



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0057173
(43) 공개일자 2025년04월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/04 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/04 (2013.01)
A61P 31/06 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0139408
- (22) 출원일자 2023년10월18일
심사청구일자 2023년10월18일

- (71) 출원인
주식회사 큐라티스
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 의료단지길 143
- (72) 발명자
이진희
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 의료단지길 143
김초원
부산광역시 금정구 중앙대로1629번길 16, 104동 3502호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인정진

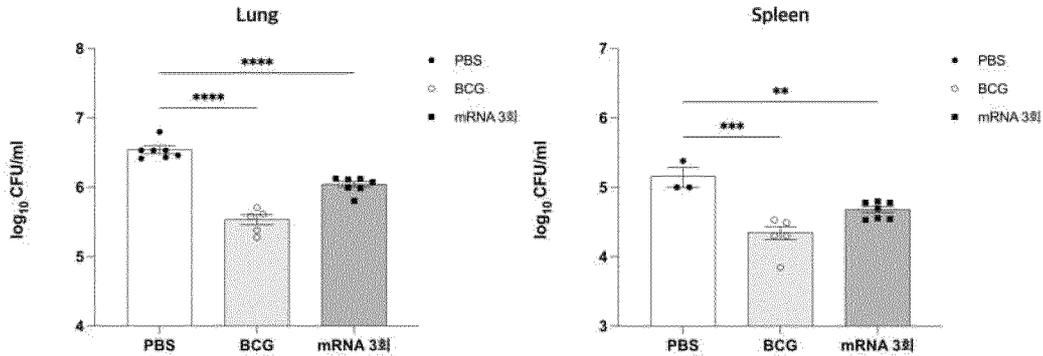
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 결핵 예방용 mRNA 백신 조성물

(57) 요약

본 발명은 결핵 예방용 mRNA 백신 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 코작 서열(Kozak sequence) 및 선도 서열(Leader sequence)을 포함하는 결핵 예방용 mRNA 백신 조성물은 결핵균 감염 시 체내에서 세포성 및 체액성 면역 반응을 효과적으로 유도할 수 있어, 결핵 예방을 위한 백신으로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 2039/53 (2013.01)
A61K 2039/55555 (2013.01)
A61K 2039/572 (2013.01)
A61K 2039/575 (2013.01)

장예은

충청북도 청주시 흥덕구 오송생명14로 215, 108동
2403호

(72) 발명자

이성무

충청북도 청주시 흥덕구 옥산면 오송가락로 1056,
116동 1802호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465038830
과제번호	HV22C0112000023
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	신변종감염병대응mRNA백신임상지원
연구과제명	자가증폭 mRNA 플랫폼을 이용한 차세대 결핵백신 후보물질 도출 및 상품화 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)큐라티스
연구기간	2022.04.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

코작 서열(Kozak sequence), 선도 서열(Leader sequence) 및 결핵균의 항원을 암호화하는 mRNA를 포함하는 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 코작 서열은 5'-GCCACC-3'인 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 선도 서열은 서열번호 2 내지 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 결핵균의 항원은 서열번호 5 또는 6으로 표시되는 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 지질나노입자(Lipid Nanoparticle)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 면역증강제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 부스터(booster) 백신인 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 결핵 예방용 백신 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 대상체에서 결핵균에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 9

코작 서열(Kozak sequence), 선도 서열(Leader sequence) 및 결핵균의 항원을 암호화하는 mRNA와 지질나노입자를 혼합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 백신 조성물의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 결핵 예방용 mRNA 백신 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 결핵은 결핵균인 *Mycobacterium tuberculosis*에 의한 만성 감염성 질환으로, 결핵의 대부분은 주로 폐에 감염을 일으켜 호흡기 관련 증상을 보이는 '폐결핵'(약 85%)이나, 폐 외 장기를 감염하여 우리 몸 속 거의 대부분의 조직이나 장기에서 병을 일으킬 수 있다. 결핵의 전파는 주로 전염성 있는 폐결핵 환자가 말을 하거나 기침, 재채기를 할 때, 비말핵 (결핵균이 포함된 미세한 침방울)이 일시적으로 공기 중에 떠 있는 동안 주위의 다른 사람들이 호흡하면서 흡입되는 과정을 통해서만 감염된다. 결핵은 6~18개월 이상의 장기간 약물복용으로 치료가 가능하지만 잘못된 복용법으로 인해 완치율이 높지 않으며, 이로 인해 약제 내성이 생겨 치료 실패의 가능성이 매우 높아진다. 세계보건기구(WHO)는 전 세계 인구의 25%가 결핵균에 감염되어 있으며, 2020년 약 149만 명이 결핵으로 인하여 사망하였다고 보고할 만큼 매우 관리가 필요한 질병으로 구분하고 있다.

[0004] 현재 결핵 예방 백신은 프랑스의 세균학자 알베르 칼메트와 동료 의사 카미유 게링이 13년에 걸쳐 230대 계대 배양하여 얻은 소결핵균인 BCG (Bacillus Calmette-Guerin) 백신이 거의 100 여년 동안 유일하게 사용되고 있다. BCG 백신은 소아결핵 예방 백신이며, 신생아 생후 4주 이내 접종하고 효과는 최대 10년까지 지속된다고 알려져 있다. 이처럼 BCG의 효능은 영유아에게만 제한적으로 나타나고, 지속력이 10년이기 때문에 현재 문제가 되고 있는 성인의 결핵에는 거의 효과가 없다. 이러한 문제점을 해결하고자 BCG를 대체할 보다 안전하고 효과가 우수한 새로운 결핵 예방 백신의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 사람을 포함하는 진핵세포는 유전정보를 담고 있는 핵을 둘러싼 막이 있어, 크게 핵과 세포질로 구별된다. 핵 속에 있는 DNA는 직접 단백질로 만들어지지 않고, 필요한 유전정보만 DNA에서 RNA로 전달하는 '전사(transcription)'의 과정을 거친다. 이때, 관여하는 RNA가 바로 mRNA(messenger RNA)이다. 핵 속에서 만들어진 mRNA는 세포질로 나와 단백질을 합성하는데, 이 단계를 '번역(translation)'이라 한다. 즉, DNA와 단백질의 중간매개의 역할을 하는 것이 mRNA이다. 생명공학 기술의 발달로 질병의 치료를 넘어 예방 차원에서 근본적인 원인을 해결할 수 있는 mRNA 기반 치료법이 개발되고 있다. DNA와 달리 mRNA는 핵 안까지 전달할 필요도 없으며, 외부 유전자가 DNA 사이에 통합되는 'Genome Integration'이 일어날 가능성이 없어 리스크도 적다. 또한, 전달된 mRNA는 일시적으로 단백질을 만들고, 빠르게 분해되기 때문에 안전하다. 또한, 제조하기 쉬우며 비용마저 적게 든다. 이러한 많은 장점에도 불구하고, mRNA는 사람의 체액 (눈물, 침, 점액, 땀 등)에서 발견되는 RNA 분해 효소인 리보뉴클레아제 (Ribonucleases)에 의해 쉽게 분해되는 불안정한 형태이기 때문에, 치료제로서 개발이 어려웠다. 하지만, mRNA의 구조 연구가 진행된 이후, 단백질 번역 효율과 mRNA의 반감기가 모두 높아진 변형된 형태의 mRNA가 제조되면서 mRNA 기반 치료법 개발이 시작되었다.

[0006] mRNA 백신의 가장 큰 장점은 바이러스의 염기서열만 알면 쉽게 합성 가능하여 새로운 바이러스나 변이에 빠르게 대응할 수 있다는 점이다. 백신에 사용되는 mRNA는 동물이나 인간 세포를 이용하지 않고 실험실에서 여러 단계의 효소 반응을 통해 합성 (Cell-free system) 되어 기존의 단백질 제조공정보다 훨씬 더 간편하고 빠르기 때문에 단기간 내 개발 및 생산이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 이러한 장점에도 불구하고, mRNA 백신을 적용하기 위해서는 mRNA 전달 효율을 높이고 임상적으로 mRNA 백신에 대한 유효성을 입증하는 연구가 많이 필요하다.

[0007] 이에 본 발명자들은 새로운 결핵 예방 백신을 개발하기 위한 연구를 계속한 결과, 결핵 항원 단백질의 번역 증

대를 위해 여러가지 서열들 (Kozak sequence, leader sequence)를 도입하였으며, 항원의 종류와 Leader sequence의 종류에 따라 면역원성이 달라짐을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) KR 101749165 B1

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) H. Al Tbeishat. Novel In Silico mRNA vaccine design exploiting proteins of M. tuberculosis that modulates host immune responses by inducing epigenetic modifications. Scientific Reports. 2022. 12:4645.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 결핵 예방용 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 대상체에서 결핵균에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 결핵 예방용 백신 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 코작 서열(Kozak sequence), 선도 서열(Leader sequence) 및 결핵균의 항원을 암호화하는 mRNA를 포함하는 결핵 예방용 백신 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 결핵 예방용 백신 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 결핵균에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 코작 서열(Kozak sequence), 선도 서열(Leader sequence) 및 결핵균의 항원을 암호화하는 mRNA와 지질나노입자를 혼합하는 단계를 포함하는 상기 백신 조성물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 결핵 예방용 mRNA 백신 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 코작 서열(Kozak sequence) 및 선도 서열(Leader sequence)을 포함하는 결핵 예방용 mRNA 백신 조성물은 결핵균 감염 시 체내에서 세포성 및 체액성 면역 반응을 효과적으로 유도할 수 있어, 결핵 예방을 위한 백신으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 QAg1 항원을 이용한 마우스 면역원성 평가 모식도를 나타낸다.

도 2는 QAg1 항원 3회 접종 그룹의 IFN- γ 분비능을 ELISpot assay를 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 QAg1 항원 3회 접종 그룹의 항원 특이적 Total IgG를 ELISA assay를 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 QAg3 항원 이용한 마우스 면역원성 평가 모식도를 나타낸다.

도 5는 QAg3 항원 2회 접종 그룹의 IFN- γ 분비능을 ELISpot assay를 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 QAg3 항원 2회 접종 그룹의 항원 특이적 Total IgG를 ELISA assay를 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 Leader sequence3-QAg3 항원을 이용한 감염 예방 효능평가 모식도를 나타낸다.

도 8은 Leader sequence3-QAg3 항원 3회 접종 그룹의 폐와 비장에서의 결핵균 수를 cfu assay를 통해 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.
- [0024] 본 발명은 코작 서열(Kozak sequence), 선도 서열(Leader sequence) 및 결핵균의 항원을 암호화하는 mRNA를 포함하는 결핵 예방용 백신 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 코작 서열은 코작 공통 서열(Kozak consensus sequence)이라고도 불리며, 대부분의 진핵생물 mRNA 전사체에서 단백질 번역 개시 부위로 기능하는 핵산 모티프이다. 이 중 5'-UTR (untranslated region)의 염기서열은 번역 시작 과정에 영향을 미치며, 번역 시작 코돈인 AUG 앞쪽에 위치하는 코작 서열은 척추동물의 효율적인 번역 시작 과정에 필수적인 것으로 알려져 있다. 따라서 mRNA의 안정성과 번역의 정확성을 향상시키기 위해 5' UTR(untranslated region)에 코작 서열을 도입시킬 수 있다. 본원의 일 구현예에 따르면, 바람직하게 상기 코작 서열은 5'-GCCACC-3'이나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0026] 상기 선도 서열 (Leader sequence)은 일부 진핵생물 단백질의 N 말단에 있는 16-20개의 아미노산 서열이다. 프로모터 (Promoter)와 코딩 영역 (coding region) 사이에 있는 polynucleotide region이며, 유전자 발현 조절에 관여한다. 소포체에 들어갈 예정인 단백질의 선도 서열은 항상 지질 이중층 막에 내장되는 소수성 아미노산을 포함하고, 막에서 기공의 위치를 표시하는 수용체 단백질로 초기 단백질을 안내하는 기능을 한다. 세포질에서 만들어지고 기능하는 단백질은 선도 서열이 없다. 선도 서열의 일부는 짧은 선도 펩타이드(leader peptide)로 번역될 수 있지만 신호 펩타이드(signal peptide)와는 달리 선도 서열은 구조 단백질(structural protein)의 일부가 아니다. 선도 서열과 신호 펩타이드는 다른 기능을 가지고 있지만 종종 동의어로 사용되기도 한다. 본 발명의 바람직한 실시예에서 상기 선도 서열은 tissue Plasminogen Activator(tPA), Albumin Preproprotein(AP), Interleukin 10(IL10) 유전자에서 유래되었다
- [0027] 본 발명의 구체적인 실시예에 사용된 코작 서열과 선도 서열의 조합은 본 발명의 결핵 항원의 항원 특이적인 체액성 면역 반응뿐만 아니라 세포성 면역 반응을 증가시킬 수 있다.
- [0028] 상기 결핵균의 항원은 결핵균 병독성 항원인 Rv2299c와 ESAT-6를 암호화하는 mRNA를 포함할 수 있고, 결핵균의 병독성에 관련된 단백질인 Rv2608, Rv3619, Rv3620과 결핵의 잠복성에 관련된 단백질인 Rv1813를 암호화하는 mRNA를 포함할 수 있으며, 바람직하게 상기 결핵균의 항원은 서열번호 5 또는 서열번호 6일 수 있다.
- [0029] 상기 조성물은 지질나노입자 (Lipid Nanoparticle, LNP)를 추가로 포함할 수 있다. RNA 기반의 백신 및 치료제 개발에 있어 핵심 요소는 RNA가 분해되지 않고 효율적으로 세포 내로 전달되는 것이며, 이를 위해 mRNA 전달체로 지질 나노입자가 사용되고 있다.
- [0030] 상기 조성물은 면역증강제를 추가로 포함할 수 있다. 면역증강제 (Adjuvant)는 백신으로 사용하는 항원에 대한 방어면역반응을 최대한으로 향상시키고 오랫동안 유지시킬 수 있다. Alexander Glenny에 의해 Aluminum salt가 면역반응을 증가시킨다는 것을 발견하게 되었고, 1932년 사람백신에 적용되는 첫 면역증강제로 허가되어 현재까지 가장 많은 백신에 사용되고 있다. 면역증강제는 종류에 따라 Th1 또는 Th2 활성을 유도하며, 특히 Pathogen recognition receptors(PRRs)를 활성화하는 면역유도물질이 포함되어 있을 경우 대식세포를 활성화시 IFN- γ 를 통해 Th1 활성을 유도해 세포성 면역 (Cellular immunity)을 유도한다. 본 발명의 백신 조성물과 함께 투여되어 면역 반응을 증강시킬 수 있는 면역증강제는 임의의 다양한 면역증강제를 포함하며, 전형적인 면역증강제는 프로인트 애쥬반트 (Freund adjuvant), 알루미늄 화합물 (aluminum compound), 무라밀 디펩타이드 (muramyl dipeptide), 리포폴리싸카라이드 (LPS), 모노포스포릴 리피드 A, 또는 쿠일 A 등이 알려져 있다. 상기 면역증강

<p>5</p>	<p>QAg1 항원</p>	<p>ATGAACGCCACGTGGAACAGCTGGAATTTTCAGGCCGAAGCCAGACAGCTGCTGGACCTGATGGTGCACAGCG TGTACAGCAACAAGGACGCCTTCTCTGAGAGAGCTGATCTCTAACGCCAGCGACGCCCTGGACAAGCTGAGAAT CGAAGCCCTGAGAAACAAGGACCTGGAAGTGGACACCAGCGACCTGCACATCGAGATCGATGGCCGATAAGGCC GCCAGAACACTGACCGTCAGAGACAACGGAATCGGCATGGCCAGAGAAGAGGTGGTGGATCTGATCGGCACAC TGGCCAAGTCTGGAACAGCCGAAGTCTGAGAGCCAGCTGAGAGAAGCCAAGAATGCCCGCTTCTGAGGAAT GATCGGCCAGTTCGGCATCGGCTTCTACTCTAGCTTTCATGGTGGCCGACAAGGTGCAGCTGCTGACAAGAAA GCTGGCGAGTCTGCCGCCACAAGATGGGAATCTAGCGCGGAGGGCACCTACACAATCGAGTCTGTGGAAGATG CCCCCAGGGCACCTCTGTGACACTGCACCTGAAGCCTGAGGACGCCGAGGACGATCTGCACGATTACACCTC CGAGTGAAGATCAGAAAACCTGGTCAAGAAGTACAGCGACTTTATCGCCTGGCCTATCAGGATGGACGTGAA AGAAGAACCCTGCCAGCCAAGAGGAAAGGTGGCGAAGGGCGAGAGGAAACCCTGACCATCGAGACAGAGACAC TGAACAGCATGAAGGCCCTGTGGGCCAGACCTAAAGAAGAAGTGTCCGAGCAAGAGTACAAGAGTTTACAA GCACGTGCCCCACGCCTGGGACGACCTCTGGAATCATTGCCATGAAGCTGAGGGCACATTCGAGTATCAG GCCCTGCTGTTTCATCCCTCTCAGCCCCCTTCGACCTGTTTCGATAGAGATGCCATGTGGGAATCCAGCTGT ACGTGAAGAGGGTGTTCATCTATGGGGCAGTGCAGCCAGCTGATGCCCCGAGTACGATGTTGGAAGGGCGT GGTGGACGCCAGGACATGTCTCTGAATGTGTCCAGAGATCTGCAGCAGGACAGACAGATCAAGGCCATC AGAAGGGCGTGAACAAGAAGGTGCTGAGCACAATCAAGGACGTGCAGAGCAGACACCCGAGGACTACAGAA CCTTCTGGACCCAGTTCGGAAGAGTCTGAAAGAGGGCTGCTGAGCGACATCGACAACAGAGAAACCCTGCT GGGAATCAGCAGCTTCGTGTCCACCTACAGCGAGGAAGAACCACCACTGGCTGAGTACGTGGAACGGATG AAGGACGGCCAGCAGCAGATCTTTTACGCCACCGCGCAAAACAAGACAGCAGCTCCTGAAGTCTCCCCACCTGG AAGCCTCAAGGCAAGGGATATGAGTGTGCTGCTCACAGACCCCTGGATGAAGTGTGGGTGGAATGGT GCCTGAGTTCGACGGCAAGCCTCTGCAAGTCTGTGGCTAAGGGCGAAGTGGACCTGAGCAGGAGGATACA AGCGAGGCCGAGCGGAGGAAAGACAGAAAGAGTTCGCCGATCTGCTGACCTGGCTGCAAGAGACTCTGAGCG ACCACGTGAAAGAAGTGCCTGAGCACCAGACTGACAGAGTCTCCAGCCTGTCTGATCACCGACGCCCTTCGG AATGACACCCGACTGGCCAGAATCTACAGAGCCAGTGGACAAGAGGTGCCAGTGGGAAAGAGAAATCCTGGAA CTGAACCCAGCCATCCTCTGGTCACTGGACTGAGACAGGCCACCAGGATAGAGCCGATGATGCCGAAAAGT CTCTGGCCGAAACCGCGAAGTGTGTACGGAACAGCTGCTGTGCTGAAGGGCGCTCTGGAAGATCCTGC CAGATTTGCTGAGCTGTGGCTGAGAGACTGGCCAGGACACTGATGACCGAGCAGCAGTGAATTCGCGCGA ATTGAAGCCGCTGCTAGCGCCATCCAGGGCAACGTGACATCTATCCACAGCCTGTGAGTGAAGGCAAGCAGT CTCTGACAAAGCTGGCTGCTGTTGGGGCGGATCTGGATCTGAAGCTTATCAGGGCGTGCAGCAGAAGTGGGA CGCCACAGCCACAGAATGAACAACGCCCTGCAGAATCTGGCCCGGACAATCTCTGAAGCCGACAGGCTATG GCCAGCACAGAGGAAATGTGACCGGCATGTTCCGCTGA</p>
<p>6</p>	<p>QAg3 항원</p>	<p>ATGACCATCAACTACCAGTTTGGCGAGCTGGACGCCACGGCGCTATGATTAGAGCACAGGCTGGATCTCTGG AAGCCGAGCACCAGGCCATCATCTCTGATGTGCTGACCGCCTCTGATTTCTGGGGCGGAGCTGGATCTGCTGC CTGTGAGGGCTTTATCACACAGCTGGCCAGAACTTCCAAGTATCTACGAGCAGGCCAACGCTCACGGACAG AAAGTGCAGGCCGCTGGAACAACATGGCCAGACAGATTCTGCCGTGGCGAGCTCTGGGCTGGAACACATC TGGCCAACCGCAGCATGAGCGAAGTATGATGTCTGAGATCGCCGCGCTCAGATCTCCTTCTTACTGACACTA CGGGCCATTGCCATGCTCTAGCGGAGCTTCTGGAAAGCCCTGGCATCAGAGAACCAGCCAGAGCTGAA CAGGTGGCCCTGGAAGTGTGGGACAAGACCTGCAAGGTGGTGTCCAGATTACCAGATGTGGCGCCGTTGG CCTACAACGGCTCTAAGTATCAAGGGCGCACAGGCTGACAAGAAGGGCTGCTGAGGACGATGCCGTGAACAG ACTGGAAGGCGGAAGAATCGTGAACCTGGGCTGCAACGAGCTGATGACCAGCAGATTATGACCGATCCTCAC GCCATGAGAGACATGGCCGCGAGATTTGAAGTGCACGCCAGCCGGAAGATGAGGCTAGAAGAATGTGG CCAGCGCTCAGAATATTTCTGGCGCGGATGGTCCGGAATGGCCGAAGCTACAAGCCTGGACACAATGACCCA GATGAACCAGGCCCTTCGGAACATCGTGAACATGCTGCACGGCGTCAGAGATGGACTCGTGGCGGATGCAAC AATTACGAGCAGCAAGAGCAGGCTCTCAGCAAATCCTGAGCAGCGTGGACATCAACTTTGCCGTGCTGCCTC CTGAAGTGAACAGCGCCAGAATTTTGGCGCGCTGGACTGGACCTATGCTGGCTGCTGCTTCTGCTTGGGA TGGACTGGCCGAAGAACTGCATGCCCGCTGGATCTTTCCGCTCTGTTACAACAGGACTGGCTGGCGACGCT TGGCATGGACCTGCTTCTCTGGCTATGACAAGAGCCGCTCTCCTTACGTCCGCTGGCTGAATACTGCTGCTG GACAGGCTGCTCAAGCCGAGGACAAGCTAGACTGGCCGCTCTGCTTTTGAAGCCACACTGGCTGCTACCGT GTCTCCTGCCATGGTGGCCGCAATAGAACAAGACTGGCAAGCCTGGTGGCTGCCAACCTGCTGGCAGAAAT GCTCCAGCTATCGCCGCTGCGGAGCCGAGTATGAACAGATCTGGGGCTCAAGCCGCTGACAGGCTATGTTCCGAT ACCATTCTGCCGCTAGCGCTGTGGCTACTCAGCTGGCTCCTATCCAAGAAGGACTGCAGCAGCAGCTCCAGAA TGTGCTGGCTCAACTGGCCTTGCCAACTCGGATCTGGAAACGTCCGAGTGGCAACATCGGCAACGATAAC ATCGGAAACGCCAATATCGGCTTCGGCAACAGGGCGACGCTAACATTGGAATCGGAAACATCGGCGACAGAA ACCTCGGCATCGGCAATACCGCAACTGGAATATCGGAATCGGCATACAGGCAACGGCCAGATCGGCTTTGG AAAGCCTGCTAACCTGACGTGCTGGTTCGTTGAAATGGTGGACCTGGCGTGCAGCCCTGGTCATGGGAGGA ACAGATTCTGCTGCCCTGCCTAACATCCCTCTGCTGGAATACGCCGACAGATTATCACACCTGTGCACC CTGGCTACACCGCCACCTTTCTGGAAACCCCTAGCCAGTCTTCCCTTCAACCGGCTGAACAGGCTGACCTA TGATGTGCTGTGGCCAGGGCGTGACAAACCTGCATACAGCTATTATGGCCAGCTGGCTGCCGAAACGAG GTGGTGGTTTTTCGGAACAAGCCAGAGCGCCACAATCGCCACCTTCGAGATGAGATACCTGCAGAGCCTGCCTG CTCATCTGAGGCCCTGGACTGGATGAGCTGAGCTTCACTGACCGGCAATCCCAACAGACCTGATGGCGGCAT CCTGACCAGATTGGCTTCTCTATCCCTCAGCTGGGCTTACCTTGTCTGGCGCTACACAGCCGATGCTTAT CCTACCGTGGACTACGCTTTCAGTACGACGGCGTGAACGACTTCCCTAAGTACCTCTGAACGTGTTCCGCA CCGCCAACGCTATCGCTGGCATCCTGTTTCTGACTCCGGACTGATCGCTTGGCACTGATCTGGCTAGCGG AGTGGTGCAGCCAGTCTCTTCTCTGACCTGACCTGACCCCTACATCCTGCTGACGATCTCAGGATCTGCCACTG CTGGTGCCTCTGAGAGCTATTCTCTGCTCGGAAACCCCTTGGCCGACCTGATTCAGCCTGATCTGAGAGTGC TGGTGAACCTGGGTACGACAGAACAGCCACCAGGACGTGCCATCTCCATTCGGACTGTTCCCTGATGTGGA TTGGCCGAAGTGGCAGCTGATCTGCAACAAGGTGCTGTGCAGGGCGTCAACGATGCTGCTGCTGGACTTGG CTGCCTCCTCTGGCAACCTGCTCTGCTTAGACTGTTTACGACCCATCACCATCACCATCACTAG</p>

7	Ko-QAg1	<p>GCCACCATGAACGCCACGTGGAACAGCTGGAATTTTCAGGCCGAAGCCAGACAGCTGCTGGACCTGATGGTGC ACAGCGTGTACAGCAACAAGGACGCCCTTCCTGAGAGAGCTGATCTCTAACGCCAGCGACGCCCTGGACAAGCT GAGAATCGAAGCCCTGAGAAAACAAGGACCTGGAAGTGGACACCAGCGACCTGCACATCGAGATCGATGCCGAT AAGGCCGCCAGAACACTGACCGTGCAGAGACAACCGAATCGGCATGGCCAGAGAAGAGTGGTGGATCTGATCG GCACACTGGCCAAGTCTGGAACAGCCGAAGTGCAGAGCCAGCTGAGAGAAGCCAAGAATGCCGCCGCTTCTGA GAACTGATCGGCCAGTTCGGCATCGGCTTCTACTCTAGCTTCATGGTGGCCGACAAGGTGCAGCTGCTGACA AGAAAGGCTGGCCGAGTCTGCCGCCACAAGATGGGAATCTAGCCGGCAGGGCACCACACATCGAGTCTGTGG AAGATGCCCTCAGGGCACCTGTGTGACACTGCACCTGAAGCCTGAGGACGCCGAGGACGATCTGCACGATTA CACCTCCGAGTGAAGATCAGAAACCTGGTCAAGAAGTACAGCGACTTTATCGCCTGGCCTATCAGGATGGAC GTGGAAGAAGAACCCCTGCCAGCCAAGAGGAAGTGGCGAAGGCCGAGAGAAACCGTGACCATCGAGACAG AGACACTGAACAGCATGAAGGCCCTGTGGGCCAGACCTAAAGAAGAAGTGTCCGAGCAAGAGTACAAAGAGTT CTACAAGCAGCTGCCACGCCCTGGACGACCCCTCTGGAATCATTGCCATGAAGGCTGAGGGCACATTCGAG TATCAGGCCCTGCTGTTTCATCCCTCTCACGCCCTTTTCGACCTGTTGATAGAGATGCCATGTGGGAATCC AGCTGTACGTGAAGAGGGTGTTCATCATGGCGACTGCCACAGCTGATGCCGATCCTGAGATTCGTGAA AGGCGTGGTGGACGCCAGGACATGTCTCTGAATGTGTCCAGAGAGATCCTGCAGCAGGACAGACAGATCAAG GCCATCAGAAGGCCGCTGACCAAGAAGGTGCTGAGCACAATCAAGGACGTGCAGAGCAGCAGCCGAGGACT ACAGAACCTTCTGGACCCAGTTCGGAAGAGTGTGAAAGAGGGCCTGTGAGCGACATCGACAACAGAGAAAC CCTGCTGGGAATCAGCAGCTTCGTGTCCACCTACAGCGAGGAAGAACCACCACACTGGCTGAGTACGTGAA CGATGAAGGACGGCCAGCAGCAGATCTTTACGCCACCCGGCGAAACAAGACAGCAGCTCCTGAAGTCTCCCC ACCTGGAAGCCTTCAAGGCCAAGGGATATGAGGTGCTGTGCTCACAGACCCCGTGGATGAAGTGTGGGTTGG AATGGTGCCTGAGTTCGACGGCAAGCCTCTGCAGTCTGTGGCTAAGGGCGAAGGACCTGAGCAGCGAAGAG GATACAAGCGAGGCCGAGCGGAGGAAAGACAGAAAGAGTTCGCCGATCTGCTGACCTGGCTGCAAGAGACTC TGAGCGACCAGTGAAGAAGTGGCCTGAGCACCAGACTGACAGAGTCTCCAGCCTGTCTGATCACCAGCGC CTTCGGAATGACACCCGACTGGCCAGAATCTACAGAGCCAGTGGACAAGAGGTGCCAGTGGGAAAGAGAATC CTGGAATGAACCCAGCCATCCTCTGGTCACTGGACTGAGACAGGCCACCAGGATAGAGCCGATGATGCCG AAAAGTCTCTGGCCGAAACCGCGAAGTGTACGGAACAGCTCTGCTTGTGAAGGCCGCGCTCTGGAAGA TCCTGCCAGATTTGCTGAGTGTGGCTGAGAGACTGGCCAGGACACTGATACCCGACAGCAGTGGAACTTC GCCGAATGAAGCCGCTGCTAGCGCCATCCAGGGCAACGTGACATCTATCCAGGCTCTGATGAGGCGCA AGCAGTCTCTGACAAAGCTGGCTGTGCTTGGGGCGGATCTGGATCTGAAGCTTATCAGGGCGTGCAGCAGAA GTGGGACGCCACAGCCACAGAAGTGAACAACGCCCTGCAGAATCTGGCCCGACAATCTCTGAAGCCGGACAG GCTATGGCCAGCACAGAGGGAATGTGACCGCATGTTTCGCCCTGA</p>
8	Ko-tPA-QAg1	<p>GCCACCATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGAACG CCCACGTGGAACAGCTGGAATTTTCAGGCCGAAGCCAGACAGCTGCTGGACCTGATGGTGCACAGCGTGTACAG CAACAAGGACGCCCTTCCTGAGAGAGCTGATCTCTAACGCCAGCGACGCCCTGGACAAGCTGAGAATCGAAGCC CTGAGAAAACAAGGACCTGGAAGTGGACACCAGCGACCTGCACATCGAGATCGATGCCGATAAAGGCCCCAGAA CACTGACCCGTGAGAGACAACCGAATCGGCATGGCCAGAGAAGAGTGGTGGATCTGATCGGCCACACTGGCCAA GTCTGGAACAGCCGAAGTGCAGAGCCAGCTGAGAGAAGCCAAGAATGCCGCCGCTTCTGAGGAACTGATCGGC CAGTTCGGCATCGGCTTCTACTCTAGCTTCATGGTGGCCGACAAGGTGCAGCTGCTGACAAGAAAGGCTGGCG AGTCTGCCGCCACAAGATGGGAATCTAGCCGGCAGGGCACCTACACAATCGAGTCTGTGGAAGATGCCCCCTCA GGGCACCTCTGTGACACTGCACCTGAAGCCTGAGGACGCCGAGGACGATCTGCACGATTACACCTCCGAGTGG AAGATCAGAAACCTGGTCAAGAAGTACAGCGACTTTATCGCCTGGCCTATCAGGATGGACGTGGAAGAAGAA CCCCTGCCAGCCAAGAGGAAGTGGCGAAGGCCGAGAGGAAACCGTGACCATCGAGACAGAGACTGAACAG CATGAAGCCCTGTGGCCAGACTAAAGAAAGAGTGTCCGAGCAAGAGTACAAAGGCTTCTACAGCAGCTC GCCCAGCCTGGGACGACCCCTCTGGAATCATTGCCATGAAGGCTGAGGGCACATTCGAGTATCAGGCCCTGC TGTTCATCCCTCTCACGCCCTTTTCGACCTGTTGATAGAGATGCCATGTGGGAATCCAGCTGTACGTGAA GAGGTGTTTCATATGGGCGACTGCGACCAGCTGATGCCCGAGTACCTGAGATTCGTGAAAGGCGTGGTGGAC GCCCAGGACATGTCTCTGAATGTGTCCAGAGAGATCCTGCAGCAGGACAGACAGATCAAGGCCATCAGAAGGC GGCTGACCAAGAAGGTGCTGAGCACAATCAAGGACGTGCAGAGCAGCAGCCGAGGACTACAGAACCTTCTG GACCCAGTTCGGAAGAGTGTGAAAGAGGGCCTGCTGAGCGACATCGACAACAGAGAAACCCCTGCTGGAAATC AGCAGCTTCGTGTCCACCTACAGCGAGGAAGAACCACCACACTGGCTGAGTACGTGGAACGGATGAAGGACG GCCAGCAGCAGATCTTTACGCCACCCGGCGAAACAAGACAGCAGCTCCTGAAGTCTCCCCACCTGGAAGCCTT CAAGGCCAAGGGATATGAGGTGCTGTGCTCACAGACCCCGTGGATGAAGTGTGGGTTGGAATGGTGCCTGAG TTCGAGGGCAAGCCTCTGCAGTCTGTGGCTAAGGGCGAAGTGGACCTGAGCAGCGAAGAGGATAAAGCGAGG CCGAGCGGAGGAAAGACAGAAAGAGTTCGCCGATCTGCTGACCTGGCTGCAAGAGACTCTGAGCGACACGT GAAAGAAGTGGCCTGAGCACCAGACTGACAGAGTCTCCAGCCTGTCTGATCACCAGCCTTCGGAATGACA CCCGCACTGGCCAGAATCTACAGAGCCAGTGGACAAGAGGTGCCAGTGGGAAAGAGAATCCTGGAATGAACC CCAGCCATCCTCTGGTCACTGGACTGAGACAGGCCACCAGGATAGAGCCGATGATGCCGAAAAGTCTCTGGC CGAAACCCGCAAGTGTGTACGGAACAGCTCTGCTTGTGAAGGCCGCGCTCTGGAAGATCCTGCCAGATTT GCTGAGCTGCTGGCTGAGAGACTGGCCAGGACACTGATGACCGAGCAGCAGTGGAACTTCGCCGAAATGAAG CCGCTGCTAGCGCCATCCAGGGCAACGTGACATCTATCCACAGCCTGTGGATGAGGGCAAGCAGTCTCTGAC AAAGTGGCTGTGCTTGGGGCGGATCTGGATCTGAAGCTTATCAGGGCGTGCAGCAGAAAGTGGGACGCCACA GCCACAGAAGTGAACAACGCCCTGCAGAATCTGGCCCGACAATCTCTGAAGCCGGACAGGCTATGGCCAGCA CAGAGGGAATGTGACCGCATGTTTCGCCCTGA</p>

<p>9</p>	<p>Ko-AP-QAg1</p>	<p>GCCACCATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTCTTTAGCTCGGCTTATTTCAACGCCACGTGG AACAGCTGGAATTTTCAGGCCGAAGCCAGACAGCTGCTGGACCTGATGGTGCACAGCGTGTACAGCAACAAGGA CGCCTTCCCTGAGAGAGCTGATCTCTAACGCCAGCGACGCCCTGGACAAGCTGAGAATCGAAGCCCTGAGAAAC AAGGACCTGGAAGTGGACACCAGCGACCTGCACATCGAGATCGATGCCGATAAGGCCGCCAGAACACTGACCG TCAGAGACAACGGAATCGGCATGGCCAGAGAAGAGGTGGTGGATCTGATCGGCACACTGGCCAAGTCTGGAAC AGCCGAAGTGGAGCCAGCTGAGAGAAGCAAGAATGCCGCCGCTTCTGAGGAACTGATCGGCCAGTTCCGGC ATCGGCTTCTACTCTAGCTTCATGGTGGCCGACAAGGTGCAGCTGCTGACAAGAAAGGCTGGCCAGTCTGCCG CCACAAGATGGGAATCTAGCGCGAGGGCACCTACACAATCGAGTCTGTGGAAGATGCCCTCAGGGCACCTC TGTGACACTGCACCTGAAGCCTGAGGACGCCGAGGACGATCTGCACGATTACACCTCCGAGTGGAAAGATCAGA AACCTGGTCAAGAAGTACAGCGACTTTATCGCCTGGCCTATCAGGATGGACGTGGAAGAAGAACCCTGCCA GCCAAGAGGAAGGTGGCGAAGGCCGAGAGGAAACCGTGACCATCGAGACAGAGACTGAACAGCATGAAGGC CCTGTGGCCAGACCTAAAGAAGAAGTGTCCGAGCAAGAGTACAAGAGTTTACAAGCACGTCGCCCACGCC TGGGACGACCCCTTGGAATCATTGCCATGAAGGCTGAGGGCACATTCGAGTATCAGGCCCTGCTGTTTCATCC CCTCTCACGCCCTTTTCAGCTGTTCGATAGAGATGCCCATGTGGGAATCCAGCTGTACCTGAAGAGGGTGT CATCATGGGCGACTGCGACCAGCTGATGCCCGAGTACCTGAGATTCTGTGAAAGGCGTGGTGGACGCCACGGAC ATGTCTCTGAATGTGTCCAGAGAGATCCTGCAGCAGGACAGACAGATCAAGGCCATCAGAAGGCCGGCTGACCA AGAAGGTGCTGAGCACAATCAAGGACGTGCAGAGCAGCAGACCCGAGGACTACAGAACCTTCTGGACCCAGTT CGGAAGAGTGTGAAAGAGGGCCTGCTGAGCGACATCGACAACAGAGAACCCTGCTGGGAATCAGCAGCTTC GTGTCCACCTACAGCGAGGAAGAACCACCACACTGGCTGAGTACGTGGAACGGATGAAGGACGCCCAGCAGC AGATCTTTACGCCACCGCGAACAAGACAGCAGCTCCTGAAGTCTCCCCACCTGGAAGCCTTCAAGGCCAA GGGATATGAGGTGCTGTGCTCACAGACCCCGTGGATGAAGTGTGGGTGGATGGAAGTGTGAGTTCGACGGC AAGCCTCTGCAGTCTGTGGCTAAGGGCGAAGTGGACCTGAGCAGCGAAGAGGATACAAGCGAGGCCGAGCGCG AGGAAAGACAGAAAGAGTTCCCGATCTGTGACCTGGCTGCAAGAGACTCTGAGCGACCAGTGAAGAAGT GCGCCTGAGCACCAGACTGACAGAGTCTCCAGCCTGTCTGATACCGACGCCCTCGGAATGACACCCGACTG GCCAGAATCTACAGAGCCAGTGGACAAGAGGTGCCAGTGGGAAAGAGAATCCTGGAATGAACCCAGCCATC CTCTGGTCACTGGACTGAGACAGGCCACCAGGATAGAGCCGATGATGCCGAAAAGTCTCTGGCCGAAACCCG CGAAGTGTGTACGGAACAGCTCTGCTTGTGAAGGCGCGCTCTGGAAGATCCTGCCAGATTTGCTGAGCTG CTGGCTGAGAGACTGGCCAGGACACTGATGACCGAGCAGCAGTGAAGTTCGCCGGAATGGAAGCCGCTGCTA GCGCCATCCAGGCAACGTGACATCTATCCACAGCCTGCTGGATGAGGGCAAGCAGTCTCTGACAAAGTGGC TGCTGCTTGGGGCGGATCTGGATCTGAAGCTTATCAGGGCGTGCAGCAGAAGTGGGACGCCACAGCCACAGAA CTGAACAACGCCCTGCAGAATCTGGCCCGACAATCTCTGAAGCCGGACAGGCTATGGCCAGCAGAGGGAA ATGTGACCCGCATGTTCCGCTGA</p>
<p>10</p>	<p>ko-IL10-QAg1</p>	<p>GCCACCATGCACAGCTCCGCACTTTTGTGTGCTGGTCTGCTGACTGGGGTGGCGCTAACGCCACAGTGG AACAGCTGGAATTTTCAGGCCGAAGCCAGACAGCTGCTGGACCTGATGGTGCACAGCGTGTACAGCAACAAGGA CGCCTTCCCTGAGAGAGCTGATCTCTAACGCCAGCGACGCCCTGGACAAGCTGAGAATCGAAGCCCTGAGAAAC AAGGACCTGGAAGTGGACACCAGCGACCTGCACATCGAGATCGATGCCGATAAGGCCGCCAGAACACTGACCG TCAGAGACAACGGAATCGGCATGGCCAGAGAAGAGGTGGTGGATCTGATCGGCACACTGGCCAAGTCTGGAAC AGCCGAAGTGGAGCCAGCTGAGAGAAGCAAGAATGCCGCCGCTTCTGAGGAACTGATCGGCCAGTTCGGC ATCGGCTTCTACTCTAGCTTTCATGGTGGCCGACAAGGTGCAGCTGCTGACAAGAAAGGCTGGCGAGTCTGCCG CCACAAGATGGGAATCTAGCGCGAGGGCACCTACACAATCGAGTCTGTGGAAGATGCCCTCAGGGCACCTC TGTGACACTGCACCTGAAGCCTGAGGACGCCGAGGACGATCTGCACGATTACACCTCCGAGTGGAAAGATCAGA AACCTGGTCAAGAAGTACAGCGACTTTATCGCCTGGCCTATCAGGATGGACGTGGAAGAAGAACCCTGCCA GCCAAGAGGAAGTGGCGAAGGCCGAGAGGAAACCGTGACCTCGAGACAGAGAACCCTGCTGGGAATCAGCAGCTT CCTGTGGCCAGACCTAAAGAAGAAGTGTCCGAGCAAGAGTACAAGAGTTTACAAGCACGTCGCCCACGCC TGGGACGACCCCTTGGAATCATTGCCATGAAGGCTGAGGGCACATTCGAGTATCAGGCCCTGCTGTTTCATCC CCTCTCACGCCCTTTTCAGCTGTTCGATAGAGATGCCCATGTGGGAATCCAGCTGTACCTGAAGAGGGTGT CATCATGGGCGACTGCGACCAGCTGATGCCCGAGTACCTGAGATTCTGTGAAAGGCGTGGTGGACGCCACGGAC ATGTCTCTGAATGTGTCCAGAGAGATCCTGCAGCAGGACAGACAGATCAAGGCCATCAGAAGGCCGGCTGACCA AGAAGGTGCTGAGCACAATCAAGGACGTGCAGAGCAGCAGACCCGAGGACTACAGAACCTTCTGGACCCAGTT CGGAAGAGTGTGAAAGAGGGCCTGCTGAGCGACATCGACAACAGAGAACCCTGCTGGGAATCAGCAGCTTCT GTGTCCACCTACAGCGAGGAAGAACCACCACACTGGCTGAGTACGTGGAACGGATGAAGGACGCCCAGCAGC AGATCTTTACGCCACCGCGAACAAGACAGCAGCTCCTGAAGTCTCCCCACCTGGAAGCCTTCAAGGCCAA GGGATATGAGGTGCTGTGCTCACAGACCCCGTGGATGAAGTGTGGGTGGATGTTGCTGAGTTCGACGGC AAGCCTCTGCAGTCTGTGGCTAAGGGCGAAGTGGACCTGAGCAGCGAAGAGGATACAAGCGAGGCCGAGCGCG AGGAAAGACAGAAAGAGTTCCCGATCTGTGACCTGGCTGCAAGAGACTCTGAGCGACCAGTGAAGAAGT GCGCCTGAGCACCAGACTGACAGAGTCTCCAGCCTGTCTGATCACCAGCCCTCGGAATGACACCCGACTG GCCAGAATCTACAGAGCCAGTGGACAAGAGGTGCCAGTGGGAAAGAGAATCCTGGAATGAACCCAGCCATC CTCTGGTCACTGGACTGAGACAGGCCACCAGGATAGAGCCGATGATGCCGAAAAGTCTCTGGCCGAAACCCG CGAAGTGTGTACGGAACAGCTCTGCTTGTGAAGGCGCGCTCTGGAAGATCCTGCCAGATTTGCTGAGCTG CTGGCTGAGAGACTGGCCAGGACACTGATGACCGAGCAGCAGTGAAGTTCGCCGGAATGGAAGCCGCTGCTA GCGCCATCCAGGGCAACGTGACATCTATCCACAGCCTGCTGGATGAGGGCAAGCAGTCTCTGACAAAGTGGC TGCTGCTTGGGGCGGATCTGGATCTGAAGCTTATCAGGGCGTGCAGCAGAAGTGGGACGCCACAGCCACAGAA CTGAACAACGCCCTGCAGAATCTGGCCCGACAATCTCTGAAGCCGGACAGGCTATGGCCAGCAGAGGGAA ATGTGACCCGCATGTTCCGCTGA</p>

11	Ko-QAg3	<p>GCCACCATGACCATCAACTACCAGTTTGGCGACGTGGACGCCACGGCGCTATGATTAGAGCACAGGCTGGAT CTCTGGAAGCCGAGCACCAGGCCATCATCTCTGATGTGCTGACCGCCTCTGATTTCTGGGGCGGAGCTGGATC TGCTGCCTGTCAGGGCTTATCACACAGCTGGGCAGAACTTCCAAGTGATCTACGAGCAGGCCAACGCTCAC GGACAGAAAGTGCAGGCCGCTGGAAAACAACATGGCCCAGACAGATTCTGCCGTGGGCAGCTCTTGGGCTGGAA CACATCTGGCCAACGGCAGCATGAGCGAAGTGATGATGCTGAGATCGCCGGCCTGCCTATTCTCCTATCAT CCACTACGGCGCCATTGCCTATGCTCCTAGCGGAGCTTCTGGAAGGGCCTGGCATCAGAGAACACCAGCCAGA GCTGAACAGGTGGCCCTGAAAAGTGTGGCGACAAGACCTGCAAGGTGGTGTCCAGATTACCAGATGTGGCG CCGTGGCTACAACGGCTCTAAGTATCAAGGCGGCACAGGCCGTGACAAGAAGGGCTGTGAGGACGATGCCGT GAACAGACTGGAAGGCGGAAGAATCGTGAAGTGGGCTGCAACGAGCTGATGACCAGCAGATTCATGACCGAT CCTCAGCCATGAGAGACATGCGCCGAGATTGAAAGTGCACGCCAGACCGTGGAAAGATGAGGCTAGAAGAA TGTGGGCCAGCGCTCAGAATATTTCTGGCGCCGATGGTCCGGAATGGCCGAAGCTACAAGCCTGGACACAAT GACCCAGATGAACCAGGCCCTCCGGAACATCGTGAACATGTGACGGCGTCAGAGATGGACTCGTGGCGGAT GCCAACAAATTACGAGCAGCAAGAGCAGGCCCTCTCAGCAAATCCTGAGCAGCGTGGACATCAACTTTGCCGTGC TGCCTCCTGAAGTGAACAGCGCCAGAATTTTGGCCGGCCTGGACTGGGACCTATGCTGGCTGCTGCTTCTGC TTGGGATGGACTGGCCGAAGAAGTGCATGCCGCCGCTGGATCTTTCCGCTCTGTTACAACAGGACTGGCTGGC GACGCTTGGCATGGACCTGCTTCTTGGCTATGACAAGAGCCGCTCTCCTTACGTCGGCTGGTGAATACTG CTGCTGGACAGGCTGCTCAAGCCGAGGACAAGCTAGACTGGCCGCCCTCTGTTTTGAAGCCCACTGGCTGC TACCGTGTCTCCTGCCATGGTGGCCGCAATAGAACAAAGACTGGCAAAGCCTGGTGGCTGCCAACCTGTGGGA CAGAATGCTCCAGTATCGCCGCTCGCCAGGCCGAGTATGAACAGATCTGGGCTCAAGACGTGGCCGCTATGT TCGGATACCATTCTGCCGCTAGCGCTGTGGCTACTCAGCTGGCTCCTATCCAAGAAGGACTGCAGCAGCAGCT CCAGAATGTGCTGGCTCAACTGGCCTCTGGCAACCTCGGATCTGGAACCTCGGAGTGGGCAACATCGGCAAC GATAACATCGAAAACGCAATATCGGCTTCGGCAACAGGGGCGACGCTAACATTGGAATCGGAAACATCGGCG ACAGAAACCTCGGCATCGGCAATACCGCAACTGGAATATCGGAATCGGCATCACAGGCAACGGCCAGATCGG CTTTGAAAAGCCTGCTAACCCCTGACGTGCTGGTCTGTTGAAAATGGTGGACCTGGCGTGACAGCCCTGGTCATG GGAGGAACAGATTCTCTGCTGCCCCTGCTAACATCCCTCTGTGGAATACGCCCGCAGATTATCACACCTG TGCACCCCTGGCTACACCGCCACCTTTCTGGAACCCCTAGCCAGTTCCTCCCTTACCAGGCTGAACAGCCT GACCTATGATGTGCTGTGGCCAGGGCGTGACAAACCTGCATACAGTATTATGGCCAGCTGGCTGCCGGA AACGAGGTGGTGGTTTTCGGAACAAGCCAGAGCGCCACAATCGCCACCTTCGAGATGAGATACCTGCAGAGCC TGCTGCTCATCTGAGGCTGGACTGGATGAGCTGAGCTTACACTGACCGGCAATCCCAACAGACCTGATGG CGGCATCCTGACCAGATTCCGCTTCTCTATCCCTCAGCTGGGCTTACCTTGTCTGGCGCTACACCAGCCGAT GCCTATCCTACCGTGGACTACGCCCTTTCAGTACGACGGCGTGAACGACTTCCTTAAGTACCCTCTGAACGTGT TCGCCACCGCCAACGCTATCGCTGGCATCCTGTTTCTGCACTCCGACTGATCGCTCTGCCACCTGATCTGGC TAGCGGAGTGGTGCAGCCAGTCTTCTCCTGACGTCCTGACCACCTACATCCTGTGCCATCTCAGGATCTG CCACTGCTGGTGCCTCTGAGAGCTATTCTCTGCTCGGAAACCTCTGGCCGACCTGATTCAGCCTGATCTGA GAGTCTGGTGGAACTGGGCTACGACAGAACAGCCACCAGGACGTGCCATCTCCATTCCGACTGTTCCCTGA TGTGGATTGGCCGAAGTGGCAGCTGATCTGCAACAAGGTGCTGTGCAGGGCGTCAACGATGCTCTGTCTGGA CTTGGACTGCTCCTCTTGGCAACCTGCTCTGCCTAGACTGTTACGACCTGA</p>
----	---------	--

12	Ko-tPA-QAg3	<p>GCCACCATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCGTTTCGACCA TCAACTACCAGTTTGGCGACGTGGACGCCACGGCGCTATGATTAGAGCACAGGCTGGATCTCTGGAAGCCGA GCACCAGGCCATCATCTCTGATGTGCTGACCGCCTCTGATTTCTGGGGCGGAGCTGGATCTGCTGCCTGTCAG GGCTTTATCACACAGCTGGGCAGAACTTCCAAGTGATCTACGAGCAGGCCAACGCTCACGGACAGAAAAGTGC AGGCCGCTGGAAACAACATGGCCCAGACAGATTCTGCCGTGGGCAGCTCTTGGGCTGGAACACATCTGGCCAA CGGCAGCATGAGCGAAGTGATGATGTCTGAGATCGCCGGCCTGCCTATTCCTCTATCATCCACTACGGCGCC ATTGCCATATGCTCCTAGCGGAGCTTCTGGAAAGGCCTGGCATCAGAGAACCACCGCCAGAGCTGAACAGGTGG CCCTGGAAAAGTGTGGCGACAAGACCTGCAAGGTGGTGTCCAGATTACCAGATGTGGCGCCGTGGCCTACAA CGGCTCTAAGTATCAAGGCGGCACAGGCCGTACAAGAAGGGCTGCTGAGGACGATGCCGTGAACAGACTGGAA GGCGAAGAATCGTGAACCTGGCCCTGCAACGAGCTGATGACCAGCAGATTCATGACCGATCCTCACGCCATGA GAGACATGGCCGCGAGATTTGAAGTGCACGCCAGACCGTGAAGATGAGGCTAGAAGAATGTGGGCCAGCGC TCAGAATATTTCTGGCGCCGATGGTCCGGAATGGCCGAAGCTACAAGCCTGGACACAATGACCAGATGAAC CAGGCCTTCGGAAACATCGTGAACATGCTGCACGGCGTCAGAGATGGACTCGTGGGGATGCCAACAAATTACG AGCAGCAAGCAGCGCCTCTCAGCAAATCCTGAGCAGCGTGGACATCAACTTTGCCGTGCTGCCCTCCTGAAGT GAACAGCGCCAGAAATTTTGGCGGCTGGACTGGGACCTATGCTGGTGTGCTTCTGCTTGGGATGGACTG GCCGAAGAACTGCATGCCGCCGCTGGATCTTTCGCCCTGTTTACAACAGGACTGGTGGCGACGCTTGGCATG GACCTGCTTCTCTGGCTATGACAAGAGCCGCTCTCCTTACGTCGGCTGGCTGAATACTGCTGCTGGACAGGC TGCTCAAGCCGAGGACAAGCTAGACTGGCCGCTCTGCTTTTGAAGCCCACTGGCTGTACCGTGTCTCCT GCCATGGTGGCCGCAATAGAACAAGACTGGCAAGCCTGGTGGCTGCCAACCTGCTGGGACAGAATGTCCAG CTATCGCCGCTGCCGAGGCCGAGTATGAACAGATCTGGGCTCAAGACGTGGCCGCTATGTTCCGATACCATTC TGCCGCTAGCGCTGTGGCTACTCAGCTGGCTCCTATCCAAGAAGGACTGCAGCAGCAGCTCCAGAATGTGCTG GCTCAACTGGCCTCTGGCAACCTCGGATCTGGAAACGTCGGAGTGGGCAACATCGGCAACGATAACATCGGAA ACGCCAATATCGGCTTCGGCAACAGGGGCGACGCTAACATTGGAATCGGAAACATCGGCGACAGAAACCTCGG CATCGGCAATACCGGCAACTGGAAATATCGGAATCGGCATCACAGGCAACGGCCAGATCGGCTTTGGAAAGCCT GCTAACCCCTGACGTGTGGTGTGGAAATGGTGGACCTGGCGTGACAGCCCTGGTATGGGAGGAACAGATT CTCTGCTGCCCTGCCTAACATCCCTCTGCTGGAATACGCCGCCAGATTATCACACCTGTGCACCCCTGGCTA CACCGCCACCTTTCTGGAACCCCTAGCCAGTTCCTCCCTTCACCGGCTGAACAGCCTGACCTATGATGTG TCTGTGGCCAGGGCGTGACAAACCTGCATACAGCTATTATGGCCAGCTGGCTGCCGAAACGAGGTGGTGG TTTTCGGAACAAGCCAGAGCGCCACAATCGCCACCTTCGAGATGAGATACTGCAGAGCCTGCCGTGCTCATCT GAGGCTGGACTGGATGAGCTGAGCTTCACTGACCGGCAATCCCAACAGACCTGATGGCGGCATCCTGACC AGATTGGGCTTCTATCCCTCAGCTGGGCTTACCTTGTCTGGCGCTACACCAGCCGATGCCATCCTACCG TGGACTACGCCTTTCAGTACGACGGCGTGAACGACTTCCCTAAGTACCCTCTGAACGTGTTCCGCCACCGCCAA CGCTATCGCTGGCATCCTGTTTCTGCACTCCGACTGATCGCTCTGCCACCTGATCTGGCTAGCGGAGTGGTG CAGCCAGTCTTCTCTCTGACGTCTGACCACCTACATCCTGCTGCCATCTCAGGATCTGCCACTGCTGGTGC CTCTGAGAGCTATTCTCTGCTCGGAAACCCCTTGGCCGACCTGATTACAGCTGATCTGAGAGTGTGGTGGGA ACTGGGCTACGACAGAACAGCCACCAGGACGTGCCATCTCCATTCCGACTGTTCCCTGATGTGGATTGGGCC GAAGTGGCAGCTGATCTGCAACAAGGTGCTGTGCAGGGCGTCAACGATGCTCTGCTGACTTGGACTGCCTC CTCCTTGGCAACCTGCTCTGCCTAGACTGTTACAGCACCTGACATCACCATCACCATCACTAG</p>
----	-------------	---

13	Ko-IL10-QAg3	<p>GCCACCATGCACAGCTCCGCACCTTTTGTGTGCTGGTCTGCTGACTGGGGTGCGGCTACCATCAACTACC AGTTTGGCGACGTGGACGCCACGGCGCTATGATTAGAGCACAGGCTGGATCTCTGGAAGCCGAGCACCAGGC CATCATCTCTGATGTGCTGACCGCCTCTGATTTCTGGGGCGGAGCTGGATCTGCTGCCTGTCAGGGCTTATC ACACAGCTGGGCAGAACTTCCAAGTGATCTACGAGCAGGCCAACGCTCACGGACAGAAAGTGCAGGCCGCTG GAAACAACATGGCCAGACAGATTCTGCCGTGGGAGCTCTTTGGGTGGAACACATCTGGCCAACCGGCAGCAT GAGCGAAGTGATGATGTCTGAGATCGCCGGCTGCCTATTCCTCTATCATCCACTACGGCCGCAATTGCCTAT GCTCCTAGCGGAGCTTCTGGAAAGGCTGGCATCAGAGAACCAGCCAGAGCTGAACAGTGGCCCTGGAAA AGTGTGGGACAAGACCTGCAAGTGGTGTCCAGATTCACCAGATGTGGGCGCGTGGCCTACAACGGCTCTAA GTATCAAGGCGGCACAGGCCTGACAAGAAGGGTGTGAGGACGATGCCGTGAACAGACTGGAAGGCGGAAGA ATCGTGAACCTGGGCGCTGCAACGAGCTGATGACCAGCAGATTATGACCAGATCCTACGCCATGAGAGACATGG CCGGCAGATTTGAAGTGACAGCCAGACCGTGAAGATGAGGCTAGAAGAATGTGGGCCAGCGCTCAGAATAT TTCTGGGCGCGGATGGTCCGAATGGCCGAAGCTACAAGCCTGGACACAATGACCAGATGAACCAGGCCTTC CGGAACATCGTGAACATGCTGCACGGCGTCAGAGATGGACTCGTGGGGATGCCAACAAATTACGAGCAGCAAG AGCAGGCCTCTCAGCAAATCCTGAGCAGCGTGGACATCAACTTTGGCGTGCCTCCTTGAAGTGAACAGCGC CAGAATTTTGGCCGGCGTGGACTGGGACCTATGCTGGCTGCTGCTTCTGCTGGGATGGACTGGCCGAAGAA CTGCATGCCCGCTGGATCTTTCCCTCTGTTACAACAGGACTGGCTGGCGACGCTTGGCATGGACCTGCTT CTCTGGCTATGACAAGAGCCGCTCTCCTTACGTGGCTGGCTGAATACTGCTGCTGGACAGGCTGCTCAAGC CGCAGGACAAGTAGACTGGCCGCCTCTGCTTTTGAAGCCACACTGGCTGCTACCGTGTCTCCTGCCATGGTG GCCGCAATAGAACAAAGACTGGCAAGCCTGGTGGCTGCCAACCTGTGGGACAGAATGCTCCAGCTATCGCC CTGCCGAGGCGGAGTATGAACAGATCTGGGCTCAAGACGTGGCCGCTATGTTCCGATACCAATTCGCCGTAG CGCTGTGGCTACTCAGCTGGCTCCTATCCAAGAAGGACTGCAGCAGCAGCTCAGAAATGTGTGGCTCAACTG GCCTCTGGCAACCTCGGATCTGGAACGTCGGAGTGGCAACATCGGCAACGATAACATCGGAAACGCCAATA TCGGCTTCGGCAACAGGGCGACGCTAACATTTGAATCGGAAACATCGGCGACAGAAACCTCGGCATCGGCAA TACCGGCAACTGGAATATCGGAATCGGCATCACAGGCAACGGCCAGATCGGCTTTGGAAAGCCTGCTAACCCCT GACGTGCTGGTCTGTTGAAATGGTGGACCTGGCGTGACAGCCCTGGTCATGGGAGGAACAGATTCTCTGCTGC CCCTGCCTAACATCCCTCTGCTGGAATACGCCCCAGATTCATCACACCTGTGCACCCTGGCTACACCGCCAC CTTTCTGGAACCCCTAGCCAGTTCCTCCCTTACCCGCTGAACAGCCTGACCTATGATGTGTCTGTGGCC CAGGGCGTGACAAACCTGCATACAGCTATTATGGCCACGCTGGCTGCCGGAACAGGTTGGTTCGGAA CAAGCCAGAGCGCCACAATCGCCACCTTCGAGATGAGATACCTGCAGAGCCTGCCTGCTCATCTGAGGCTGG ACTGGATGAGCTGAGCTTCACACTGACCGCAATCCCAACAGACCTGATGGCGGCATCCTGACCAGATTCCGGC TTCTCTATCCCTCAGCTGGGCTCACCTTGTCTGGCGCTACCCAGCCGATGCCTATCCTACCGTGGACTACG CCTTTCAGTACGAGCGGTGAACGACTTCCTAAGTACCCTCTGAACGTGTTGCCACCGCCAACGCTATCGC TGGCATCCTGTTTCTGCACTCCGACTGATCGCTTCCACCTGATCTGGCTAGCGGAGTGGTGACCCAGCT TCTTCTCTGACGTCCTGACCACCTACATCCTGCTGCCATCTCAGGATCTGCCACTGCTGGTGCCTCTGAGAG CTATTCCTCTGCTCGGAAACCTCTGGCCGACCTGATTGAGCCTGATCTGAGAGTGGTGGAACTGGGCTA CGACAGAACAGCCACCAGGACGTGCCATCTCCATTCGGACTGTTCCCTGATGTGGATTGGGCCGAAGTGGCA GCTGATCTGCAACAAGGTGCTGTGCAGGGCGTCAACGATGCTCTGCTGGACTTGGACTGCCTCCTCTTGGC AACCTGCTCTGCCTAGACTGTTTCAGCACCTGACATCACCATCACCATCACTAG</p>
----	--------------	--

- [0046] *Ko: Kozak sequence
- [0047] 1-1. QAg1 항원을 포함하는 mRNA의 제조
- [0048] 선천면역(Innate Immunity)과 후천면역(Adaptive Immunity)을 동시에 활성화하면서, 효과적인 면역원성을 유도하도록 결핵균 병독성 항원인 Rv2299c와 ESAT-6을 암호화하는 유전자를 포함하는 mRNA 백신 후보군을 준비하였다.
- [0049] 구체적으로, 상기 mRNA를 생산하기 위하여 그에 상응하는 DNA 템플레이트를 포함하는 벡터를 구축하여 형질전환을 수행하고 시퀀싱을 수행하였으며, 그 서열은 서열번호 7 내지 10로 표시된다.
- [0050] 배양 후 회수한 Wet cell을 suspension buffer (Solution I)에서 현탁하고 Detergent (SDS)를 포함한 Alkaline solution (Solution II)을 첨가하여 세포 파쇄 및 변성을 유도하였다. 그 후, Lysate의 pH를 중화하여 cell debris, denatured protein 및 genomic DNA 등과 같은 불순물들은 응집시키고, Ammonium Bicarbonate (NH₄HCO₃)를 첨가하면 CO₂ 및 NH₃ 생성되고 응집물을 표면으로 떠올려 Semi-stable Flocculate Layer를 형성함으로 투명한 Plasmid DNA 추출물의 분리하였다. plasmid DNA만 용해된 상태로 회수하였다.
- [0051] Plasmid DNA는 Anion Exchange Chromatography를 이용하여 1차 정제 후, Hydrophobic Interaction Chromatography를 이용하여 나머지 불순물을 2차 정제하였다. 2차 정제 후의 용출액은 염 농도가 높기 때문에 이후 Linearization에서 간섭이 발생하므로 MWC0 30 kDa인 Membrane를 사용하여 Buffer를 WFI로 교환하였다 (ultrafiltration/diafiltration, UF/DF).
- [0052] 세포배양액으로부터 정제한 Plasmid DNA는 mRNA의 Invitro transcription (IVT) 원료물질로 사용하기 위해 제한효소(Not I)를 이용하여 선형화하였다. Linearized plasmid DNA는 Multimodal Chromatography를 이용하여 정

제하였다. 3차 Multimodal Chromatography가 끝난 용출액은 IVT 공정에서 Buffer의 간섭이 발생하므로 MWCO 30 kDa인 Membrane를 사용하여 Buffer를 WFI로 교환하였다(DF/DF).

[0053] T7 promoter(DNA로부터 RNA의 전사를 촉진하는 T7 중합효소의 결합부위)를 포함하는 linearized plasmid DNA를 주형으로 T7 RNA 중합효소와 RNA의 핵산 단위체인 nucleotide triphosphate(NTP), RNase inhibitor 등과 반응하여 단일 가닥의 mRNA를 합성하였다. 이후 mRNA 합성반응물에 DNA 분해효소(DNase)를 처리하여 잔류 DNA를 제거하였다. 그 후, Cation Exchange Chromatography를 이용하여 정제하였으며, MWCO 100 kDa인 Membrane을 사용하여 Buffer를 WFI로 교환하였다(UF/DF)).

[0054] IVT 반응 이후, 최종 mRNA의 구조는 세포 내 안정성과 효율적인 전이를 위해 5' cap 구조가 필요하다. Guanylyltransferase, 2' S-adenosylmethionine (SAM) 등 enzyme을 이용하여 Post-transcriptional Enzymatic Capping 방법으로 capping하였다. 그 후, Cation Exchange Chromatography를 이용하여 정제하였다. Cation Exchange Chromatography가 끝난 용출액은 정제 Step에서 제거되지 않는 Enzyme을 포함한 Impurity를 효율적으로 분리한다(UF/DF). 따라서 MWCO 100 kDa인 Membrane을 사용하여 Buffer를 WFI로 교환하였다.

[0056] 1-2. QAg3 항원을 포함하는 mRNA의 제조

[0057] 병독성을 가진 활동성 결핵은 물론, 잠복결핵에 대한 면역원성까지 확보할 수 있도록 결핵균의 병독성에 관련된 단백질인 Rv2608, Rv3619, Rv3620과 결핵의 잠복성에 관련된 단백질인 Rv1813를 암호화하는 유전자를 포함하는 mRNA 백신 후보군을 준비하였다.

[0058] 구체적으로, 상기 mRNA를 생산하기 위하여 그에 상응하는 DNA 템플레이트를 포함하는 벡터를 구축하여 형질전환을 수행하고 시퀀싱을 수행하였으며, 그 서열은 서열번호 11 내지 13로 표시된다. 구체적인 방법은 상기 실시예 1-1과 동일하다.

[0060] <실시에 2> mRNA 백신의 제조

[0061] 실시예 1에서 제조한 mRNA와 mRNA 전달체인 LNP를 300 µg 또는 750 µg을 혼합하여 백신을 제조하였다. 구체적으로, -80℃ 보관인 mRNA를 완전히 해동 후, 상온보관인 LION(Lipid Inorganic Nanoparticle, 지질 무기질 나노 입자)과 일정 비율에 맞춰 섞어주었다. 이 때, vortex나 Sonication 사용은 하지 않도록 하며, pipetting으로 섞어주었다.

[0063] <실험예 1> QAg1 항원을 포함하는 mRNA 백신 조성물의 면역원성 평가

[0064] 1-1. 실험 디자인

[0065] 상기 실시예에서 제작한 mRNA 백신이 결핵 예방 백신으로 이용될 수 있는지 그 효능을 검증하기 위하여, 동물 실험을 수행하였다. 실험 동물은 약 7-8주령의 C57BL/6 암컷 마우스를 사용하였으며, 하기와 같이 그룹당 5마리씩 무작위로 8그룹으로 나누었다.

[0066] 그룹 1: PBS

[0067] 그룹 2: Kozak-QAg1 (25 µg)

[0068] 그룹 3: Kozak-Leader Sequence1-QAg1 (10 µg)

[0069] 그룹 4: Kozak-Leader Sequence1-QAg1 (25 µg)

[0070] 그룹 5: Kozak-Leader Sequence2-QAg1 (10 µg)

[0071] 그룹 6: Kozak-Leader Sequence2-QAg1 (25 µg)

[0072] 그룹 7: Kozak-Leader Sequence3-QAg1 (10 µg)

[0073] 그룹 8: Kozak-Leader Sequence3-QAg1 (25 µg)

- [0075] 각각 0일, 4주 및 8주에 대퇴부 근육에 50 μ l을 접종하고, 12주에 마우스를 희생시켜 채혈 및 비장을 분리하여 면역원성을 평가하였다 (도 1 참조).
- [0077] 1-2. IFN- γ 생성능 분석
- [0078] 본 발명의 mRNA 백신 조성물의 결핵에 대한 백신 접종의 방어 효과를 확인하기 위해 ELISpot을 이용하여 IFN- γ 의 생성능을 분석하였다. ELISpot assay는 백신 접종 개체에서 추출한 live 면역세포(비장세포, 말초 혈액 단핵세포 등)에 stimulator로 재자극 시 사이토카인 발현 유무를 확인하는 실험으로, 결핵균 항원에 자극된 CD4 T세포가 분비한 IFN- γ 를 측정할 수 있다.
- [0079] ELISpot을 이용하여 IFN- γ 발현 세포를 측정한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, Leader sequence에 따라 IFN- γ 분비 수준이 달라지는 것을 확인하였다. PBS를 접종한 대조 그룹을 기준으로 항원 면역화 그룹과 비교하여 수치화하여 비교한 결과, Kozak-Leader sequence 2-QAg1 및 Kozak-Leader sequence 3-QAg1는 항원 접종량이 늘어남에 따라 IFN- γ 발현 세포가 증가하는 경향을 나타냈다. 특히 Kozak-Leader sequence 3-QAg3 25 μ g 접종 그룹은 Leader sequence가 포함되지 않은 Kozak-QAg1과 비교하여 약 4배 정도 IFN- γ 발현 세포가 증가하는 것으로 나타났다.
- [0080] 상기의 결과는 본 발명의 mRNA 백신 조성물이 결핵에 대해 세포성 면역 반응을 유도할 수 있음을 시사한다.
- [0082] 1-3. 항원 특이적 항체 역가의 확인
- [0083] 본 발명의 mRNA 백신 조성물의 결핵에 대한 백신 접종의 방어 효과를 확인하기 위해 ELISA을 이용하여 항원 특이적 혈중 IgG 항체가를 측정하였다.
- [0084] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, Leader sequence에 따라 항체 생성 정도가 달라졌으며 Leader sequence가 없는 Kozak-QAg1 실험군에 비해 Leader sequence가 포함된 항원을 접종한 개체에서 항원 특이적인 항체가 많이 생성되는 것으로 나타났다.
- [0085] 상기의 결과는 본 발명의 mRNA 백신 조성물이 결핵에 대해 체액성 면역 반응을 유도할 수 있음을 시사한다.
- [0087] <실험예 2> QAg3 항원을 포함하는 mRNA 백신 조성물의 면역원성 평가
- [0088] 2-1. 실험 디자인
- [0089] 상기 실시예에서 제작한 mRNA 백신이 결핵 예방 백신으로 이용될 수 있는지 그 효능을 검증하기 위하여, 동물 실험을 수행하였다. 실험 동물은 약 7-8주령의 C57BL/6 암컷 마우스를 사용하였으며, 하기와 같이 그룹당 5마리씩 무작위로 4그룹으로 나누었다.
- [0090] 그룹 1: PBS
- [0091] 그룹 2: Kozak--QAg3 (25 μ g)
- [0092] 그룹 3: Kozak-Leader Sequence1-QAg3 (25 μ g)
- [0093] 그룹 4: Kozak-Leader Sequence3-QAg3 (25 μ g)
- [0095] 각각 0일 및 4주에 대퇴부 근육에 50 μ l을 접종하고, 8주에 마우스를 희생시켜 채혈 및 비장을 분리하여 면역원성을 평가하였다 (도 4 참조).
- [0097] 2-2. IFN- γ 생성능 분석
- [0098] 본 발명의 mRNA 백신 조성물의 결핵에 대한 백신 접종의 방어 효과를 확인하기 위해 ELISpot을 이용하여 IFN- γ 의 생성능을 분석하였다.
- [0099] ELISpot을 이용하여 IFN- γ 발현 세포를 측정한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, Leader sequence에 따라 IFN-

γ 분비 수준이 달라지는 것을 확인하였다. PBS를 접종한 대조 그룹을 기준으로 항원 면역화 그룹과 비교하여 수치화하여 비교한 결과 Kozak-Leader sequence 1-QAg3이 IFN- γ 발현 세포 수가 가장 높은 것으로 나타났다.

[0100] 상기의 결과는 본 발명의 mRNA 백신 조성물이 결핵에 대해 세포성 면역 반응을 유도할 수 있음을 시사한다.

[0102] **2-3. 항원 특이적 항체 역가의 확인**

[0103] 본 발명의 mRNA 백신 조성물의 결핵에 대한 백신 접종의 방어 효과를 확인하기 위해 ELISA을 이용하여 항원 특이적 혈중 IgG 항체가를 측정하였다.

[0104] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, Kozak-QAg3를 제외하고 모든 실험군에서 특이 항체가 유의적으로 증가하는 것이 확인되었다. 특히 Kozak-Leader sequence3-QAg3이 항체가 높게 형성됨을 알 수 있었다.

[0105] 상기의 결과는 본 발명의 mRNA 백신 조성물이 결핵에 대해 체액성 면역 반응을 유도할 수 있음을 시사한다.

[0107] **<실험예 3> Kozak-Leader sequence3-QAg3 항원을 포함하는 mRNA 백신 조성물의 예방 효능 평가**

[0108] **3-1. 실험 디자인**

[0109] 상기 실시예에서 제작한 mRNA 백신이 결핵 예방 백신으로 이용될 수 있는지 예방 효능을 검증하기 위하여, 동물 실험을 수행하였다. 실험 동물은 약 6주령의 C57BL/6 암컷 마우스를 사용하였으며, 하기와 같이 그룹당 5마리씩 무작위로 3그룹으로 나누었다.

[0111] 그룹 1: PBS

[0112] 그룹 2: BCG (Positive control)

[0113] 그룹 3: Kozak-Leader Sequence3-QAg3 (25 μ g)

[0115] 각각 0일, 4주, 8주(4주 간격 3회)에 대퇴부 근육에 50 μ l을 접종하고, 마지막 백신 접종 4주 후(12주)에, 결핵균 균주 약 100개가 폐조직에 일차감염 되도록 공기 감염을 시킨다. 감염 4주 후 마우스를 CO2로 안락사시킨 다음 폐와 비장에서 결핵균 수를 측정하고 조직병리를 분석한다.

[0116] **3-2. 폐 및 비장에서의 결핵균 수 측정**

[0117] 본 발명의 mRNA 백신 조성물의 결핵에 대한 백신 접종의 방어 효과를 확인하기 위해 폐와 비장을 이용하여 결핵균 수를 측정하였습니다.

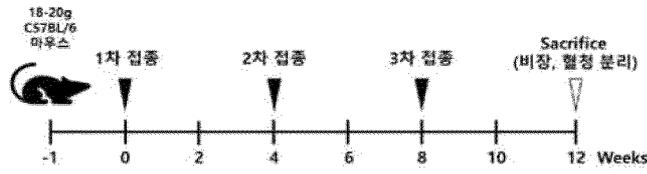
[0118] Cfu assay를 통해 폐와 비장에서의 결핵균 수를 측정한 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, Kozak-Leader sequence3-QAg3 항원 접종에 따라 결핵균 수가 달라지는 것을 확인하였다.

[0119] PBS를 접종한 대조 그룹을 기준으로 Kozak-Leader sequence3-QAg3 면역화 그룹과 비교하여 수치화한 결과, 폐와 비장에서의 결핵균 수가 통계학적으로 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.

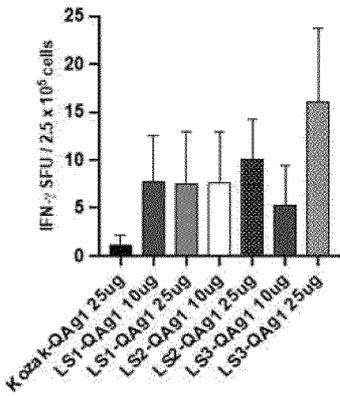
[0120] 상기의 결과는 본 발명의 mRNA 백신 조성물이 결핵에 대해 예방 효능을 유도할 수 있음을 시사한다.

도면

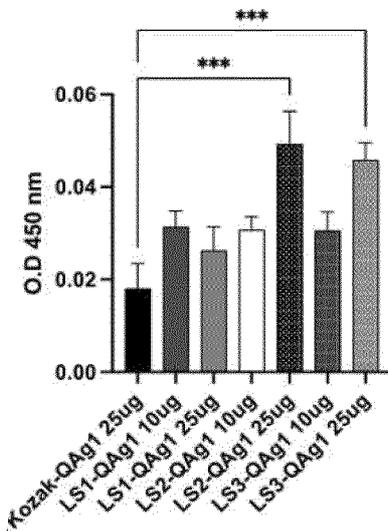
도면1



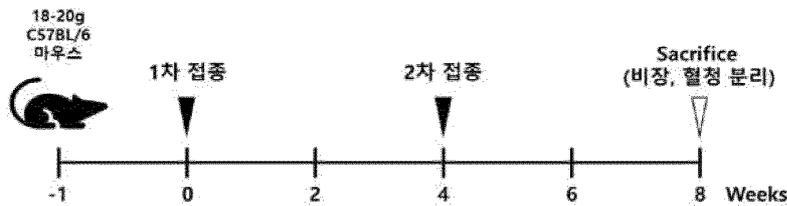
도면2



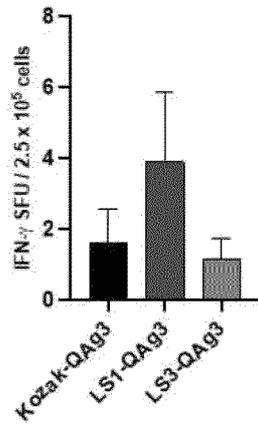
도면3



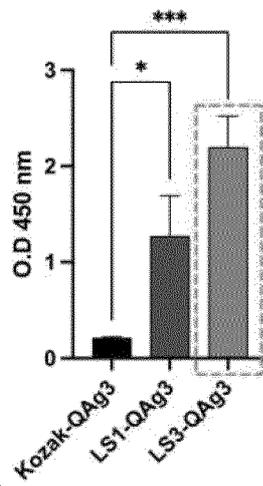
도면4



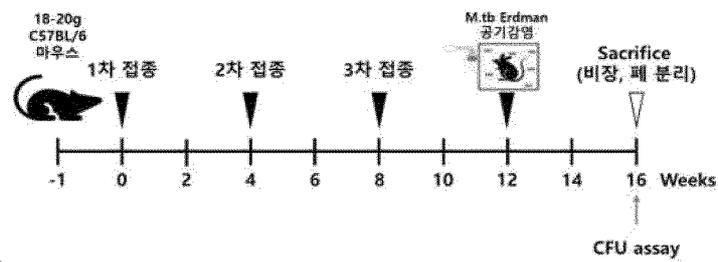
도면5



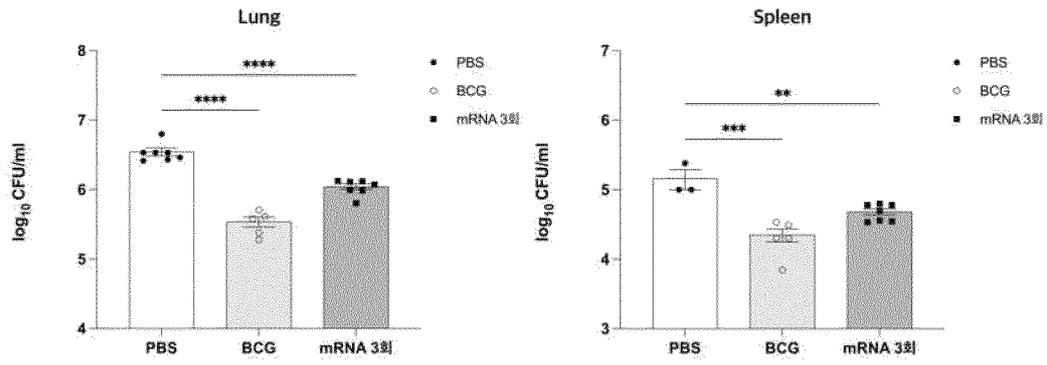
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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