(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 3 월 19 일 (19.03.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/055163 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/67 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 15/90 (2006.01) *C07K 14/005* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/011830

(22) 국제출원일: 2019 년 9 월 11 일 (11.09.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0108713 2018 년 9 월 12 일 (12.09.2018) KR

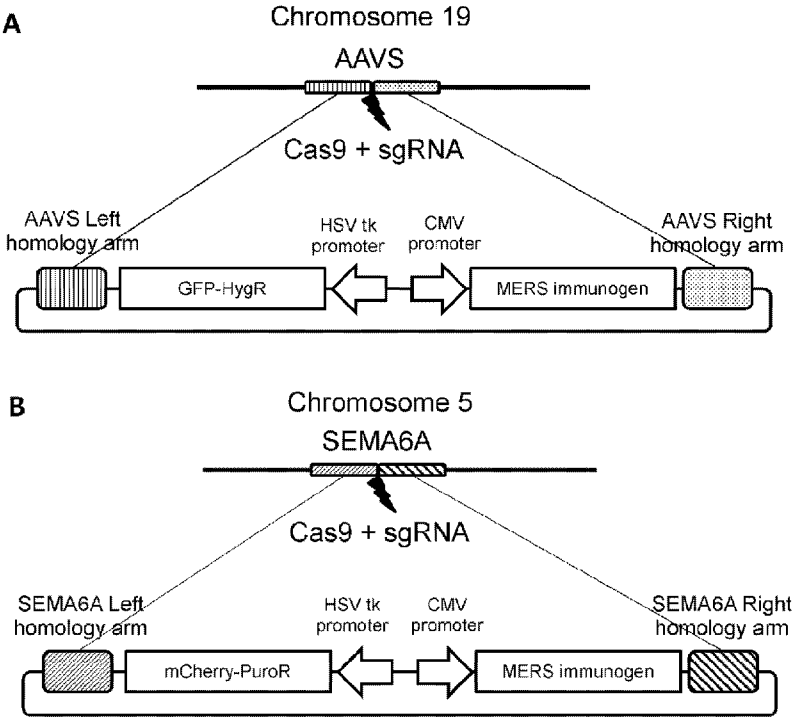
(71) 출원인: 한국화학연구원 (**KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY**) [KR/KR]; 34114 대전시 유성구 가정로 141 (장동), Daejeon (KR). 한국식품연구원 (**KOREA FOOD RESEARCH INSTITUTE**) [KR/KR]; 55365 전라북도 완주군 이서면 농생명로 245, Jeollabuk-do (KR). 한양대학교 산학협력단 (**IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)**) [KR/KR]; 04763 서울시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내), Seoul (KR). 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR).

(72) 발명자: 김천생 (**KIM, Chonsaeng**); 34085 대전시 유성구 은구비남로 55 열매마을7단지 705동 502호., Daejeon (KR). 김성준 (**KIM, Seong Jun**); 34049 대전시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트 205동 807호., Daejeon (KR). 안대균 (**AHN, Dae Gyun**); 10374 경기도 고양시 일산서구 강선로 169 후곡마을15단지아파트 1509동 1203호., Gyeonggi-do (KR). 김균도 (**KIM, Kyun Do**); 16808 경기도 용인시 수지구 신봉3로 25, 310동 510호., Gyeonggi-do (KR). 구근본 (**KU, Keunbon**); 34116 대전시 유성구 신성로84번길 43-6, Daejeon (KR). 김해수 (**KIM, Hae Soo**);

WO 2020/055163 A1

(54) **Title:** VECTOR EXPRESSING RECOMBINANT ANTIGEN BY USING CRISPR EDITING TECHNOLOGY, AND SIMULTANEOUS MULTIPLE INSERTION METHOD THEREFOR

(54) **발명의 명칭:** CRISPR 편집 기술을 이용한 재조합 항원을 발현시키는 벡터 및 이를 동시에 다중 삽입시키는 방법



(57) **Abstract:** Provided in the present invention is a method for simultaneously inserting multiple vectors expressing recombinant antigens in multiple locations of eukaryotic chromosomes by using a homology directed recombination method, which is a CRISPR technology. The present invention relates to a method for expressing a recombinant protein which can be used as an immunogen, by selecting a human cell line that can stably over-express an immunogen, when simultaneous insertion into two sites is performed, and then using the cells, and which can be effectively used for the development of recombinant immunogens and vaccines against various socially problematic viruses.

[다음 쪽 계속]

34049 대전시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트 212동 204호, Daejeon (KR). **신혜진 (SHIN, Hye Jin)**; 18459 경기도 화성시 노작로4길 22-5 301호, Gyeonggi-do (KR). **황인수 (HWANG, In Su)**; 34116 대전시 유성구 신성남로95번길 16 102호, Daejeon (KR). **윤건영 (YOON, Gun Young)**; 35203 대전시 서구 만년로68번길 62 101동 506호, Daejeon (KR). **장현주 (CHANG, Hyun Joo)**; 05677 서울시 송파구 송파대로36가길 16, Seoul (KR). **후인티 응옥 유인 (HUYNH, Thi Ngoc Duyen)**; 16702 경기도 수원시 영통구 덕영대로1673번길 8-11 비 02호, Gyeonggi-do (KR). **김미화 (KIM, Mihwa)**; 54938 전라북도 전주시 덕진구 전주천동로 453 309호, Jeollabuk-do (KR). **김범태 (KIM, Bum Tae)**; 34179 대전시 유성구 계룡로 92 씨제이 나인파크 102동 1502호, Daejeon (KR). **배상수 (BAE, Sangsu)**; 04763 서울시 성동구 왕십리로 222 한양대학교 자연과학관 36동 316호, Seoul (KR). **우재성 (WOO, Jaesung)**; 02841 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교 하나과학관 316호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 주원 (B&IP-JOOWON PATENT AND LAW FIRM); 06050 서울시 강남구 언주로 711, 건설회관 9층 (논현동), 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, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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))

(57) 요약서: 본 발명은 CRISPR 기술인 Homology directed recombination 방법을 통하여 진핵 세포 크로모좀의 다중 위치에 재조합 항원을 발현시키는 벡터를 동시에 다중 삽입시키는 방법을 제공한다. 동시에 두 곳에 삽입시켜서, 면역원을 안정적이고 과 발현 할 수 있는 인간 세포주를 선별한 후, 이러한 세포를 이용하여 면역원으로 사용 가능한 재조합 단백질을 발현하는 방법에 관한 것으로써, 사회적으로 문제가 되는 다양한 바이러스에 대한 재조합 면역원, 백신 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: CRISPR 편집 기술을 이용한 재조합 항원을 발현시키는 벡터 및 이를 동시에 다중 삽입시키는 방법

기술분야

[1] 본 발명은 항원의 안정적인 과 발현을 유도하기 위하여 CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 기술인 homology directed recombination 방법을 통하여 인간 크로모좀(chromosome) 특정 위치에 재조합 항원을 발현시키는 벡터 및 이를 삽입시키는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 일반적으로 단백질 연구를 진행할 때 발현은 E.coli와 같은 원핵세포를 이용하여 진행된다. 하지만 바이러스의 표면에 존재하는 단백질을 재조합 면역원으로 사용할 때는 glycosylation과 같은 단백질 수식이 면역원성에 큰 영향을 끼칠 수 있다. 원핵세포에서 발현을 수행하는 경우 인간세포와 같은 진핵세포에서 단백질을 발현하는 경우와 다른 glycosylation이 유도되어 과도한 glycosylation이 필요한 단백질을 생산하는데는 한계가 있다 (Nat Chem Biol (2012) 8(5): 434-436). 때문에 재조합 면역원을 발현하는 경우 293 세포와 같은 인간세포를 많이 이용해오고 있다. 현재까지 주로 사용되는 방법은 재조합 면역원 발현 플라스미드를 진핵세포에 transfection 한 후 transient하게 발현되는 단백질을 정제하는 방법이다 (Vaccine 32 (2014) 6170-6176). 이러한 transient한 방법으로 면역원성을 시험하기에는 충분하지만 대량의 재조합 면역원을 생산하기에는 한계가 존재한다. 이를 극복하기 위해서 인간세포에서 안정적으로 재조합 면역원을 발현할 수 있는 세포주를 선별하여 계속 생산되는 재조합 면역원을 얻어서 정제하는 방법이 사용 가능하다. 면역원을 안정적으로 발현하는 세포주를 제작하기 위해서 CRISPR gene editing 기술의 Homology-directed Repair 방법이 사용되고 있다. Nature Biotechnology 33 (2015) 543-550에서는 단백질 발현 벡터를 293 세포에서 비교적 transcription이 잘 일어나는 AAVS site에 삽입시키는 방법을 사용하였다. 이러한 방법은 세포 안에서 단백질 발현을 유도하는 방법이다. Signal Peptide는 단백질들의 N-말단에 위치하여 세포 밖으로 배출(secretion) 될 수 있도록 작용하는 펩타이드이다. 이들을 원하는 단백질에 융합시켜서 발현하면 세포 밖으로 배출시킬 수 있는 특징이 있다. 메르스 바이러스의 경우도 스파이크 단백질(S protein)의 경우 자신의 signal peptide를 N-말단에 포함하고 있다. 재조합 면역원 역시 signal peptide를 융합시켜서 발현시키면 세포 밖으로 배출이 가능해서 세포를 lysis 시키지 않고도 원하는 단백질을 얻을 수 있는 장점이 있다. AAVS site 이외에도 Biotechnol. J 11 (2016) 1100-1109에 따르면, gene의 transcription이 활발히

일어나는 hot spot이 보고되어 있다. 이러한 site 중에서 SEMA6A site를 사용하여 AAVS에 integration 시키는 방법처럼 추가로 원하는 발현 벡터를 integration 시킬 수 있다. 한 세포에 발현이 활발히 일어나는 두 site에 동시에 동일한 발현 벡터를 integration 시켜서 재조합 면역원 발현을 두 배 이상 향상시킬 수 있음을 알아내어 본 발명을 완성하였다.

[4] 한편, 다양한 재조합 항원을 안정적으로 확보하는 것은 재조합 단백질을 이용한 다양한 연구 진행에 있어서 매우 중요한 과정이다. 그러나, 현재까지의 기술로 재조합 항원의 안정적인 과 발현을 유도하는 기술은 매우 어렵고, 이러한 문제를 극복하는 기술이 공지된 바가 없다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명에서는 항원을 과 발현시키는 벡터를 크로모좀 특정 위치에 삽입시켜서 안정적으로 항원을 발현하는 안정 세포주를 제공하는데 목적이 있다.

[7] 또한, 본 발명은 항원의 안정적인 과 발현율 증대를 위하여 크로모좀의 다중 위치(multiple sites)에 재조합 항원을 발현시키는 벡터를 동시에 다중 삽입시키는 방법을 제공하는데 목적이 있다.

[8]

과제 해결 수단

[9] 상기 목적을 해결하기 위하여,

[10] 본 발명은 진핵 세포에서 재조합 항원의 안정적인 과 발현 유도를 위해 CRISPR 유전자 편집기술인 homology-directed repair 방법으로 인간 크로모좀 특정 위치에 항원을 발현시키는 벡터를 제공한다.

[11] 또한, 본 발명은 진핵 세포에서 항원의 안정적인 과 발현 효율 증대를 위해 CRISPR 유전자 편집 기술인 homology-directed repair 방법으로 진핵 세포 크로모좀의 다중 위치에 재조합 항원을 발현시키는 벡터를 동시에 다중 삽입시키는 방법을 제공한다.

[12] 본 발명에서 보다 구체적으로 항원은 메르스 바이러스의 항원이고, 상기 메르스 바이러스 항원은 스파이크 단백질 안에 위치한 수용체 결합부위(receptor binding domain; RBD)인 것이 바람직하다. 이 RBD 항원은 단백질 정제를 위해 필요한 6개의 histidine 아미노산 tag을 C-terminal에 fusion시킨 것, Fc 부분을 fusion시킨 것 또는 N-말단에 글리코실화를 유도하는 signal peptide가 융합된 것이 바람직하다.

[13] 또한 본 발명의 상기 벡터는 AAVS 및 SEMA6A 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 포함하며, Cas 단백질 발현 서열을 포함하고 Cas 단백질은 Cas9 단백질인 것이 바람직하다.

[14] 본 발명의 방법은 Hygromycin resistant gene 부위 또는 Puromycin resistant gene

부위를 더 포함할 수 있다. 또한 상기 진핵 세포는 293 세포를 포함한다.

[15] 또한 본 발명은 메르스 바이러스 항원을 포함하는 CRISPR-Cas 시스템을 발현할 수 있는 벡터를 제공한다.

[16] 상기 벡터는 AAVS 및/또는 SEMA6A 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 포함하고, 상기 Cas는 Cas9인 것이 바람직하다. 또한 상기 메르스 바이러스 항원은 스파이크 단백질 안에 위치한 수용체 결합부위(receptor binding domain; RBD)이고, 단백질 정제를 위해 필요한 6개의 histidine 아미노산 tag을 C-terminal에 fusion시키거나 RBD 단백질 뒤에 Fc 부분을 fusion시킨 것 또는 N-말단에 글리코실화를 유도하는 signal peptide가 융합된 것일 수 있고, Hygromycin resistant gene 부위 또는 Puromycin resistant gene 부위를 더 포함할 수 있다.

[17]

발명의 효과

[18] 본 발명은 진핵 세포에서 재조합 항원을 안정적이며 고효율로 생산할 수 있는 효과가 있다.

[19] 또한 본 발명은 다양한 재조합 항원을 대량으로 확보할 수 있다는 장점이 있다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21] 도 1은 CRISPR-cas9 편집 기술인 homology-directed repair 방법으로 진핵 세포 크로모좀 특정 위치 (chromosome 5 및 9)에 항원 발현 벡터를 삽입(integration) 시켜서 항원을 안정적으로 발현하는 안정 세포주(stable cell line)를 제작하는 모식도이다.

[22] 도 2는 실시예 1의 과정을 통해 과 발현되는 재조합 항원(메르스바이러스 수용체결합부위, MERS-CoV RBD) 구조를 보여주는 모식도이다.

[23] 도 3은 실시예 2의 재조합 항원을 발현하는 벡터를 chromosome 특정 위치(chromosome 5 및 9) 2곳 동시에 삽입(integration) 시킨 후, 항원 발현양이 세포 안(Cell pellet)과 밖(Supernatant)에서 2배 이상 증가함을 보여주는 웨스턴 블로팅 결과이다.

[24] 도 4는 실시예 3에서 발현되어 세포 밖(Supernatant)으로 배출된 항원이 glycosylation이 됨을 입증하는 웨스턴 블로팅 결과이다.

[25] 도 5는 실시예 4의 항원(메르스바이러스 수용체결합부위, MERS-CoV RBD)을 대량으로 정제한 후, 은 염색법(silver staining)을 통하여 항원의 고순도 정제를 보여주는 결과이다. 아래 표는 정제된 항원의 고효율을 보여준다.

[26] 도 6은 실시예 5의 정제된 항원(메르스바이러스 수용체결합부위, MERS-CoV RBD)의 고순도를 RP_HPLC를 통해 분석한 결과이다.

[27] 도 7은 실시예 5의 정제된 항원(메르스바이러스 수용체결합부위, MERS-CoV RBD)의 고순도를 gel filtration을 통해 분석한 결과이다.

[28]

발명의 실시를 위한 형태

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

[30]

[31] <실시예 1> 재조합 항원(메르스바이러스 수용체결합부위) 발현 안정 세포주 선별

[32] 본 발명에 따른 재조합 항원(메르스바이러스 수용체결합부위) 안정 세포주를 제작하기 위해서 다음과 같이 실험하였다.

[33] 현재까지, 진핵 세포에서의 단백질 발현은 일시적인 발현을 통하여 이루어져 왔다. 본 발명에서는 CRISPR-Cas9 기술을 이용하여 면역원을 안정하게 발현하는 세포주를 만들고, 이를 이용하여 계속해서 동일한 재조합 항원을 발현 정제할 수 있는 방법을 이용하였다. 단백질 발현이 활발히 이루어지는 크로모좀 위치로 보고된 크로모좀 19번 AAVS 위치에 homology directed repair (HDR) 방법을 이용하여 재조합 항원 발현 벡터를 삽입(integration) 시키는 방법을 이용하였다 (도 1 참조). 재조합 항원 발현율을 증가시키기 위하여 AAVS 위치와 유사하게 단백질을 과 발현시킬 수 있는 크로모좀 5번 SEMA6A 위치를 이용하여 동시에 두 위치에 같은 재조합 항원 발현 벡터를 삽입할 수 있는 시스템을 개발하였다(도 1 참조).

[34] Cas9 단백질 발현 플라스미드와 AAVS 및 SEMA6A 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 발현하는 플라스미드를 293 세포에 트랜스팩션 해주면 원하는 위치의 DNA를 모두 자를 수 있고, 같이 트랜스팩션한 재조합 항원 발현 플라스미드에 있는 왼쪽과 오른쪽 homology arm을 이용하여 HDR이 일어나서 원하는 유전자를 정확한 위치로 삽입할 수 있는 시스템을 개발하였다. 도 1의 재조합 항원 발현 플라스미드에 왼쪽과 오른쪽 homology arm을 표시하였다.

[35] 재조합 항원을 생산하기 위해서 타겟 단백질은 메르스바이러스의 스파이크 단백질 안에 위치한 수용체결합부위(receptor binding domain, RBD)를 사용하였다. 여기에 단백질 정제를 위해 필요한 6개의 histidine 아미노산 tag을 C-terminal에 fusion 시켰다(도 2. 면역원 발현 벡터 1). 인간 항체의 Fc 부분은 재조합 항원을 체내에서 안정화시키는 기능을 가지고 있어서 RBD 단백질 뒤에 fusion 시켜서 면역원 발현 벡터 2로 제작하였다(도 2. 면역원 발현 벡터 2). 인간 항체의 Fc 부분은 프로테인 G 컬럼을 통하여 순수 분리 정제가 가능하고 이를 본 발명에 사용하였다. 자연상태의 메르스바이러스 스파이크 단백질은 글리코실화(glycosylation)가 된다고 알려져 있다. 따라서, 재조합 메르스바이러스 RBD 항원도 같은 배출 과정을 거치면서 글리코실화가 일어나도록 두 개의 재조합 항원 N-말단에는 글리코실화를 유도하는 signal

peptide를 융합시켰다. 세포 밖으로 배출된 재조합 항원을 정제하면, 세포 안에서 발현되는 단백질을 정제하면서 겪을 수 있는 다른 오염 단백질들의 양을 줄일 수 있어 효율적이고 순수하게 단백질을 정제할 수 있는 장점이 있다.

[36] 실제로 재조합 항원 발현 안정 세포주를 만들기 위하여 먼저 293 세포의 AAVS 위치에 항원 발현 플라스미드를 삽입시켰다. Hygromycin resistant gene이 같이 삽입되어 원하는 세포만 세포 배양 배지에 hygromycin을 첨가하여 선별하였다. 이렇게 생성된 hygromycin resistant 콜로니 중에서 면역원을 효율적으로 발현하는 세포를 웨스턴 방법으로 골라내고 이를 확장하여 면역원 발현 세포로 사용하였다. 또한, 두 위치에 동시에 삽입된 세포를 만들기 위해서 AAVS에서 얻어진 세포에 동일한 면역원을 발현하는 SEMA6A 위치용 벡터를 이용하여 유사한 방법으로 세포를 선별하였다. SEMA6A 벡터는 puromycin resistant gene이 같이 삽입되어서 세포 배양 배지에 hygromycin과 puromycin을 같이 첨가하여 세포를 선별하였다. 살아남은 세포들 중에서 면역원 단백질 발현이 높은 세포를 골라서 면역원을 대량 발현하는데 사용하였다.

[37]

[38] <실시예 2> 두 위치에 동시에 삽입한 재조합 항원 발현 세포에서 단백질 발현율 증가 확인

[39] 상기 실시예 1에서 제작된 AAVS와 SEMA6A 두 위치에 동시에 삽입된 재조합 항원 발현 세포(AACY + SEMA6A)가 AAVS 위치 1곳에만 발현하는 세포(AACY)보다 재조합 항원의 발현율이 증가하는지 알아보기 위하여 확인 실험을 진행하였다. 세포 안에서 만들어진 면역원 단백질이 세포 밖으로 배출되도록 제작한 시스템이어서 세포 안의 단백질의 양과 세포 밖 배지에 존재하는 단백질의 양을 비교하였다. 도 2의 면역원 발현 벡터 2번을 이용하여 실험한 결과를 보여주고 있다. 이 항원(MERS-RBD-Fc)의 경우 인간 항체의 Fc 부분이 fusion 되어 있어서, 웨스턴 블로팅 방법으로 인간 항체에 대한 2차 항체를 이용하면 단백질 발현을 확인할 수 있다.

[40] 도 3의 결과에서 나타난 바와 같이 AACY의 경우보다 AACY + SEMA6A의 경우가 세포 내에서의 발현(Cell pellet)과 세포 밖으로 secretion 된(supernatant) 항원 모두 발현이 2배 이상 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 단백질 발현 증가는 항원 생산율의 증가로 이어져 실제 항원 생산에 있어서 경제성을 상승시킨다.

[41]

[42] <실시예 3> 재조합 항원(메르스바이러스 수용체결합부위) 글리코실화 (glycosylation) 확인

[43] 메르스 바이러스의 signal peptide에 의해서 세포밖으로 secretion 된 재조합 항원이 glycosylation이 잘 일어났는지 확인하기 위하여 N-linked glycan을 제거할 수 있는 PNGase F를 이용하여 실험하였다.

[44] PNGase F를 이용하여 glycosylation 된 부분을 제거하면 단백질의 전체 무게가

감소하고, 이러한 glycosylation이 제거된 단백질이 SDS-PAGE gel 상에서 더 빨리 이동하게 되어 이러한 크기 차이를 비교하여 glycosylation이 되었는지 확인할 수 있는 실험이다. 실험에 사용한 재조합 항원은 도 2의 면역원 발현 벡터 1에 의해서 만들어진 메르스바이러스 수용체결합부위 단백질이다(MERS-RBD).

[45] 메르스바이러스 수용체결합부위 단백질에 PNGase F를 처리하고, 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 면역원을 인지할 수 있는 anti-His tag 항체를 이용하여 단백질을 확인하였다. 도 3에서 확인한 바와 같이 PNGase F를 처리한 면역원 단백질(MERS-RBD deglycosylated)이 처리하지 않은 면역원 단백질(MERS-RBD glycosylated)보다 작은 크기로 검출되는 것으로 보아 glycosylation이 잘 유도됨을 확인하였다. 바이러스의 표면 단백질과 유사하게 glycosylation을 유도하여 특이적으로 바이러스를 중화시킬 수 있는 항체를 형성하는데 도움이 될 수 있는 면역원으로서 사용 가능할 것이다.

[46]

[47] <실시예 4> 항원(메르스바이러스 수용체결합부위, MERS-CoV RBD) 발현 세포 대량 배양 및 단백질 정제와 이를 통한 단백질 발현 수율 확인

[48] 실시예 1에서 선별된 세포주들을 대량으로 증식하여 면역원을 분리하였다. 세포를 키울 때 사용되는 소태아 혈청의 경우 여러 단백질들이 고농도로 포함되어 있어서 항원 단백질의 정제에 방해가 될 수 있어서, 혈청 없이 293 세포를 키울 수 있는 serum free media를 이용하여 면역원 발현 세포주들을 대량 배양하였다. 시그마 회사의 Excell 293 serum free media 혹은 ThermoFisher Scientific 회사의 FreeStyle 293 expression media를 사용하였다. Sigma 회사의 CELLINE Classic bioreactor flask의 경우 항체나 세포의 단백질 발현에 많이 사용되는 flask로 중간에 삽입된 membrane을 통해서 세포의 증식에 필요한 배지는 자유롭게 이동하지만 세포나 세포 밖으로 배출된 단백질들은 이동하지 못한다. 많은 수의 세포를 적은 볼륨 안에서 배양이 가능한 장점이 있고 고농도의 단백질을 얻을 수 있어서 정제 과정에서 훨씬 고순도의 단백질 정제에 도움이 된다. 원심분리기를 이용하여 세포와 세포배양액을 분리한 후 세포배양액 속에 있는 재조합 항원을 정제하였다. MERS-RBD 단백질은 Ni-NTA column (QIAGEN)을 이용하여 정제하였고, MERS-RBD-Fc 단백질은 protein G-column (GE healthcare)을 이용하여 정제하였다. 도 5에서 대량 정제된 재조합 항원을 은 염색법(silver staining)으로 염색하여 확인한 결과를 제시한다. 각 항원 단백질의 수율은 도 5의 테이블에 정리하였다. 두 위치에 삽입한 세포에서는 (AACY + SEMA6A) 수율이 2배 이상 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[49]

[50] <실험예 5> 정제된 항원(메르스바이러스 수용체결합부위, MERS-CoV RBD) 순도 분석

[51] 정제된 재조합 항원들의 순도를 측정하기 위하여 RP-HPLC, Gel filtration 방법을 통하여 분석하였다. 도 6에서는 MERS-RBD 항원과 MERS-RBD-Fc

항원의 순도를 RP-HPLC 방법으로 분석한 그래프이다. 단 1회의 column 정제만을 이용하여서도 94% 이상의 고순도의 항원들이 정제된 것을 확인할 수 있었다. 정제된 각 항원들의 순도를 그래프 밑의 표로 제시하였다. Gel filtration 방법을 통하여 추가적으로 MERS-RBD-Fc 항원의 순도를 분석하였다(도 7). MERS-RBD-Fc 면역원의 경우 대부분 single peak를 나타내는 것으로 확인되어 순도가 높은 항원임을 확인하였다.

[52]

[53] 이상의 설명은 본 발명을 예시적으로 설명한 것에 불과한 것으로, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 변형이 가능할 것이다. 따라서, 본 명세서에 개시된 실시 예들은 본 발명을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시 예에 의하여 본 발명의 사상과 범위가 한정되는 것은 아니다.

[54] 본 발명의 보호범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술은 본 발명의 권리범위에 포함하는 것으로 해석되어야 할 것이다.

산업상 이용가능성

[55] 본 발명은 다양한 바이러스에 대한 재조합 면역원, 백신 개발에 유용하게 사용될 수 있어 산업상 이용가능성이 있다.

[56]

청구범위

[청구항 1] 진핵 세포에서 항원의 안정적인 과 발현 효율 증대를 위해 CRISPR 유전자 편집 기술인 homology-directed repair 방법으로 진핵 세포 크로모좀의 다중 위치에 재조합 항원을 발현시키는 벡터를 동시에 다중 삽입시키는 방법

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 항원은 메르스 바이러스의 항원인 방법

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 메르스 바이러스 항원은 스파이크 단백질 안에 위치한 수용체 결합부위(receptor binding domain; RBD)인 방법

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 RBD 항원은 단백질 정제를 위해 필요한 6개의 histidine 아미노산 tag을 C-terminal에 fusion시킨 것인 방법

[청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 RBD 항원은 Fc 부분을 fusion시킨 것인 방법

[청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 RBD 항원은 N-말단에 글리코실화를 유도하는 signal peptide가 융합된 것인 방법

[청구항 7] 제1항에 있어서, 벡터는 AAVS 및 SEMA6A 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 포함하는 방법

[청구항 8] 제1항에 있어서, 벡터는 Cas 단백질 발현 서열을 포함하는 방법

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 Cas9 단백질인 방법

[청구항 10] 제1항에 있어서, Hygromycin resistant gene 부위를 더 포함하는 방법

[청구항 11] 제1항에 있어서, Puromycin resistant gene 부위를 더 포함하는 방법

[청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 진핵 세포는 293 세포인 방법

[청구항 13] 메르스 바이러스 항원을 포함하는 CRISPR-Cas 시스템을 발현할 수 있는 벡터

[청구항 14] 제13항에 있어서, AAVS 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 포함하는 벡터

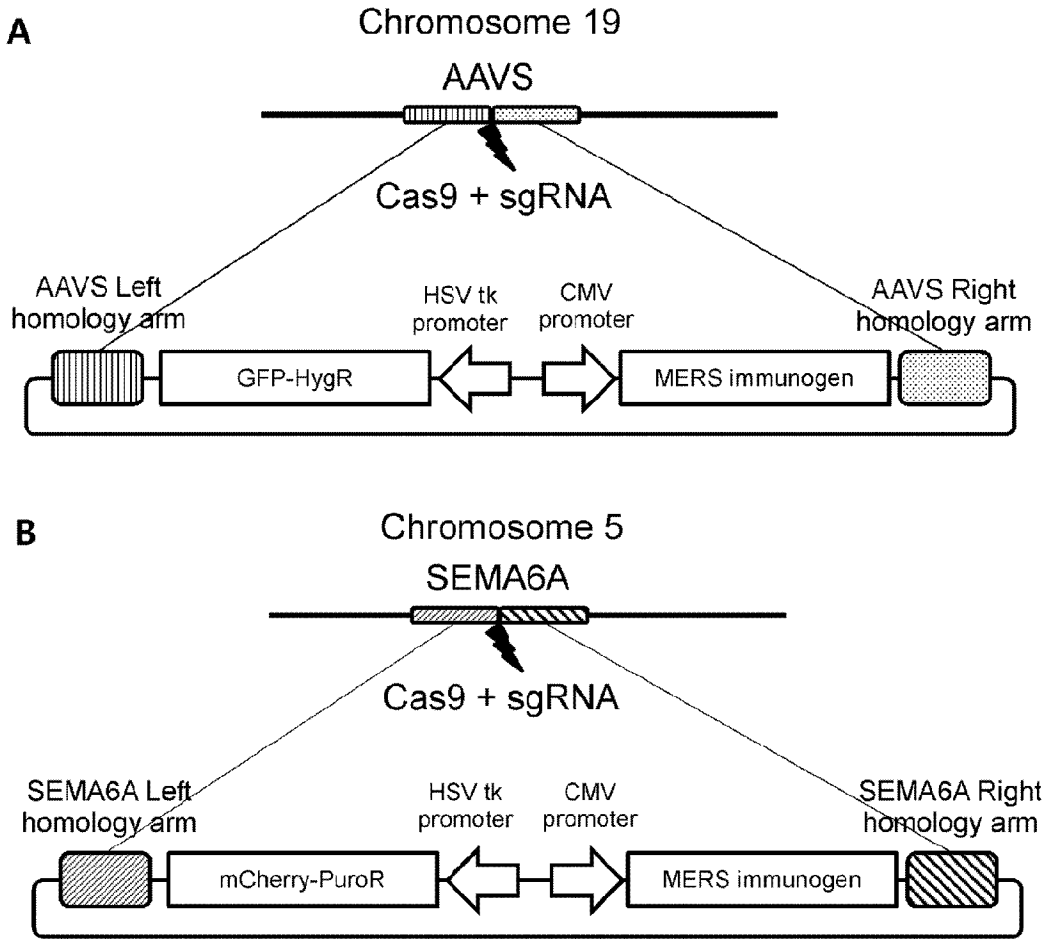
[청구항 15] 제13항에 있어서, SEMA6A 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 포함하는 벡터

[청구항 16] 제13항에 있어서, AAVS 및 SEMA6A 위치를 타겟팅하는 sgRNA를 포함하는 벡터

[청구항 17] 제13항에 있어서, 상기 Cas는 Cas9인 벡터

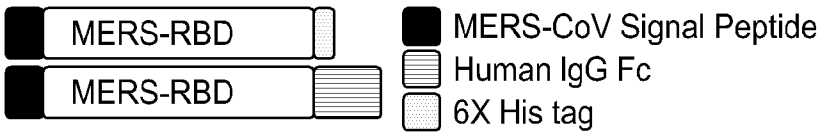
[청구항 18] 제13항에 있어서, 상기 메르스 바이러스 항원은 스파이크 단백질 안에 위치한 수용체 결합부위(receptor binding domain; RBD)인 벡터

[도1]

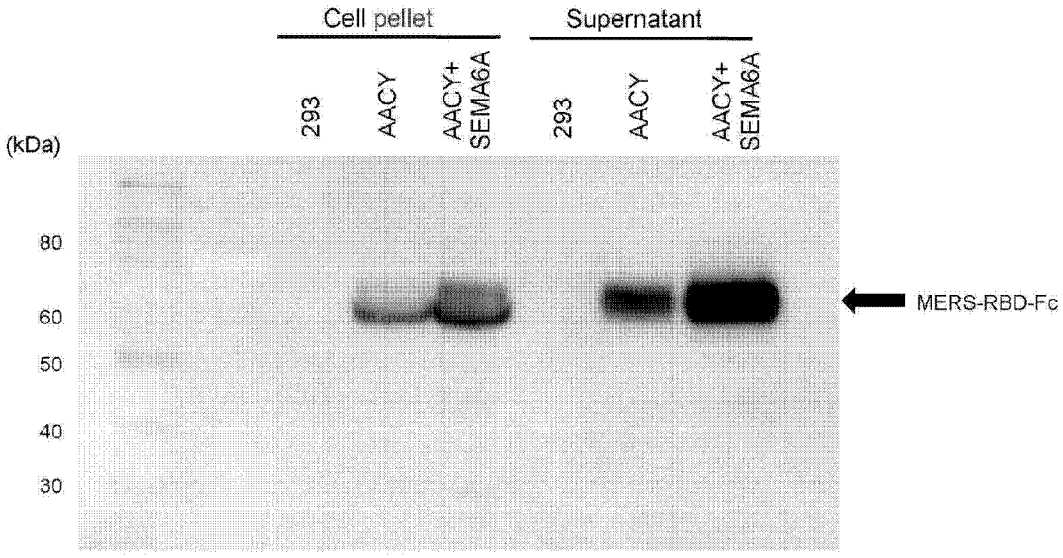


[도2]

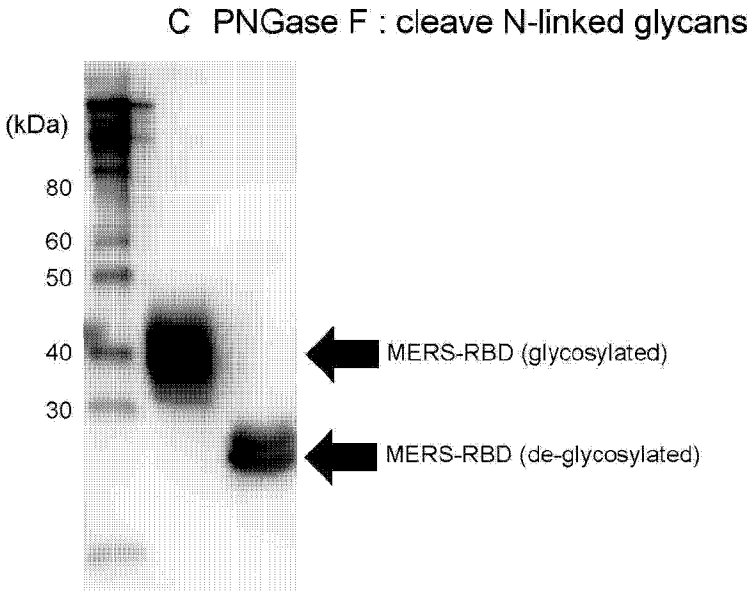
	면역원 발현 Vector
1	pMERS-RBD
2	pMERS-RBD-Fc



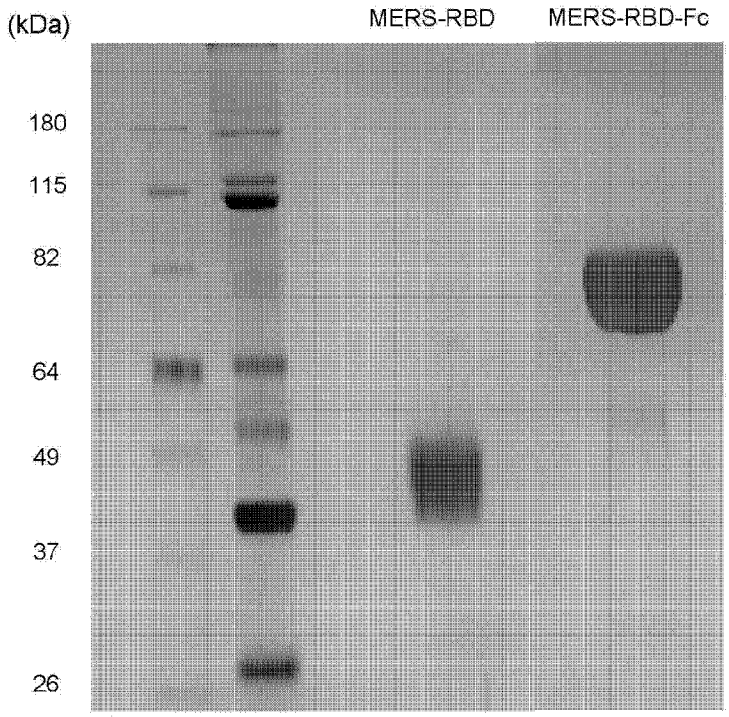
[도3]



[도4]



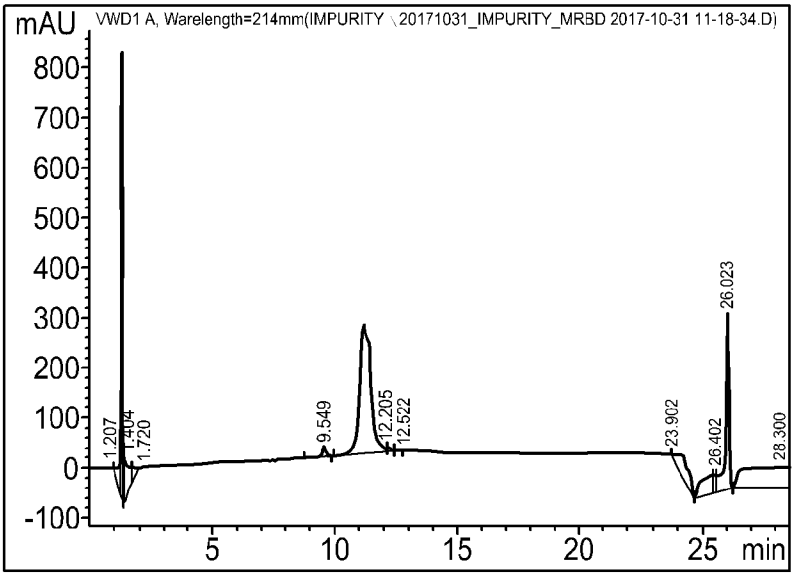
[도5]



	MERS-CoV immunogen	Yield (mg/L)
1	MERS-RBD (AACY)	4.4
2	MERS-RBD-Fc (AACY)	7.3
3	MERS-RBD-Fc (AACY+SEMA6A)	14.8

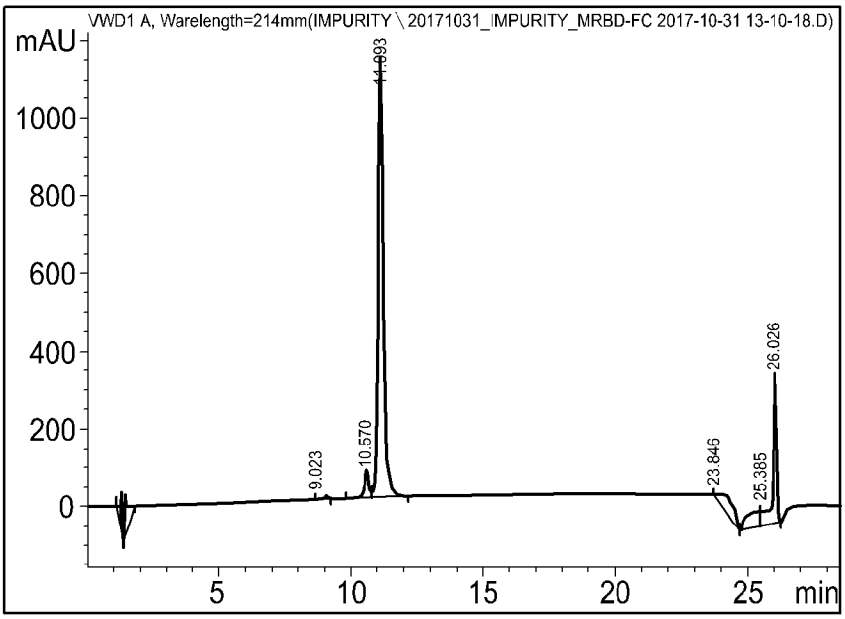
[도6]

A ● MERS-RBD (RP-HPLC)



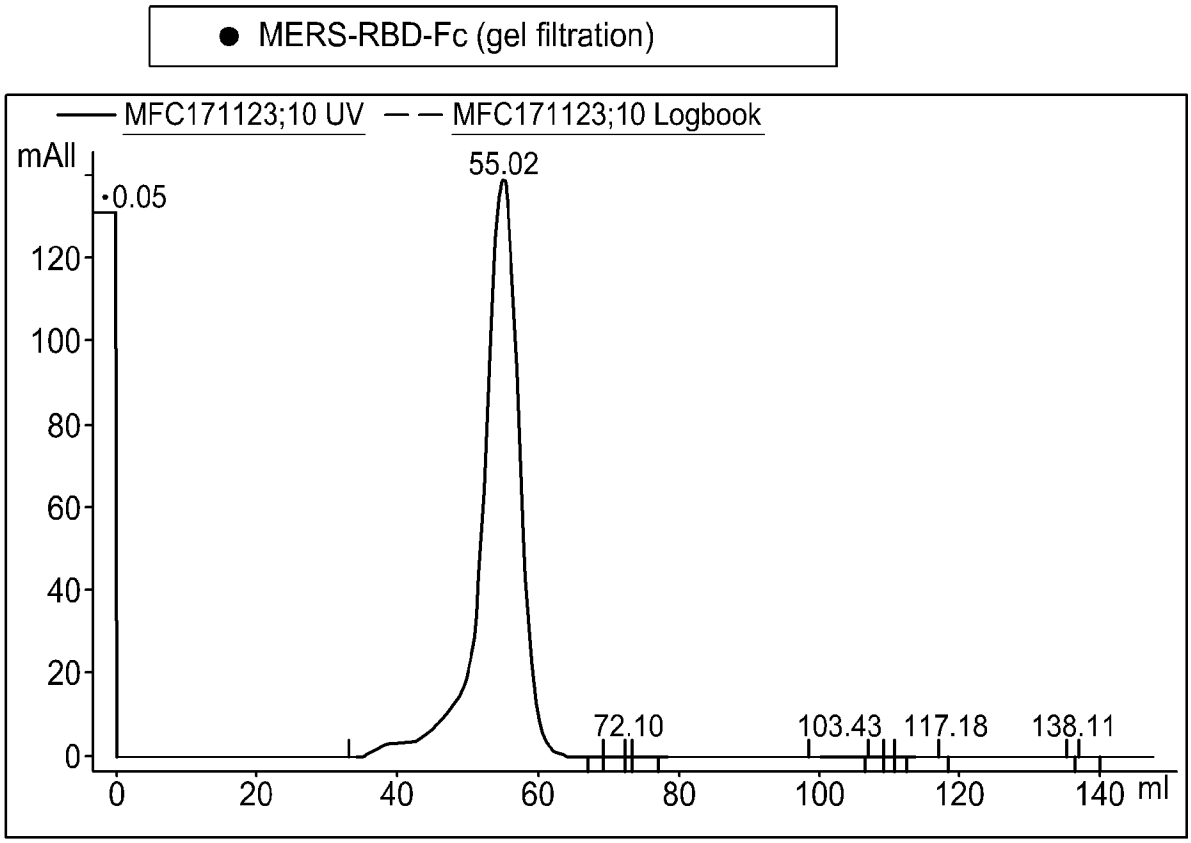
Peak	RT	Area	%Area
Peak 1	9.549	221.374	2.63
Peak 2	11.176	8195.504	97.37

B ● MERS-RBD-Fc (RP-HPLC)



Peak	RT	Area	%Area
Peak 1	10.570	880.29	5.46
Peak 2	11.093	15244.9	94.54

[도7]


● MERS-RBD-Fc (gel filtration)
MFC171123;10 UV
MFC171123;10 Logbook
mAll
0.05
55.02
72.10
103.43
117.18
138.11
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
140
ml

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/011830

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/67(2006.01)i, C12N 15/10(2006.01)i, C12N 15/90(2006.01)i, C12N 9/22(2006.01)i, C12N 15/113(2010.01)i, C07K 14/005(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/67; C12N 15/90; C12N 7/00; C12N 15/10; C12N 9/22; C12N 15/113; C07K 14/005

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: CRISPR, multiplex, chromosome, SEMA6A, AAVS, MERS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MA, C. et al. Searching for an ideal vaccine candidate among different MERS coronavirus receptor-binding fragments-the importance of immunofocusing in subunit vaccine design. Vaccine. 2014, vol. 32, pages 6170-6176 See abstract; figure 1; page 6171.	1-18
Y	RONDA, C. et al. CrEdit: CRISPR mediated multi-loci gene integration in Saccharomyces cerevisiae. Microbial cell factories. 2015, vol. 14, thesis no.:97, pages 1-11 See abstract; page 9.	1-12,16
Y	BRESSAN, R. B. et al. Efficient CRISPR/Cas9-assisted gene targeting enables rapid and precise genetic manipulation of mammalian neural stem cells. Development. 2017, vol. 144, pages 635-648 See abstract; figure 1.	7,13-18
Y	CHENG, J. K. et al. Identifying and retargeting transcriptional hot spots in the human genome. Biotechnology journal. 2016, vol. 11, pages 1100-1109 See table 1.	7,15-16

☒ 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	Date of mailing of the international search report
24 DECEMBER 2019 (24.12.2019)	**24 DECEMBER 2019 (24.12.2019)**
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.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/011830

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TAI, W. et al. A recombinant receptor-binding domain of MERS-CoV in trimeric form protects human dipeptidyl peptidase 4 (hDPP4) transgenic mice from MERS-CoV infection. Virology. 2016, vol. 499, pages 375-382 See abstract; page 376.	1-18
Y	US 2016-0298137 A1 (SIGMA-ALDRICH CO. LLC.) 13 October 2016 See abstract; claims 1, 8, 14.	7,13-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/011830

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2016-0298137 A1	13/10/2016	AU 2013-355214 A1	04/06/2015
		AU 2013-355214 B2	15/06/2017
		AU 2017-204031 A1	06/07/2017
		AU 2017-204031 B2	14/06/2018
		AU 2018-229489 A1	04/10/2018
		AU 2018-229489 B2	06/12/2018
		AU 2019-201344 A1	21/03/2019
		BR 112015012375 A2	26/09/2017
		CA 2891347 A1	12/06/2014
		CA 2891347 C	27/02/2018
		CA 2977152 A1	12/06/2014
		CA 2977152 C	09/04/2019
		CA 3034794 A1	12/06/2014
		CN 105142669 A	09/12/2015
		CN 105142669 B	03/07/2018
		CN 108715602 A	30/10/2018
		CN 108913676 A	30/11/2018
		DK 3138910 T3	16/10/2017
		DK 3138911 T3	21/01/2019
		DK 3138912 T3	21/01/2019
		EP 2928496 A1	14/10/2015
		EP 2928496 A4	01/03/2017
		EP 2928496 B1	09/10/2019
		EP 3135765 A1	01/03/2017
		EP 3138909 A1	08/03/2017
		EP 3138910 A1	08/03/2017
		EP 3138910 B1	20/09/2017
		EP 3138911 A1	08/03/2017
		EP 3138911 B1	05/12/2018
		EP 3138912 A1	08/03/2017
		EP 3138912 B1	05/12/2018
		EP 3141604 A1	15/03/2017
		EP 3360964 A1	15/08/2018
		EP 3360964 B1	02/10/2019
		EP 3363902 A1	22/08/2018
		EP 3363902 B1	27/11/2019
		ES 2653212 T3	06/02/2018
		ES 2713243 T3	20/05/2019
		ES 2714154 T3	27/05/2019
		HK 1218389 A1	17/02/2017
		IL 238856 A	30/06/2015
		JP 2016-502840 A	01/02/2016
		JP 2017-192392 A	26/10/2017
		JP 2019-037231 A	14/03/2019
		KR 10-1844123 B1	02/04/2018
		KR 10-2006880 B1	02/08/2019
		KR 10-2015-0091052 A	07/08/2015
		KR 10-2018-0011351 A	31/01/2018
		KR 10-2019-0093680 A	09/08/2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/011830

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		LT 3138910 T	10/11/2017
		LT 3138911 T	25/02/2019
		LT 3138912 T	25/02/2019
		PL 3138911 T3	30/04/2019
		PL 3138912 T3	30/04/2019
		PT 3138910 T	18/10/2017
		SG 10201800585 A	27/02/2018
		SG 11201503824 A	29/06/2015
		US 2014-0273230 A1	18/09/2014
		US 2014-0273233 A1	18/09/2014
		US 2016-0017366 A1	21/01/2016
		US 2016-0298125 A1	13/10/2016
		US 2016-0298132 A1	13/10/2016
		US 2016-0298133 A1	13/10/2016
		US 2016-0298134 A1	13/10/2016
		US 2016-0298135 A1	13/10/2016
		US 2016-0298136 A1	13/10/2016
		US 2016-0298138 A1	13/10/2016
		US 2017-0073705 A1	16/03/2017
		US 2017-0191082 A1	06/07/2017
		US 2018-0135073 A1	17/05/2018
		WO 2014-089290 A1	12/06/2014

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/011830

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/67(2006.01)i, C12N 15/10(2006.01)i, C12N 15/90(2006.01)i, C12N 9/22(2006.01)i, C12N 15/113(2010.01)i, C07K 14/005(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 15/67; C12N 15/90; C12N 7/00; C12N 15/10; C12N 9/22; C12N 15/113; C07K 14/005

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:CRISPR, 다중 삽입(multiplex), 크로모좀(chromosome), SEMA6A, AAVS, 메르스(MERS)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	MA, C. 등, `Searching for an ideal vaccine candidate among different MERS coronavirus receptor-binding fragments-the importance of immunofocusing in subunit vaccine design`, Vaccine, 2014, 32권, 페이지 6170-6176 초록; 도면 1; 페이지 6171	1-18
Y	RONDA, C. 등, `CrEdit: CRISPR mediated multi-loci gene integration in Saccharomyces cerevisiae`, Microbial cell factories, 2015, 14권, 논문번호:97, 페이지 1-11 초록; 페이지 9	1-12,16
Y	BRESSAN, R. B. 등, `Efficient CRISPR/Cas9-assisted gene targeting enables rapid and precise genetic manipulation of mammalian neural stem cells`, Development, 2017, 144권, 페이지 635-648 초록; 도면 1	7,13-18
Y	CHENG, J. K. 등, `Identifying and retargeting transcriptional hot spots in the human genome`, Biotechnology journal, 2016, 11권, 페이지 1100-1109 표 1	7,15-16

☒ 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	국제조사보고서 발송일
2019년 12월 24일 (24.12.2019)	2019년 12월 24일 (24.12.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/011830

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	TAI, W. 등, `A recombinant receptor-binding domain of MERS-CoV in trimeric form protects human dipeptidyl peptidase 4 (hDPP4) transgenic mice from MERS-CoV infection`, Virology, 2016, 499권, 페이지 375-382 초록; 페이지 376	1-18
Y	US 2016-0298137 A1 (SIGMA-ALDRICH CO. LLC) 2016.10.13 요약; 청구항 1, 8, 14	7,13-18

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/011830

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2016-0298137 A1	2016/10/13	AU 2013-355214 A1	2015/06/04
		AU 2013-355214 B2	2017/06/15
		AU 2017-204031 A1	2017/07/06
		AU 2017-204031 B2	2018/06/14
		AU 2018-229489 A1	2018/10/04
		AU 2018-229489 B2	2018/12/06
		AU 2019-201344 A1	2019/03/21
		BR 112015012375 A2	2017/09/26
		CA 2891347 A1	2014/06/12
		CA 2891347 C	2018/02/27
		CA 2977152 A1	2014/06/12
		CA 2977152 C	2019/04/09
		CA 3034794 A1	2014/06/12
		CN 105142669 A	2015/12/09
		CN 105142669 B	2018/07/03
		CN 108715602 A	2018/10/30
		CN 108913676 A	2018/11/30
		DK 3138910 T3	2017/10/16
		DK 3138911 T3	2019/01/21
		DK 3138912 T3	2019/01/21
		EP 2928496 A1	2015/10/14
		EP 2928496 A4	2017/03/01
		EP 2928496 B1	2019/10/09
		EP 3135765 A1	2017/03/01
		EP 3138909 A1	2017/03/08
		EP 3138910 A1	2017/03/08
		EP 3138910 B1	2017/09/20
		EP 3138911 A1	2017/03/08
		EP 3138911 B1	2018/12/05
		EP 3138912 A1	2017/03/08
		EP 3138912 B1	2018/12/05
		EP 3141604 A1	2017/03/15
		EP 3360964 A1	2018/08/15
		EP 3360964 B1	2019/10/02
		EP 3363902 A1	2018/08/22
		EP 3363902 B1	2019/11/27
		ES 2653212 T3	2018/02/06
		ES 2713243 T3	2019/05/20
		ES 2714154 T3	2019/05/27
		HK 1218389 A1	2017/02/17
		IL 238856 A	2015/06/30
		JP 2016-502840 A	2016/02/01
		JP 2017-192392 A	2017/10/26
		JP 2019-037231 A	2019/03/14
		KR 10-1844123 B1	2018/04/02
		KR 10-2006880 B1	2019/08/02
		KR 10-2015-0091052 A	2015/08/07
		KR 10-2018-0011351 A	2018/01/31
		KR 10-2019-0093680 A	2019/08/09

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/011830

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		LT 3138910 T	2017/11/10
		LT 3138911 T	2019/02/25
		LT 3138912 T	2019/02/25
		PL 3138911 T3	2019/04/30
		PL 3138912 T3	2019/04/30
		PT 3138910 T	2017/10/18
		SG 10201800585 A	2018/02/27
		SG 11201503824 A	2015/06/29
		US 2014-0273230 A1	2014/09/18
		US 2014-0273233 A1	2014/09/18
		US 2016-0017366 A1	2016/01/21
		US 2016-0298125 A1	2016/10/13
		US 2016-0298132 A1	2016/10/13
		US 2016-0298133 A1	2016/10/13
		US 2016-0298134 A1	2016/10/13
		US 2016-0298135 A1	2016/10/13
		US 2016-0298136 A1	2016/10/13
		US 2016-0298138 A1	2016/10/13
		US 2017-0073705 A1	2017/03/16
		US 2017-0191082 A1	2017/07/06
		US 2018-0135073 A1	2018/05/17
		WO 2014-089290 A1	2014/06/12