

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2019년 10월 10일 (10.10.2019) WIPO | PCT



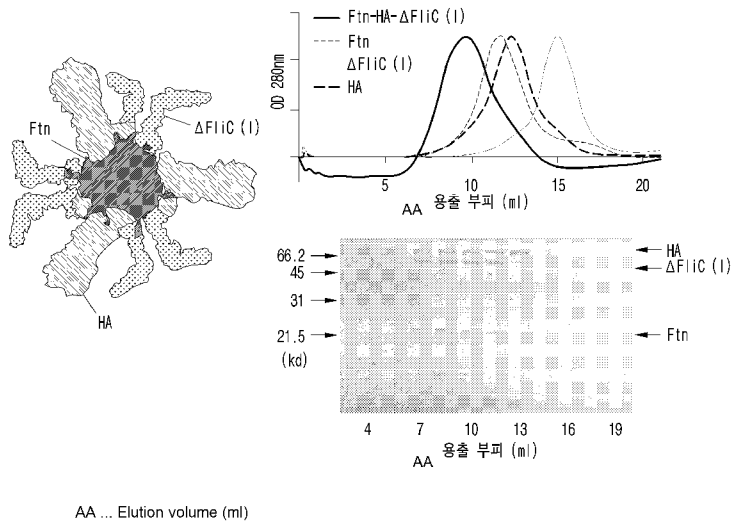
(10) 국제공개번호

WO 2019/194393 A1

- (51) 국제특허분류: *A61K 39/145* (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/69 (2017.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/015938
- (22) 국제출원일: 2018년 12월 14일 (14.12.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0038078 2018년 4월 2일 (02.04.2018) KR
- (71) 출원인: 충남대학교 산학협력단 (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) [KR/KR]; 34134 대전시 유성구 대학로 99, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 이혜영 (LEE, Hayoung); 34140 대전시 유성구 어른로 57 130-405, Daejeon (KR). 김영상 (KIM, Young Sang); 34034 대전시 유성구 배울2로 133 203-403, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 06132 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: NANOPARTICLES IN WHICH ANTIGEN PEPTIDE AND ADJUVANT ARE BOUND TO FERRITIN SELF ASSEMBLY, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 페리틴 자가조립체에 항원 펩타이드 및 면역 증강제가 결합된 나노 입자 및 이의 용도

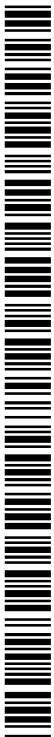


AA ... Elution volume (ml)

(57) Abstract: The present invention relates to ferritin nanoparticles to which an antigen peptide and an adjuvant are bound. Since an antigen peptide or an adjuvant are indirectly bound to a ferritin self assembly by using HTT^{CYS} and V_L12.3^{CYS} peptides, a fusion protein can be produced more easily than when an antigen and an adjuvant are directly fused, and also, the relative mole ratio of the antigen and the adjuvant can be readily adjusted, and thus the present invention can be effectively used as a vaccine composition.

(57) 요약서: 본 발명은 항원 펩타이드 및 면역 증강제가 결합되어 있는 페리틴 나노 입자에 관한 것으로, HTT^{CYS} 펩타이드와 V_L12.3^{CYS} 펩타이드를 이용하여 페리틴 자가조립체에 항원 펩타이드 또는 면역 증강제를 간접적으로 결합시킴으로써, 항원 및 면역 증강제를 직접 융합시키는 경우보다 용이하게 융합 단백질을 생산할 수 있고, 또한 이를 통해 항원 및 면역 증강제의 상대적 몰비를 손쉽게 조절할 수 있어 백신 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2019/194393 A1

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

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

공개:

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

명세서

발명의 명칭: 페리틴 자가조립체에 항원 펩타이드 및 면역 증강제가 결합된 나노 입자 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 페리틴 자가조립체에 항원 펩타이드 및 면역 증강제가 결합된 나노 입자에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 백신이란 감염증의 예방을 위하여 동물을 능동적으로 면역하기 위하여 쓰이는 항원(antigen), 또는 항원을 유효성분으로 함유한 생물학적 체제로서 프랑스의 미생물학자 L.파스퇴르에 의하여 제창되었다. 통상 백신을 투여하면 생체에서는 해당 항체가 만들어져 면역이 획득되며, 일단 생성된 항체는 비교적 오랫동안 생체 안에 남아있게 되어, 해당 질병의 원인균에 의한 감염이 발생하더라도 이에 대한 방어가 가능하여 결과적으로 질병을 예방할 수 있다.
- [3]
- [4] 통상적으로 백신제제에는 세균을 사멸시켜 사용하는 사균백신(killed vaccine), 불활성 백신(inactivated vaccine), 살아있는 세균을 그대로 사용하는 생균백신(live vaccine), 세균을 약화시킨 약독균주(attenuated strain)를 사용하는 약독화 백신(attenuated vaccine), 세균의 독소이드(toxoid) 또는 이것의 유도체 등 다양한 종류가 존재하며, 효과적인 백신 개발을 위해서는 질병을 일으키는 원인체에 대해 항체의 형성을 원활하게 하여 생체 내 면역반응이 적절히 유도되도록 해야 하기 때문에, 가능한 질병 원인체에 유사한 형태로 개발되는 것이 바람직하다. 이 때문에 아무 처리도 하지 않고 생균을 그대로 사용하는 생균백신이 백신으로서는 가장 좋은 효과를 나타낼 수 있다. 하지만, 생균백신의 경우 질병을 야기하는 질병 원인체를 살아 있는 채로 이용하는 것이기 때문에, 향후 독성이 있는 균주로 전환되어 오히려 질병을 유발할 수 있는 위험성을 가지고 있어 극히 일부 감염성 질환에 있어서만 사용되고 있는 실정이다. 이런 단점을 극복하기 위한 대안으로 생균을 약독화시킨 약독화백신이 개발되어 사용되어지고 있지만, 이 경우 일반적으로 항원성이 생균백신에 비해 약화되어 백신으로서의 효과가 떨어지고, 또한 여전히 안전하다고도 할 수 없는 문제점을 가지고 있다. 사용상 안전성 때문에 개발된 사균백신은 비록 상기의 안전성 관점에서의 문제점을 해결할 수는 있지만 항원성이 생균백신이나 약독백신에 비해 크게 떨어지는 것이 일반적이다. 이에 따라, 사균백신처럼 사용상 안전하면서도 생균백신처럼 항원성이 뛰어난 이상적인 새로운 백신제제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.
- [5]
- [6] 케이지(cage) 단백질은 저분자량 단일체들의 정밀한 자가조립 성질에 의하여

단일체 분자량의 수십에서 수백 배의 거대분자를 형성할 수 있는 단백질이다. 자연계에서 바이러스 capsid 단백질, 페리틴, 열충격 단백질 (heat shock protein), Dps 단백질 등이 이에 해당되며 케이지(cage)를 구성하는 각각의 단량체들은 인접 단량체들과 매우 규칙적이고 정밀한 상호작용을 이루어, 내부가 비어있는 구조를 형성한다.

[7] 페리틴은 철을 저장하는 단백질로써 원핵생물과 진핵생물에 널리 존재한다. 페리틴 케이지(cage)의 분자량은 약 500,000Da으로, 20 kDa의 동일한 단량체(중쇄 혹은 경쇄 중 하나로 구성된 단일 단량체 혹은 이중 단량체)가 자가 조립되어 거대한 구 형태의 삼차구조를 형성한 것으로, 인간 페리틴 케이지의 경우 외경은 약 12 nm 이고 내경은 약 8 nm이다. 페리틴은 pH 조건에 따라 단량체로 흩어지기도 하고 24개의 단량체가 결합한 나노 입자를 형성하기도 하는데 이러한 특성을 이용하면 페리틴 내에 다양한 물질을 포집할 수 있다.

[8] 그 외에도 페리틴 단량체의 N-말단에 인플루엔자 헤마글루티닌(hemagglutinin)을 유전적으로 융합하여 페리틴 케이지의 외부 표면에 나타낼 수 있고 (Kanekiyo, M et al., Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies, Nature 2013; 499: 102~6), 특히 헤마글루티닌의 불변 영역(invariable region)의 서열을 페리틴 표면에 발현시키는 경우, 광범위한 인플루엔자 균주에 대한 후보 백신을 생산하는 데에도 사용될 수 있다 (Yassine, HM et al., Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection, Nat Med 2015; 21: 1065~70).

[9]

[10] 이에 본 발명자들은 항원-항체 결합 및 이황화 결합을 형성하는 HTT^{cys} 펩타이드와 V_L12.3^{cys} 펩타이드를 이용하여 페리틴 자가조립체에 항원 펩타이드 및 면역 증강제를 결합시킨 나노 입자를 제조하여, 항원 및 면역 증강 펩타이드를 직접 융합시키는 경우보다 용이하게 융합 단백질을 생산할 수 있고, 페리틴 자가조립체에 결합하는 항원 펩타이드 및 면역 증강제의 몰비(molar ratio)를 용이하게 조절할 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 상기 나노 입자를 포함하는 조성물은 총 면역글로불린 수치를 증가시키고, 세포성 면역 및 체액성 면역을 증진시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명의 목적은 페리틴 자가조립체에 항원 펩타이드 및 면역 증강제가 결합된 페리틴 나노 입자를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 HTT^{cys} 펩타이드 및 페리틴 단량체의 융합 단백질 24개의 자가조립체; V_L12.3^{cys} 펩타이드 및 항원 펩타이드가 융합된

융합 단백질; 및 V_L12.3^{cys} 펩타이드 및 면역 증강제(adjuvant)의 융합 분자를 포함하는 나노 입자로서, 상기 항원 펩타이드 및 면역 증강제는 상기 HTT^{cys} 펩타이드와 V_L12.3^{cys} 펩타이드 간의 결합에 의해 페리틴 자가조립체와 연결된 것인, 나노 입자를 제공한다.

[14] 또한, 본 발명은 상기 나노 입자를 포함하는, 백신 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[15] 본 발명의 나노 입자는 HTT^{cys} 펩타이드와 V_L12.3^{cys} 펩타이드를 매개로 페리틴 자가조립체에 항원 펩타이드 또는 면역 증강제가 결합된 것으로, 항원 및 면역 증강제를 직접 융합시키는 경우보다 용이하게 융합 단백질을 생산할 수 있으며 항원 펩타이드 및 면역 증강제의 물비를 용이하게 조절할 수 있으므로 백신 생산을 위한 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[16]

도면의 간단한 설명

[17] 도 1은 HTT 펩타이드 및 V_L12.3 펩타이드 간의 항원-항체 결합에 이황화 결합을 추가적으로 도입시킬 수 있는 HTT^{cys} 펩타이드 및 V_L12.3^{cys} 펩타이드의 서열을 나타낸 것이다.

[18] 도 2는 살모넬라 플라젤린(FliC), 대장균 페리틴(Ftn) 및 헤마글루티닌(인플루엔자 A 바이러스 (A/California/04/2009(H1N1), HA)의 융합 단백질 도메인을 도시적으로 나타낸 것이다.

[19] 도 3a은 면역 증강 펩타이드인 플라젤린이 결합된 Ftn-HA-ΔFliC 나노입자(A-1), 상기 나노입자의 크기 배제 크로마토그래피 프로파일(A-2) 및 크로마토그래피로 정제된 나노입자의 SDS-PAGE 분석 결과(A-3)를 나타낸 것이다.

[20] 도 3b는 면역 증강 펩타이드인 플라젤린이 결합된 Ftn-PA-ΔFliC 나노입자(B-1) 및 상기 나노입자의 크기 배제 크로마토그래피 프로파일(B-2)을 나타낸 것이다.

[21] 도 3c는 면역 증강 펩타이드인 플라젤린이 결합된 I3-01-HA-ΔFliC 나노입자(C-1) 및 상기 나노입자의 크기 배제 크로마토그래피 프로파일(C-2)을 나타낸 것이다.

[22] 도 4는 Ftn-HA-ΔFliC 나노입자에서 HTT^{cys} 펩타이드와 V_L12.3^{cys} 펩타이드 간 이황화 결합이 형성되었는지 확인하기 위해, 상기 나노입자를 각각 환원 조건(+βME) 및 비환원 조건(-βME)에서 수행한 SDS-PAGE 결과 및 항-HA 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸 것이다.

[23] 도 5는 Ftn, Ftn-ΔFliC(N) 및 Ftn-FliC 와 각각 배양된 HEK293 세포의 TLR5 활성화 정도를 나타낸 것이다.

[24] 도 6은 Ftn-HA-ΔFliC(N) 및 Ftn-HA-FliC(N)로 각각 면역화된 마우스 혈청의 총 IgG 및 IgG 서브클래스 수치를 나타낸 것이다

[25] (Ftn : HA = 24:10;

- [26] HA : FliC(또는 Δ FliC) = 4:1).
- [27] 도 7은 Ftn + Δ FliC, Ftn- Δ FliC(C), Ftn- Δ FliC(I) 및 Ftn- Δ FliC(N) 와 각각 배양된 HEK293 세포의 TLR5 활성화 정도를 나타낸 것이다.
- [28] 도 8a는 HA, Ftn + Δ FliC + HA 및 Ftn- Δ FliC(I) + HA로 각각 면역화된 마우스 혈청의 IgG 수치를 나타낸 것이다
- [29] (Ftn- Δ FliC에서 Ftn : Δ FliC = 24:10;
- [30] Ftn-HA에서 Ftn : HA = 24:10;
- [31] Ftn-HA- Δ FliC(I)에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:3.3).
- [32] 도 8b는 Ftn-HA + Δ FliC 및 Ftn-HA- Δ FliC(I)로 각각 면역화된 마우스 혈청의 IgG 수치를 나타낸 것이다
- [33] (Ftn- Δ FliC에서 Ftn : Δ FliC = 24:10;
- [34] Ftn-HA에서 Ftn : HA = 24:10;
- [35] Ftn-HA- Δ FliC(I)에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:3.3).
- [36] 도 9a는 Ftn-HA 및 HA와 Δ FliC의 몰비를 다르게 조절하여 제조한 Ftn-HA- Δ FliC로 각각 면역화된 마우스 혈청의 총 IgG의 수치를 나타낸 것이다
- [37] (1:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:10;
- [38] 2:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:5;
- [39] 3:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:3.3;
- [40] 4:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:2.5).
- [41] 도 9b는 Ftn-HA 및 HA와 Δ FliC의 몰비를 다르게 조절하여 제조한 Ftn-HA- Δ FliC로 각각 면역화된 마우스 혈청의 IgG1의 수치를 나타낸 것이다
- [42] (1:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:10;
- [43] 2:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:5;
- [44] 3:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:3.3;
- [45] 4:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:2.5).
- [46] 도 9c는 Ftn-HA 및 HA와 Δ FliC의 몰비를 다르게 조절하여 제조한 Ftn-HA- Δ FliC로 각각 면역화된 마우스 혈청의 IgG2a의 수치를 나타낸 것이다
- [47] (1:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:10;
- [48] 2:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:5;
- [49] 3:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:3.3;
- [50] 4:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:2.5).
- [51] 도 9d는 Ftn-HA 및 HA와 Δ FliC의 몰비를 다르게 조절하여 제조한 Ftn-HA- Δ FliC로 각각 면역화된 마우스 혈청의 IgG2b의 수치를 나타낸 것이다
- [52] (1:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:10;
- [53] 2:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:5;
- [54] 3:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:3.3;
- [55] 4:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:2.5).
- [56] 도 9e는 Ftn-HA 및 HA와 Δ FliC의 몰비를 다르게 조절하여 제조한

- Ftn-HA- Δ FliC로 각각 면역화된 마우스 혈청의 IgG1/IgG2a 의 값을 나타낸 것이다
- [57] (1:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:10;
- [58] 2:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:5;
- [59] 3:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:3.3;
- [60] 4:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:2.5).
- [61] 도 10a는 Ftn-HA; 및 HA와 Δ FliC의 몰비를 다르게 조절하여 제조한 Ftn-HA- Δ FliC로 각각 면역화된 마우스의 비장 세포로부터 분비되는 사이토카인 IFN- γ 의 양을 나타낸 것이다
- [62] (1:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:10;
- [63] 2:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:5;
- [64] 4:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:2.5).
- [65] 도 10b는 Ftn-HA; 및 HA와 Δ FliC의 몰비를 다르게 조절하여 제조한 Ftn-HA- Δ FliC로 각각 면역화된 마우스의 비장 세포로부터 분비되는 사이토카인 IL-4의 양을 나타낸 것이다
- [66] (1:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:10;
- [67] 2:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:5;
- [68] 4:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:2.5).
- [69] 도 11a는 Ftn와 HA의 몰비를 다르게 조절하여 제조한 Ftn-HA; 및 HA와 Δ FliC의 몰비를 3:1로 조절한 Ftn-HA- Δ FliC로 각각 면역화된 마우스 혈청의 총 IgG의 수치를 나타낸 것이다
- [70] (Low의 Ftn-HA에서 Ftn : HA = 24:4;
- [71] High의 Ftn-HA에서 Ftn : HA = 24:24;
- [72] 3:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:3.3).
- [73] 도 11b는 Ftn와 HA의 몰비를 다르게 조절하여 제조한 Ftn-HA; 및 HA와 Δ FliC의 몰비를 3:1로 조절한 Ftn-HA- Δ FliC로 각각 면역화된 마우스 혈청의 IgG1의 수치를 나타낸 것이다
- [74] (Low의 Ftn-HA에서 Ftn : HA = 24:4;
- [75] High의 Ftn-HA에서 Ftn : HA = 24:24;
- [76] 3:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:3.3).
- [77] 도 11c는 Ftn와 HA의 몰비를 다르게 조절하여 제조한 Ftn-HA; 및 HA와 Δ FliC의 몰비를 3:1로 조절한 Ftn-HA- Δ FliC로 각각 면역화된 마우스 혈청의 IgG2a의 수치를 나타낸 것이다
- [78] (Low의 Ftn-HA에서 Ftn : HA = 24:4;
- [79] High의 Ftn-HA에서 Ftn : HA = 24:24;
- [80] 3:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:3.3).
- [81] 도 11d는 Ftn와 HA의 몰비를 다르게 조절하여 제조한 Ftn-HA; 및 HA와 Δ FliC의 몰비를 3:1로 조절한 Ftn-HA- Δ FliC로 각각 면역화된 마우스 혈청의 IgG2b의 수치를 나타낸 것이다

- [82] (Low의 Ftn-HA에서 Ftn : HA = 24:4;
 [83] High의 Ftn-HA에서 Ftn : HA = 24:24;
 [84] 3:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:3.3).
 [85] 도 11e는 Ftn와 HA의 물비를 다르게 조절하여 제조한 Ftn-HA; 및 HA와 Δ FliC의 물비를 3:1로 조절한 Ftn-HA- Δ FliC로 각각 면역화된 마우스 혈청의 IgG1/IgG2a 값을 나타낸 것이다
- [86] (Low의 Ftn-HA에서 Ftn : HA = 24:4;
 [87] High의 Ftn-HA에서 Ftn : HA = 24:24;
 [88] 3:1의 Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:3.3).
 [89] 도 12a는 Ftn, Ftn-HA 및 Ftn-HA- Δ FliC(I)로 각각 면역화된 마우스를 H1N1 바이러스로 감염시켰을 때 마우스의 생존율을 나타낸 것이다
- [90] (PBS: 무처리 대조군; QIV: 불활성화된 H1N1 바이러스(A/California/7/2009) 투여 실험군;
 [91] Ftn-HA에서 Ftn : HA= 24:10;
 [92] Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:10).
 [93] 도 12b는 Ftn, Ftn-HA 및 Ftn-HA- Δ FliC(I)로 각각 면역화된 마우스를 H1N1 바이러스로 감염시켰을 때 마우스의 체중 회복율을 나타낸 것이다
- [94] (PBS: 무처리 대조군; QIV: 불활성화된 H1N1 바이러스(A/California/7/2009) 투여 실험군;
 [95] Ftn-HA에서 Ftn : HA= 24:10;
 [96] Ftn-HA- Δ FliC에서 Ftn : HA : Δ FliC = 24:10:10).
 [97]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [98] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [99] 본 발명은 HTT^{cys} 펩타이드 및 페리틴 단량체의 융합 단백질 24개의 자가조립체; V_L12.3^{cys} 펩타이드 및 항원 펩타이드가 융합된 융합 단백질; 및 V_L12.3^{cys} 펩타이드 및 면역 증강제(adjuvant)의 융합 분자를 포함하는 나노 입자로서, 상기 항원 펩타이드 및 면역 증강제는 상기 HTT^{cys} 펩타이드와 V_L12.3^{cys} 펩타이드 간의 결합에 의해 페리틴 자가조립체와 연결된 것인, 나노 입자를 제공한다.
- [100] 본 발명에서 "융합 단백질"은 2개 이상의 단백질 또는 펩타이드가 서로 연결된 인위적으로 합성된 단백질을 의미한다. 본 발명의 융합 단백질은 당해 분야에 공지된 화학적 합성방법으로 제조하거나 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현벡터에 클로닝하여 발현시켜서 제조할 수 있다. 상기 융합 단백질은 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드의 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 고안된 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있고, 공지된 아미노산 서열의 일부 아미노산이 부가, 치환, 결실 등의

방법으로 변이된 변이체 단백질도 본 발명에서 제공하는 융합 단백질의 범주에 포함될 수 있다.

[101] 본 발명에서 페리틴(ferritin) 자가조립체는 생물 유래의 페리틴 단량체 24개가 자가조립(self-assembly)을 통하여 속이 빈 케이지(cage) 형태의 나노 입자를 형성한 것을 말한다.

[102] 상기 페리틴 단량체는 서로 동종 또는 이종일 수 있으며, 인간, 헬리코박터 균, 또는 대장균(*E. coli*) 유래의 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게 상기 페리틴 단량체는 대장균 유래의 것일 수 있고 더 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[103] 서열번호 1:

[104] MLKPEMIEKLNEQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHTFEGAAAFRRHAQEE
MTHMQRLFDYLTDTGNLPRINTVESPFAEYSSLDELQFQETKHEQLITQKINEL
AHAAMTNQDYPTFNFLQWYVSEQHEEEKLFKSIIDKLSLAGKSGEGLYFIDKE
LSTLDTQN

[105] 본 발명에서 HTT^{cys} 펩타이드는 헌팅틴(huntingtin) 단백질에 존재하는 짧은 알파 나선의 헌팅틴 펩타이드(이하, HTT로 표기)의 변이체를 의미한다. 구체적으로, 상기 HTT^{cys} 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 HTT 펩타이드의 6번째 아미노산인 알라닌(Alanine, A)을 시스테인(cysteine, C)으로 돌연변이시킨 것으로, 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[106] [표1]

명칭	서열 번호	서열종 류	서열
HTT	2	아미노 산 서열	EKLMK <u>A</u> FESLKSFQ
HTT ^{cys}	3	아미노 산 서열	EKLMK <u>C</u> FESLKSFQ

[107] 상기 HTT^{cys} 펩타이드는 페리틴 단량체의 N-말단 또는 C-말단에 융합되거나 내부에 삽입된 것일 수 있고, 바람직하게는 N-말단에 융합된 것일 수 있다. 상기 HTT^{cys} 펩타이드가 페리틴 단량체의 N-말단에 융합된 융합 단백질로 페리틴 자가조립체 형성 시, HTT^{cys} 펩타이드는 페리틴 자가조립체의 외부 표면에 위치할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 상기 HTT^{cys} 펩타이드는 페리틴 단량체의 N-말단에 융합된 것이고, 상기 HTT^{cys} 펩타이드가 페리틴 단량체의 N-말단에 융합된 융합 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[108] 상기 HTT^{cys} 펩타이드 및 페리틴 단량체의 융합 단백질 24개로 이루어진 페리틴 자가조립체에서, 상기 HTT^{cys} 펩타이드는 페리틴 자가조립체의 내부 또는 외부

표면에 위치할 수 있으며, 바람직하게는 페리틴 자가조립체의 외부 표면에 위치할 수 있다.

[109]

[110] 본 발명에서 V_L12.3^{cys} 펩타이드는 상기 헤파타이트 펩타이드에 결합하는 면역글로블린 단편인 V_L12.3 펩타이드의 변이체를 의미한다. 구체적으로, 상기 V_L12.3^{cys} 펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성된 V_L12.3 펩타이드의 53번째 아미노산인 타이로신(Tyrosine, Y)을 시스테인(C)으로 돌연변이시킨 것으로, 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[111] [표2]

명칭	서열 번호	서열종 류	서열
V _L 12.3	4	아미노 산 서열	MGSQPVLVTQSPSVSAAPRQRVTISVSGSNSNI GSNTVNWIQQLPGRAPPELLM <u>Y</u> DDDLLAPGVS DRFSGSRSGTSASLTISGLQSEDEADYYAATW DDSLNGWVFGGGTKVTVLSA
V _L 12.3 ^{cys}	5	아미노 산 서열	MGSQPVLVTQSPSVSAAPRQRVTISVSGSNSNI GSNTVNWIQQLPGRAPPELLM <u>C</u> DDDLLAPGVS DRFSGSRSGTSASLTISGLQSEDEADYYAATW DDSLNGWVFGGGTKVTVLSA

[112] 상기 V_L12.3^{cys} 펩타이드는 항원 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 융합되거나 내부에 삽입된 것일 수 있다.

[113] 상기 항원 펩타이드는 헤마글루티닌(Hemagglutinin, HA), PA(Protective antigen), PSA (prostate-specific antigen), 한타바이러스 당단백질 항원(Hantavirus glycoprotein antigen), SFTS 바이러스 당단백질 항원(virus glycoprotein antigen) 등일 수 있으나, 면역 반응을 유도할 수 있는 항원을 구성하는 펩타이드인 한, 제한없이 사용될 수 있다.

[114] 상기 면역 증강제(adjuvant)는 플라젤린(flagellin), MPL-A (monophosphoryl lipid A), 박테리아 리포단백질(bacterial lipoprotein) 등일 수 있으나, 면역 반응을 유도하는 항원 펩타이드의 기능을 직접적 또는 간접적인 방식으로 강화시킬 수 있는 한, 제한없이 사용될 수 있다. 바람직하게는 상기 면역 증강제는 면역 증강 펩타이드일 수 있고, 더 바람직하게는 플라젤린(flagellin) 펩타이드일 수 있다.

[115] [표3]

명칭	서열 번호	서열종 류	서열
헤마글루티닌(hemagglutinin, HA)	8	아미노 산 서열	DTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVN LLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWIL GNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCYPGD FIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHD SNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNS YPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQ QSLYQNADTYVFBVSSRYSKKFKPEIAIRPKV RDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVV PRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTP KGAINSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLA TGLRNIPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGMVDG WYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITN KVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLN KKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHD SNVKNLYEKVRSQLKNNAKEIGNGCFEFYHK CDNTCMESVKNNGTYDYPKYSEEAKLNREEID GVKLESTRIYQI
전장 플라젤린(full-l ength flagellin, Flic)	9	아미노 산 서열	MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERL SSGCRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQA SRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELA VQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSG QTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDID LKQINSQTLGLDTLNVQQKYKVSDDAATVTG YADTTIALDNSTFKASATGLGGTDQKIDGDL KFDDTTGKYAKVTVTGGTGKDGYYEVSVD KTNGEVTLAGGATSPLTGGLPATATEDVKNV QVANADLTEAKAALTAAGVTGTASVVKMSY TDNNGKTIDGGLAVKVGDDYYSATQNKDGS ISINTTKYTADDGTSKTALNKLGGADGKTEV VSIGGKTYAASKAEGHNFKAQPDLAEEAATT TENPLQKIDAALAQVDTLRSDLGAVQNRFN AITNLGNTVNNLTSARSRIECSDYATEVSNMS RAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR
절단된	10	아미노	FTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEI

플라젤린(truncated flagellin, Δ Flic)	산 서열	NNNLQRVRELA VQSANSTNSQSDLDLSIQAEIT QRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQV GANDGETIDIDLKQINSQTLGLDTLNVQQKY KVSDTAATVTGYADTTIALDNSTFKASATGL GGTDQKIDGDLKFDDTTGKYAKVTVTGGT GKDGYYEVSVDKTNGEVTLAGGATSPLTGG LPATATEDVKNVQVANADLTEAKAALTAAG VTGTASVVKMSYTDNNGKTIDGGLAVKVG DYYSATQNKDGSISINTTKYTADDGTSKTAL NKLGGADGKTEVV SIGGKTYAASKAEGHNF KAQPD LAEAAATTENPLQKIDAALA QVDTL RSDLGAVQNRFN SAITNLGNTVNNLTSARSRI ECSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQ VPQNVLSLLR
--	------	---

[116] 상기 $V_L12.3^{cys}$ 펩타이드는 항원 펩타이드 또는 면역 증강 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 융합되거나 내부에 삽입된 것일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 $V_L12.3^{cys}$ 펩타이드는 항원 펩타이드인 헤마글루티닌의 C-말단 또는 면역 증강 펩타이드인 전장(full length) 플라젤린의 N-말단, C-말단 또는 내부에 융합된 것을 이용하였다.

[117]

[118] 상기 HTT^{cys} 펩타이드는 헌팅틴(huntingtin) 단백질에 존재하는 짧은 알파 나선의 헌팅틴(HTT) 펩타이드의 변이체이고, 상기 $V_L12.3^{cys}$ 펩타이드는 상기 헌팅틴 펩타이드에 결합하는 면역글로불린 단편인 $V_L12.3$ 펩타이드의 변이체로서, 상기 HTT^{cys} 펩타이드와 $V_L12.3^{cys}$ 펩타이드는 항원-항체 반응에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 HTT^{cys} 펩타이드 및 $V_L12.3^{cys}$ 펩타이드는 각각 HTT 펩타이드와 $V_L12.3$ 펩타이드 내에 시스테인이 도입된 변이체로서, 상기 HTT^{cys} 펩타이드와 $V_L12.3^{cys}$ 펩타이드는 이황화 결합에 의해 결합될 수 있다. 따라서 상기 $V_L12.3^{cys}$ 펩타이드와 융합된 항원 펩타이드 및 면역 증강제는 상기 HTT^{cys} 펩타이드와 $V_L12.3^{cys}$ 펩타이드 간의 결합에 의해 페리틴 자가조립체에 연결될 수 있다. 따라서 상기 HTT^{cys} 펩타이드와 $V_L12.3^{cys}$ 펩타이드 간의 결합은 항원-항체 결합 및 이황화 결합을 포함할 수 있으며, 이에 상기 HTT^{cys} 펩타이드와 $V_L12.3^{cys}$ 펩타이드 간의 결합은 항원-항체 결합만 형성한 경우보다 견고한 결합을 형성할 수 있다.

[119] 상기 나노 입자 내의 항원 펩타이드와 면역 증강 펩타이드의 몰비(molar ratio)는 적절하게 조절될 수 있다. 바람직하게는 0.1~10 : 1 일 수 있으며, 보다 바람직하게는 1~4 : 1 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 1~3 : 1 일 수 있다.

[120] 상기 나노 입자는 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조될 수 있다:

- [121] 1) HTT^{cys} 펩타이드 및 페리틴 단량체의 융합 단백질 24개의 단량체로부터 페리틴 자가조립체를 얻는 단계; 및
- [122] 2) 상기 1)의 페리틴 자가조립체에 V_L12.3^{cys} 펩타이드 및 항원 펩타이드가 융합된 융합 단백질; 및 V_L12.3^{cys} 펩타이드 및 면역 증강제(adjuvant)가 융합된 융합 분자를 혼합하는 단계.
- [123]
- [124] 또한, 본 발명은 본 발명의 나노 입자를 포함하는, 백신 조성물을 제공한다. 본 발명의 나노 입자는 항원 및 면역 증강제를 페리틴 단량체 단백질에 직접 융합시키는 경우 보다 제작이 용이하고 항원 펩타이드 및 면역 증강제의 물비를 용이하게 조절할 수 있다.
- [125] 상기 백신은 총 IgG 수치를 증가시킬 수 있다.
- [126] 또한, 상기 백신은 세포성 면역 및 체액성 면역을 증진시킬 수 있다.
- [127] 본 발명의 백신 조성물은 약학적 허용가능한 담체, 적절한 보조제, 기타 통상적인 물질들을 더욱 포함할 수 있고, 면역학적 효과량으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 용어, "면역학적 효과량"이란 면역 증강 효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 정확한 투여 농도는 투여될 특정 면역원에 따라 달라지며 면역반응의 발생을 검사하기 위하여 당업자가 공지된 방법을 이용하여 이를 결정할 수 있다. 또한, 투여형태 및 경로, 수용자의 연령, 건강 및 체중, 증상의 특성 및 정도, 현재 치료법의 종류, 및 치료 횟수에 따라 변화될 수 있다.
- [128] 담체는 당 분야에 공지된 것으로 안정화제, 희석제, 완충액을 포함할 수 있다. 적절한 안정화제는 솔비톨, 락토즈, 만니톨, 전분, 당, 덱스트란 및 포도당 같은 탄수화물; 알부민 또는 카제인 같은 단백질 등을 포함할 수 있다. 적절한 희석제에는 염, Hanks 균형 염, 링거액 등을 포함할 수 있다. 적절한 완충액에는 알칼리 금속 인산염, 알칼리 금속 탄산염, 알칼리 토금속 탄산염 등을 포함한다. 또한 백신에는 면역반응을 개선 또는 강화시키기 위하여 하나 이상의 면역 증강제(아쥘반트, adjuvant)를 포함할 수 있다. 적절한 면역 증강제의 예는 알루미늄 히드록시드, 프로이드 완전 또는 불완전 아쥘반트, DEAE 덱스트란, 레바미솔, PCG 및 poly I:C 또는 poly A:U를 포함할 수 있다. 본 발명의 백신 조성물은 공지의 투여 경로를 통하여 투여될 수 있다. 이와 같은 방법에는 경구, 경피, 근육, 복막, 정맥, 피하, 비강 경로를 이용할 수 있지만 이에 국한되지는 않으며, 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [129]
- [130] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 본 발명자들은 HTT^{cys} 펩타이드와 V_L12.3^{cys} 펩타이드를 매개로 페리틴 자가조립체에 헤마글루티닌 항원 펩타이드 및 플라젤린 면역 증강 펩타이드가 안정적으로 결합된 나노 입자를 제조하였다 (도 3a 내지 3c 참조).

- [131] 또한, 본 발명자들은 단백질 분해(proteolytic degradation) 및 중합화하는 경향을 가진 플라젤린 D0 도메인의 면역 반응 유도에 대한 영향을 시험하고자, 플라젤린의 D0 내지 D3 도메인을 포함하는 전장 플라젤린(이하, FliC로 표기)이 페리틴 자가조립체에 결합된 나노 입자(Ftn-FliC); 및 D0 도메인이 절단된 플라젤린(이하, ΔFliC로 표기)이 페리틴 자가조립체에 결합된 나노 입자(Ftn-ΔFliC)의 TLR5 활성화능과 상기 나노 입자로 유도된 마우스 혈청 내 면역글로불린 수치를 확인한 결과, 단백질 다량 생산에 제한이 될 수 있는 플라젤린의 D0 도메인은 IgG 반응에 미미한 영향을 끼치는 것을 확인하였다 (도 5 및 도 6 참조).
- [132] 또한, 본 발명자들은 페리틴 자가조립체에 적합한 플라젤린(ΔFliC)의 부착 부위를 확인하고자, 플라젤린(ΔFliC)의 N-말단, C-말단 또는 내부(D3 도메인)에 V_L12.3^{cys} 펩타이드를 융합하여 페리틴 자가조립체에 결합시킨 나노 입자(각각 Ftn-ΔFliC(N), Ftn-ΔFliC(C) 및 Ftn-ΔFliC(I)로 표기)의 TLR5 활성화능을 확인한 결과, Ftn-ΔFliC(N) 및 Ftn-ΔFliC(I)는 Ftn-ΔFliC(C) 보다 TLR5 신호전달경로를 자극하는 데 효과적임을 확인하였다 (도 7 참조).
- [133] 또한, 본 발명자들은 페리틴 자가조립체에 대해 헤마글루티닌과 플라젤린을 동시에 결합하는 경우, 결합하지 않고 헤마글루티닌과 플라젤린을 단순히 혼합하는 경우보다 강력한 면역 반응을 유도함을 확인하였다 (도 8a 및 도 8b 참조).
- [134] 또한, 본 발명자들은 면역 증강 활성화에 필요한 플라젤린의 최소량을 확인하고자, 페리틴 자가조립체에 결합한 헤마글루티닌 대 플라젤린의 물비가 조절된 나노 입자로 유도된 마우스 혈청 내 면역글로불린 수치 및 비장세포의 사이토카인의 양을 측정된 결과, 페리틴 자가조립체에 결합한 헤마글루티닌 대 플라젤린의 물비는 3:1까지 IgG2a 클래스 전환과 Th1 반응에 영향없이 플라젤린의 양을 줄일 수 있음을 확인하였다. 또한, 페리틴 자가조립체에 헤마글루티닌과 플라젤린을 동시 결합하는 것은 체액성 면역 반응을 증진시키고, 항원-특이적 T세포 반응을 자극하는 것임을 확인하였다 (도 9a 내지 도 9c, 도 10a 및 도 10b 참조).
- [135] 또한, 본 발명자들은 4 분자 또는 24 분자 헤마글루티닌이 페리틴 자가조립체에 결합된 나노 입자(각각 Ftn-HA(Low), Ftn-HA(High))와, 헤마글루티닌과 플라젤린이 3:1의 물비로 페리틴 자가조립체에 결합된 나노 입자(Ftn-HA-ΔFliC)로 유도된 마우스 혈청 내 면역글로불린 수치를 확인한 결과, 페리틴 자가조립체에 최대로 결합된 헤마글루티닌은 체액성 면역 반응을 유도하는 데 유용하지만, 자가 면역 증강 활성을 가진 나노 입자를 생산하기 위해서는 플라젤린이 결합되어야 함을 확인하였다 (도 11a 내지 도 11e 참조).
- [136] 따라서, 본 발명의 나노 입자는 HTT^{cys} 펩타이드와 V_L12.3^{cys} 펩타이드를 매개로 페리틴 자가조립체에 항원 펩타이드 및 면역 증강제가 결합된 것으로, 나노 입자 내의 항원 펩타이드 및 면역 증강제의 물비를 용이하게 조절할 수 있어, 독성을

나타낼 위험성이 있는 면역 증강제의 함량을 최적화할 수 있다. 또한, 항원 펩타이드와 면역 증강제를 함께 결합시킨 나노 입자를 투여한 경우, 전체(Total) IgG 뿐만 아니라 Th1 사이토카인 분비 및 IgG2a 클래스 전환을 크게 향상시킬 수 있으므로, 상기 나노 입자를 백신 조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

[137]

발명의 실시를 위한 형태

[138] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[139] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[140] <실시예 1> 이황화 결합 형성을 위한 아미노산 서열 설계

[141] V_L12.3은 115개의 아미노산(서열번호 4)으로 이루어진 단일 도메인 항체 단편으로, 인간 헌팅틴 단백질(human huntingtin protein) 내 HTT 펩타이드 서열(서열번호 2)과 항원-항체 결합에 의해 결합한다. Disulfide-by-Design 웹 서버를 사용하여 HTT 펩타이드와 V_L12.3에 각각 시스테인 서열을 도입한 V_L12.3^{cys}와 HTT^{cys} 펩타이드를 제조하였다 (도 1, <http://cptweb.cpt.wayne.edu/DbD2/>). V_L12.3^{cys}와 HTT^{cys} 펩타이드는 항원-항체 결합 이외에 추가적인 이황화 다리 형성을 통해 견고한 공유결합을 형성할 수 있다 (도 1, 표 1 및 표 2).

[142]

[143] <실시예 2> 자가조립체의 단량체 제조

[144] <실시예 2-1> HTT^{cys} 펩타이드가 융합된 페리틴(ferritin) 단량체의 제조

[145] 대장균(*E. coli*) 페리틴 단량체(이하 Ftn로 표기)의 N-말단에 HTT^{cys}를 융합시키고자(도 2), HTT^{cys}가 융합된 페리틴 단량체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(표 4)를 PCR로 증폭하였다. 구체적으로, PCR 주형으로는 HTT^{cys}는 Addgene plasmid #23966 (Addgene, Cambridge, MA), 페리틴 단량체(Ftn)는 Addgene bacterial strain #61440를 사용하였으며, 하기 프라이머를 이용하여 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초 조건으로 PCR을 수행하였다.

[146] (HTT^{cys} 정방향 프라이머: ATC ATC CAT GGG CGA AAA GCT GAT GAA GTG TTT C(서열번호 25);

[147] HTT^{cys} 역방향 프라이머: ATC ACT CTA GAA CCA CCC TGG AAG GAC TTG AG(서열번호 26);

[148] Ftn 정방향 프라이머: TGC GGT CTA GAA TGC TGA AAC CAG AAA TGA TTG AA(서열번호 27);

[149] Ftn 역방향 프라이머: AGG CCA GCC ACT CGA GAC TAG TTC ATT AGT TTT GTG TGT C(서열번호 28))

[150] 증폭된 HTT^{cys}-페리틴(HTT^{cys}-Ftn)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 pET28a 벡터(Addgene, Cambridge, MA)에 클로닝하였다.

[151] [표4]

명칭	서열 번호	서열종 류	서열
HTT ^{cys} -페리틴 단량체(HTT ^{cys} - Ftn)	6	아미노 산 서열	MGEKLMKCFESLKSFQGGSRMLKPEMIEKLN EQMNLELYSSLLYQQMSAWCSYHTFEGAAA FLRRHAQEEMTHMQRLFDYLTDTGNLPRINT VESPFAEYSSLDELQETYKHEQLITQKINELA HAAMTNQDYPTFNFLQWYVSEQHEEEKLFK SIIDKLSLAGKSGEGLYFIDKELSTLDTQN
	7	염기서 열	atgggcgaaaagctgatgaagtgttcgagtcctcaagtcctccagg gtggttctagaatgctgaaaccagaaatgattgaaaaacttaagca gatgaacctggaactgtactctcactgctttatcagcaaatgagcgct ggtgcagctatcatacctcgaaggtgctgccgcttctgcgccgta cgcccaggaagagatgacgcatatgcagcgtctgtttgattacctgact gataccggcaattaccgcgtattaataccgttgaatctccgttctgaa tattcctcactgatgaattattccaggaaacctataaacacgaacaatta atcaccagaaaattaacgaactggctcatgctgcaatgaccaatcagg actaccaacatttaattcctgcagtggtatgtttctgagcagcatgaag aagagaaactgttcaaatcgattattgataaattaagcctggcaggcaaa agcggcgaaaggtctgtattttatcgacaaagaactctctaccctcgacac acaaaactaa

[152] 클로닝된 벡터를 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 형질전환하고, 박테리아 배양액의 O.D.₆₀₀ 값이 0.7에 도달할 때, 1 mM IPTG를 첨가하여 HTT^{cys}-페리틴 단량체 융합 단백질 생산을 유도하였다. 37°C에서 4시간 배양한 후, 4°C에서 4000 rpm, 30분 동안 원심분리를 통해 *E. coli*(DE3)를 수확하였다.

[153] 수확한 세포의 펠릿(pellet)을 20 mM Tris(pH 8.0), 200 mM NaCl, 10 mM β-메르kap토에탄올(β-mercaptoethanol) 및 0.1 mM PMSF를 포함한 용해 완충액(lysis buffer)에 재현탁하고, 마이크로플루다이저(microfluidizer, Microfluidics, Westwood, MA)를 사용하여 균질화시킨 후 15,000 rpm으로 4°C에서 40분 동안 원심분리하였다. 상층액을 80°C에서 10분간 가열한 후 15,000 rpm으로 4°C에서 30분 동안 원심분리하고, Q-Sepharose 음이온 교환 컬럼으로 단백질을 정제하여 HTT^{cys}-페리틴 단량체 융합 단백질을 함유하는 분획을 수득한 후 농축시켰다.

[154]

[155] <실시예 2-2> HTT^{cys} 펩타이드가 융합된 I3-01 단량체의 제조[156] 페리틴 자가조립체에 항원 또는 면역 증강 펩타이드를 부착하기 위한 HTT^{cys}

펩타이드 및 V_L12.3^{cys} 펩타이드 간의 결합이 다른 단백질의 자가조립체에서도 유용한지 확인하기 위해, 인공 케이지 단백질 I3-01 단량체의 N-말단에도 HTT^{cys} 서열을 융합시켰다. I3-01 자가조립체는 60개의 단량체 서브유닛으로 구성된 250 옹스트롬 케이지를 형성하는 컴퓨터로 설계된 단백질이다.

- [157] 구체적으로, PCR 주형으로는 HTT^{cys} 는 Addgene plasmid #23966 (Addgene, Cambridge, MA), I3-01 자가조립체는 워싱턴 대학교 Dr. Baker 실험실의 I3-01 cDNA를 사용하였으며, 하기 프라이머를 이용하여 95°C에서 30초, 62°C에서 60초, 72°C에서 30초 조건으로 PCR을 수행하였다.
- [158] (HTT^{cys}-I3-01 정방향 프라이머: ATT ATC ATA TGC ATC ATC ATC ATC ATC ACG GTG GAA GCG GTG GAA GC(서열번호 29);
- [159] HTT^{cys}-I3-01 역방향 프라이머: TGC GCC TCG AGC TAT TAT TCG GTG CAG CCA CGA ATC(서열번호 30))

[160] [표5]

이름	서열 번호	서열종 류	서열
HTT ^{cys} -I3-01	11	아미노 산 서열	MHHHHHHGGSGGSEKLMKCFESLKSFQGGG GGSMKMEELFKKHKIVAVLRANSVEEAKKK ALAVFLGGVHLIEITFTVPDADTVIKELSFLKE MGAIGAGTVTSVEQCRKAVESGAEFIVSPHL DEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTLVKAMKL GHTILKLFPGEVVGPQFVKAMKGPFPNVKFV PTGGVNLNDNVCEWFKAGVLA VGVGSALVKG TPVEVAEKAKAFVEKIRGCTE
	12	염기서 열	atgcatcatcatcatcacggtggaagcggggaagcgaagctg atgaagtgttcgagtcctcaagtcctccagggtgtagcggcggtc tatgaagatggaagagctgtcaagaaacacaagatcgtgccgtgctg cgtgccaatagtggaagaagcgaagaaagcggcgggtttc ctggcgggcgttcattgattgaaattaccgtgccggatgcgga taccgtgattaaggaactgagctttctgaaggaaatggcgcgattattg gtgcgggcaccgtgaccagcgtggagcagtgccgtaaagcgggtgga aagtggcgccgaattcattgtgagtcgcacctggacgaggaaattag ccaatttgcaaggagaagggtgtgttctatatgccaggcgttatgacc cgaccgaactggtgaaagccatgaaactgggccataccatcttaaac tgtttccgggtgaggtgggtggcagttgttaaagcagatgaaagg tccgttccgaatgaaattgtgccaaccggcggtgtaactctggaca atgtgtgcaatggtcaagcggcgtgctggccgtggcggtgggc agcgcgttagtgaaggcaccgggtggaagtggcggaaaaggcca aggcgttcgtgagaagattcgtgctgcaccgaataa

[161] 클로닝된 벡터를 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 형질전환하고, 박테리아 배양액의 O.D.₆₀₀ 값이 0.5에 도달할 때, 0.5 mM IPTG를 첨가하여 HTT^{cys}-I3-01 융합 단백질 생산을 유도하였다. 37°C에서 4시간 배양한 후, 4°C에서 4000 rpm, 30분 동안 원심분리를 통해 *E. coli*(DE3)를 수확하였다.

[162] 수확한 세포의 펠릿(pellet)을 20 mM Tris(pH 8.0), 200 mM NaCl, 10 mM β-메르캅토에탄올(β-mercaptoethanol) 및 0.1 mM PMSF를 포함한 용해 완충액(lysis buffer)에 재현탁하고, 마이크로플루다이저(microfluidizer, Microfluidics, Westwood, MA)를 사용하여 균질화시킨 후, 15,000 rpm으로 4°C에서 40분 동안 원심분리하였다. 상층액을 80°C에서 5분간 가열한 후 15,000 rpm으로 4°C에서 30분 동안 원심분리하고, Q-Sepharose 음이온 교환 컬럼으로

단백질을 정제하여 HTT-I3-01 융합 단백질을 함유하는 분획을 수득한 후 농축시켰다.

[163]

[164] <실시예 3> 항원 펩타이드의 제조

[165] <실시예 3-1> V_L12.3^{cys} 펩타이드 및 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA) 항원이 융합된 융합 단백질의 제조

[166] 인플루엔자 A 바이러스의 헤마글루티닌(hemagglutinin, 이하 HA로 표기) (A/California/ 04/2009 (H1N1))의 단편(18D~530I)을 항원 펩타이드로 사용하였다 (도 2).

[167] 상기 HA 항원 단편의 C-말단에 V_L12.3^{cys} 도메인이 융합된 단백질을 얻기 위해, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(표 6)를 PCR로 증폭하였다. 구체적으로, PCR 주형으로는 HA 는 Swine Flu H1N1 hemagglutinin (a.a. 1-530)(A/California/04/2009)의 cDNA 클론, V_L12.3^{cys} 는 MIT(Massachusetts Institute of Technology) Dr Wittrup 실험실로부터 얻은 V_L12.3 single domain intrabody의 cDNA를 사용하였으며, 하기 프라이머를 이용하여 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초 조건으로 PCR을 수행하였다.

[168] (HA-V_L12.3^{cys} 정방향 프라이머: AGG CCT CTA GAA GCA TGG GTA GTC AAC CAG TAC TT (서열번호 31);

[169] HA-V_L12.3^{cys} 역방향 프라이머: GTG ATG ATG ATG ATG ATG GCT ACT GCC TGC GGA CAG CAC CGT (서열번호 32))

[170] 증폭된 HA-V_L12.3^{cys} 암호화 폴리뉴클레오티드를 pAcGP67A 바큘로바이러스 전달 벡터(baculovirus transfer vector, BD Biosciences, San Jose, CA)로 클로닝하였다.

[171] [표6]

이름	서열 번호	서열종 류	서열

HA-V _L 12.3 ^{cys}	13	아미노산 서열	ADPDTLCIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTH SVNLLEDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAG WILGNPECESLSTASSWSYIVETPSSDNGTCY PGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWP NHDSNKGVTAACPHAGAKSFYKNLIWLVKK GNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTS ADQQSLYQNADTYVFGSSRYSKKFKPEIAIR PKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGN LVVPRYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTC QTPKGAINSTLFPQNIHPITIGKCPKYVKSTKL RLATGLRNIPSIQSRGLFGAIAAGFIEGGWTGM VDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDE ITNKVNSVIEKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIEN LNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTDY HDSNVKPLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFY HKCDNTCMESVKNGTYDYPKYSEEAKLNRE EIDGVKLESTRIYQIGSRSMGSQPVLTSQSPSVS AAPRQRVTISVSGSNSNIGSNTVNWIQQLPGR APELLMCDDLLAPGVSDRFSGSRSGTSASLT ISGLQSEDEADYYAATWDDSLNGWVFGGGT KVTVLSAGSSHHHHH
	14	염기서열	aggggggatggacaggtatggtcgatggctggatgggtaccaccatc agaacgagcaaggatctggttacgccgatctaaagcaacacaaaa tgcaattgatgaaatcacaataaggtaaattcagtaatagagaagatga atacacagttcacagcagtaggcaaagaatttaacacctggagaaaa gaatagaaaacctcaataaaaaggtagacgatggtttcttagacattgg acatacaatgcagaactcctagtactactcgaatgaaaggacgctg gactaccatgactcaaacttaaaaatctatatgaaaaagtaagtcaca gttgaaaaataatgccaagagataggaaatggatgctttgaattttacc ataaatgtgacaatacatgtatggaatcagttaaaaatgggacttacgatt atccaaagtatagcgaagaagctaagctgaatagagaagaaatagatg gggtaaaactagaatcaactaggatttatcagattggctctagaagcatg ggtagtcaaccagtaacttacacaaagcccgtctgtctgccctccac gtcagagagtcaccatctcagttagtggttctaattcaaatataggatcga acacagtgaactggattcagcagttgcctggccgtgccccggagtatt aatgtgtgatgatgatttattagcaccggagatcagatcgttttcagg aagccgtagtgactagtgctccttaaccattagcgggttacagtct

		gaagacgaagcggactattacgcagctacgtgggatgatagttaaag gctgggttttgggtggtactaaagttacgggtgctgtccgcaggcagt agccatcatcatcatcactaa
--	--	--

- [172] 클로닝된 벡터를 High Five 곤충 세포(High Five insect cells, Invitrogen, Waltham, MA)에 감염시키고, 28°C에서 2일 동안 배양 후 세포를 수득하였다. 세포 배양액을 4°C에서 4,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 상등액을 얻은 후, 상등액에 0.1 mM PMSF, 10 mM β-메르kap토에탄올(β-mercaptoethanol)을 처리한 다음 상등액을 Ni-NTA 킬레이팅 아가로스 CL-6B 및 Q-Sepharose 음이온 교환 컬럼에 로딩하여 HA-V_L12.3^{cys} 융합 단백질을 정제하였다.
- [173]
- [174] <실시예 3-2> V_L12.3^{cys} 펩타이드 및 PA(protective antigen) 항원이 융합된 융합 단백질의 제조
- [175] 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*)의 방어항원(protective antigen, 이하 PA)의 도메인 4(596F-735G)를 항원 펩타이드로 사용하였다. PA의 도메인4는 모세혈관 형성 단백질2(capillary morphogenesis protein 2, CMG2) 수용체에 대한 PA의 결합을 중재하고, 탄저병 중화 항체(anthrax neutralizing antibody)의 인식 부위이다.
- [176] 상기 PA 항원 단편의 C-말단에 V_L12.3^{cys} 도메인이 융합된 단백질을 얻기 위해, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(표 7)를 PCR로 증폭하였다. 구체적으로, PCR 주형으로는 PA 는 Addgene plasmid #11079, V_L12.3^{cys} 는 MIT(Massachusetts Institute of Technology) Dr Wittrup 실험실로부터 얻은 V_L12.3 single domain intrabody의 cDNA를 사용하였으며, 하기 프라이머를 이용하여 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초 조건으로 PCR을 수행하였다.
- [177] (PA-V_L12.3^{cys} 정방향 프라이머: AAG AGC CAT GGG CTT TCA TTA TGA TAG AAA TAA C (서열번호 33);
- [178] PA-V_L12.3^{cys} 역방향 프라이머: AGC ATC TCG AGT GCG GAC AGC ACC GTA ACT TTA (서열번호 34))
- [179] 증폭된 PA-V_L12.3^{cys} 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 pET28a 벡터에 클로닝하였다.

[180] [표7]

이름	서열 번호	서열종류	서열
PA-V _L 12.3 ^{cys}	15	아미노산 서열	MGFHYDRNNI AVGADES VVKEAHREVINSST EGLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVIN DRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKKYNDKLPLYI SNPNYKVVNYAVTKENTIINPSENGDTSTNGI KKILIFSKKGYEIGSGGSMGSQPVL TQSPSVSA APRQRVTISVSGSNSNIGSNTVNWIQQLPGRA PELLMCDDLLAPGVSDRFSGSRSGTSASLTI SGLQSEDEADYYAATWDDSLNGWVFGGGT KVTVLSALEHHHHHH
	16	염기서열	atgggctttcattatgatagaaataacatagcagttggggcggatgagtc agtagttaaggaggctcatagagaagtaattaattcgtaacagaggga ttattgttaaatattgataaggatataagaaaaatattatcaggttatattgt agaaattgaagatactgaagggttaagaagtataaatgacagatat gatattgtaattttctagttacggcaagatgaaaaacattatagatt ttaaaaaatataatgataaattaccgttatataagtaatcccaattataa ggtaaatgtatatgctgttactaaagaaaacactattattaatcctagtga gaatggggatactagtaccaacgggatcaagaaaatttaacttttctaa aaaaggctatgatagataggatccggtagcatgggtagtcaaccagt acttacacaaagcccgtctgtgtctgccgctccacgtcagagagtcacc atctcagttagtggttctaattcaaatataggatcgaacacagtgaactg gattcagcagttgctggccgtgccccggagttattaatgtgtgatgatg atttattagcaccggagtatcagatcgttttcaggaagccgtagtggc actagtgcgtccttaaccattagcgggtfacagtctgaagacgaagcgg actattacgcagctacgtgggatgatagtttaaatggctgggttttgggtg gtgggtactaaagttacgggtgctgtccgcactcagaccaccaccacc accactga

[181] 클로닝된 벡터를 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 형질전환하고, 박테리아 배양액의 O.D.₆₀₀ 값이 0.5에 도달할 때, 0.4 mM IPTG를 첨가하여 PA-V_L12.3^{cys} 융합 단백질을 생산을 유도하였다. PA-V_L12.3^{cys} 융합 단백질은 30°C에서 3.5시간 배양한 후, 4°C에서 4000 rpm, 30분 동안 원심분리를 통해 *E. coli*(DE3)를 수확하였다.

[182] PA-V_L12.3^{cys} 융합 단백질을 발현하는 세포 펠릿을 20 mM Tris(pH 8.0), 200 mM NaCl, 10 mM β-메르캅토에탄올(β-mercaptoethanol) 및 0.1 mM PMSF를 포함한 용해 완충액(lysis buffer)에 재현탁하고, 마이크로플루다이어저(microfluidizer,

Microfluidics, Westwood, MA)를 사용하여 균질화시켰다. 15,000 rpm으로 4°C에서 40분 동안 원심분리한 후, 단백질을 Ni-NTA 킬레이팅 아가로스 CL-6B(Incospharm, Daejeon, Korea) 및 Q-Sepharose(GE Healthcare, Pittsburgh, PA) 음이온 교환 컬럼으로 정제하였다. PA-V_L12.3^{cys} 융합 단백질을 포함하는 분획을 수득한 후 농축시켰다.

[183]

[184] <실시예 4> V_L12.3^{cys}가 융합된 플라젤린(flagellin)의 제조

[185] D0 도메인을 포함하는 전장(full-length) 플라젤린은 D0 도메인이 절단된(truncated) 플라젤린보다 면역 반응을 자극하는 활성이 더 높다고 알려져 있으나, 플라젤린 D0 도메인은 단백질 분해 및 중합(polymerization)을 증가시키는 경향이 있어, D0 도메인을 포함한 재조합 단백질의 생산은 종종 어려움이 따른다.

[186] 본 발명의 나노 입자 시스템에서 D0 도메인의 영향을 테스트하기 위해, D0 내지 D3를 모두 포함하는 전장(full-length) 플라젤린(이하 FliC로 표기)과 D1 내지 D3를 포함하는 절단된 플라젤린(이하 ΔFliC로 표기)를 모두 사용하였다. 전장 플라젤린(FliC)의 경우, 단백질 분해를 감소시키기 위해 이황화 결합을 도입시킨 SS5 돌연변이를 포함한다. SS5 돌연변이는 플라젤린(FliC)의 L36C와 D456C 잔기의 이황화 결합이며, 플라젤린의 단백질 분해를 감소시킨다. 또한 플라젤린과의 가장 적합한 융합 부위를 확인하기 위해, V_L12.3^{cys}을 플라젤린의 N-말단, C-말단 또는 D3 도메인(238G와 239G 사이, I) 내부에 융합시켰다 (도 2).

[187] 표 8과 같이, 플라젤린과 V_L12.3^{cys}의 다양한 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 PCR로 증폭하였다. 구체적으로, PCR 주형으로는 FliC는 Addgene plasmid #85438, V_L12.3^{cys}는 MIT(Massachusetts Institute of Technology) Dr Wittrup 실험실로부터 얻은 V_L12.3 single domain intrabody의 cDNA를 사용하였으며, 하기 프라이머를 이용하여 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초 내지 1분 조건으로 PCR을 수행하였다.

[188] (FliC(N)-V_L12.3^{cys} 정방향 프라이머: AGC GGC ATA TGG GTA GTC AAC CAG TAC TTA CAC AAA GCC CG (서열번호 35);

[189] FliC(N)-V_L12.3^{cys} 역방향 프라이머: ATT ATG CGG CCG CTC AAC GCA GTA AAG AGA GGA CG (서열번호 36);

[190] ΔFliC(N)-V_L12.3^{cys} 정방향 프라이머: ACT GGT GGT ACC ATG GGT AGT CAA CCA GTA CTT (서열번호 37);

[191] ΔFliC(N)-V_L12.3^{cys} 역방향 프라이머: AGT TAC TCG AGA CGG GCA GAA GTC AGG TTG TT (서열번호 38);

[192] ΔFliC(C)-V_L12.3^{cys} 정방향 프라이머: ATA ATC CAT GGG CTT TAC CGC GAA CAT CAA AGG T (서열번호 39);

[193] ΔFliC(C)-V_L12.3^{cys} 역방향 프라이머: AGC ATC TCG AGT GCG GAC AGC ACC GTA AC (서열번호 40);

- [194] Δ FliC(I)-V_L12.3^{cys} 정방향 프라이머: ATA ATC CAT GGG CTT TAC CGC GAA CAT CAA AGG T (서열번호 41);
- [195] Δ FliC(I)-V_L12.3^{cys} 역방향 프라이머: AGT TAC TCG AGA CGG GCA GAA GTC AGG TTG TT (서열번호 42))
- [196] 증폭된 폴리뉴클레오티드를 pET28a 벡터(Addgene, Cambridge, MA)에 클로닝하였다.

[197] [표8]

이름	서열 번호	서열종류	서열
FliC	9	아미노산 서열	MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSG CRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNAN DGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTN SQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLA QDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDTLN VQQKYKVSDTAATVTGYADTTIALDNSTFKASAT GLGGTDQKIDGDLKFDDTTGKYYAKVTVTGGTG KDGYYEVSVDKTNGEVTLAGGATSPLTGGLPAT ATEDVKNVQVANADLTEAKAALTAAGVTGTASV VKMSYTDNNGKTIDGGLAVKVGDDYYSATQNK DGSISINTTKYTADDGTSKTALNKLGGADGKTEV VSIGGKTYAASKAEGHNFKAQPDLAEEAATTEN PLQIDAALAQVDTLRSDLGAVQNRFNSAITNLG NTVNNLTSARSRIECSDYATEVSNMSRAQILQQA GTSVLAQANQVPQNVLSLLR
Δ FliC	10	아미노산 서열	FTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNN LQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEI DRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETID IDLKQINSQTLGLDTLNVQQKYKVSDTAATVTGY ADTTIALDNSTFKASATGLGGTDQKIDGDLKFDD TTGKYYAKVTVTGGTGKDGYYEVSVDKTNGEVT LAGGATSPLTGGLPATATEDVKNVQVANADLTE AKAALTAAGVTGTASVVKMSYTDNNGKTIDGGL AVKVGDDYYSATQNKDGSISINTTKYTADDGTSK TALNKLGGADGKTEVVSIGGKTYAASKAEGHNF KAQPDLAEEAATTENPLQIDAALAQVDTLRSD LGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLTSAR
FliC(N)-V L12.3 ^{cys}	17	아미노산 서열	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGSQPVLTSQSPSVS AAPRQRVTISVSGSNSNIGSNTVNWIQQLPGRAPE LLMCDLLAPGVSDRFSGRSGTSASLTISGLQS EDEADYYAATWDDSLNGWVFGGGTKVTVLSAG GSAMAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERL SSGCRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQASR NANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSA

			<p>NSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGV KVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGL DTLNVQQKYKVSDDAATVTGYADTTIALDNSTFK ASATGLGGTDQKIDGDLKFDDTTGKYAKVTVT GGTGKDGYYEVSVDKTNGEVTLAGGATSPLTGG LPATATEDVKNVQVANADLTEAKAALTAAGVTG TASVVKMSYTDNNGKTIDGGLAVKVGDDYYSAT QNKDGSISINTTKYTADDGTSKTALNKLGGADGK TEVVSIGGKTYAASKAEGHNFKAQPDLAEEAATT TENPLQKIDAALAQVDTLRSDLGAVQNRFNSAIT NLGNTVNNLTSARSRIECSDYATEVSNMSRAQIL QQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR</p>
	18	염기서열	<p>aatttgatgatacactggaaaatattacgcaaaagtaccggttacggggggaa ctggtaaagatggctattatgaagttccggtgataagacgaacggtgaggtga ctcttgctggcgggtgcgacttccccgcttacaggtggactacctgcgacagca actgaggatgtgaaaaatgtacaagttgcaaatgctgatttgacagaggctaaa gccgcattgacagcagcaggtgtaccggcacagcatctgttgaagatgtct tatactgataataacggtaaaactattgatgggtgtagcagttaaggtagcgc atgattactattctgcaactcaaaataaagatgggtccataagtaataactacg aaatacactgcagatgacggtacatccaaaactgcaactaaactgggtgg cgcagacggcaaaaccgaagttgttctattgggtgtaaaacttacgctgcaag taaagccgaaggtcacaactttaagcacagcctgatctggcgggaagcggct gtacaaccaccgaaaaccgctgcagaaaattgatgctgcttggcacaggt tgacacgttacgttctgacctgggtgcggtacagaaccgttcaactccgctatt accaactgggcaacaccgtaaacactgacttctgcccgtagccgtatcga atgctccgactacgcgaccgaagttccaacatgtctcgcgcgcagattctgca gcagggcggctacctcgttctggcgcaggcgaaccaggtccgcaaacgctc ctctcttactgcgttga</p>
Δ FliC(N)- V _L 12.3 ^{cys}	19	아미노산 서열	<p>MGSQPVLTSQSPVSAAPRQRVTISVSGSNSNIGSN TVNWIQQLPGRAPPELLMCDDLLAPGVSDRFGSGS RSGTSASLTISGLQSEDEADYYAATWDDSLNGW VFGGGTKVTVLSAGGSAMGFTANIKGLTQASRN ANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANS TNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKV LAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDT LNVQQKYKVSDDAATVTGYADTTIALDNSTFKAS ATGLGGTDQKIDGDLKFDDTTGKYAKVTVTGG</p>

			TGKDGYYEVSVDKTNGEVTLAGGATSPLTGGLP ATATEDVKNVQVANADLTEAKAALTAAGVTGT ASVVKMSYTDNNGKTIDGGLAVKVGDDYYSAT QNKDGSISINTTKYTADDGTSKTALNKLGGADGK TEVVSIGGKTYAASKAEGHNFKAQPDLAEEAATT TENPLQKIDAALAQVDTLRSDLGAVQNRFNSAIT NLGNTVNNLTSARLEHHHHHH
20	염기서열		cgacagcaactgaggatgtgaaaaatgtacaagttgcaaatgctgattgaca gaggctaaagccgattgacagcagcaggtgtaccggcacagcatctgtgt taagatgtcttatactgataataacggtaaaactattgatgggtgtagcagtaa ggtaggcgatgattactattctgcaactcaaaataaagatggtccataagtatta atactacgaaatacactgcagatgacggtagatccaaaactgcactaaacaaa ctgggtggcgacagcggcaaaaccgaagttgttctattggtgtaaaacttac gctgcaagtaaagccgaaggtcacaactttaagcacagcctgatctggcgg aagcggctgtacaaccaccgaaaaccgctgcagaaaattgatgctgctttg gcacaggttgacacgttacgttctgacctgggtgcggtacagaaccgttcaac tccgctattaccaacctgggcaacaccgtaaacacctgacttctgcccgctc gagcaccaccaccaccactga

Δ FliC(C)- V _L 12.3 ^{cys}	21	아미노산 서열	MGFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEIN NNLQRVRELA VQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRLN EIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGET IDIDLKQINSQTLGLDTLNVQQKYKVS DTAATVT GYADTTIALDNSTFKASATGLGGTDQKIDGDLKF DDTTGKYYAKVTVTGGTGKDGYYEVSVDKTNG EVTLAGGATSPLTGGLPATATEDVKNVQVANAD LTEAKAALTAAGVTGTASVVKMSYTDNNGKTID GGLAVKVGDDYYSATQNKDGSISINTTKYTADD GTSKTALNKLGGADGKTEVVSIGGKTYAASKAE GHNFKAQPD LAEAAATTENPLQKIDAALA QVD TLRSDLGAVQNRFN SAITNLGNTVNNLTSARLEG GSMG SQPVL TQSPSV SAAPRQRVTISVSGSNSNIG SNTVNW IQQLPGRAP ELLMCD DDL LAPGVSDRFS GSRSGT SASLTISGLQSEDEADYYAATWDDSLNG WVFGGGTKVTVLSALEHHHHHH
	22	염기서열	aagcacagcctgatctggcggaagcggctgtacaaccaccgaaaaccgcg tgcagaaaattgatgctgctttggcacagggtgacacgttacgttctgacctgg gtgcggtacagaaccgttcaactccgctattaccaacctgggcaacaccgta aacaacctgacttctgccgctcgcagggtgtagcatgggtagtcaaccagt acttacacaaagcccgtctgtctgccgctccacgtcagagagtcaccatctc agttagtggttcaattcaaatataggatcgaacacagtgaaactggattcagcag ttgctgcccgtgccccggagttattaatgtgtgatgatgattattagcaccgg gagtatcagatcgttttcaggaagccgtagtggcactagtgcgctccttaacca ttagcgggttacagtctgaagacgaagcggactattacgcagctacgtgggat gatagtttaaatggctgggttttgggtggtgactaaagttacgggtgctgtccgc actcgagcaccaccaccaccactga
Δ FliC(I)- V _L 12.3 ^{cys}	23	아미노산 서열	MGFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEIN NNLQRVRELA VQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRLN EIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGET IDIDLKQINSQTLGLDTLNVQQKYKVS DTAATVT GYADTTIALDNSTFKASATGLGGTDQKIDGDLKF DDTTGKYYAKVTVTGGSGGSMG SQPVL TQSPSV SAAPRQRVTISVSGSNSNIGSNTVNW IQQLPGRAP ELLMCD DDL LAPGVSDRFSGSRSGT SASLTISGLQ SEDEADYYAATWDDSLNGWVFGGGTKVTVLSA GHMLVPRGSGGSVDGTGKDGYYEVSVDKTNGE

		VTLAGGATSPLTGGLPATATEDVKNVQVANADL TEAKAALTAAGVTGTASVVKMSYTDNNGKTIDG GLAVKVGDDYYSATQNKDGSISINTTKYTADDGT SKTALNKLGGADGKTEVVSIGGKTYAASKAEGH NFKAQPDLAEEAATTENPLQKIDAALAQVDTLR SDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLTSARLEHHHH HH
24	염기서열	ctcttgctggcggcgcgacttccccgctfacaggtggactacctgcgacagca actgaggatgtgaaaaatgtacaagttgcaaatgctgatttgacagaggctaaa gccgcattgacagcagcaggtgttaccggcacagcatctgtttagatgtct tatactgataataacggtaaaactattgatgggtgtagcagttaaggtaggcg atgattactattctgcaactcaaaataaagatggttccataagtattaatactacg aaatacactgcagatgacggatcacaaaactgcactaaacaaaactgggtgg cgcagacggcaaaaccgaagttgttctattgggtgtaaaacttacgctgcaag taaagccgaaggtcacaaactttaagcacagcctgatctggcgggaagcggct gtacaaccaccgaaaaccgctgcagaaaattgatgctgctttggcacaggt tgacacgttacgttctgacctgggtgcggtacagaaccgttcaactccgctatt accaacctgggcaacaccgtaaacaacctgacttctgcccgtctcgagcacc accaccaccaccactga

- [198] 클로닝된 벡터를 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 형질전환하고, 박테리아의 O.D.₆₀₀ 값이 0.7에 도달할 때, 1 mM IPTG를 첨가하여 융합 단백질 생산을 유도하였다. 37°C에서 3시간 배양한 후, 4°C에서 4000 rpm, 30분 동안 원심분리를 통해 *E. coli* (DE3)를 수확하였다.
- [199] 수확한 세포 펠릿을 20 mM Tris(pH 8.0), 200 mM NaCl, 10 mM β-메르kap토에탄올(β-mercaptoethanol) 및 0.1 mM PMSF를 포함한 용해 완충액(lysis buffer)에 재현탁하고, 마이크로플루다이저(microfluidizer, Microfluidics, Westwood, MA)를 사용하여 균질화시켰다. 15,000 rpm으로 4°C에서 40분 동안 원심분리한 후, 단백질을 Ni-NTA 킬레이팅 아가로스 CL-6B(Incospharm, Daejeon, Korea) 및 Q-Sepharose(GE Healthcare, Pittsburgh, PA) 음이온 교환 컬럼으로 정제하였다. 플라젤린-V_L12.3^{cys} 융합 단백질을 포함하는 분획을 수득한 후 농축시켰다.
- [200]
- [201] <실험예 1> 나노 입자의 제조
- [202] <1-1> 크기 배제 크로마토그래피를 이용한 나노 입자 제조 확인
- [203] 실시예 2 내지 4에서 제조한 각 단백질의 정확한 농도는 SDS-PAGE와 농도계(densitometry)에 의해 계산되었고, 먼저 실시예 2에서 제조한 단량체 융합 단백질을 케이지 형태의 페리틴 자가조립체와 I3-01 자가조립체를 제조하였다.

제조한 자가조립체에 하기 표 9에 기재된 조합으로 실시예 3 및 4에서 제조한 항원 또는 플라젤린을 혼합하여 자가조립체에 결합시켜 나노 입자를 제조하였다.

[204] [표9]

혼합물 종류	생성물
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, ΔFliC(I)-V _L 12.3 ^{cys} , HA-V _L 12.3 ^{cys}	Ftn-HA-ΔFliC(I)
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, ΔFliC(I)-V _L 12.3 ^{cys} , PA-V _L 12.3 ^{cys}	Ftn-PA-ΔFliC(I)
HTT ^{cys} -I3-01 자가조립체, ΔFliC(I)-V _L 12.3 ^{cys} , HA-V _L 12.3 ^{cys}	I3-01-HA-ΔFliC(I)

[205] 제조한 나노 입자를 DPBS(Dulbecco 's phosphate-buffered saline, Welgene)를 완충제로 사용하여 Superdex 200(GE Healthcare) 크기 배제 크로마토그래피로 추가 정제하였다. 원하는 나노 입자를 포함하는 분획을 모아 농축시키고, High-Capacity Endotoxin Removal Resin(Pierce, Thermo Scientific, San Jose, CA)를 사용하여 엔도톡신을 제거하고, 농축된 단백질 용액을 여과멸균하였다. 자가조립된 나노 입자는 크기 배제 크로마토그래피를 통해 확인하였다.

[206]

[207] 크기 배제 크로마토그래피 용출 프로파일에서 볼 수 있듯이, PA, HA 및 플라젤린은 페리틴 자가조립체에 안정적으로 결합하였고, HA 및 플라젤린은 또한 I3-01 자가조립체에 안정적으로 결합하였다 (도 3a 내지 도 3c).

[208]

[209] <1-2> SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯팅을 이용한 나노 입자 제조 확인

[210] 실시예 2 내지 4에서 제조한 각 단백질의 정확한 농도는 SDS-PAGE와 농도계(densitometry)에 의해 계산되었고, 먼저 실시예 2에서 제조한 단량체 용합 단백질을 케이지 형태의 페리틴 자가조립체를 제조하였다. 제조한 자가조립체에 하기 표 10에 기재된 조합으로 실시예 3 및 4에서 제조한 항원 또는 플라젤린을 혼합하여 자가조립체에 결합시켜 나노 입자를 제조하였다.

[211] [표10]

혼합물 종류	생성물
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, HA-V _L 12.3 ^{cys}	Ftn-HA
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, ΔFliC(I)-V _L 12.3 ^{cys} , HA-V _L 12.3 ^{cys}	Ftn-HA-ΔFliC(I)

[212] 제조한 나노 입자를 β-머캅토에탄올을 포함하는 환원 조건과 β-머캅토에탄올을 포함하지 않은 비환원 조건에서 각각 SDS-PAGE로

분석하였다. 그 결과, Ftn-HA- Δ FliC(I)의 HA, Δ FliC(I) 및 HTT^{cys}-Ftn은 환원 조건의 겔에서 예상되는 위치에서 확인되었다. 그러나, 비환원 조건의 겔에서는 환원 조건에서보다 더 높은 분자량 위치에서 밴드가 확인되었다 (도 4).

[213] 환원 조건의 겔에서 위치가 이동한 밴드가 Ftn-HA 임을 확인하기 위해, 웨스턴 블롯팅을 수행하였으며, Ftn-HA의 밴드는 항-HA 항체(sc-52025, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)를 이용하여 확인하였다. 그 결과, 환원 조건의 겔에서 위치가 이동한 밴드는 Ftn-HA 임을 확인하였다.

[214] 상기 결과로부터, HTT^{cys}와 VL12.3^{cys} 사이에 의도된 이황화 결합이 형성되었으며, Ftn과 HA, 그리고 Ftn과 플라젤린이 비가역적으로 연결되었음을 보여준다 (도 4).

[215]

[216] <실험예 2> 면역증강제(Adjuvant)로서 플라젤린 선택

[217] <실험예 2-1> FliC와 Δ FliC에 따른 TLR5 활성화 측정

[218] 면역증강제(adjuvant)로서 플라젤린 내의 D0 도메인의 효과를 조사하기 위해, D0 내지 D3를 모두 포함하는 전장(full-length) 플라젤린(FliC)과 D1 내지 D3를 포함하는 D0 도메인이 절단된 플라젤린(Δ FliC)의 TLR5 활성화능을 측정하였다. 이를 위해 실시예 2-1에서 제조한 HTT^{cys}-Ftn 융합 단백질의 단량체로부터 제조한 페리틴 자가조립체에 실시예 4에서 제조한 V_L12.3^{cys}-FliC(N) 및 V_L12.3^{cys}- Δ FliC(N))을 각각 혼합하여, Ftn-FliC(N)과 Ftn- Δ FliC(N)을 제조하였다.

[219]

[220] TLR5 활성화 측정 과정은 다음과 같다. 24-웰 플레이트의 2×10⁵의 HEK293 세포를 X-tremeGENE HP DNA 형질 전환 시약(Roche, Basel, Switzerland)을 이용하여 500 ng의 hTLR5 발현벡터(pcDNA3.1/hTLR5), 200 ng pBII firefly NF- κ B 리포터 벡터 및 10 ng pRL-TK Renilla 인터널 컨트롤 벡터(internal control vector)로 형질전환하였다. 24시간 후, Ftn- Δ FliC(N) 및 Ftn-FliC(N)를 처리하고 18시간 동안 추가 배양하였다. 각 세포의 상대적인 루시퍼라제 활성(RLU, firefly/renilla)은 듀얼 루시퍼라제 리포터 어세이(Promega, Madison, WI) 키트 및 VICTOR 3 멀티라벨 플레이트 리더(Wallac 1420, Perkin Elmer)로 제조사의 프로토콜에 따라 분석하였으며, 결과 수치는 DPBS 완충액으로 처리된 샘플의 RLU로 표준화하였다.

[221] 그 결과, 전장 플라젤린(FliC)은 절단된 플라젤린(Δ FliC)보다 단지 1.4 내지 2.3 배의 활성을 나타내었다 (도 5).

[222]

[223] <실험예 2-2> FliC와 Δ FliC에 따른 IgG 수치 측정

[224] 시험관 내에서(*in vitro*) 전장(full-length) 플라젤린(FliC)과 절단된 플라젤린(Δ FliC)에 따른 면역 반응을 비교하고자 하였다. 이를 위해 상기 <실험예 2-1>에 기재된 바와 유사하게 HTT^{cys}-Ftn 융합 단백질로 구성된 페리틴 자가조립체에 표 11에 기재된 바와 같이 HA-V_L12.3^{cys}와 Δ FliC(N)-V_L12.3^{cys} 또는

HA-V_L12.3^{cys}와 FliC(N)-V_L12.3^{cys} 를 혼합하여 Ftn-HA-ΔFliC(N) 및 Ftn-HA-FliC(N)를 제조하였다.

[225] [표11]

혼합물 종류	생성물
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, ΔFliC(N)-V _L 12.3 ^{cys} , HA-V _L 12.3 ^{cys}	Ftn-HA-ΔFliC(N)(Ftn : HA : ΔFliC = 24:10:2.5)
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, FliC(N)-V _L 12.3 ^{cys} , HA-V _L 12.3 ^{cys}	Ftn-HA-FliC(N)(Ftn : HA : FliC = 24:10:2.5)

[226] 마우스에 주사하기 전에 페리틴에 결합된 HA 항원 또는 플라젤린의 몰비(표 11)은 SDS-PAGE 및 농도계를 이용하여 확인하였으며, 조립된 나노 입자에서 페리틴과 HA의 몰비는 24:10이었다.

[227] 충남대학교 실험 동물 관리위원회의 승인을 얻은 후 대한 바이오 링크(Eumseong, Korea)로부터 구입한 후, 6주령의 암컷 BALB/c 마우스를 각 5마리의 두 그룹으로 나눈 후 3주 간격으로 Ftn-HA-ΔFliC(N) 및 Ftn-HA-FliC(N)을 포함한 PBS 용액(HA의 농도, 5.2 μg/100 μl PBS)으로 우측 측면에 2회 피하 주사하였다.

[228] 1차 면역 접종 1주일 전 그리고 1차 면역 접종 및 반복 접종(priming and boosting) 2주 후에 안구에서 혈액을 채혈한 후 혈청 내 IgG(Total IgG, IgG₁ 및 IgG_{2a}) 수치를 하기에 기재된 바와 같이 ELISA로 측정하였다. 96웰 플레이트(microtiter plate; Komabiotech., Seoul, Korea)의 웰을 10 μg/ml의 HA 코팅 완충액(pH 9.6, Komabiotech) 100 μl로 4°C에서 밤새 코팅한 후, 세척 완충액(0.05 % Tween을 포함하는 1×PBS)으로 3회 세척하고 실온에서 2시간 동안 1% BSA를 함유한 PBS로 블로킹시켰다. 채취한 혈청을 0.1% BSA를 함유한 PBS에 1:100으로 희석하고, 추가로 연속 10배 희석한 샘플을 BSA-블로킹된 웰에 첨가하였다. 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, 플레이트를 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 호스래디쉬페록시다제(Horseradish peroxidase; Abcam, Cambridge, UK)가 결합된 항체(conjugated with goat anti-mouse IgG, IgG₁, IgG_{2a} 또는 IgG_{2b})를 0.1% BSA를 함유한 PBS에 1:10,000으로 희석하여 첨가하였다. 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, 플레이트를 세척 완충액으로 3회 다시 세척하고, 100 μl TMB 현상액(Komabiotech)을 첨가하였다. 10분 후에 0.5M 황산 100 μl로 반응을 정지시키고, 색상을 마이크로 플레이트 판독기(Tecan GENios Pro, Mannedorf, Switzerland)로 450 nm에서 측정하였다. 1:100으로 희석한 미리 면역화된 마우스 혈청보다 2배 높은 OD₄₅₀을 나타낸 가장 많이 희석한 샘플을 항체의 최종 항체 역가로 정하였다.

[229]

[230] 그 결과, 혈청 IgG₁ 수치는 Ftn-HA-ΔFliC(N) 및 Ftn-HA-FliC(N) 모두

비슷했다(도 6). Ftn-HA- Δ FliC(N) 처리 시, 혈청 내 총 IgG 및 IgG_{2a}의 양은 각각 2.1 및 2.7배 더 높은 수준을 나타내었다. 플라젤린의 D0 도메인은 본 발명의 플라젤린-페리틴 시스템에서 IgG 반응에 별 영향이 없는 것으로 결론을 내렸으며, 후속 실험에서 나노 입자를 만드는데 D0 도메인이 없는 플라젤린을 사용하였다.

[231]

[232] <실험예 3> 플라젤린에의 융합 부위(Δ FliC(C), Δ FliC(I) 및 Δ FliC(N))에 따른 TLR5 활성화 측정

[233] 플라젤린(Δ FliC)에의 최적의 융합 부위를 확인하기 위해, 실시예 2-1에서 제조한 HTT^{cys}-Ftn 융합 단백질의 단량체로부터 케이지 형태의 페리틴 자가조립체를 제조하였다. 제조한 자가조립체에 실시예 4에서 제조한 V_L12.3^{cys}- Δ FliC(N), V_L12.3^{cys}- Δ FliC(C) 및 V_L12.3^{cys}- Δ FliC(I)을 각각 혼합하여, Ftn:FliC(Δ FliC)가 24:10의 몰비인 Ftn- Δ FliC(N), Ftn- Δ FliC(C) 및 Ftn- Δ FliC(I)의 나노 입자를 제조하고, 이의 TLR5 활성화능을 측정하였다.

[234]

[235] TLR5 활성화 측정은 실험예 2-1의 나노 입자 대신 Ftn- Δ FliC(N), Ftn- Δ FliC(C), Ftn- Δ FliC(I) 그리고 페리틴 나노 입자(Ftn)과 플라젤린(Δ FliC)의 비결합된 혼합물(Ftn + Δ FliC)을 사용한 것을 제외하고, 실험예 2-1에 기재된 방법과 동일한 방법으로 수행되었다.

[236]

[237] 그 결과, 페리틴과 플라젤린(Δ FliC)의 비결합된 혼합물(Ftn + Δ FliC)은 무시할 수 있을 정도의 활성을 나타내었고, 플라젤린이 결합된 모든 페리틴 나노 입자는 농도 의존적으로 TLR5를 활성화시켰다(도 7). 특히 Ftn- Δ FliC(N) 또는 Ftn- Δ FliC(I) 경우, Ftn- Δ FliC(C) 보다 1.3 내지 1.9배 더 높게 TLR5를 활성화시켰는데, 이는 Δ FliC의 N-말단 또는 D3 도메인과 페리틴과의 결합이 TLR5 신호 전달 경로를 자극하는데 매우 효과적임을 제시한다. D3 도메인은 TLR5와의 상호 작용에 관여하지 않기 때문에, 후속 실험에서 Δ FliC의 238G와 238G 사이에 V_L12.3^{cys} 도메인과 융합시킨 페리틴 나노 입자를 선택했다.

[238]

[239] <실험예 4> 플라젤린이 결합된 페리틴 나노 입자의 면역 반응

[240] 실험예 3에서 플라젤린-페리틴 나노 입자는 플라젤린이 비결합된 나노 입자보다 TLR5를 더 효과적으로 활성화시켰으므로, 플라젤린-페리틴 나노 입자가 보다 강력한 면역증강(adjuvant) 반응을 나타낼 수 있는지 조사하였다.

[241]

이를 위해, 실시예 2-1에서 제조한 HTT^{cys}-Ftn 융합 단백질로부터 페리틴 자가조립체를 제조하였다. 제조한 자가조립체에 하기 표 12에 기재된 바와 같이 실시예 3 및 4에서 제조한 항원 또는 플라젤린을 혼합하여, Ftn- Δ FliC(I), Ftn-HA 및 Ftn-HA- Δ FliC(I)를 제조하였다.

[242] [표12]

혼합물 종류	생성물
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, ΔFliC(I)-V _L 12.3 ^{cys}	Ftn-ΔFliC(I)(Ftn : ΔFliC = 24:10)
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, HA-V _L 12.3 ^{cys}	Ftn-HA(Ftn : HA = 24:10)
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, ΔFliC(I)-V _L 12.3 ^{cys} , HA-V _L 12.3 ^{cys}	Ftn-HA-ΔFliC(I)(Ftn : HA : ΔFliC = 24:10:3.3)

[243] 마우스 혈청 내 IgG 수치 측정은 실험예 2-2의 나노 입자 대신 HA, Ftn+ΔFliC(I)+HA, Ftn-ΔFliC(I)+HA, Ftn-HA+ΔFliC(I), Ftn-HA-ΔFliC(I)을 사용한 것을 제외하고, 실험예 2-2에 기재된 방법과 동일한 방법으로 수행하였다. 결합(conjugated) 및 비결합(non-conjugated) 형태의 HA의 총 농도는 100 μl PBS 당 5.2 μg이었으며, 최종 조립된 나노 입자에서 페리틴 대 HA의 몰비(molar ratio)는 24:10 이었다.

[244]

[245] 시험관 내에서(*in vitro*) TLR5 활성화 분석에서 관찰된 것과는 달리, Ftn-ΔFliC(I) + HA(HA는 비결합된 형태로 처리)는 Ftn + ΔFliC + HA(ΔFliC 및 HA 모두 비결합된 형태로 처리)와 유사한 수준으로 마우스에서 약한 혈청 IgG 반응을 유도하였다(도 8a). 그러나 Ftn-HA-ΔFliC(I)는 Ftn-HA + ΔFliC(ΔFliC는 비결합된 형태로 처리) 보다 16.7 배 더 높은 IgG 반응을 유도하였다(도 8b). 이러한 결과는 항원과 플라젤린을 융합시키는 것이 항원과 플라젤린의 단순한 혼합보다 강력한 면역 반응을 유도함을 보여준다. 또한 HA와 플라젤린이 서로 간에 직접적으로 결합되지 않더라도 페리틴 자가조립체에 HA와 플라젤린의 동시 결합(simultaneous conjugation)은 강력한 혈청 항체 반응을 유도할 수 있으며, HA-페리틴 나노 입자에 부착된 플라젤린이 강력한 면역증강제(adjuvant)임을 제시한다.

[246]

[247] <실험예 5> 세포성 면역 반응(cellular immune response)에 필요한 플라젤린의 최소량 확인

[248] <실험예 5-1> HA:ΔFliC의 몰비에 따른 IgG 수치 측정

[249] 면역증강(adjuvant) 활성화에 필요한 HA-페리틴 나노 입자의 플라젤린의 최소량을 확인하기 위해, HA 대 플라젤린의 몰비에 따른 마우스의 면역 반응을 조사하였다.

[250] 이를 위해 실시예 2-1에서 제조한 HTT^{cys}-Ftn 융합 단백질로부터 케이지 형태의 페리틴 자가조립체를 제조하였다. 제조한 자가조립체에 하기 표 13에 기재된 조합으로 V_L12.3^{cys}-ΔFliC(I)과 HA-V_L12.3^{cys} 융합 단백질을 혼합하여, HA 대

Δ FliC(I)의 몰비가 1:1 내지 4:1인 Ftn-HA- Δ FliC(I)을 제조하였다.

[251]

[252] [표13]

혼합물 종류	생성물
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, HA-V _L 12.3 ^{cys}	Ftn-HA(Ftn : HA = 24:10)
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, Δ FliC(I)-V _L 12.3 ^{cys} , HA-V _L 12.3 ^{cys} (혼합 시 HA-V _L 12.3 ^{cys} : Δ FliC(I)-V _L 12.3 ^{cys} = 3:1)	Ftn-HA- Δ FliC(I)(Ftn: HA: Δ FliC = 24:10:10)
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, Δ FliC(I)-V _L 12.3 ^{cys} , HA-V _L 12.3 ^{cys} (혼합 시 HA-V _L 12.3 ^{cys} : Δ FliC(I)-V _L 12.3 ^{cys} = 6:1)	Ftn-HA- Δ FliC(I)(Ftn: HA: Δ FliC = 24:10:5)
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, Δ FliC(I)-V _L 12.3 ^{cys} , HA-V _L 12.3 ^{cys} (혼합 시 HA-V _L 12.3 ^{cys} : Δ FliC(I)-V _L 12.3 ^{cys} = 9:1)	Ftn-HA- Δ FliC(I)(Ftn: HA: Δ FliC = 24:10:3.3)
HTT ^{cys} -Ftn 자가조립체, Δ FliC(I)-V _L 12.3 ^{cys} , HA-V _L 12.3 ^{cys} (혼합 시 HA-V _L 12.3 ^{cys} : Δ FliC(I)-V _L 12.3 ^{cys} = 12:1)	Ftn-HA- Δ FliC(I)(Ftn: HA: Δ FliC = 24:10:2.5)

[253] 마우스 혈청 내 IgG 수치 측정은 실험예 2-2의 나노 입자 대신 Ftn-HA, HA: Δ FliC(I)의 몰비가 1:1 내지 4:1인 Ftn-HA- Δ FliC(I)을 사용한 것을 제외하고, 실험예 2-2에 기재된 방법과 동일한 방법으로 수행하였다. HA의 총 농도는 100 μ l PBS 당 5.2 μ g이었으며, 최종 조립된 나노 입자에서 페리틴 대 HA의 몰비(molar ratio)는 24:10 이었다.

[254]

[255] 그 결과 도 9a 내지 도 9e에 나타낸 바와 같이, 총 IgG 및 IgG₁ 생산은 HA: Δ FliC(I)의 몰비가 4:1 이어도 유의한 영향을 받지 않았다. 그러나 HA 대 Δ FliC의 몰비가 4:1인 경우의 IgG_{2a}의 수치는 그의 몰비가 1:1인 경우 보다 4.8 배 낮았다. 따라서, HA: Δ FliC의 몰비가 4:1일 때, 혈청 내 IgG_{2a}에 대한 IgG₁의 비는 4배 증가하였다. 혈청 IgG2b 수준 또한 35.1% 감소했다.

[256] 면역 글로불린 IgG1으로의 클래스 전환은 인터루킨-4(IL-4), IgG2a으로의 클래스 전환은 인터페론-감마(IFN- γ)와 같은 사이토카인이 필요하므로, IgG1의 증가는 Th2 반응의 증가이며, IgG2a의 증가는 Th1 반응의 증가이다. 페리틴 자가조립체에 결합한 헤마글루티닌 대 플라젤린의 몰비는 3:1 까지 IgG2a 클래스 전환과 Th1 반응에 영향이 없이 플라젤린의 양을 줄일 수 있음을 확인하였다.

[257]

[258] <실험예 5-2> HA: Δ FliC의 몰비에 따른 사이토카인 분비량 측정

- [259] 면역 글로불린의 클래스 전환은 주로 B 림프구와 특이적인 사이토카인, 구체적으로 IgG1을 만드는데 필요한 인터루킨-4(IL-4) 및 IgG2a를 만드는데 요구되는 인터페론-감마(IFN- γ)와 같은 사이토카인과의 상호작용에 의해 영향을 받는다. 따라서 <실험예 5-1>에서 제조한 Ftn-HA 또는 Ftn-HA- Δ FliC 나노 입자가 주입된 마우스의 비장 세포에서 사이토카인을 측정하였다.
- [260] 구체적으로, 마우스에 Ftn-HA 또는 Ftn-HA- Δ FliC 나노 입자를 반복 접종(boosting)하고 3주 후에 비장 세포를 분리하였다. RBC 용해 완충액(lysis buffer, Sigma)로 적혈구를 용해시킨 비장 세포(1×10^6 세포)를 96-웰 플레이트에 분주한 후, HA 캘리포니아(H1N1)의 100 μ g/ml 농도의 139 15-mer 펩타이드의 혼합물(PM-INFA-HACal, JPT innovative peptide solutions, Berlin, Germany) 10 μ g/ml로 자극하고, 37°C, 5% CO₂에서 3일간 배양하였다. 상등액을 수득, INF- γ 및 IL-4의 양을 ELISA 키트(Komabiotech)를 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라 측정하였다.
- [261]
- [262] 도 10a 및 도 10b에 나타낸 바와 같이, Ftn-HA- Δ FliC 나노 입자가 주입된 마우스의 비장 세포를 HA 펩티드로 자극하였을 때, IFN- γ 분비는 Ftn-HA가 투여된 마우스의 비장 세포보다 HA: Δ FliC의 물비가 1:1 또는 2:1에서 각각 2.8배 또는 5.4배 더 높았다. 그러나 IFN- γ 의 분비량은 HA: Δ FliC의 물비가 4:1일 때, 유의하게 감소하였다. IL-4의 분비량도 Δ FliC을 페리틴 자가조립체에 결합시킨 경우 증가하였지만, 분비량은 4:1 까지의 HA: Δ FliC 비율에 민감하지 않았다.
- [263] 종합적으로, 이러한 결과는 HA 및 플라젤린이 동시에 결합된 페리틴 나노 입자가 체액성 면역 반응 및 항원-특이적 T세포 반응을 자극하며, IgG2a 클래스 전환 및 Th1 반응에 영향 끼치는 것 없이 HA 대 플라젤린의 물비를 3:1 까지 줄일 수 있음을 제시한다.
- [264]
- [265] <실험예 5-3> HA의 분자수에 따른 IgG 수치 확인
- [266] 페리틴 자가조립체에 결합된 HA 분자의 수에 따라 혈청 IgG 수치에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해 실시예 2-1에서 제조한 HTT^{cys}-Ftn 단백질로부터 케이지 형태의 페리틴 자가조립체를 제조하고, 상기 제조한 자가조립체에 실시예 3-1에서 제조한 V_L12.3^{cys} 융합 단백질을 혼합하여 HA 4분자만 가진 Ftn-HA(low) 나노 입자와 HA 24분자를 가진 Ftn-HA(high) 나노 입자를 생산하고, 이들의 면역 자극 활성(immunostimulatory activities)을 비교했다.
- [267] 마우스 혈청 내 IgG 수치 측정은 실험예 2-2의 나노 입자 대신 Ftn-HA(low), Ftn-HA(high) 및 HA: Δ FliC(I)의 물비가 3:1인 Ftn-HA- Δ FliC(I)을 사용한 것을 제외하고, 실험예 2-2에 기재된 방법과 동일한 방법으로 수행하였다.
- [268] 그 결과 도 11a 내지 도 11e에 도시된 바와 같이, Ftn-HA(high) 나노 입자는 Ftn-HA(low) 나노 입자보다 강력한 총 IgG, IgG₁, IgG_{2a} 및 IgG_{2b} 반응을 유도하였다. 그러나 IgG₁ 이외의 IgG 반응은 Ftn-HA-FliC의 3:1 비율(Ftn-HA-FliC

내 HA:플라젤린의 몰비=3:1)의 IgG 반응보다 유의하게 낮았다. 특히, Ftn-HA- Δ FliC 3:1 나노 입자에 의해 유도된 IgG_{2a} 및 IgG_{2b} 수준은 Ftn-HA(high) 나노 입자에 의해 유도된 것보다 각각 1.8 및 7 배 더 높았다. 이러한 결과는 최대로 결합된(conjugated) HA가 체액성 면역 반응을 유도하는데 유용하지만, 자가 면역 증강 활성(self-adjuvant activity)을 가진 매우 효과적인 나노 입자를 생산하기 위해서는 플라젤린이 페리틴 자가조립체에 결합되어야 함을 나타낸다.

[269]

[270] <실험예 6> 면역화된 마우스에서의 백신 효과 확인

[271] Ftn-HA 및 Ftn-HA- Δ FliC(I)가 생 바이러스 감염으로부터 보호할 수 있는지 확인하기 위해, 마우스를 면역화시킨 후 생존율 및 체중을 측정하였다.

[272] 구체적으로, 실험예 2-2와 같이 대한 바이오 링크로부터 구입한 6주령의 암컷 BALB/c 마우스를 각 5마리씩 두 그룹으로 나눈 후, 3주 간격으로 Ftn-HA 및 Ftn-HA- Δ FliC(I)를 포함한 PBS 용액을 우측 측면에 2회 피하주사하였다. 반복 접종 2주 후, 동종 유행성 H1N1 바이러스(A/California/7/2009)를 치사량으로 마우스에 투여하였다. 투여한 후 10일 간 마우스의 개체 수와 체중을 측정하였다.

[273] 그 결과, 나이브(naive) 마우스와 빈 케이지(Ftn)를 투여한 마우스는 7일 이내에 사망하였으나, Ftn-HA, Ftn-HA- Δ FliC(I)로 면역화된 마우스는 불활성화된 H1N1 바이러스로 이루어진 2016-2017 QIV로 면역화된 마우스와 같이 생존하였다 (도 12a). 체중 측정 결과도 Ftn-HA- Δ FliC(I) 및 2016-2017 QIV로 면역화된 마우스는 6~7일 동안 원래 체중의 92% 수준까지 신속하게 도달하여 체중이 증가하기 시작하였으나, Ftn-HA를 투여한 마우스는 8~9일에 체중의 90% 수준까지만 회복하였다 (도 12b).

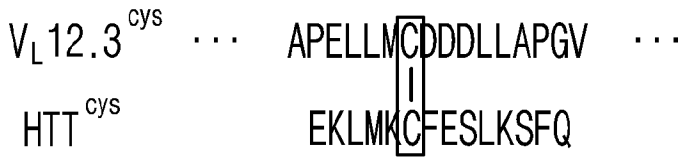
[274] 상기 결과는 Ftn-HA- Δ FliC(I) 치명적인 바이러스 감염으로부터 우수한 면역 효과를 나타냄을 입증한다.

[275]

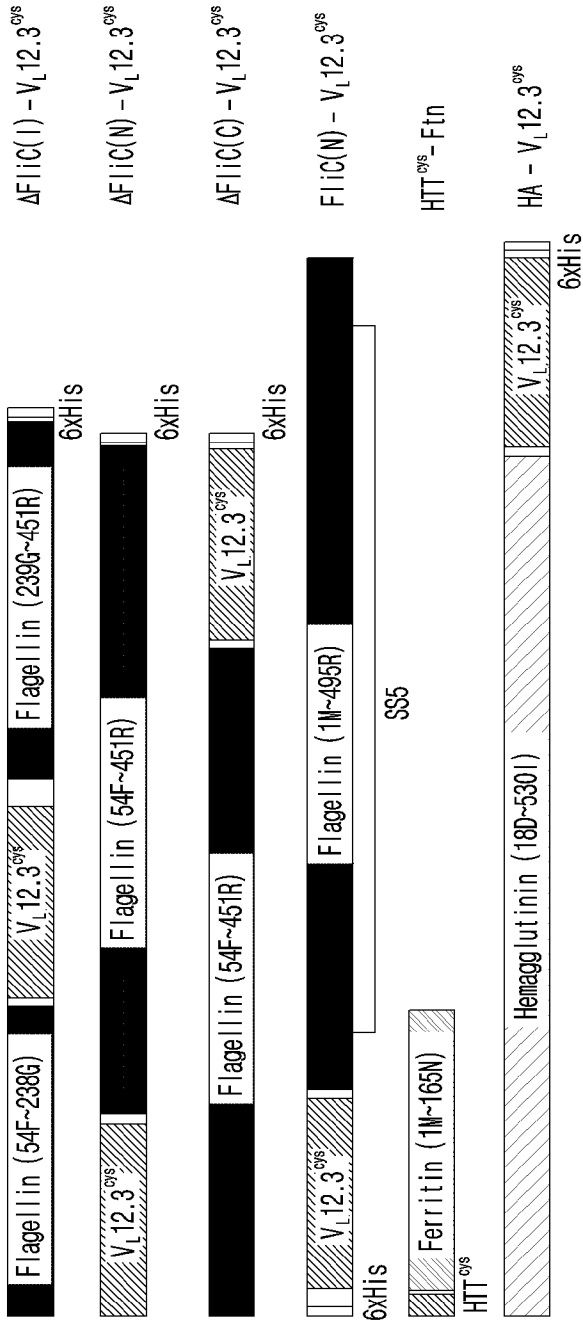
청구범위

- [청구항 1] HTT^{cys} 펩타이드 및 페리틴 단량체의 융합 단백질 24개의 자가조립체; $\text{V}_L12.3^{\text{cys}}$ 펩타이드 및 항원 펩타이드가 융합된 융합 단백질; 및 $\text{V}_L12.3^{\text{cys}}$ 펩타이드 및 면역 증강제(adjuvant)의 융합 분자를 포함하는 나노 입자로서,
상기 항원 펩타이드 및 면역 증강제는 상기 HTT^{cys} 펩타이드와 $\text{V}_L12.3^{\text{cys}}$ 펩타이드 간의 결합에 의해 페리틴 자가조립체와 연결된 것인, 나노 입자.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 HTT^{cys} 펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 것인 나노 입자.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 $\text{V}_L12.3^{\text{cys}}$ 펩타이드는 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성된 것인 나노 입자.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 HTT^{cys} 펩타이드와 $\text{V}_L12.3^{\text{cys}}$ 펩타이드 간의 결합은 항원-항체 결합 및 이황화 결합을 포함하는, 나노 입자.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 면역 증강제는 면역 증강 펩타이드인, 나노 입자.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 HTT^{cys} 펩타이드는 페리틴 단량체의 N-말단에 융합된 것인, 나노 입자.
- [청구항 7] 제5항에 있어서,
상기 $\text{V}_L12.3^{\text{cys}}$ 펩타이드는 항원 펩타이드 또는 면역 증강 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 융합되거나 내부에 삽입된 것인, 나노 입자.
- [청구항 8] 제5항에 있어서,
상기 나노 입자 내의 항원 펩타이드와 면역 증강 펩타이드의 몰비는 0.1~10:1인, 나노 입자.
- [청구항 9] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 나노 입자를 포함하는, 백신 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 백신은 총 IgG 수치를 증가시키는 것인, 백신 조성물.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 백신은 세포성 면역 및 체액성 면역을 증진시키는 것인, 백신 조성물.

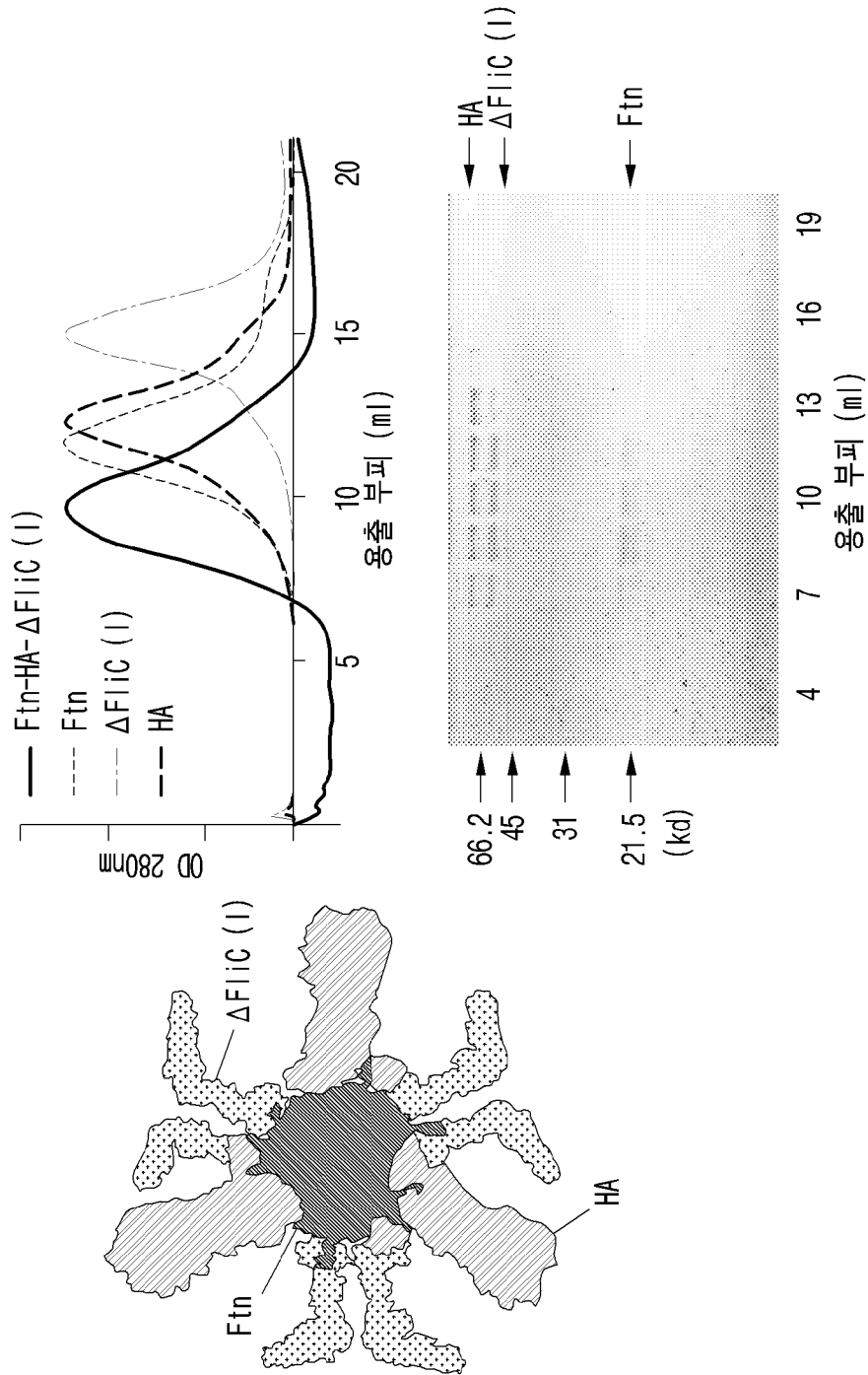
[도 1]



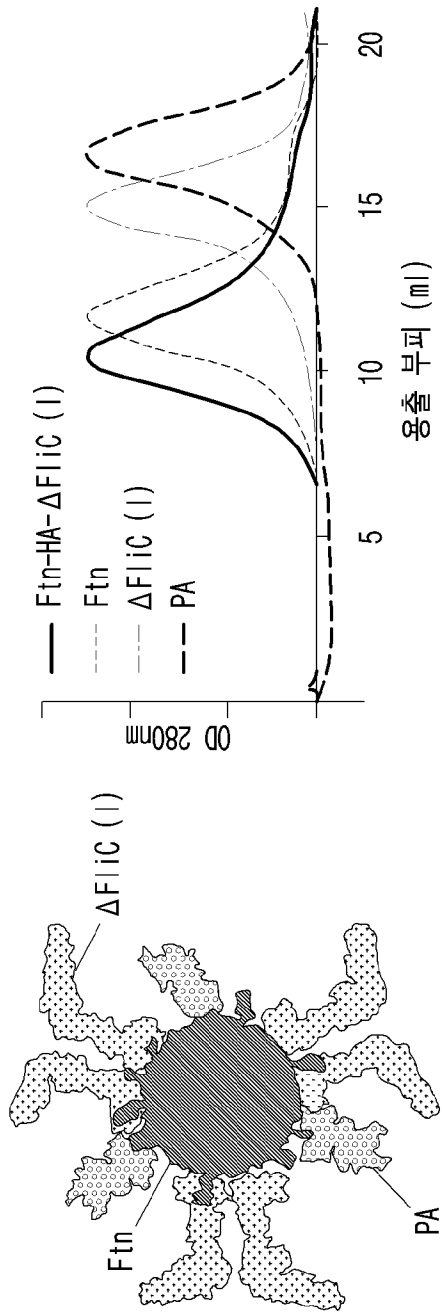
[도 2]



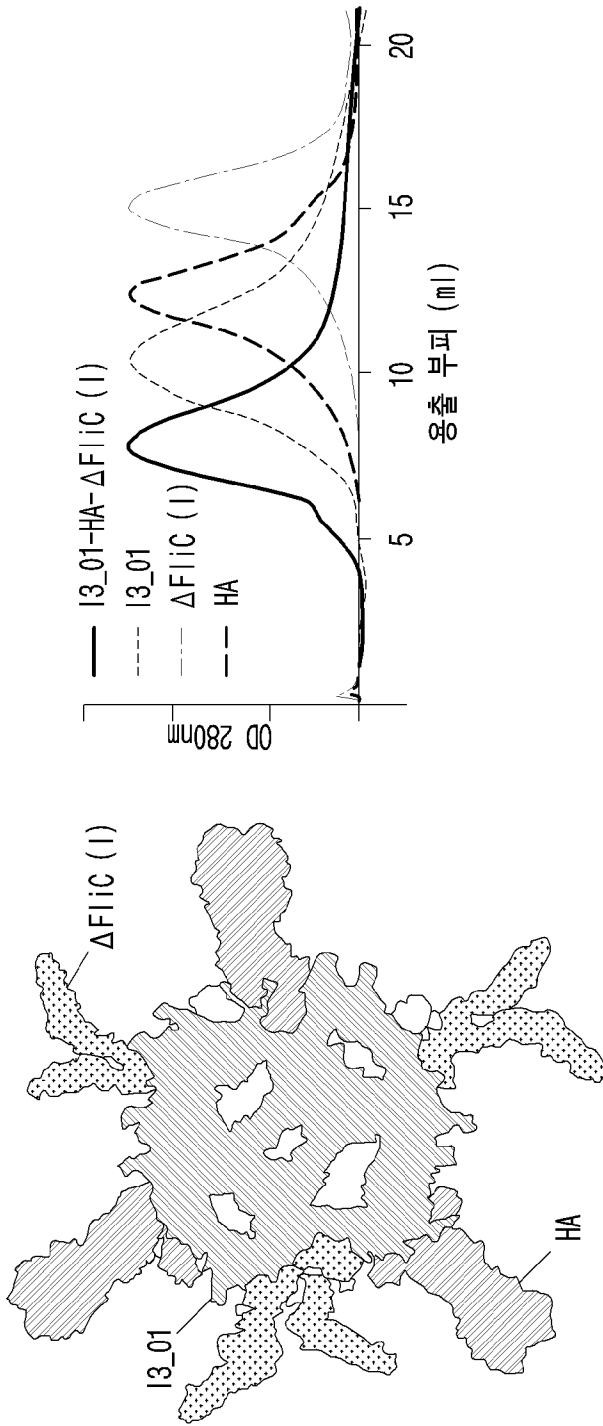
[도3a]



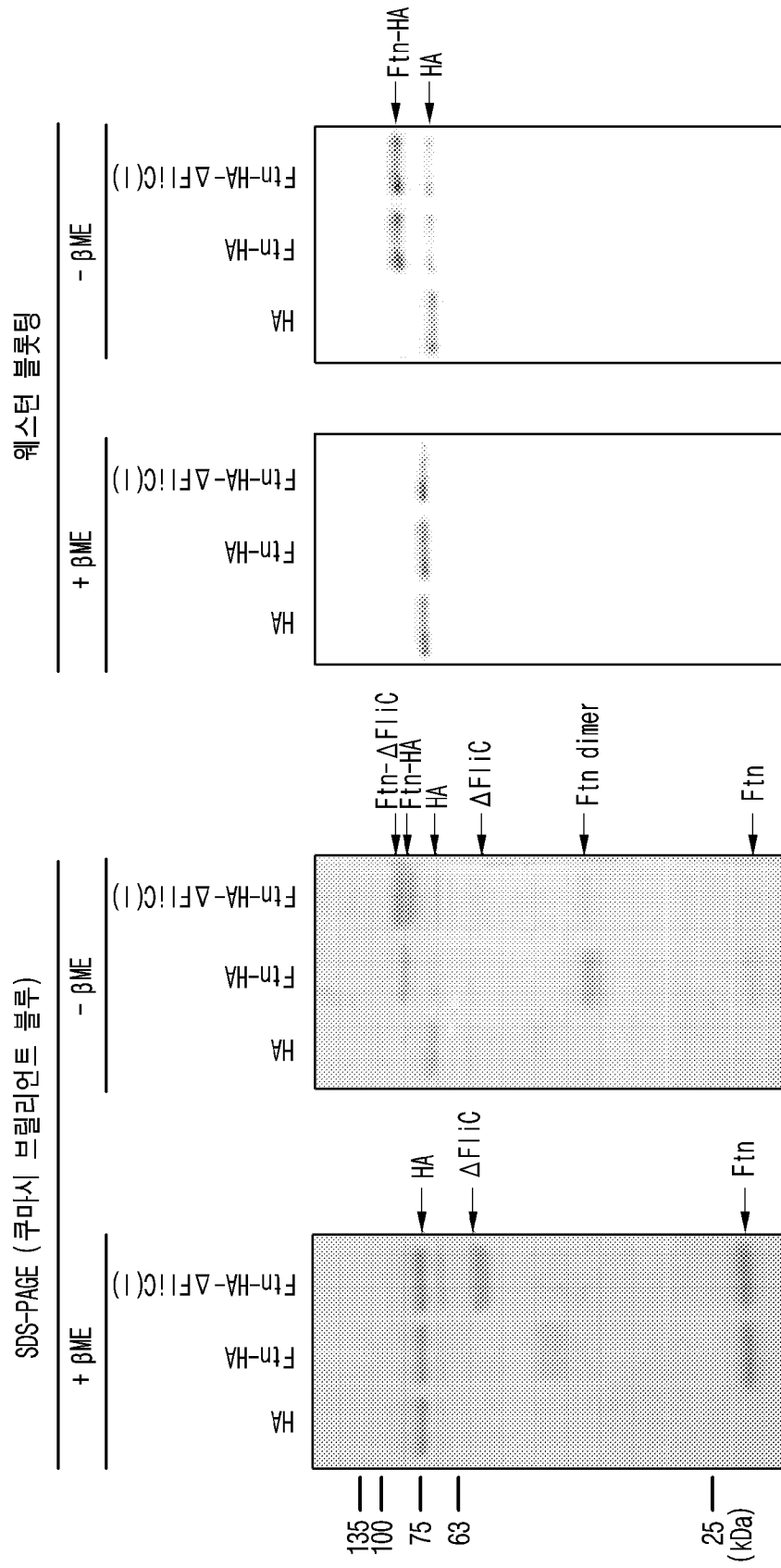
[도3b]



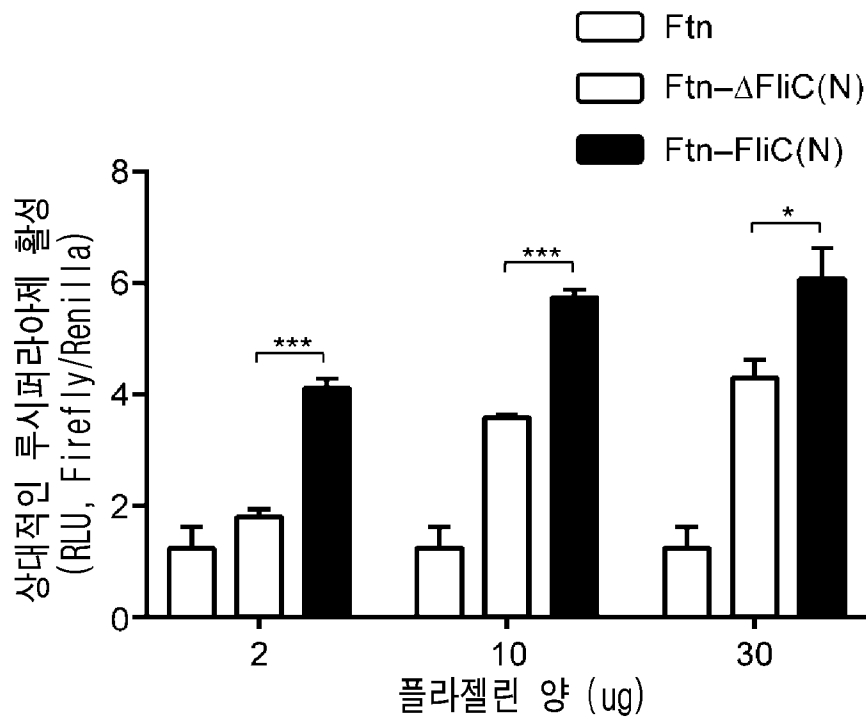
[도3c]



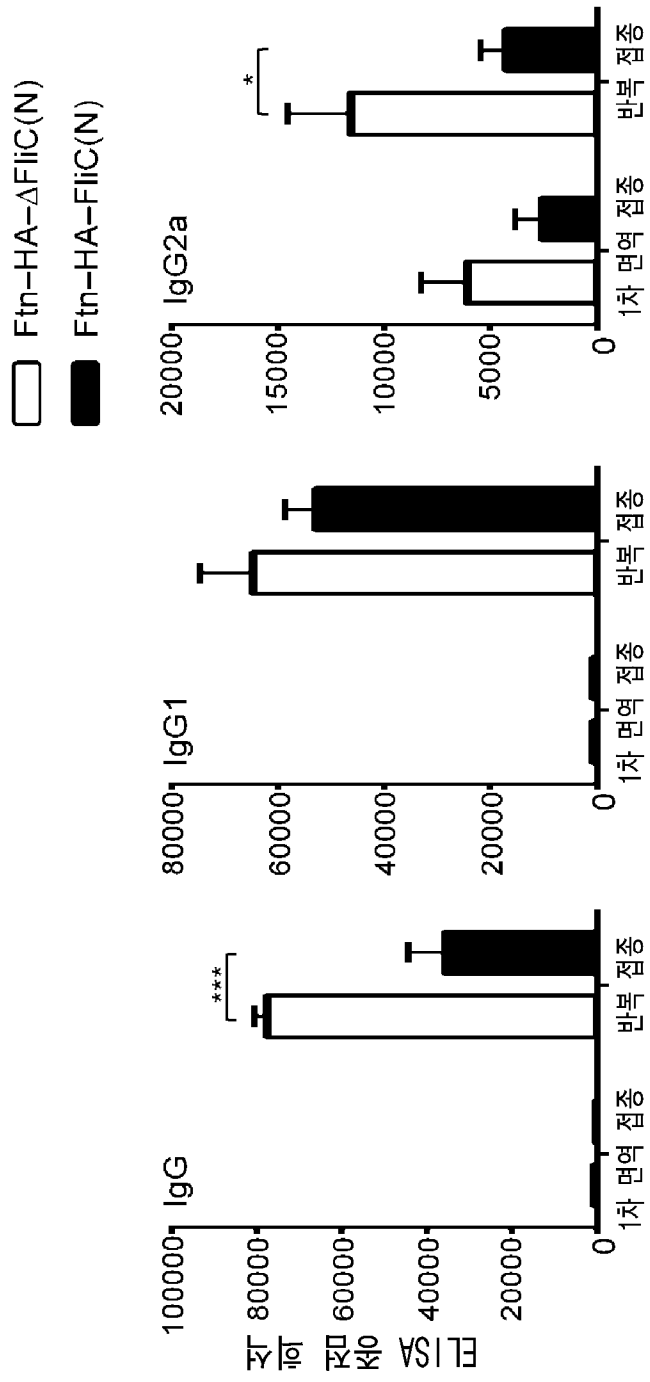
[도4]



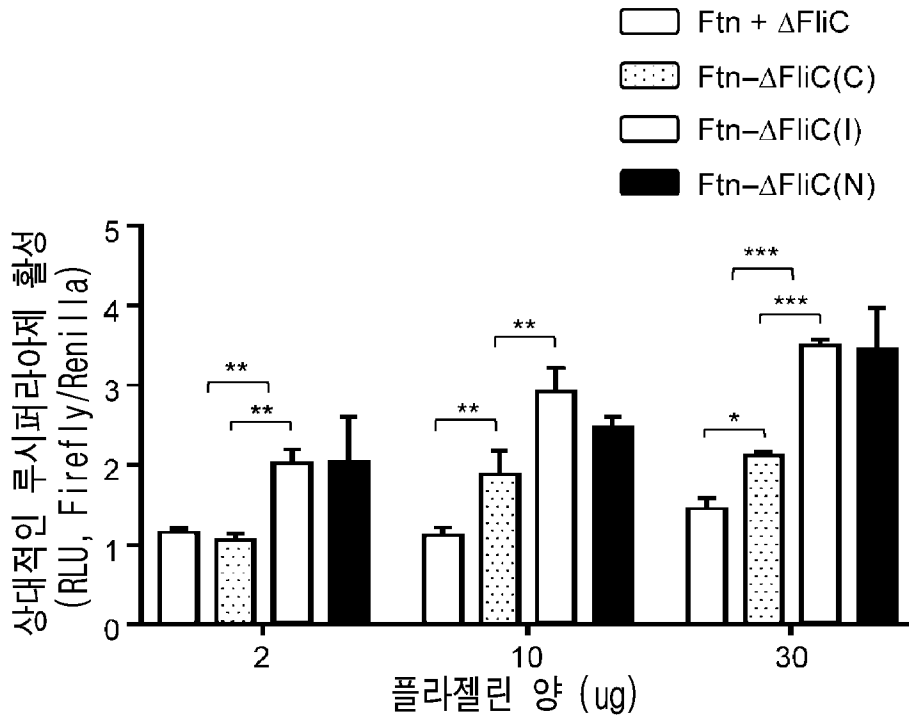
[도5]



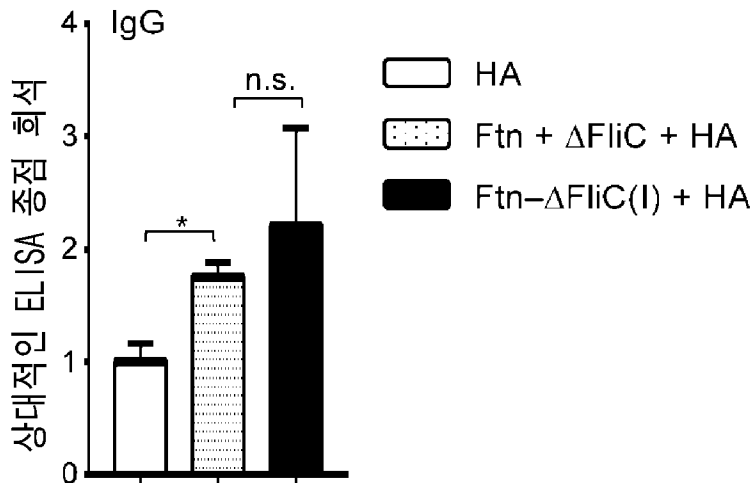
[도6]



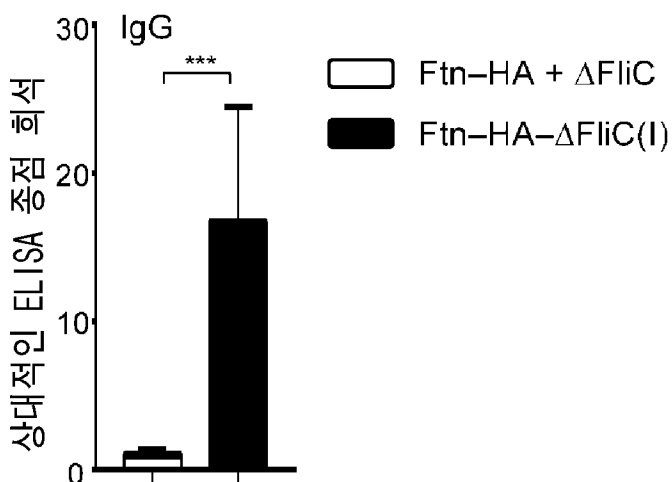
[도7]



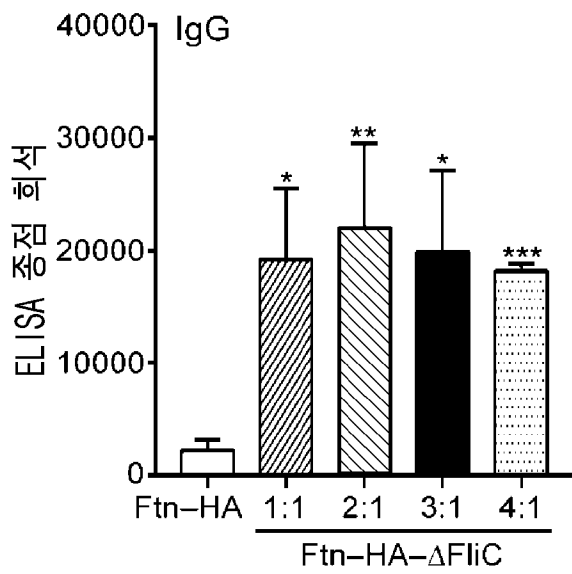
[도8a]



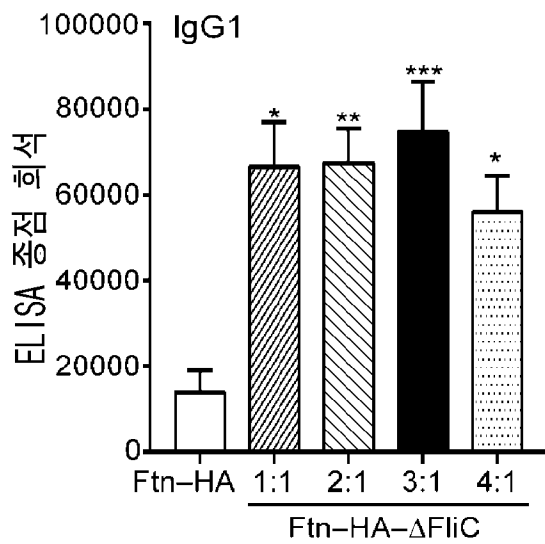
[도8b]



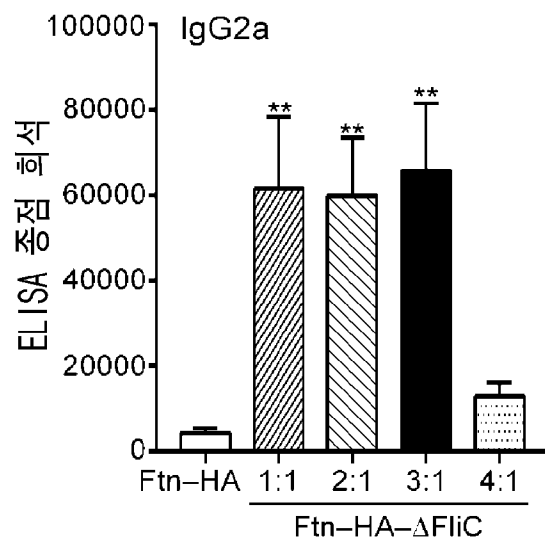
[도9a]



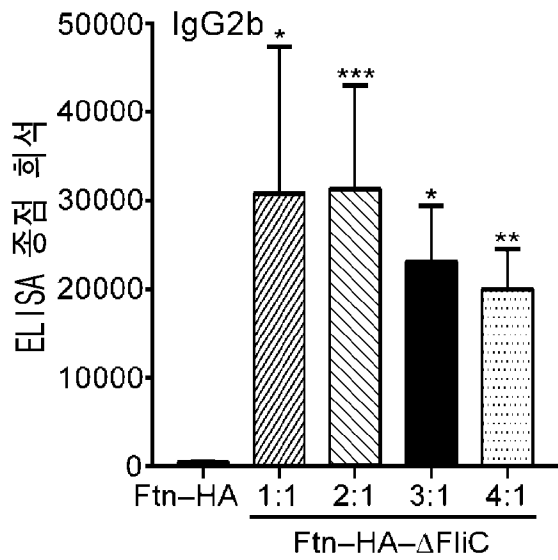
[도9b]



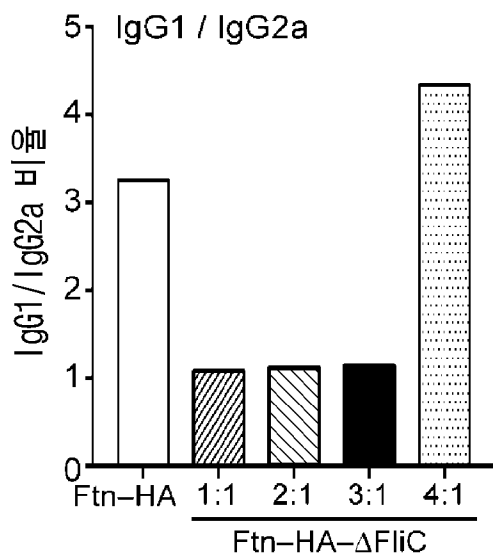
[도9c]



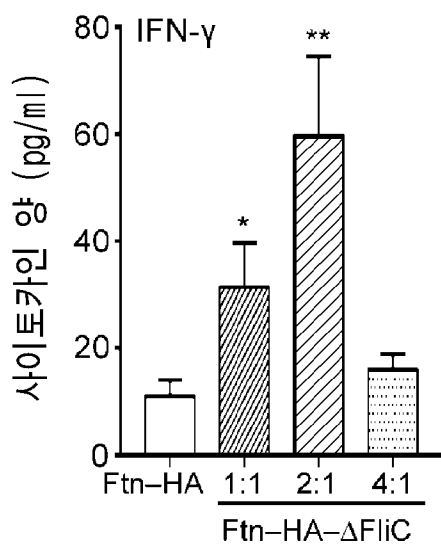
[도9d]



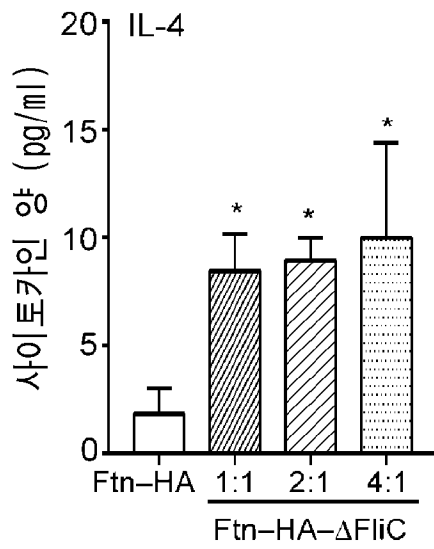
[도9e]



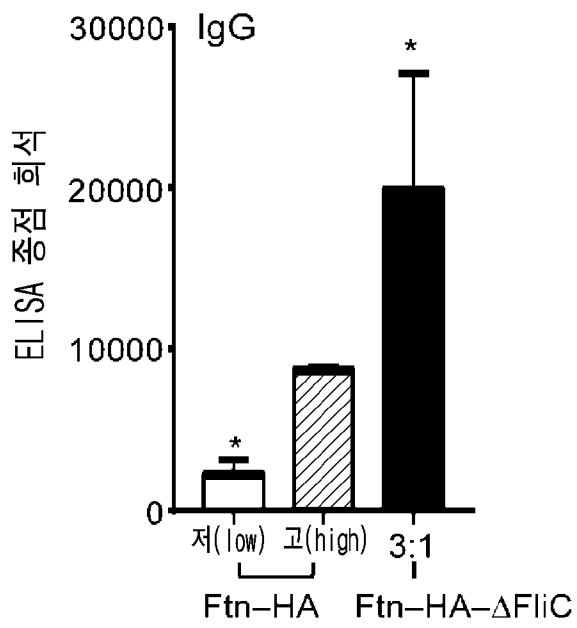
[도10a]



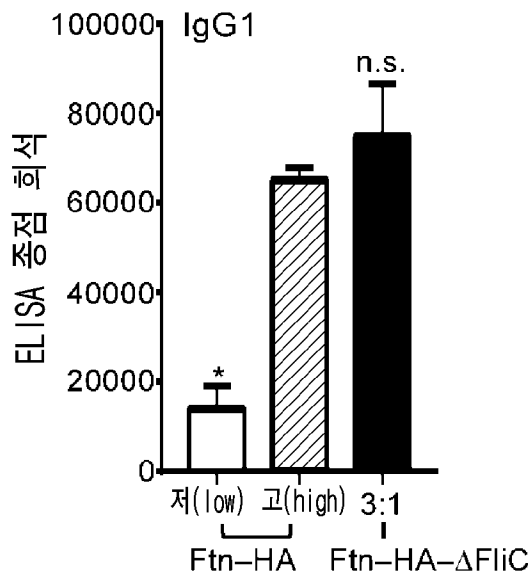
[도 10b]



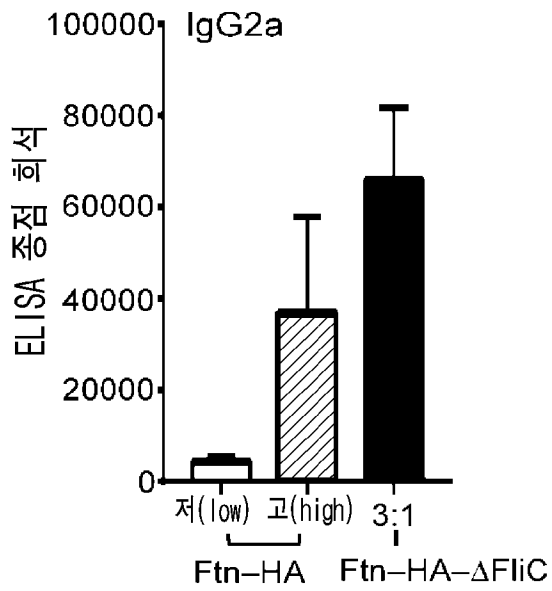
[도 11a]



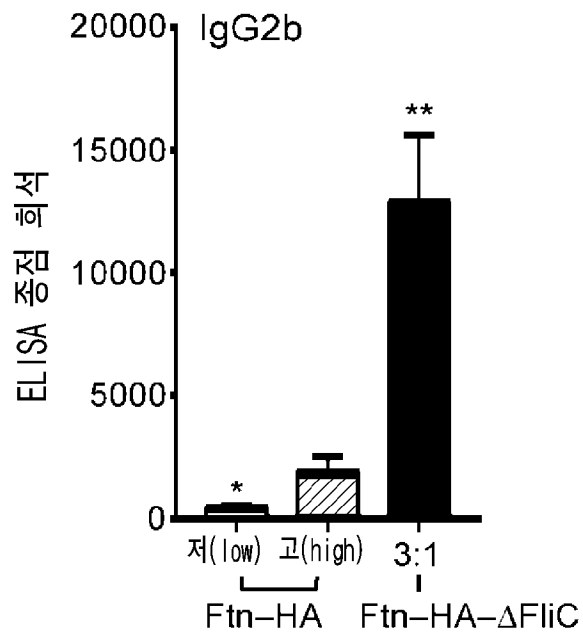
[도11b]



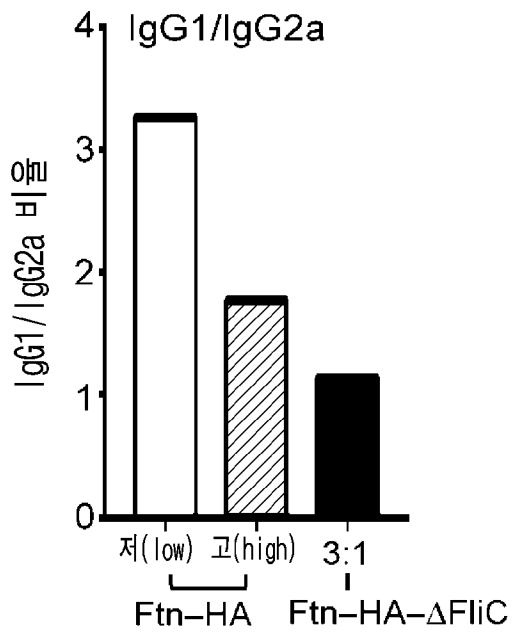
[도11c]



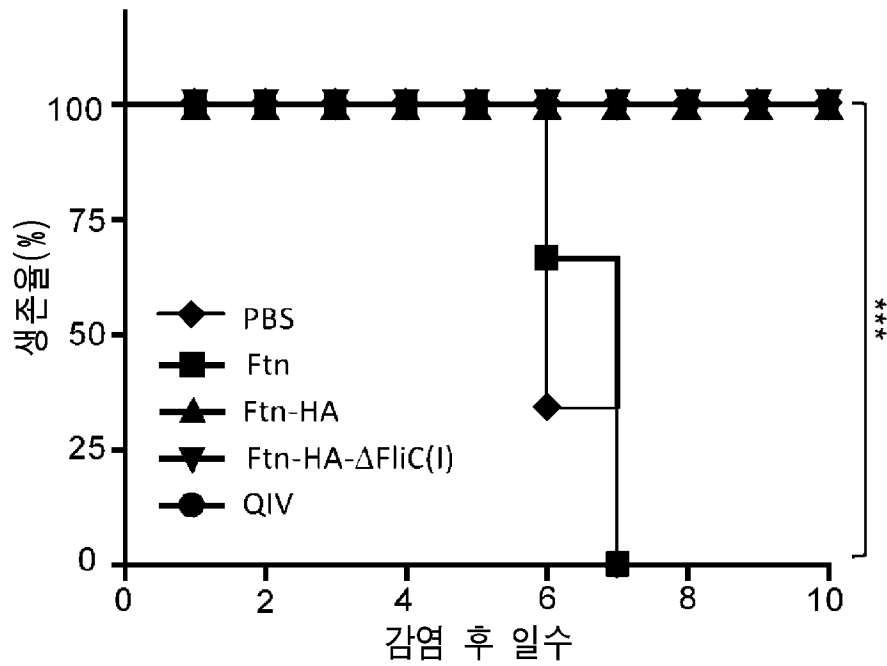
[도11d]



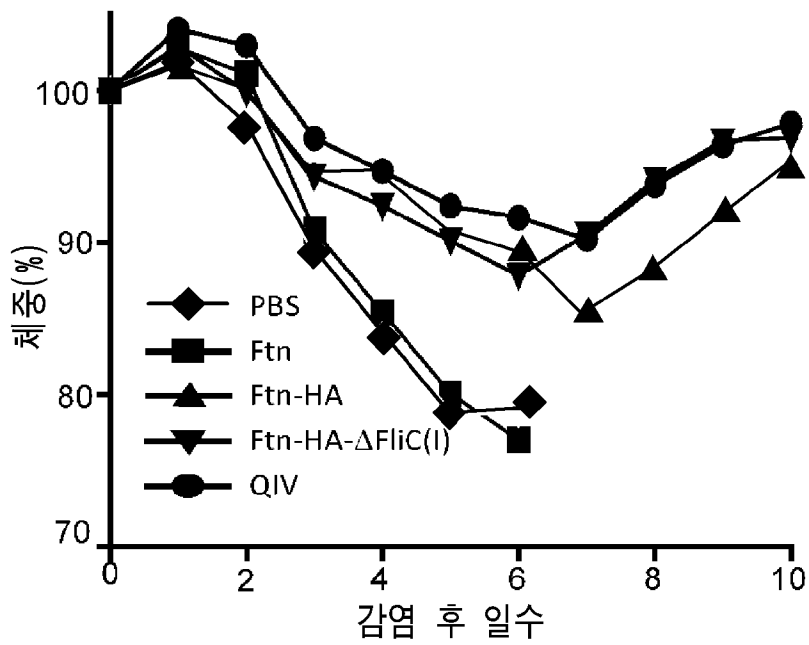
[도11e]



[도 12a]



[도 12b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/015938

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/145(2006.01)i, A61K 39/39(2006.01)i, A61K 47/69(2017.01)i, A61P 37/00(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 39/145; B82Y 5/00; C07K 19/00; C12N 15/62; A61K 39/39; A61K 47/69; A61P 37/00; A61K 39/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: ferritin, magnetic assembly, antigen, peptide, immune, nanoparticle, huntingtin, VL12.3, hemagglutinin, antibody

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1630858 B1 (UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)) 15 June 2016 See abstract; claims 1, 4, 20.	1-11
A	SCHIEFNER, A. et al. A disulfide-free single-domain VL intrabody with blocking activity towards huntingtin reveals a novel mode of epitope recognition. Journal of Molecular Biology. 2011, vol. 414, no. 3, pages 337-355 See the entire document.	1-11
A	PDB: 3LRH_B. Chain B. Huntingtin (10 October 2012) See the sequences.	1-11
A	GenBank: AAV87178.1. immunoglobulin variable light chain domain VL12.3 [synthetic construct] (12 December 2004) See the sequences.	1-11
A	KR 10-1831483 B1 (EWhA UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 23 February 2018 See abstract; claims 1, 8.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

"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

18 MARCH 2019 (18.03.2019)

Date of mailing of the international search report

21 MARCH 2019 (21.03.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,
 Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/015938

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1630858 B1	15/06/2016	KR 10-2015-0088597 A	03/08/2015
KR 10-1831483 B1	23/02/2018	KR 10-2015-0144850 A	29/12/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 39/145(2006.01)i, A61K 39/39(2006.01)i, A61K 47/69(2017.01)i, A61P 37/00(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 39/145; B82Y 5/00; C07K 19/00; C12N 15/62; A61K 39/39; A61K 47/69; A61P 37/00; A61K 39/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 페라틴, 자기조립체, 항원, 펩타이드, 면역, 나노입자, 헌팅틴, VL12.3, 헤마글루티닌, 항체		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1630858 B1 (울산과학기술원) 2016.06.15 요약; 청구항 1, 4, 20 참조.	1-11
A	SCHIEFNER, A. 등, "A disulfide-free single-domain VL intrabody with blocking activity towards huntingtin reveals a novel mode of epitope recognition", Journal of Molecular Biology, 2011, 제414권, 제3호, 페이지 337-355 전문 참조.	1-11
A	PDB: 3LRH_B, 'Chain B, Huntingtin' (2012.10.10.) 서열 참조.	1-11
A	GenBank: AAV87178.1, 'immunoglobulin variable light chain domain VL12.3 [synthetic construct]' (2004.12.12.) 서열 참조.	1-11
A	KR 10-1831483 B1 (이화여자대학교 산학협력단) 2018.02.23 요약; 청구항 1, 8 참조.	1-11
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 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 2019년 03월 18일 (18.03.2019)	국제조사보고서 발송일 2019년 03월 21일 (21.03.2019)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1630858 B1	2016/06/15	KR 10-2015-0088597 A	2015/08/03
KR 10-1831483 B1	2018/02/23	KR 10-2015-0144850 A	2015/12/29