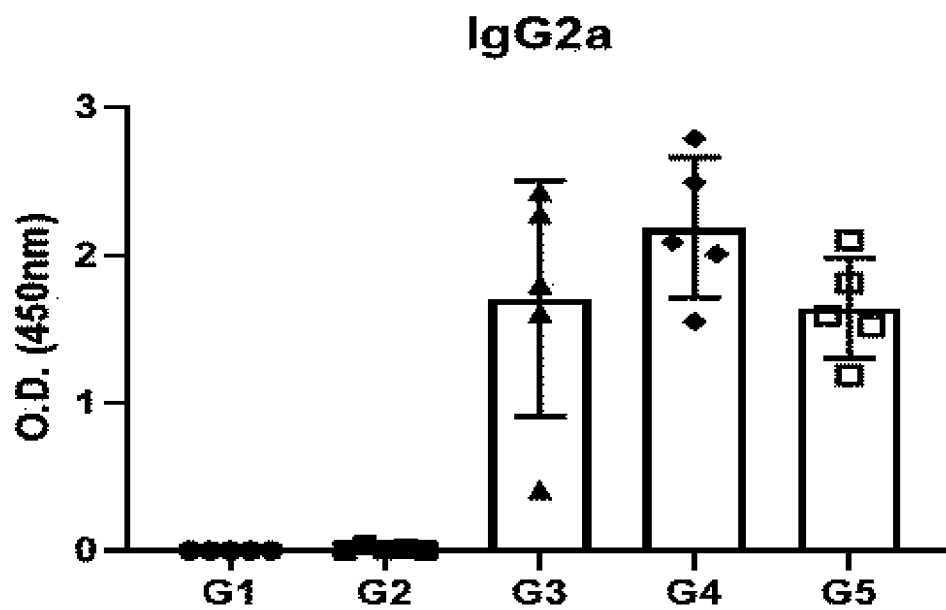
[도1]



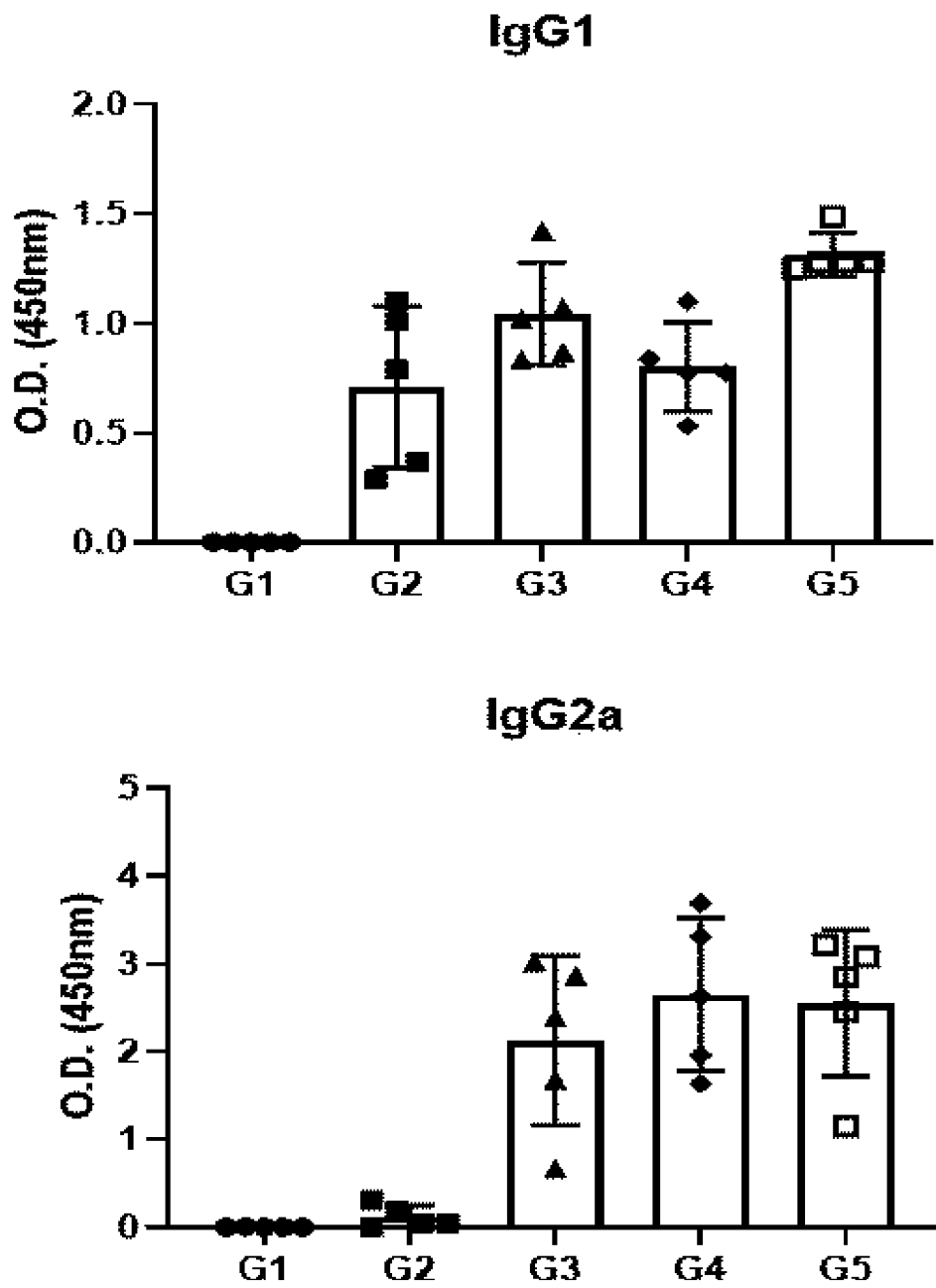
[도2]



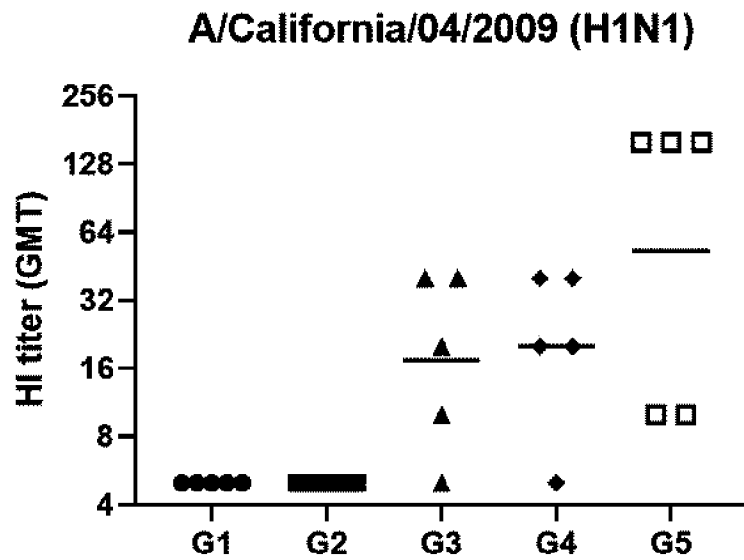
[도3]



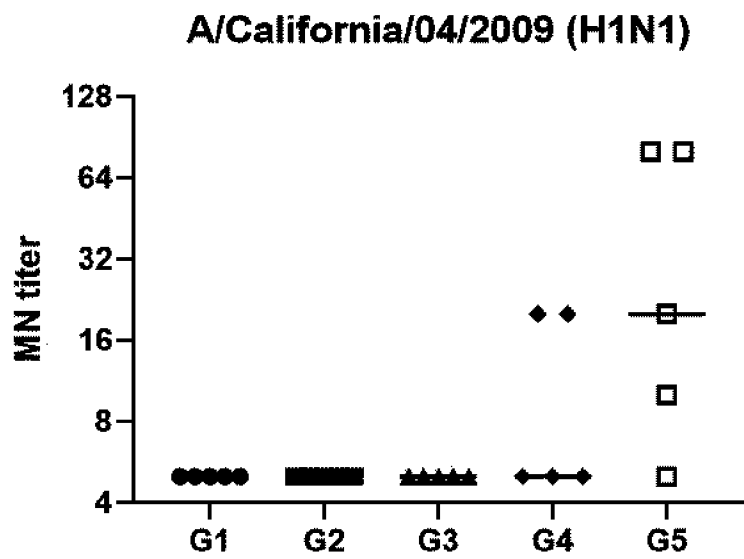
[도4]



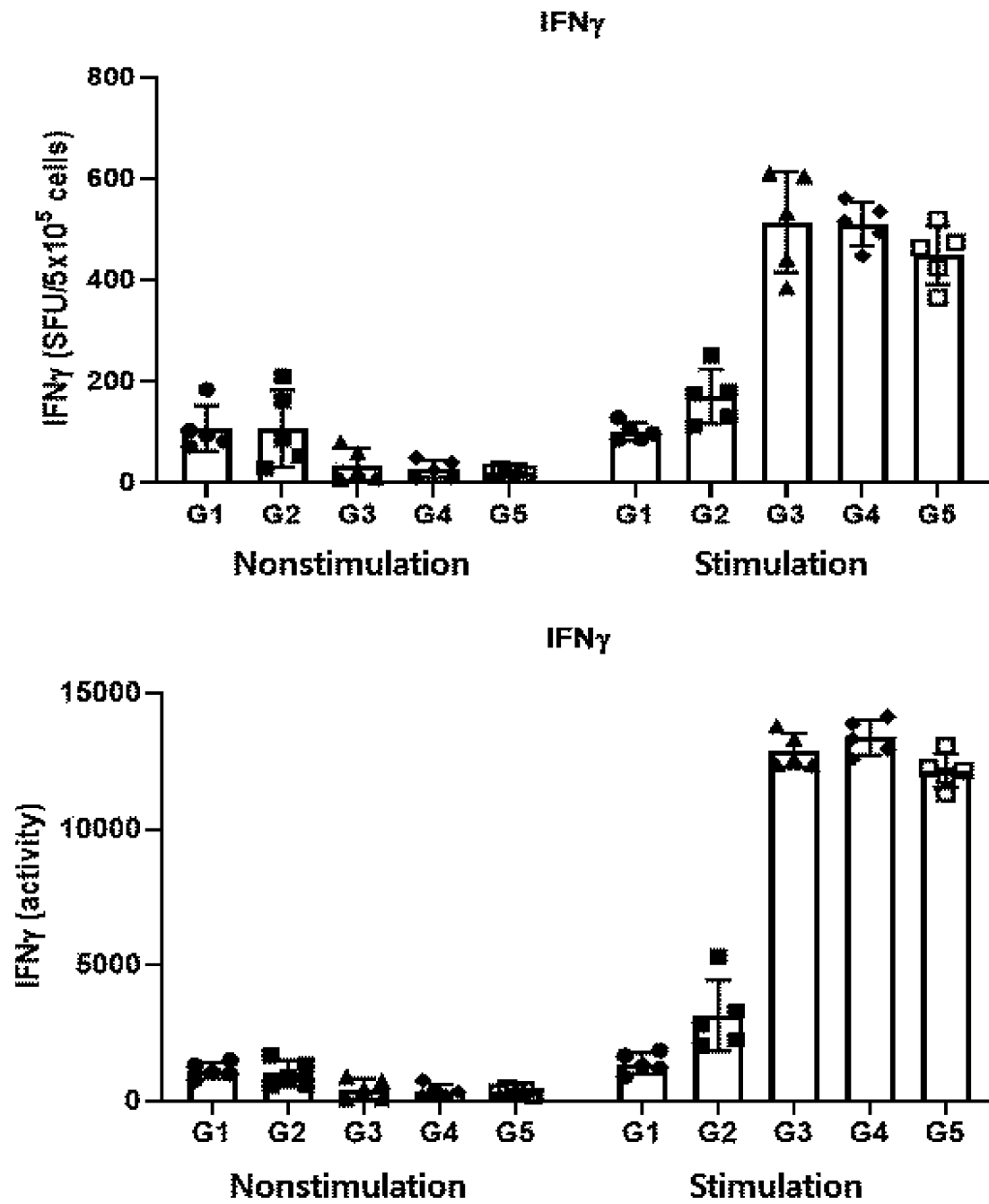
[도5]



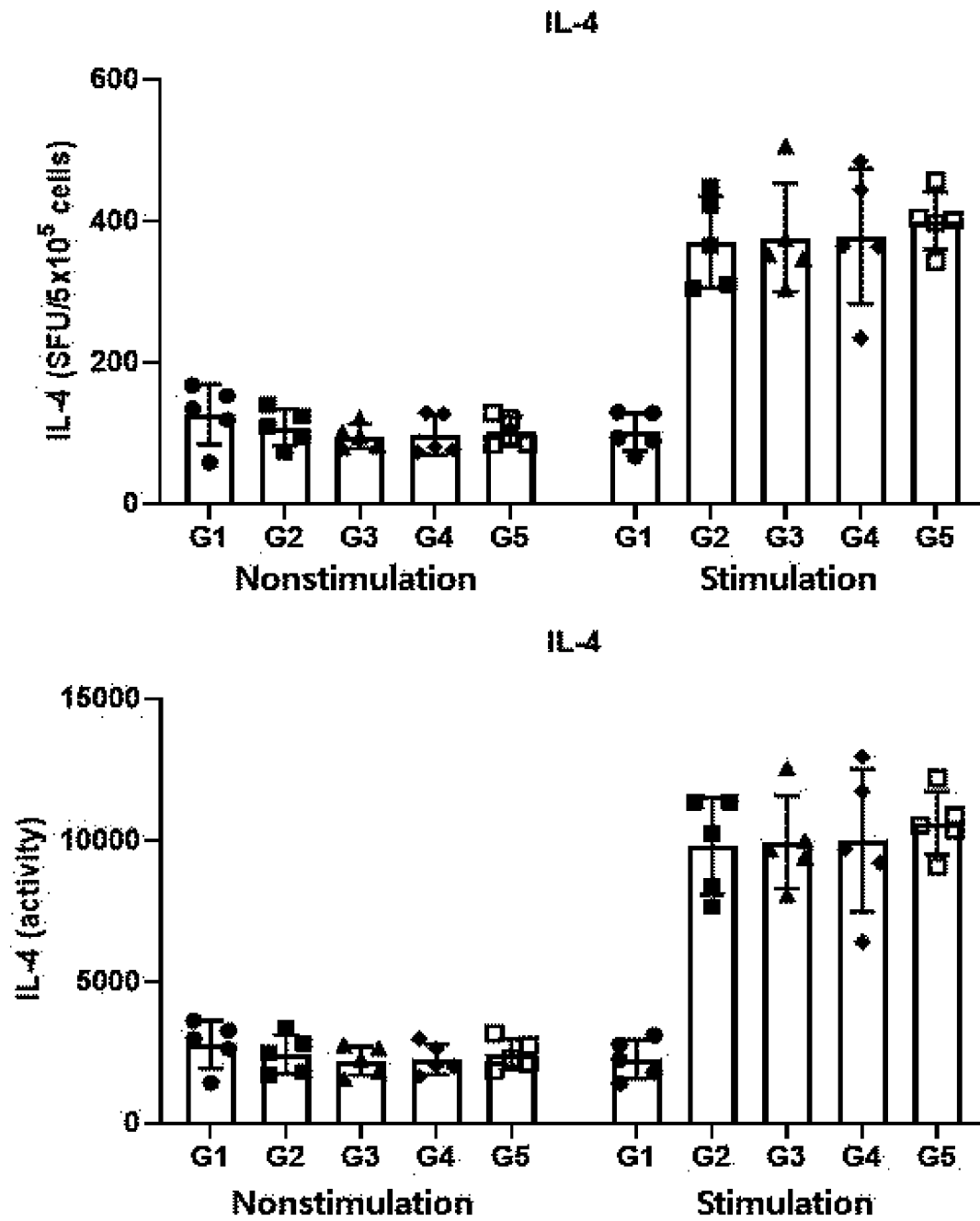
[도6]



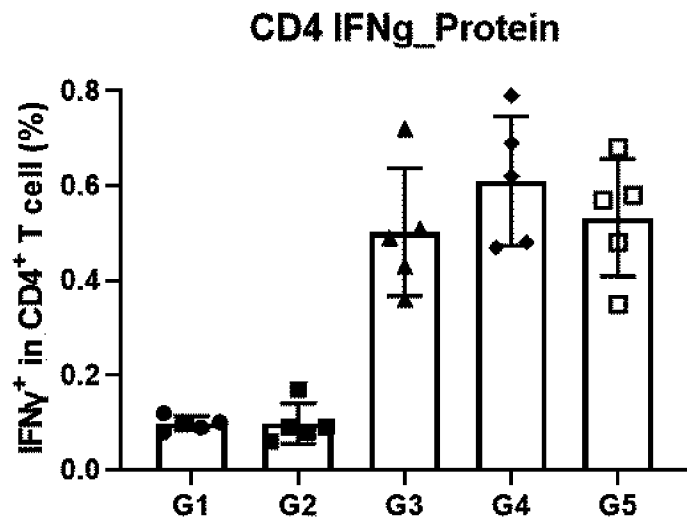
[도7]



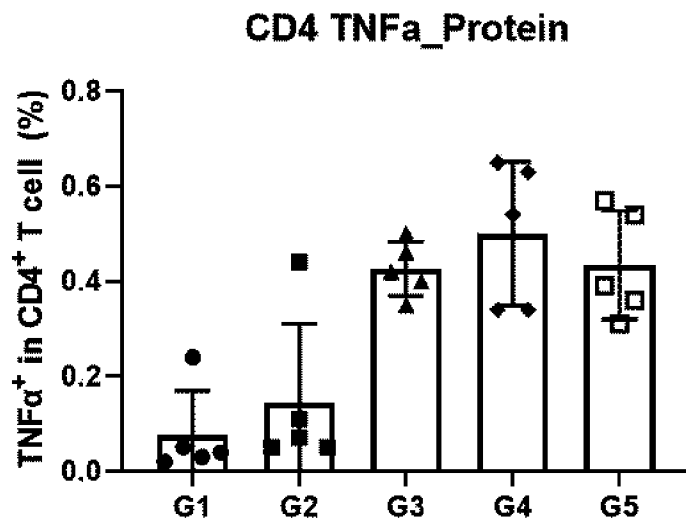
[도8]



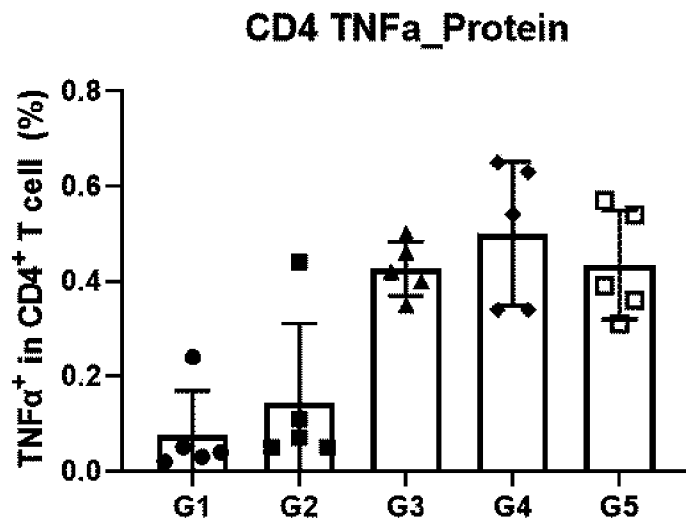
[도9]



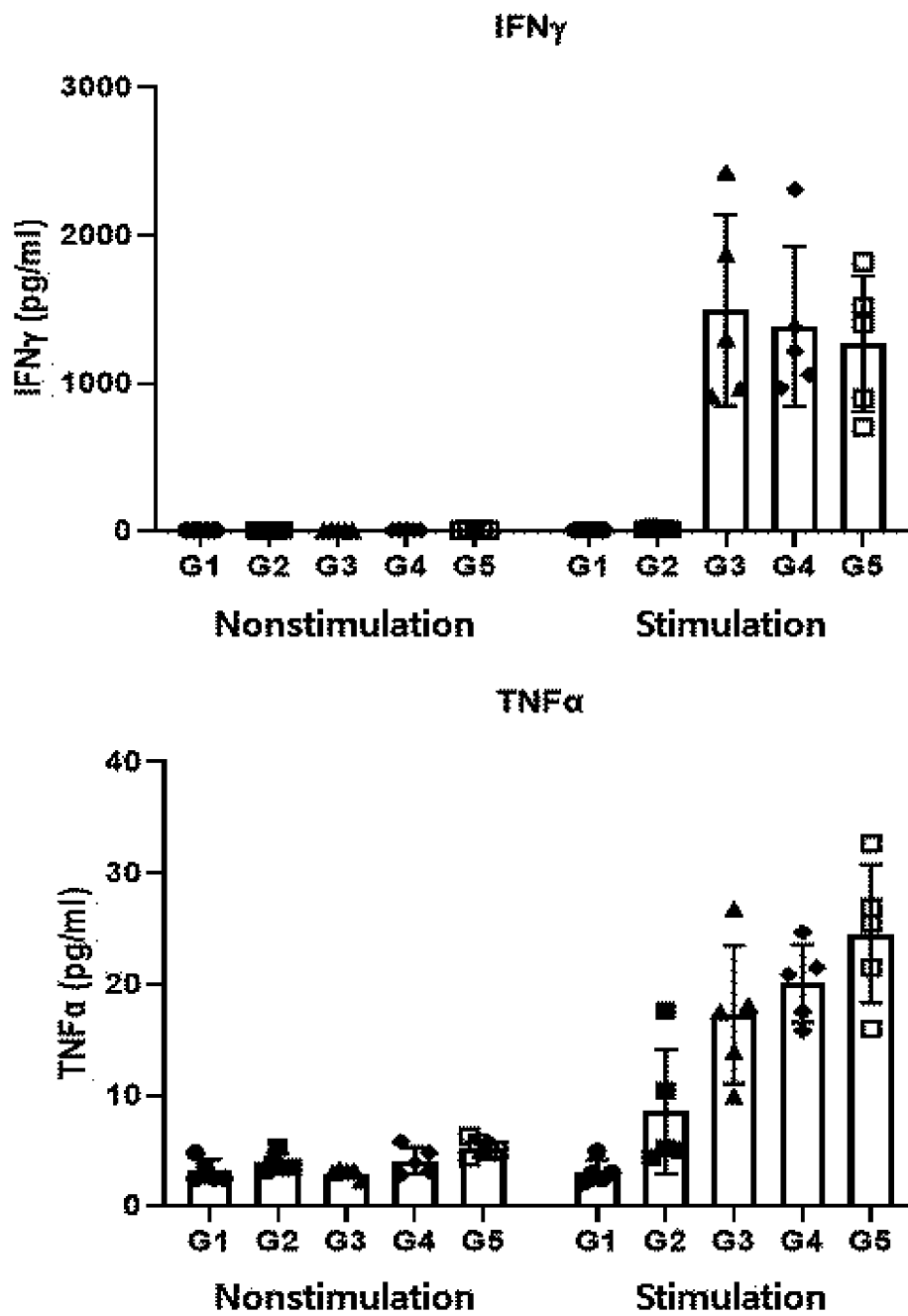
[도10]



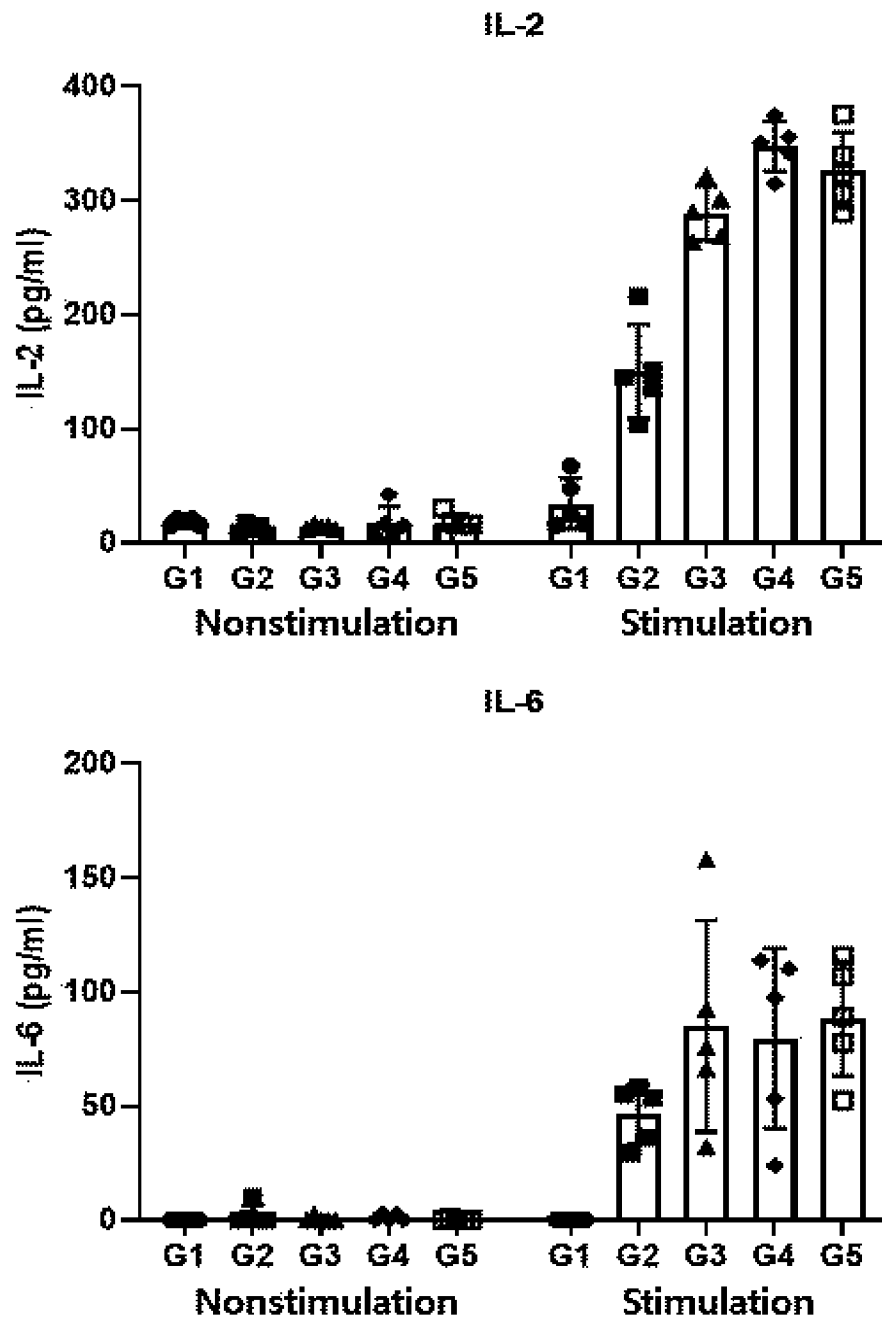
[도11]



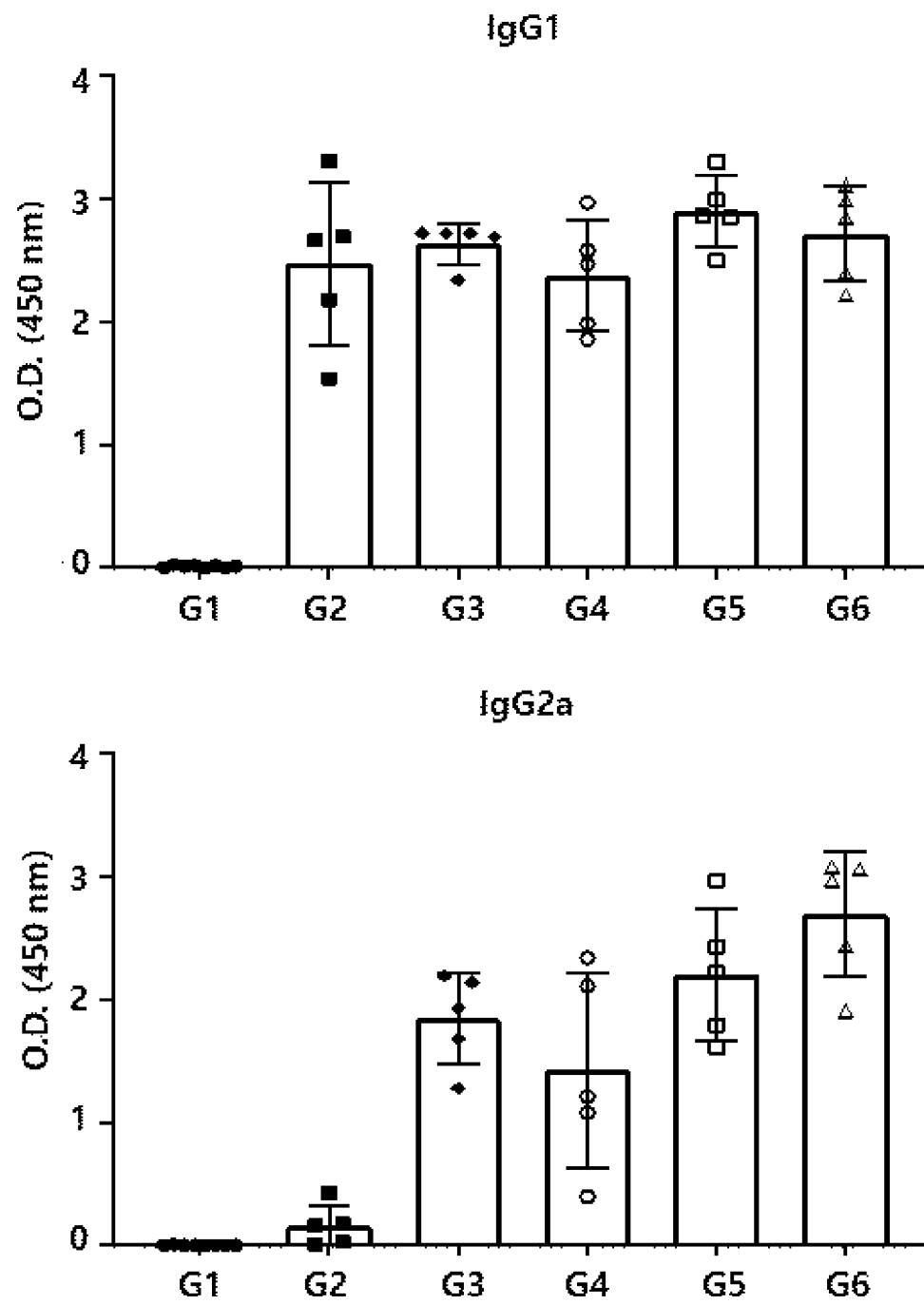
[도12]



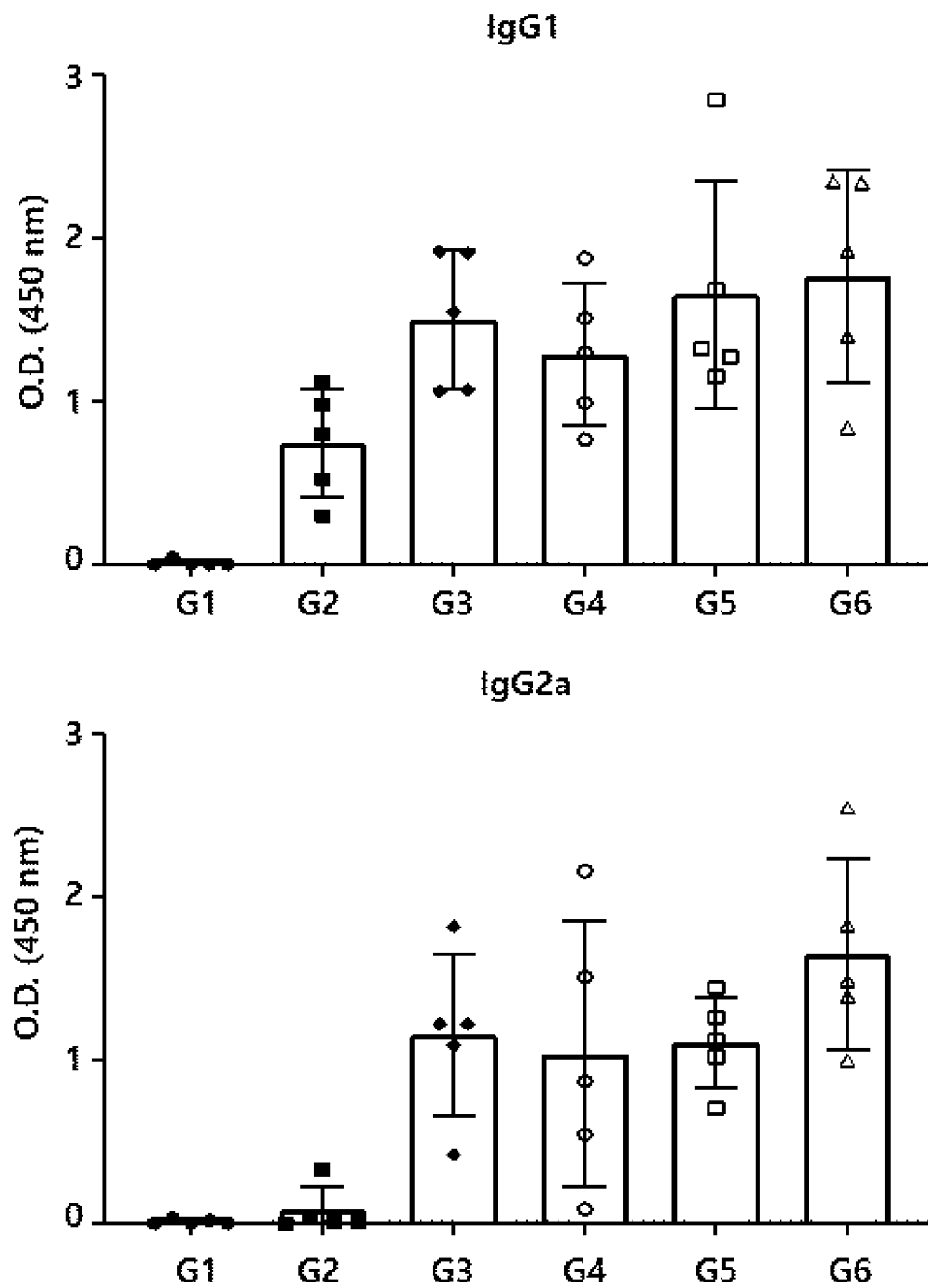
[도13]



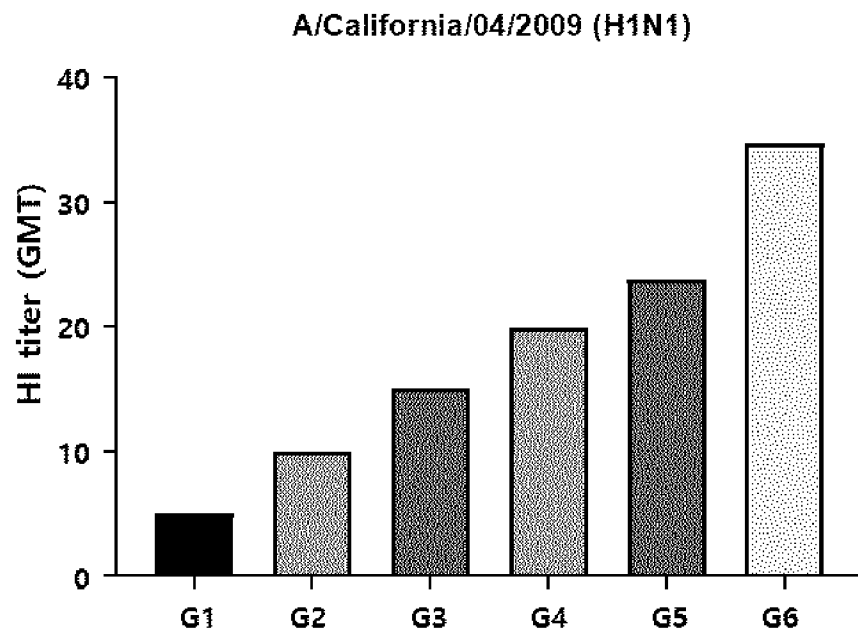
[도14]



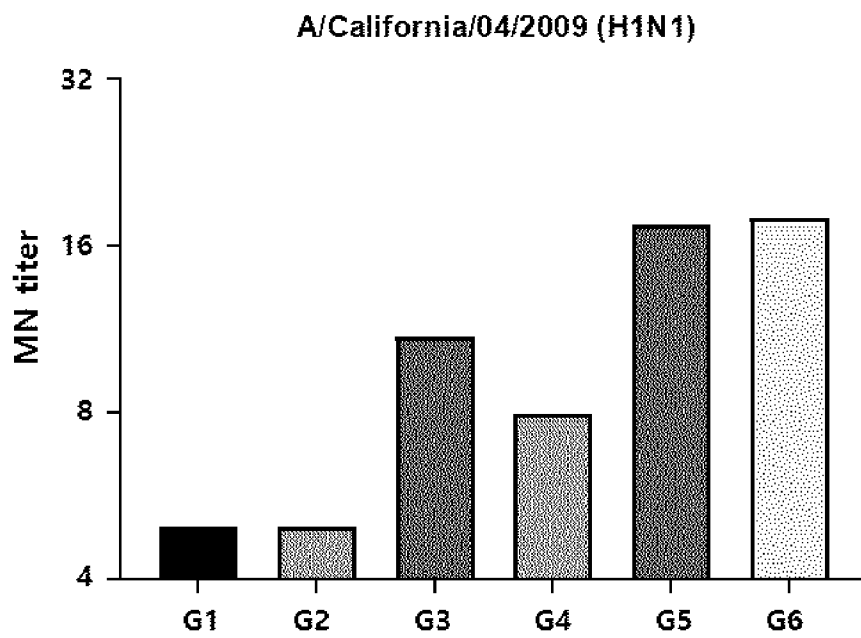
[도15]



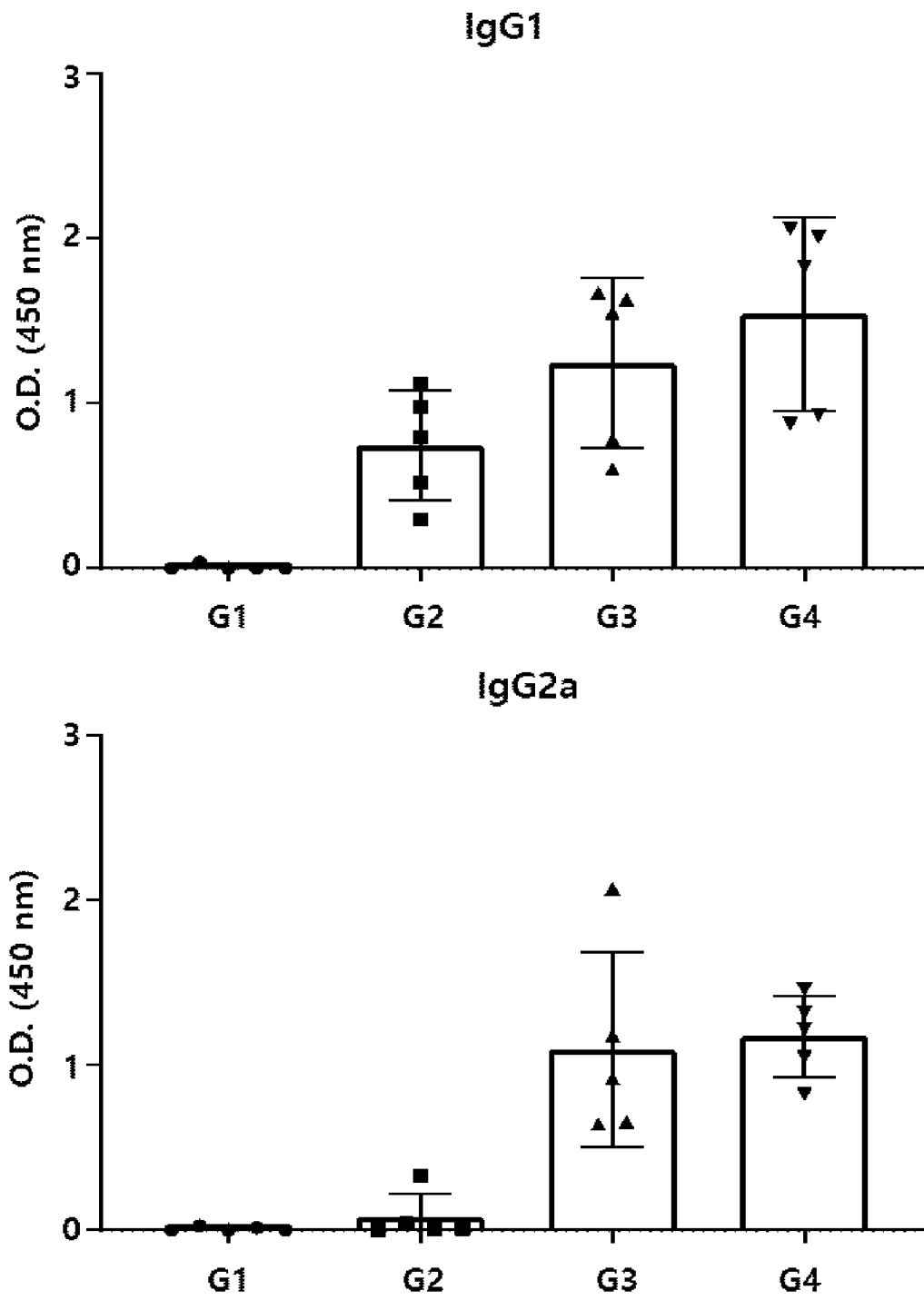
[도16]



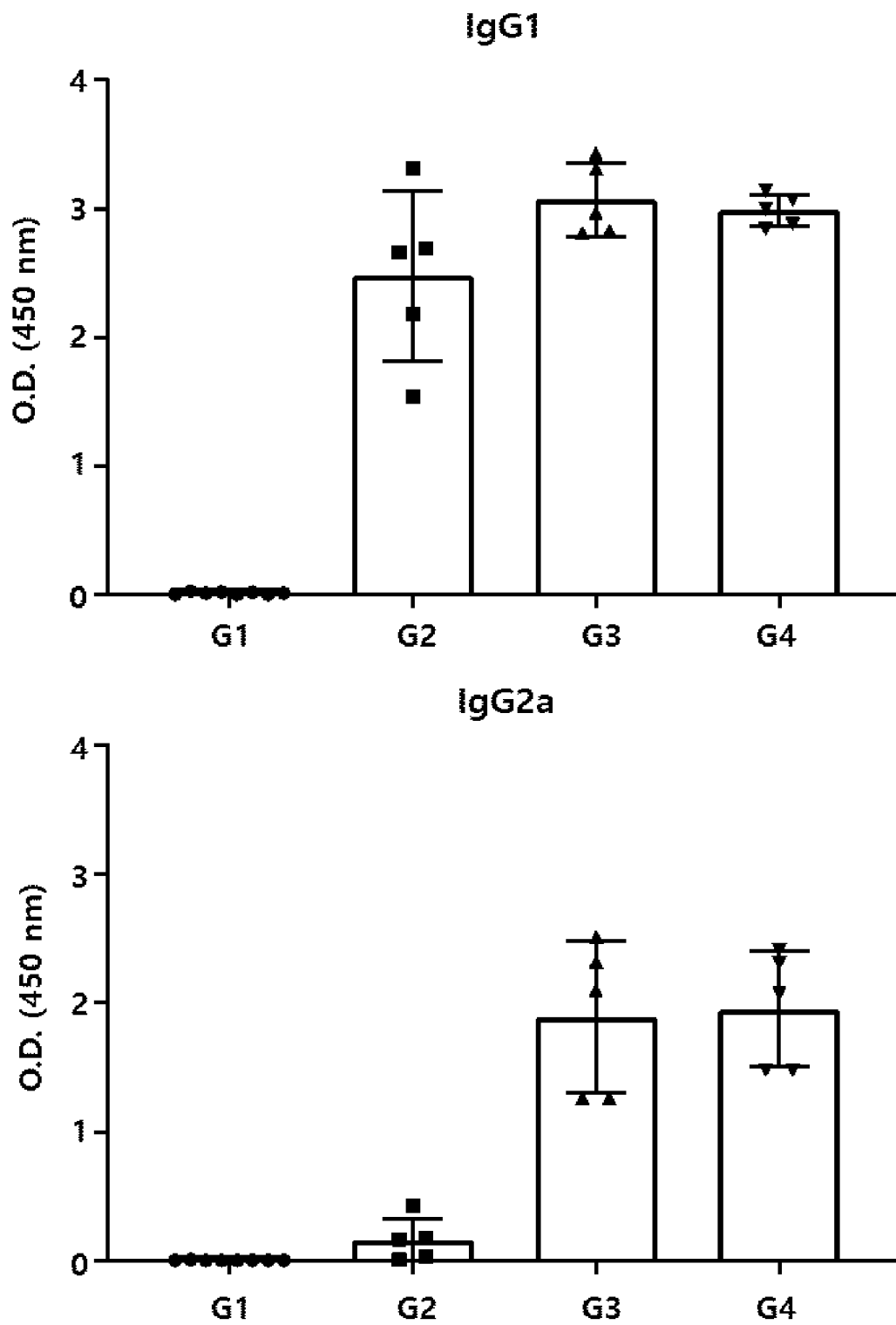
[도17]



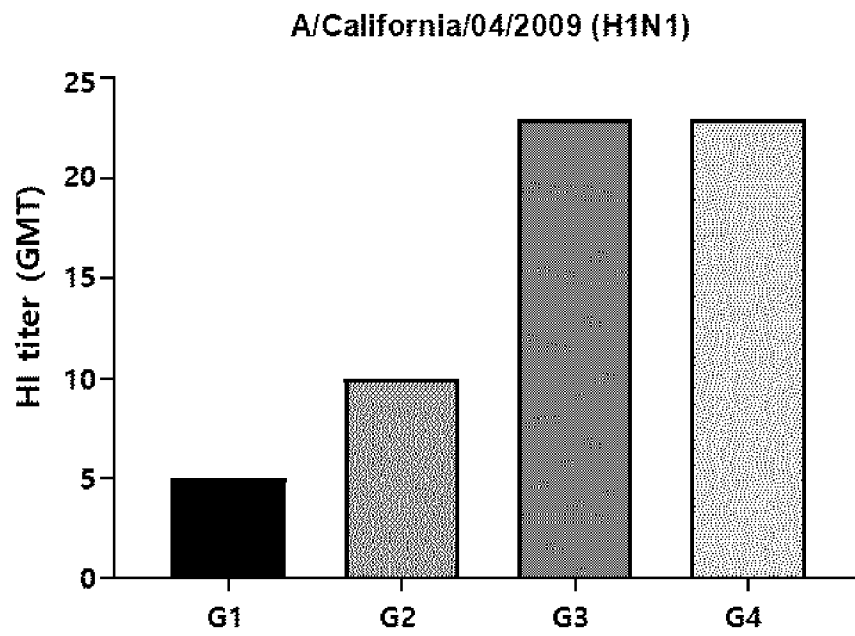
[도18]



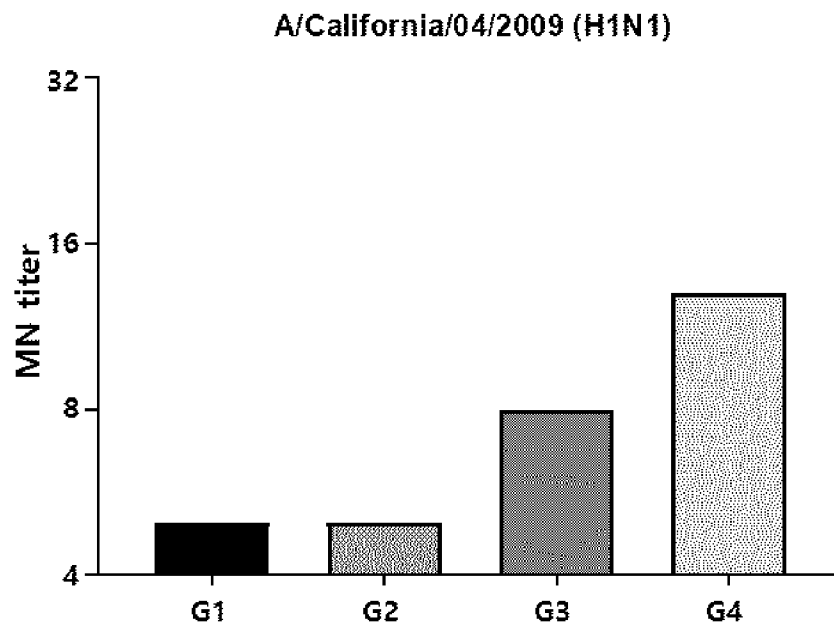
[도19]



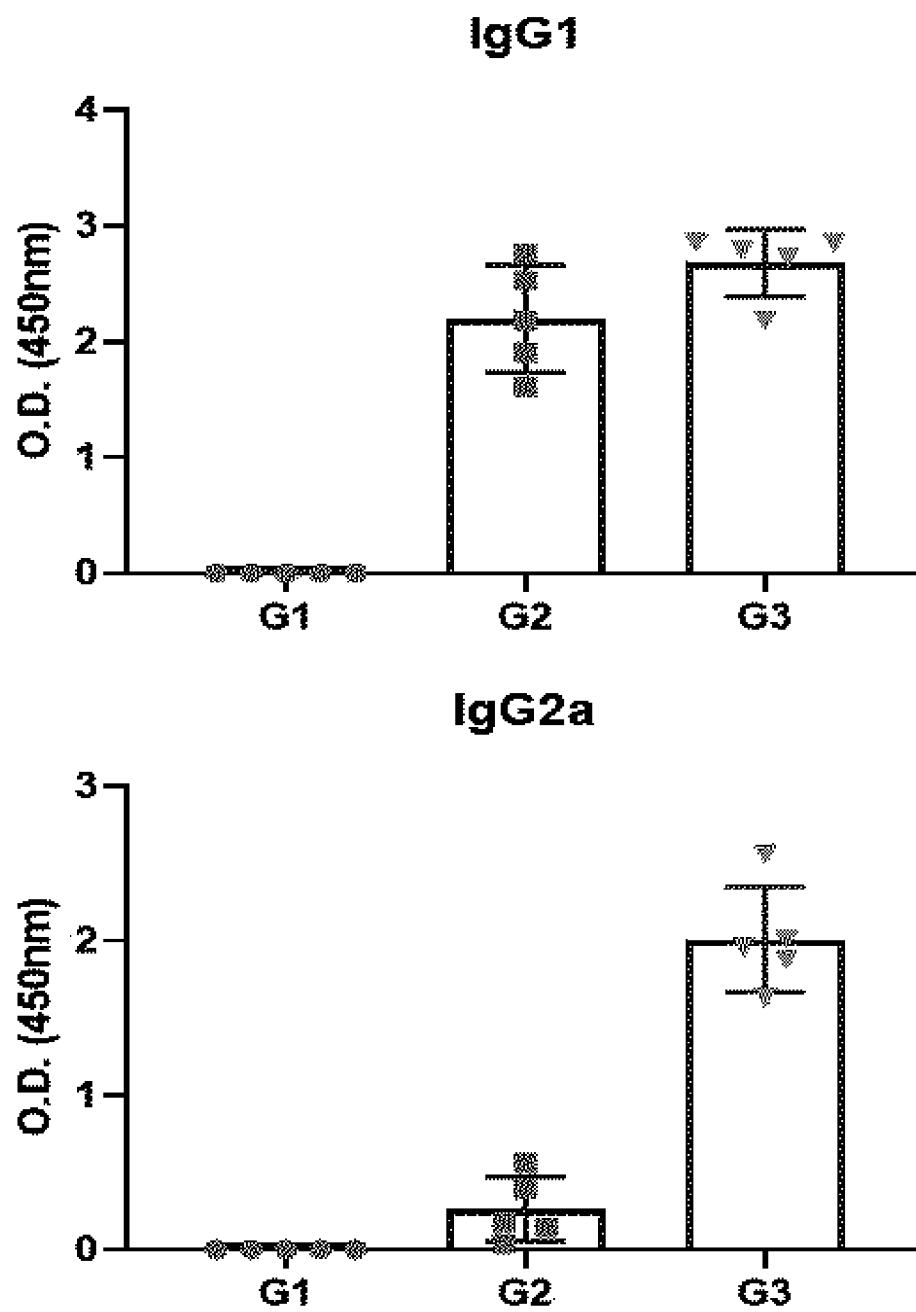
[도20]



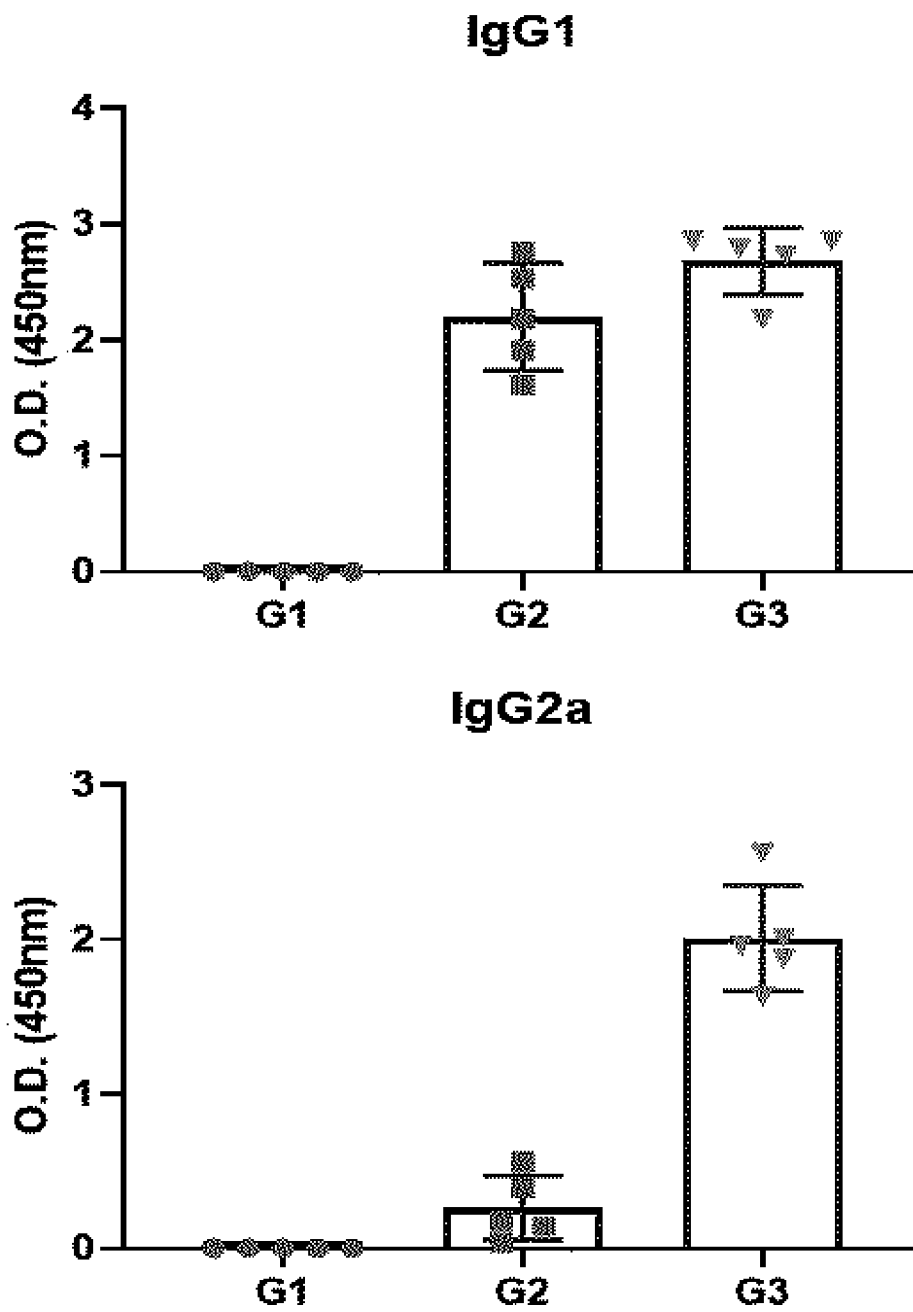
[도21]



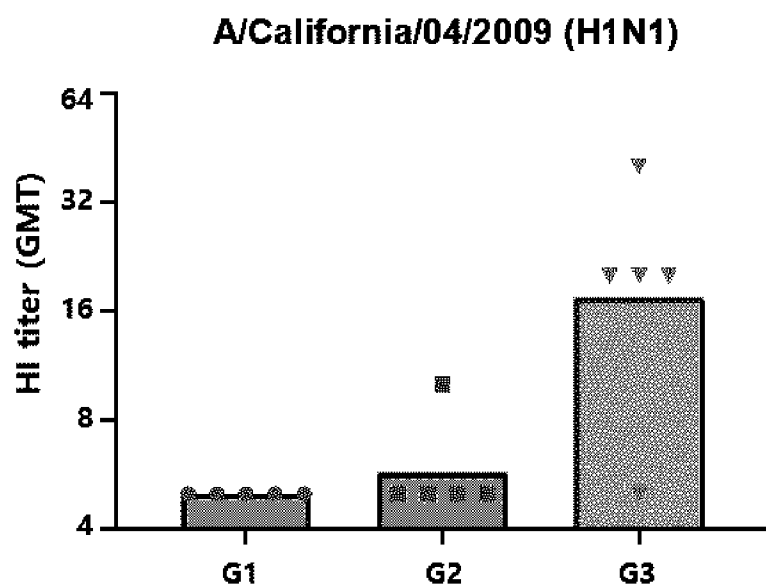
[도22]



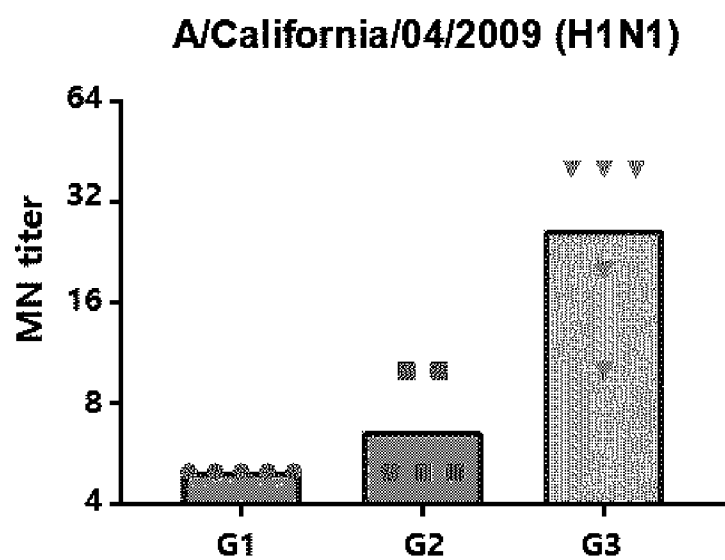
[도23]



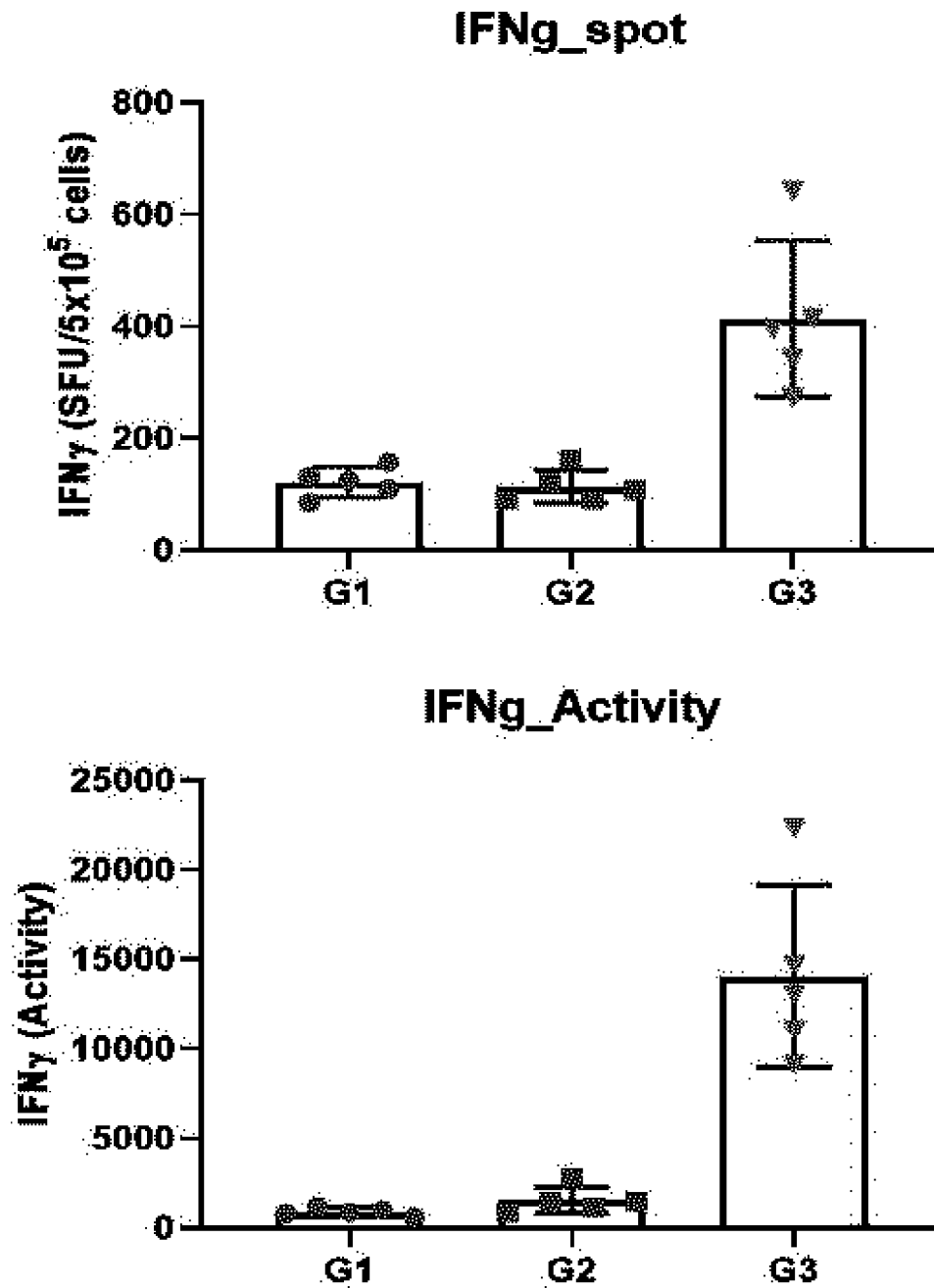
[도24]



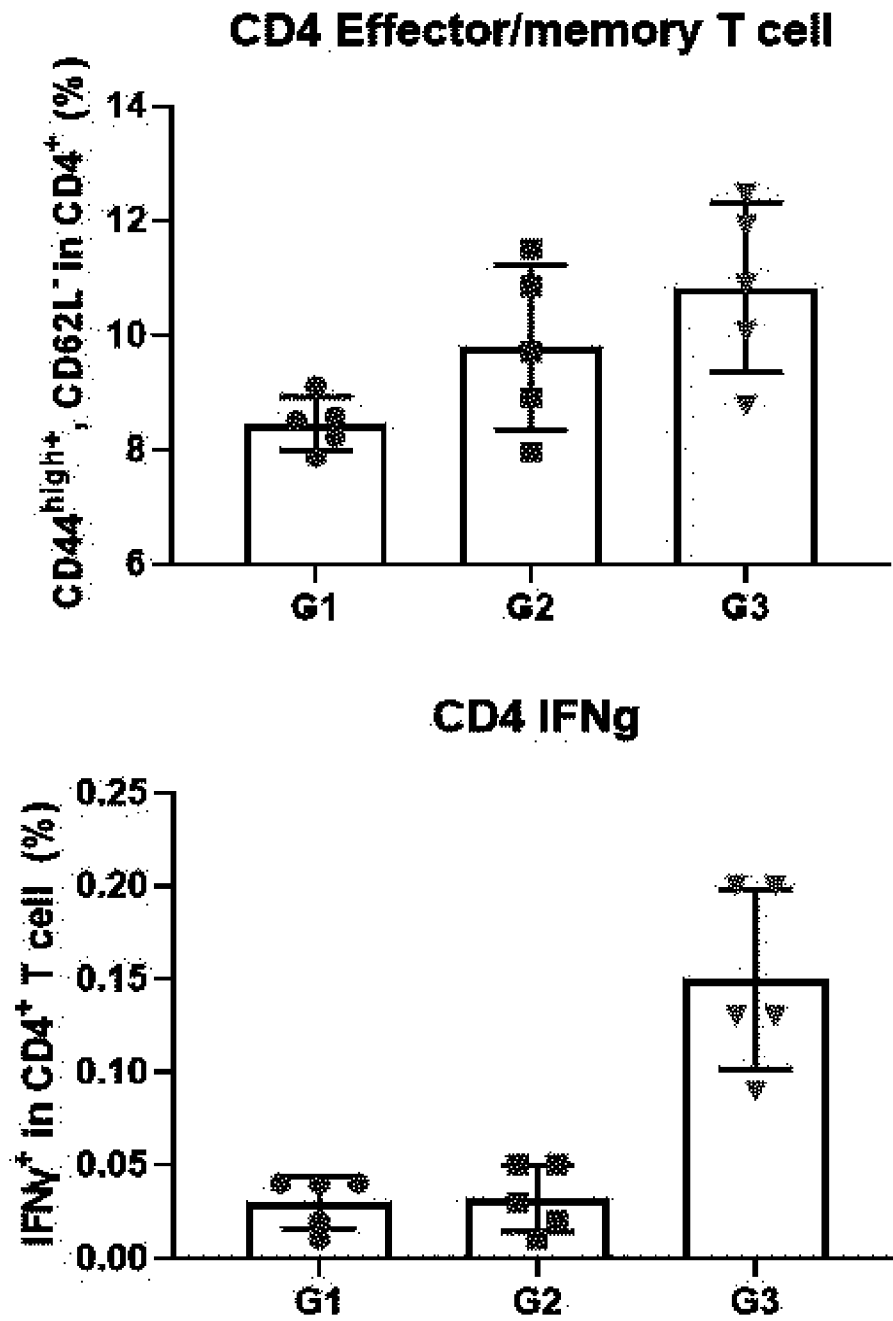
[도25]



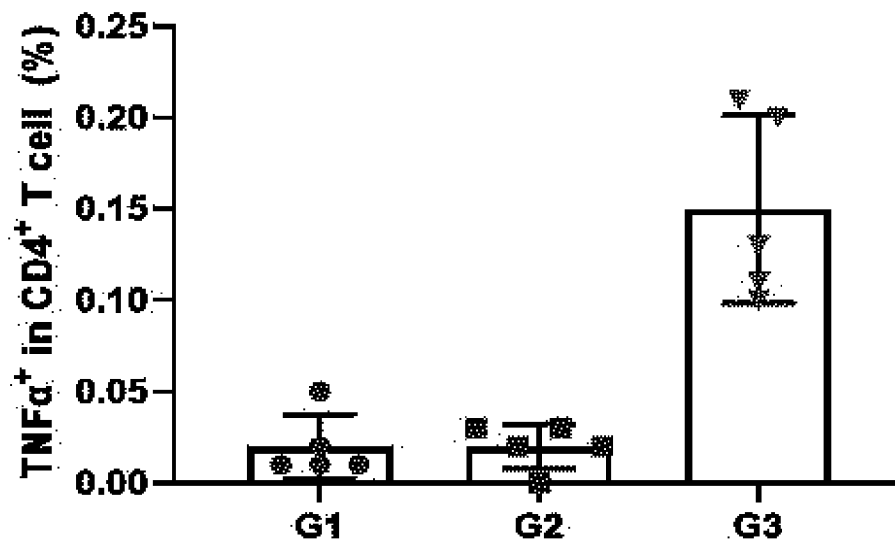
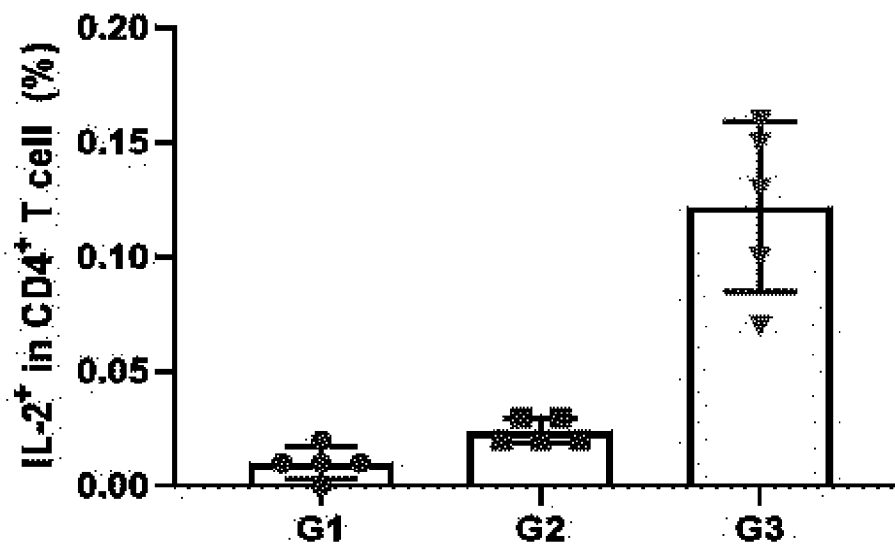
[도26]



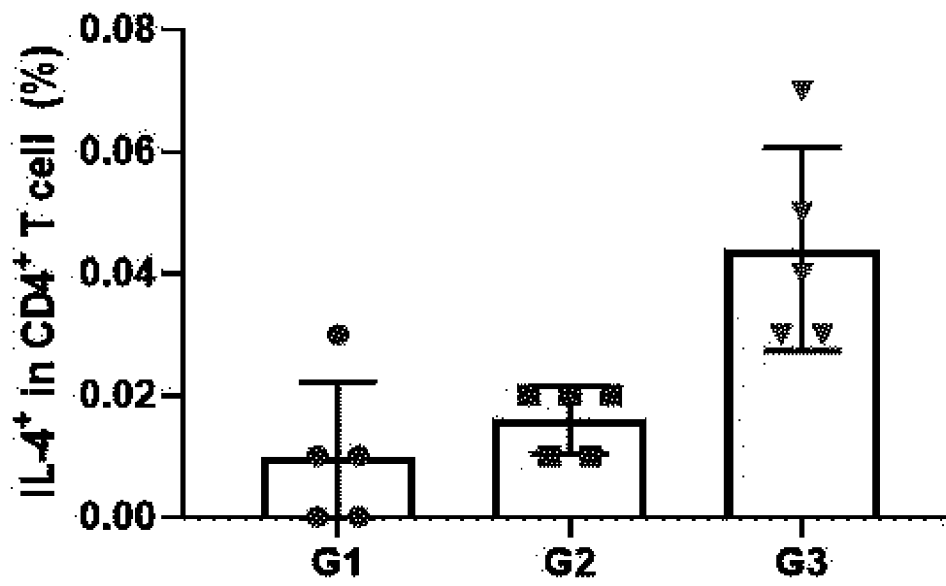
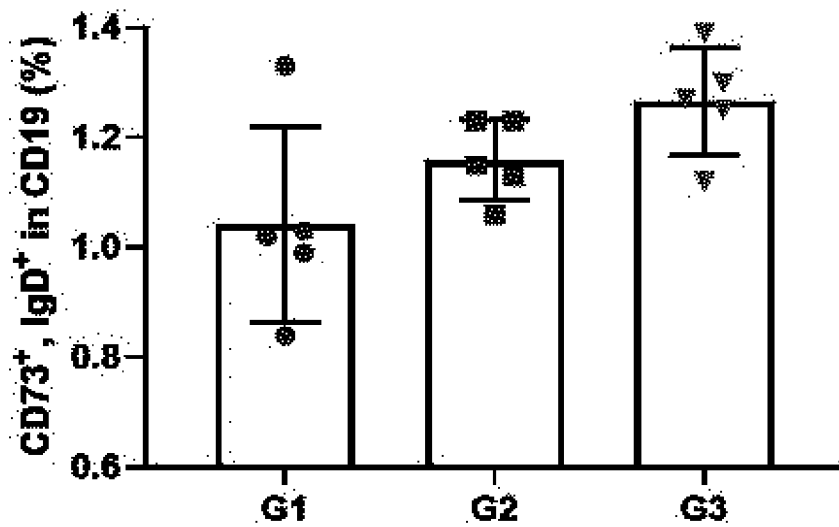
[도27]



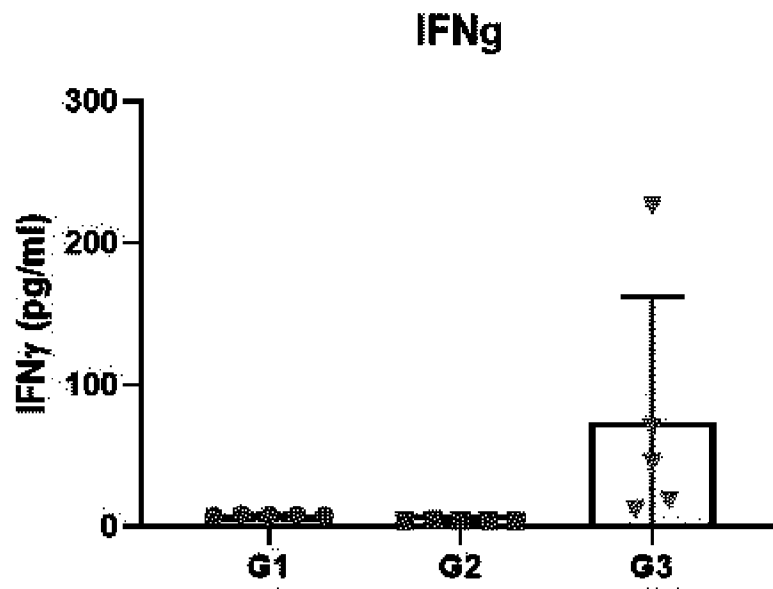
[도28]

CD4 TNF α **CD4 IL-2**

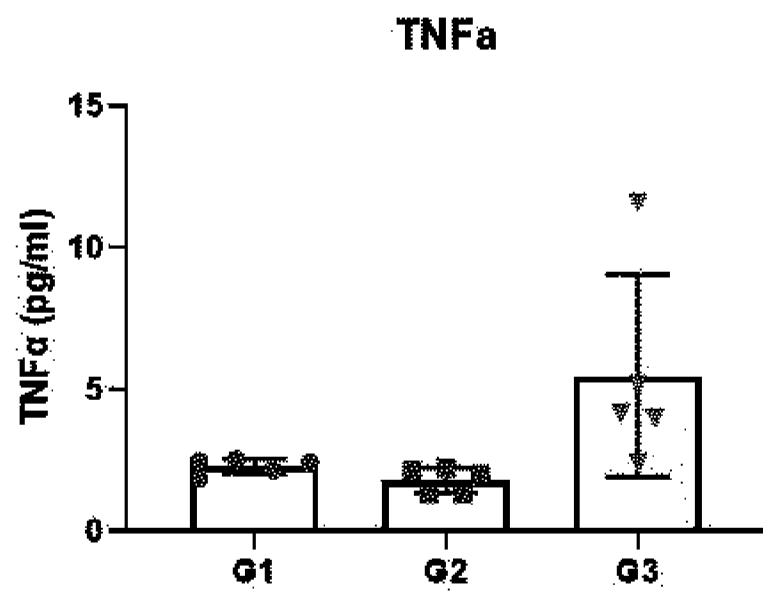
[도29]

CD4 IL-4**Memory B cell_Flu**

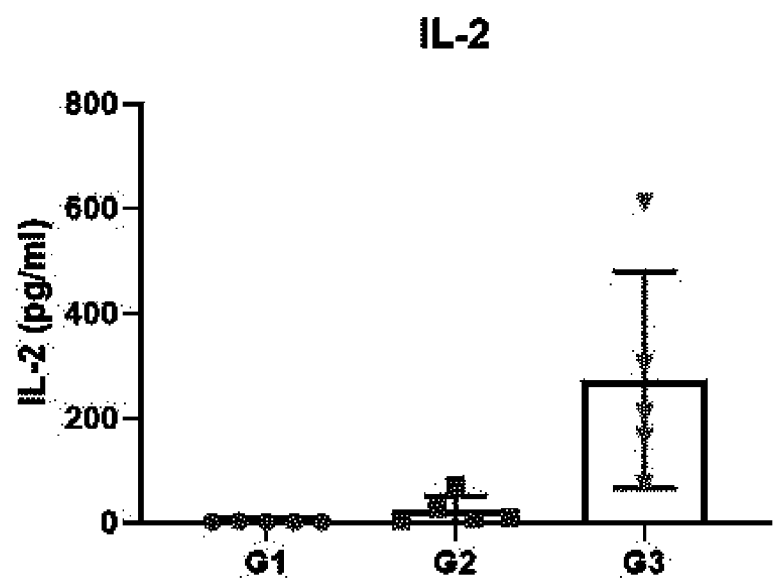
[도30]



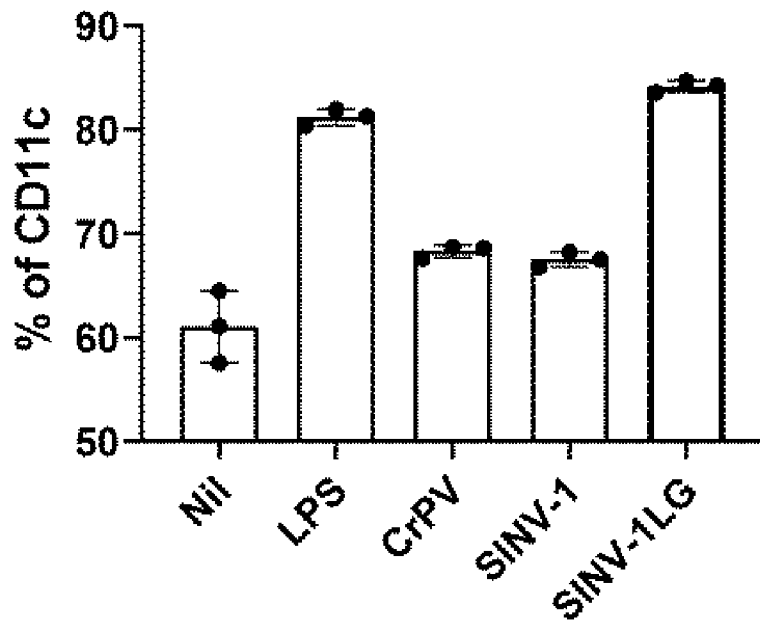
[도31]



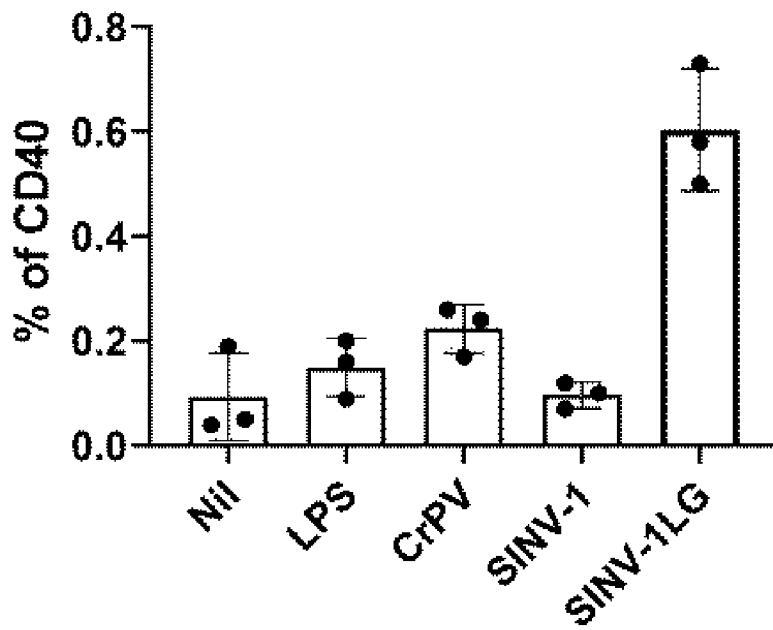
[도32]



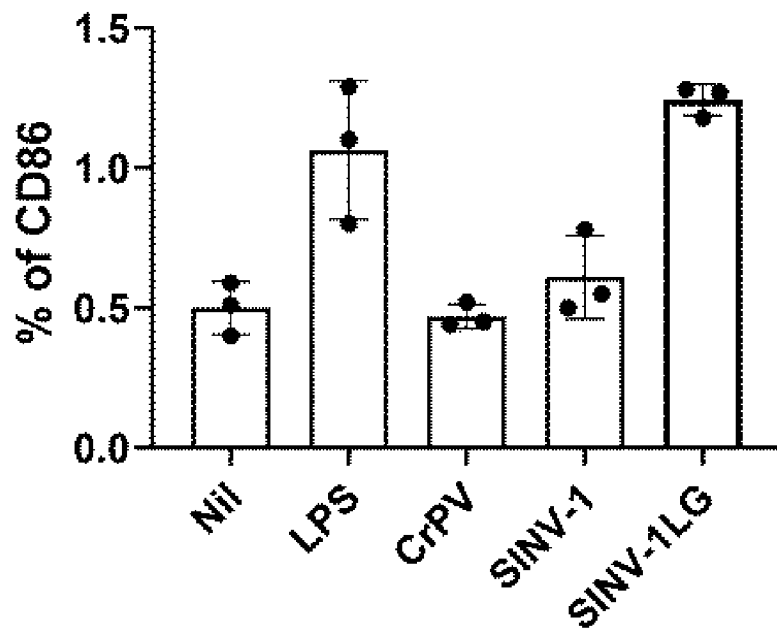
[도33]



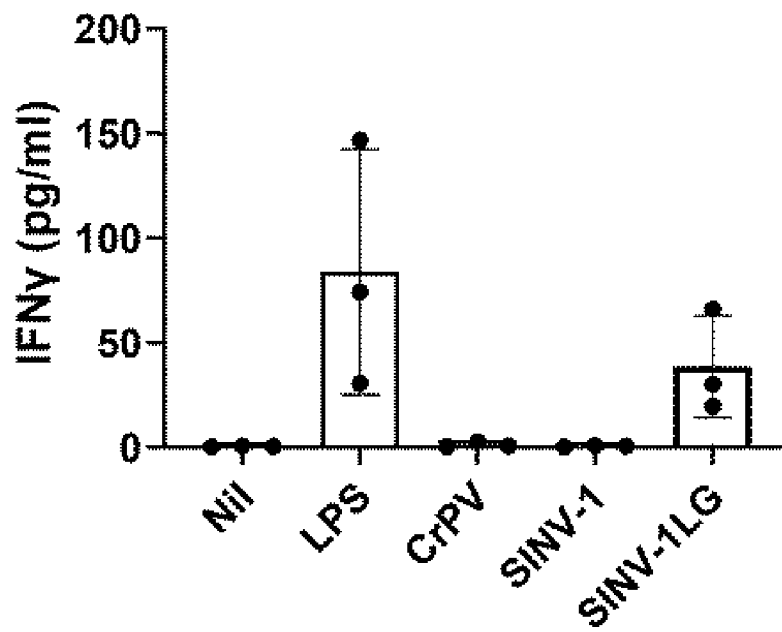
[도34]



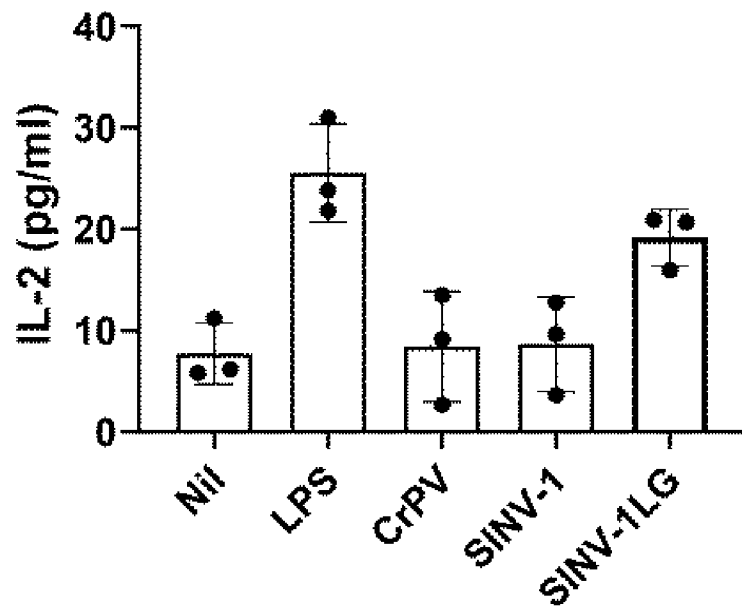
[도35]



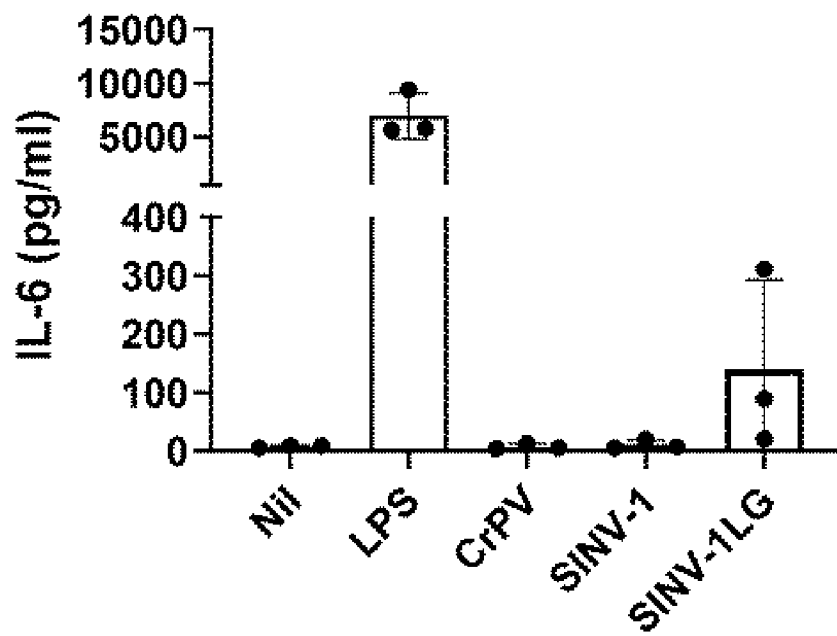
[도36]



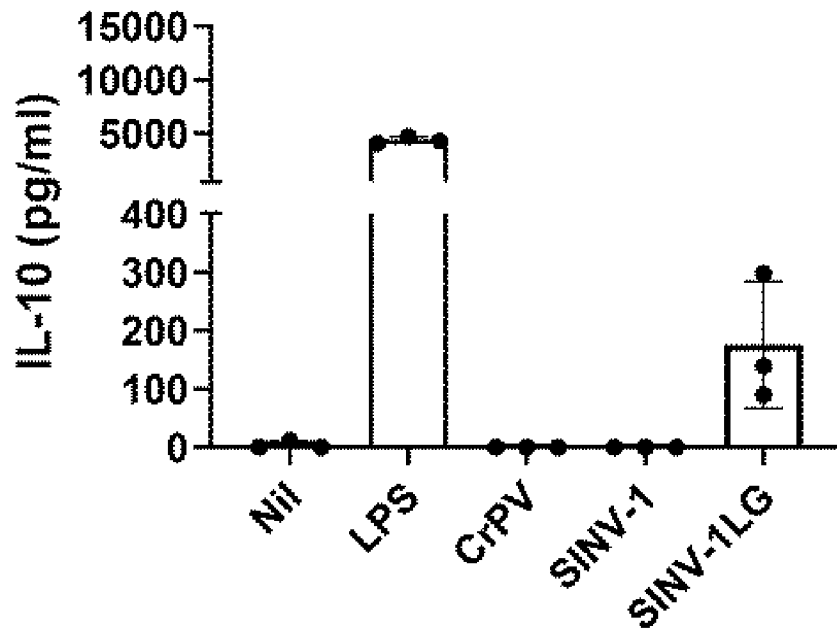
[도37]



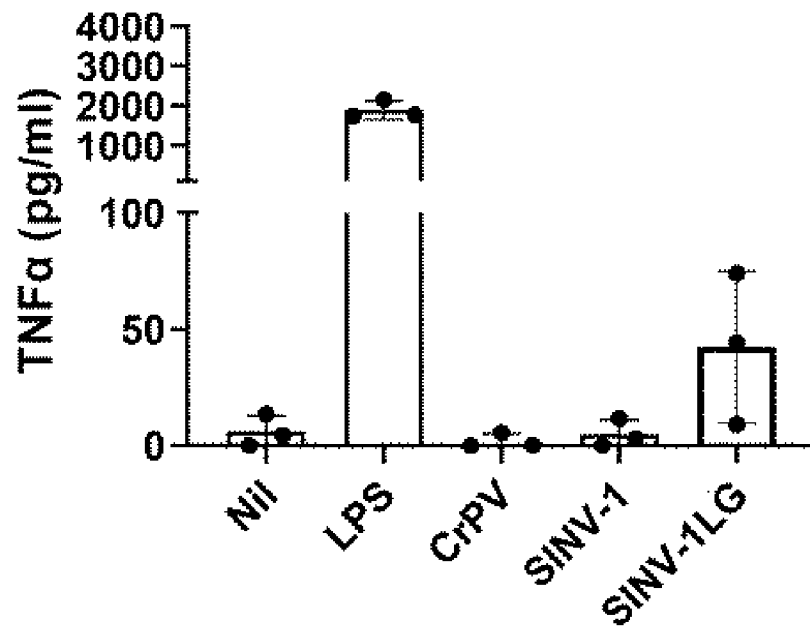
[도38]



[도39]



[도40]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/008736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/39(2006.01)i; C12N 15/66(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)

A61K 39/39(2006.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/12(2006.01); A61K 39/145(2006.01);
A61K 48/00(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: 솔레놉시스 인빅타 바이러스(solenopsis invicta virus, SINV), 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site, IRES), 발현 조절 요소(expression control element), 번역 조절 요소(translation control element, TLCE), 폴리아데노신(polyadenosine)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2075581 B1 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 10 February 2020 (2020-02-10) See entire document.	1-4,7-20
A	KWAK, H. W. et al. Cricket paralysis virus internal ribosome entry site-derived RNA promotes conventional vaccine efficacy by enhancing a balanced Th1/Th2 response. Vaccine. (electronic publication) 29 July 2019, vol. 37, pp. 5191-5202. See entire document.	1-4,7-20
A	PARK, H. et al. Evaluation of the safety profile of ssRNA adjuvant derived from the IGR IRES region of CrPV. The Journal of Immunology. 01 May 2019, vol. 202, 1_Supplement. See entire document.	1-4,7-20
A	US 10736957 B2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 11 August 2020 (2020-08-11) See entire document.	1-4,7-20



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

26 September 2023

Date of mailing of the international search report

26 September 2023

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/KR2023/008736

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020-237227 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY et al.) 26 November 2020 (2020-11-26) See entire document.	1-4,7-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/008736

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.: **5-6**
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 5-6 specify sequences, but since the sequences did not appear in the description, claims and drawings during the initial application, that which is indicated thereby cannot be concretely specified, and thus a meaningful international search cannot be carried out.
3. ☐ Claims Nos.:
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/KR2023/008736

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
KR	10-2075581	B1	10 February 2020	CN	112119162	A	22 December 2020
				KR	10-2019-0125035	A	06 November 2019
				US	2021-0340550	A1	04 November 2021
				WO	2019-209079	A1	31 October 2019
<hr/>							
US	10736957	B2	11 August 2020	US	2019-0184006	A1	20 June 2019
				WO	2019-126334	A1	27 June 2019
<hr/>							
WO	2020-237227	A1	26 November 2020	AU	2019-280583	A1	03 December 2020
				AU	2019-280583	B2	15 December 2022
				AU	2020-280105	A1	20 January 2022
				AU	2020-397956	A1	07 July 2022
				AU	2021-269137	A1	15 December 2022
				AU	2021-276410	A1	19 January 2023
				AU	2023-201630	A1	13 April 2023
				BR	112020024292	A2	02 March 2021
				BR	112021023411	A2	01 February 2022
				BR	112022023554	A2	11 April 2023
				CA	3100276	A1	12 December 2019
				CA	3139032	A1	26 November 2020
				CA	3160739	A1	10 June 2021
				CA	3178111	A1	11 November 2021
				CA	3179423	A1	25 November 2021
				CN	112399860	A	23 February 2021
				CN	115052635	A	13 September 2022
				CN	115867291	A	28 March 2023
				EP	3801639	A1	14 April 2021
				EP	3920976	A2	15 December 2021
				EP	3920976	B1	19 July 2023
				EP	3972653	A1	30 March 2022
				EP	4146285	A2	15 March 2023
				EP	4153244	A1	29 March 2023
				JP	2021-526792	A	11 October 2021
				JP	2022-533796	A	25 July 2022
				JP	2023-504568	A	03 February 2023
				JP	2023-525270	A	15 June 2023
				JP	2023-527309	A	28 June 2023
				KR	10-2021-0018323	A	17 February 2021
				KR	10-2022-0027855	A	08 March 2022
				US	11203767	B2	21 December 2021
				US	11352640	B2	07 June 2022
				US	11352641	B2	07 June 2022
				US	11447796	B2	20 September 2022
				US	11603396	B2	14 March 2023
				US	2020-0080106	A1	12 March 2020
				US	2021-0198688	A1	01 July 2021
				US	2021-0363540	A1	25 November 2021
				US	2021-0371494	A1	02 December 2021
				US	2021-0403944	A1	30 December 2021
				US	2022-0025395	A1	27 January 2022
				US	2022-0177540	A1	09 June 2022
				US	2022-0323480	A1	13 October 2022

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/008736

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 2023-0050306 A1	16 February 2023
		US 2023-0058784 A1	23 February 2023
		US 2023-0062665 A1	02 March 2023
		WO 2019-236673 A1	12 December 2019
		WO 2021-113777 A2	10 June 2021
		WO 2021-113777 A3	02 September 2021
		WO 2021-226597 A2	11 November 2021
		WO 2021-226597 A3	03 March 2022
		WO 2021-236855 A1	25 November 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 39/39(2006.01)i; C12N 15/66(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 39/39(2006.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/12(2006.01); A61K 39/145(2006.01); A61K 48/00(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: 솔레놉시스 인빅타 바이러스(solenopsis invicta virus, SINV), 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site, IRES), 발현 조절 요소(expression control element), 번역 조절 요소(translation control element, TLCE), 폴리아데노신(polyadenosine)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2075581 B1 (가톨릭대학교 산학협력단) 2020.02.10 전체 문헌	1-4,7-20
A	KWAK, H. W. 등, 'Cricket paralysis virus internal ribosome entry site-derived RNA promotes conventional vaccine efficacy by enhancing a balanced Th1/Th2 response', Vaccine, (전자공개)2019.07.29, 37권, 5191-5202 페이지 전체 문헌	1-4,7-20
A	PARK, H. 등, 'Evaluation of the safety profile of ssRNA adjuvant derived from the IGR IRES region of CrPV', The Journal of Immunology, 2019.05.01, 202권, 1_Supplement 전체 문헌	1-4,7-20
A	US 10736957 B2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 2020.08.11 전체 문헌	1-4,7-20
A	WO 2020-237227 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY 등) 2020.11.26 전체 문헌	1-4,7-20
☐ 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 2023년09월26일(26.09.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년09월26일(26.09.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

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: **5-6**
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

청구항 5-6은 서열을 특정하고 있으나, 상기 서열들이 최초 출원시 명세서, 청구범위 및 도면 전반에 기재되어 있지 않아, 지시하는 바를 구체적으로 특정할 수 없어 유효한 국제조사를 수행할 수 없습니다.

3. ☐ 청구항:
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
KR 10-2075581 B1	2020/02/10	CN 112119162 A	2020/12/22
		KR 10-2019-0125035 A	2019/11/06
		US 2021-0340550 A1	2021/11/04
		WO 2019-209079 A1	2019/10/31
US 10736957 B2	2020/08/11	US 2019-0184006 A1	2019/06/20
		WO 2019-126334 A1	2019/06/27
WO 2020-237227 A1	2020/11/26	AU 2019-280583 A1	2020/12/03
		AU 2019-280583 B2	2022/12/15
		AU 2020-280105 A1	2022/01/20
		AU 2020-397956 A1	2022/07/07
		AU 2021-269137 A1	2022/12/15
		AU 2021-276410 A1	2023/01/19
		AU 2023-201630 A1	2023/04/13
		BR 112020024292 A2	2021/03/02
		BR 112021023411 A2	2022/02/01
		BR 112022023554 A2	2023/04/11
		CA 3100276 A1	2019/12/12
		CA 3139032 A1	2020/11/26
		CA 3160739 A1	2021/06/10
		CA 3178111 A1	2021/11/11
		CA 3179423 A1	2021/11/25
		CN 112399860 A	2021/02/23
		CN 115052635 A	2022/09/13
		CN 115867291 A	2023/03/28
		EP 3801639 A1	2021/04/14
		EP 3920976 A2	2021/12/15
		EP 3920976 B1	2023/07/19
		EP 3972653 A1	2022/03/30
		EP 4146285 A2	2023/03/15
		EP 4153244 A1	2023/03/29
		JP 2021-526792 A	2021/10/11
		JP 2022-533796 A	2022/07/25
		JP 2023-504568 A	2023/02/03
		JP 2023-525270 A	2023/06/15
		JP 2023-527309 A	2023/06/28
		KR 10-2021-0018323 A	2021/02/17
		KR 10-2022-0027855 A	2022/03/08
		US 11203767 B2	2021/12/21
		US 11352640 B2	2022/06/07
		US 11352641 B2	2022/06/07
		US 11447796 B2	2022/09/20
		US 11603396 B2	2023/03/14
		US 2020-0080106 A1	2020/03/12
		US 2021-0198688 A1	2021/07/01
		US 2021-0363540 A1	2021/11/25
		US 2021-0371494 A1	2021/12/02
		US 2021-0403944 A1	2021/12/30
		US 2022-0025395 A1	2022/01/27
		US 2022-0177540 A1	2022/06/09
		US 2022-0323480 A1	2022/10/13

국제출원번호