

발명의 설명

발명의 명칭: 항원 전달용 컨쥬게이트 및 이의 이용

기술분야

- [1] 관련 출원들과의 상호 인용
- [2] 본 출원은 2023년 7월 28일자 대한민국 특허출원 제 10-2023-0099234 호 및 2023년 8월 4일자 대한민국 특허출원 제 10-2023-0102465 호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 대한민국 특허출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서에 일부로서 포함된다.
- [3] 본 명세서는 항원 단백질의 mRNA, 상기 항원 단백질의 mRNA 5' 말단 및/또는 3' 말단에 연결된 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA를 포함하는 컨쥬게이트 및 이를 포함하는 면역화용 조성물 및/또는 백신 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [4] 항암치료백신은 항원특이적 면역 반응을 강화 또는 유도하여, 암을 치료하는 방법이다. 기존의 항암치료백신은 항원의 Processing 과정을 반영하고 있지 않아서, 항원서열에 따라서 발현량이 일정하지 않거나 발현량이 높지 않아서, 서로 다른 항원 서열에 대한 특이적 면역반응이 높지 않거나 일정한 치료 효능을 기대하기 어려웠다.
- [5] 상기과 같은 문제점을 해결하여 다양한 항원 서열을 문제없이 발현시키기 위해 항원 mRNA 서열의 5' 및 3' 양 말단에 다른 단백질 (캐리어 단백질)을 암호화하는 mRNA 서열을 연결하여 항원을 mRNA 형태로 세포 내로 전달하였을 때 발현량을 증대시키고, 다양한 항원에 대해 발현된 항원 단백질 양의 편차를 줄이고, CD4/CD8 항원이 각각 적합하게 processing/presentation pathway로 전달되게 하여 높은 면역 반응을 유도하고자 하였다.

[6]

발명의 내용

기술적 과제

- [7] 본 명세서는 항원 단백질의 mRNA 및 상기 항원 단백질의 mRNA 5' 말단 및/또는 3' 말단에 연결된 제1 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA를 포함하는, 컨쥬게이트를 제공하고, 상기 항원 단백질의 발현량을 높이도록 한다.
- [8] 다른 예는 상기 컨쥬게이트를 포함하는, 면역화용 조성물 및/또는 백신 조성물을 제공한다.
- [9] 다른 예는 상기 컨쥬게이트 및 이를 포함하는 면역화용 조성물 및/또는 백신 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 면역화 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [10] 일 예는 항원 단백질의 mRNA, 상기 항원 단백질의 5' 말단, 3' 말단, 또는 둘 다에 연결된 캐리어 단백질을 포함하는, 컨쥬게이트를 제공하고,

- [11] 구체적으로, 항원 단백질의 mRNA;
- [12] 상기 항원 단백질의 mRNA 5' 말단에 연결된 제1 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA; 및
- [13] 상기 항원 단백질의 mRNA 3' 말단에 연결된 제2 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA를 포함하는, 컨쥬게이트를 제공한다.
- [14] 상기 제1 캐리어 단백질 및 제2 캐리어 단백질은 동일하거나 상이할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [15] 상기 제1 캐리어 단백질 및 제2 캐리어 단백질은 각각 Ub (ubiquitin), UbR (ubiquitin A77R mutant), Lamp, mODC (mouse ornithine decarboxylase), cmc, SORT1 (sortilin 1), TRX (Thioredoxin) (예컨대, TRXwt 및/또는 TRXmt), PSBD (peripheral subunit-binding domain), TRX-UbR (예컨대, TRXwt-UbR), TRX-Lamp (예컨대, TRXwt-Lamp), TRX-mODC (예컨대, TRXwt-mODC), TRX-cmc (예컨대, TRXwt-cmc), TRX-SORT1 (예컨대, TRXwt-SORT1), SORT1 w/TM 및 Lamp w/TM으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [16] 상기 항원 단백질은 T 세포 에피토프를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [17] 상기 컨쥬게이트는 상기 캐리어 단백질에 의해 하기 (i) 및 (ii)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 특성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:
- [18] (i) CD4/CD8이 각각 processing 및 presentation pathway로 전달; 및
- [19] (ii) 상기 항원 단백질의 발현이 증가.
- [20] 다른 예는 상기 컨쥬게이트를 포함하는, 면역화용 조성물 및/또는 백신 조성물을 제공한다.
- [21] 다른 예는 상기 컨쥬게이트 및/또는 이를 포함하는 면역화용 조성물 및/또는 백신 조성물을 암에 대한 면역화를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암에 대한 면역화 방법을 제공한다.
- [22] 다른 예는 상기 컨쥬게이트를 포함하는 암, 감염성 질환, 자가면역질환 및/또는 알레르기성 질환의 예방, 개선 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [23] 다른 예는 상기 컨쥬게이트 및/또는 조성물을 암에 대한 면역화에 사용하기 위한 용도 또는 상기 암에 대한 면역화를 위해 사용되는 조성물 (예컨대, 면역화용 조성물 및/또는 백신 조성물)의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [24] 다른 예는 상기 컨쥬게이트 및/또는 조성물을 암, 감염성 질환, 자가면역질환 및/또는 알레르기성 질환의 예방, 개선 및/또는 치료에 사용하기 위한 용도 또는 상기 암, 감염성 질환, 자가면역질환 및/또는 알레르기성 질환의 예방, 개선 및/또는 치료를 위해 사용되는 조성물 (예컨대, 암, 감염성 질환, 자가면역질환 및/또는 알레르기성 질환의 예방, 개선 및/또는 치료용 조성물)의 제조에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [25]

- [26] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 하기 설명하고자 한다.
- [27]
- [28] 컨쥬게이트
- [29] 본 명세서의 일 예는 항원 단백질의 mRNA;
- [30] 상기 항원 단백질의 mRNA 5' 말단에 연결된 제1 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA; 및
- [31] 상기 항원 단백질의 mRNA 3' 말단에 연결된 제2 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA를 포함하는, 컨쥬게이트를 제공한다.
- [32] 본 명세서에서 "항원"은 대상체에서 면역 반응을 유도하는 임의의 분자를 의미한다. 상기 항원은 T 세포 수용체 및/또는 B 세포 수용체에 의해 인식될 수 있고 대상체에서 면역 반응, 특히 T 세포 반응 및/또는 B 세포 반응을 자극할 수 있는 에피토프를 포함하는 임의의 분자를 의미한다.
- [33] 본 명세서에서 "에피토프"는 T-세포 수용체 및/또는 B-세포 수용체와 상호작용하는 항원의 영역을 의미한다.
- [34] 본 명세서에서 "캐리어 단백질"은 항원 단백질에 연결되어 항원 단백질의 제조합적 발현을 개선시키거나 (예를 들어, 높은 발현율, 일관성 있는 발현율 등), 정제를 개선시키거나, 물성을 향상시키거나, 안정화하거나, 면역원성을 증가시키거나, 및/또는 면역반응세포로 전달을 개선하는 단백질을 의미한다. 본 명세서에서 캐리어 단백질은 전장 단백질 형태 및/또는 전장 단백질의 아미노산 서열 중 일부 서열을 포함하는 형태일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에서 캐리어 단백질은 항원 단백질의 N-말단과 C-말단에 각각 연결될 수 있으며, 각각 제1 캐리어 및 제2 캐리어에 해당한다.
- [35] 본 명세서에서 "연결된"은 구성요소들이 직접 또는 간접적으로 함께 연결된 것을 의미한다. 각 구성요소들은 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결될 수 있다. 또한, "연결된"은 세포, 예를 들어 항원제시세포 또는 면역세포와 접촉 및 면역화 후에, 각 구성성분들의 화학적 또는 물리적 결합을 유지하는 것을 의미할 수 있다. 예를 들어, 항원제시세포와 면역세포가 접촉할 때까지, 성분들이 서로 자유롭게 분산되지 않도록 회합될 수 있다. 예를 들어, 2개의 성분은 서로 공유적으로 연결되어, 이러한 2개의 성분이 별도로 분산 또는 확산될 수 없도록 할 수 있다.
- [36] 상기 컨쥬게이트의 항원 단백질의 mRNA와 제1 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA 및/또는 제2 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA 사이에 링커가 존재할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [37] 본 명세서에서 "링커"는 둘 이상의 성분을 함께 연결 또는 커플링 또는 결합시키는 분자 또는 원자 군을 의미한다. 본 명세서에서 항원 단백질의 각 성분들은, 예컨대, 항원 단백질과 캐리어 단백질은 각각 임의의 적합한 수단을 통해 함께 연결되거나 결합될 수 있다.

- [38] 상기 링커는 (GS)_n, (G₂S)_n, (G₃S)_n, (G₄S)_n, Gn, LE, SSGG 또는 GGGGSGGGGG (여기서, G는 Gly, S는 Ser, L 은 Leu, E는 Glu, n은 적어도 1의 정수임)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [39]
- [40] 캐리어 단백질
- [41] 본 명세서에서 제공하는 항원 단백질의 mRNA;
- [42] 상기 항원 단백질의 mRNA 5' 말단에 연결된 제1 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA; 및
- [43] 상기 항원 단백질의 mRNA 3' 말단에 연결된 제2 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA를 포함하는, 컨주게이트에서, 상기 제1 캐리어 단백질 및 제2 캐리어 단백질은 동일하거나 상이할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [44] 상기 제1 캐리어 단백질 및 제2 캐리어 단백질은 각각 Ub (ubiquitin), UbR (ubiquitin A77R mutant), Lamp, mODC (mouse ornithine decarboxylase), cmc, SORT1 (sortilin 1), TRX (Thioredoxin) (예컨대, TRXwt 및/또는 TRXmt), PSBD (peripheral subunit-binding domain), TRXwt-UbR, TRXwt-Lamp, TRXwt-mODC, TRXwt-cmc, TRXwt-SORT1, SORT1 w/TM 및 Lamp w/TM으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [45] 상기 Ub는 항원 단백질 N 말단에 삽입 시 Ub의 가장 마지막 서열 알라닌 (A)이 아르기닌 (R)로 치환되면 잘 분해될 수 있어, 상기 항원 단백질의 mRNA 5' 말단에 Ub에 해당하는 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA가 연결되는 경우 마지막 서열에 R인 UbR을 암호화하는 mRNA를 연결될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [46] 상기 TRXwt-UbR, TRXwt-Lamp, TRXwt-mODC 및 TRXwt-cmc는 상기 UbR, Lamp, mODC, cmc 단백질의 N 말단에 TRXwt가 추가된 형태인 단백질이다.
- [47] 상기 SORT1 w/TM 및 Lamp w/TM은 상기 SORT1 및 Lamp 각각의 cytosolic domain에 transmembrane domain이 추가된 형태인 단백질이다.
- [48] 상기 컨주게이트에서,
- [49] (1) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXmt, 상기 제2 캐리어 단백질은 PSBD;
- [50] (2) 상기 제1 캐리어 단백질은 UbR, 상기 제2 캐리어 단백질은 mODC;
- [51] (3) 상기 제1 캐리어 단백질은 UbR, 상기 제2 캐리어 단백질은 SORT1;
- [52] (4) 상기 제1 캐리어 단백질은 Lamp, 상기 제2 캐리어 단백질은 mODC;
- [53] (5) 상기 제1 캐리어 단백질은 Lamp, 상기 제2 캐리어 단백질은 SORT1;
- [54] (6) 상기 제1 캐리어 단백질은 UbR, 상기 제2 캐리어 단백질은 cmc;
- [55] (7) 상기 제1 캐리어 단백질은 UbR, 상기 제2 캐리어 단백질은 Lamp;
- [56] (8) 상기 제1 캐리어 단백질은 mODC, 상기 제2 캐리어 단백질은 SORT1;
- [57] (9) 상기 제1 캐리어 단백질은 cmc, 상기 제2 캐리어 단백질은 mODC;
- [58] (10) 상기 제1 캐리어 단백질은 cmc, 상기 제2 캐리어 단백질은 SORT1;
- [59] (11) 상기 제1 캐리어 단백질은 Lamp, 상기 제2 캐리어 단백질은 Ub;

- [60] (12) 상기 제1 캐리어 단백질은 Lamp, 상기 제2 캐리어 단백질은 cmyc;
- [61] (13) 상기 제1 캐리어 단백질은 SORT1, 상기 제2 캐리어 단백질은 mODC;
- [62] (14) 상기 제1 캐리어 단백질은 mODC, 상기 제2 캐리어 단백질은 Ub;
- [63] (15) 상기 제1 캐리어 단백질은 mODC, 상기 제2 캐리어 단백질은 cmyc;
- [64] (16) 상기 제1 캐리어 단백질은 mODC, 상기 제2 캐리어 단백질은 Lamp;
- [65] (17) 상기 제1 캐리어 단백질은 cmyc, 상기 제2 캐리어 단백질은 Ub;
- [66] (18) 상기 제1 캐리어 단백질은 cmyc, 상기 제2 캐리어 단백질은 Lamp;
- [67] (19) 상기 제1 캐리어 단백질은 SORT1, 상기 제2 캐리어 단백질은 Ub;
- [68] (20) 상기 제1 캐리어 단백질은 SORT1, 상기 제2 캐리어 단백질은 cmyc;
- [69] (21) 상기 제1 캐리어 단백질은 SORT1, 상기 제2 캐리어 단백질은 Lamp;
- [70] (22) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt, 상기 제2 캐리어 단백질은 cmyc;
- [71] (23) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt, 상기 제2 캐리어 단백질은 Lamp;
- [72] (25) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt, 상기 제2 캐리어 단백질은 mODC;
- [73] (26) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt, 상기 제2 캐리어 단백질은 SORT1;
- [74] (27) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt, 상기 제2 캐리어 단백질은 Ub;
- [75] (28) 상기 제1 캐리어 단백질은 cmyc, 상기 제2 캐리어 단백질은 TRXwt;
- [76] (29) 상기 제1 캐리어 단백질은 Lamp, 상기 제2 캐리어 단백질은 TRXwt;
- [77] (30) 상기 제1 캐리어 단백질은 mODC, 상기 제2 캐리어 단백질은 TRXwt;
- [78] (31) 상기 제1 캐리어 단백질은 SORT1, 상기 제2 캐리어 단백질은 TRXwt;
- [79] (32) 상기 제1 캐리어 단백질은 UbR, 상기 제2 캐리어 단백질은 TRXwt;
- [80] (33) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt-UbR, 상기 제2 캐리어 단백질은 SORT1;
- [81] (34) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt-Lamp, 상기 제2 캐리어 단백질은 mODC;
- [82] (35) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt-mODC, 상기 제2 캐리어 단백질은
SORT1;
- [83] (36) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt-mODC, 상기 제2 캐리어 단백질은 Ub;
- [84] (37) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt-mODC, 상기 제2 캐리어 단백질은 Lamp;
- [85] (38) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt-cmyc, 상기 제2 캐리어 단백질은 Ub;
- [86] (39) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt-SORT1, 상기 제2 캐리어 단백질은 Ub;
- [87] (40) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt-SORT1, 상기 제2 캐리어 단백질은
Lamp;
- [88] (41) 상기 제1 캐리어 단백질은 TRXwt, 상기 제2 캐리어 단백질은 SORT1 w/
TM; 또는
- [89] (42) 상기 제1 캐리어 단백질은 Lamp w/ TM, 상기 제2 캐리어 단백질은
TRXwt일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [90] 다른 예에서, 상기 컨주게이트 내의 상기 제1 캐리어 단백질 및 제2 캐리어
단백질은 다음과 같이 예시될 수 있다:
- [91] [표1]

CP_set	N-term (제1 캐리어 단백질)	C-term (제2 캐리어 단백질)
CP01	TRXmt	PSBD
CP11	UbR	mODC
CP12	UbR	SORT1
CP13	Lamp	mODC
CP14	Lamp	SORT1
CP21	UbR	cmyc
CP22	UbR	Lamp
CP23	mODC	SORT1
CP24	cmyc	mODC
CP25	cmyc	SORT1
CP26	Lamp	Ub
CP27	Lamp	cmyc
CP28	SORT1	mODC
CP31	mODC	Ub
CP32	mODC	cmyc
CP33	mODC	Lamp
CP34	cmyc	Ub
CP35	cmyc	Lamp
CP36	SORT1	Ub
CP37	SORT1	cmyc
CP38	SORT1	Lamp
CP41	TRXwt	cmyc
CP42	TRXwt	Lamp
CP43	TRXwt	mODC
CP44	TRXwt	SORT1
CP45	TRXwt	Ub
CP46	cmyc	TRXwt
CP47	Lamp	TRXwt
CP48	mODC	TRXwt

CP49	SORT1	TRXwt
CP50	UbR	TRXwt
CP112	TRXwt-UbR	SORT1
CP113	TRXwt-Lamp	mODC
CP123	TRXwt-mODC	SORT1
CP131	TRXwt-mODC	Ub
CP133	TRXwt-mODC	Lamp
CP134	TRXwt-cmyc	Ub
CP136	TRXwt-SORT1	Ub
CP138	TRXwt-SORT1	Lamp
CP201	TRXwt	SORT1 w/ TM
CP202	Lamp w/ TM	TRXwt

- [92] 상기 UbR은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 UbR을 암호화하는 유전자는 서열번호 21의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [93] 상기 Ub는 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 Ub를 암호화하는 유전자는 서열번호 22의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [94] 상기 Lamp는 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 Lamp를 암호화하는 유전자는 서열번호 23 또는 24의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 Lamp가 제1 캐리어 단백질인 경우, 서열번호 3 또는 상기 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가질 수 있고, 제2 캐리어

단백질인 경우 서열번호 4 또는 상기 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [95] 상기 mODC는 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 mODC를 암호화하는 유전자는 서열번호 25 또는 26의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 mODC가 제1 캐리어 단백질인 경우, 서열번호 5 또는 상기 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가질 수 있고, 제2 캐리어 단백질인 경우 서열번호 6 또는 상기 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [96] 상기 cmc는 서열번호 7 또는 8의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 cmc를 암호화하는 유전자는 서열번호 27 또는 28의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 cmc가 제1 캐리어 단백질인 경우, 서열번호 7 또는 상기 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가질 수 있고, 제2 캐리어 단백질인 경우 서열번호 8 또는 상기 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [97] 상기 SORT1은 서열번호 9 또는 10의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 SORT1를 암호화하는 유전자는 서열번호 29 또는 30의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 SORT1이 제1 캐리어 단백질인 경우, 서열번호 9 또는 상기 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가질 수 있고, 제2 캐리어 단백질인 경우 서열번호 10 또는 상기 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [98] 상기 TRX (구체적으로, TRXwt)는 서열번호 11 또는 12의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 TRX (구체적으로, TRXwt)를 암호화하는 유전자는 서열번호 31 또는 32의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상,

95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 TRX (구체적으로, TRXwt)가 제1 캐리어 단백질인 경우, 서열번호 11 또는 상기 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가질 수 있고, 제2 캐리어 단백질인 경우 서열번호 12 또는 상기 상동성을 가지는 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 TRXwt는 TRX의 wild type, 변이가 없는 자연으로부터 획득 가능한 TRX를 의미한다.

- [99] 상기 PSBD는 서열번호 13의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 PSBD를 암호화하는 유전자는 서열번호 33의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [100] 상기 TRXwt-UbR는 서열번호 14의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 TRXwt-UbR를 암호화하는 유전자는 서열번호 34의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [101] 상기 TRXwt-Lamp는 서열번호 15의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 TRXwt-Lamp를 암호화하는 유전자는 서열번호 35의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [102] 상기 TRXwt-mODC는 서열번호 16의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 TRXwt-mODC를 암호화하는 유전자는 서열번호 36의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [103] 상기 TRXwt-cmyc는 서열번호 17의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 TRXwt-cmyc를 암호화하는 유전자는 서열번호 37의

염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [104] 상기 TRXwt-SORT1는 서열번호 18의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 TRXwt-SORT1를 암호화하는 유전자는 서열번호 38의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [105] 상기 SORT1 w/ TM는 서열번호 19의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 SORT1 w/ TM를 암호화하는 유전자는 서열번호 39의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [106] 상기 Lamp w/ TM는 서열번호 20의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 Lamp w/ TM를 암호화하는 유전자는 서열번호 40의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [107] 상기 TRXmt는 서열번호 145의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 TRXmt를 암호화하는 유전자는 서열번호 146의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [108] 상기 TRXmt는 TRX 아미노산 서열 (구체적으로, 서열번호 11의 아미노산 서열)의 N-말단으로부터 32번째, 35번째, 62번째, 69번째 및 73번째 위치에 해당하는 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산이 세린 (Serine; S)으로 치환된 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 치환은 시스테인 (Cysteine; C)이 세린으로 치환되는 것일 수 있다.
- [109] 본 명세서에서 제공되는 단백질 또는 폴리펩타이드는 천연에서 분리 및/또는 정제되거나, 재조합적 또는 화학적으로 합성된 것일 수 있다. 본 명세서에서

제공되는 단백질 또는 폴리펩타이드의 아미노산 서열이 N-말단으로부터 첫 번째 아미노산 잔기로서 메티오닌 (Met, M)을 포함하는 경우, 상기 단백질 또는 폴리펩타이드가 재조합적으로 생산된 것일 수 있고, 상기 N-말단으로부터 첫 번째 아미노산 위치의 메티오닌은 개시코돈에 의하여 코딩된 것일 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 제공되는 단백질 또는 폴리펩타이드의 아미노산 서열이 N-말단에 재조합적 생산에 의한 메티오닌을 포함하는 경우, 상기 단백질 또는 폴리펩타이드가 다른 방법 (예컨대, 화학적 합성 또는 천연에서 분리)으로 얻어지거나 컨주게이트 내에서 N 말단에 위치하지 않는 경우에는, 상기 재조합적 생산에 의한 N-말단 첫 번째 위치의 메티오닌을 제외한 두 번째 아미노산 잔기로부터 시작되는 아미노산 서열을 포함하는 것으로 해석될 수 있다.

- [110] 상기 제1 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA는 항원 단백질의 mRNA 5' 말단 (항원 단백질의 N 말단에 대응)에 연결되는 것으로, 상기 제1 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA는 5' 말단에 메티오닌 (Met, M)을 암호화하는 염기서열이 추가되어 연결되는 것일 수 있고, 예컨대, "atg" 서열이 추가되어 연결될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [111]
- [112] 항원 단백질
- [113] 본 명세서에서 제공하는 항원 단백질의 mRNA;
- [114] 상기 항원 단백질의 mRNA 5' 말단에 연결된 제1 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA; 및
- [115] 상기 항원 단백질의 mRNA 3' 말단에 연결된 제2 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA를 포함하는, 컨주게이트에서 상기 항원 단백질은 T 세포 에피토프를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 항원 단백질은 MHC 클래스 I 및/또는 II 결합 모티프를 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 항원 단백질은 MHC 클래스 II 결합 모티프를 포함하며 MHC 클래스 II 분자에 의해 항원제시세포의 표면에 제시될 수 있는 펩티드 서열인 CD4+ T 세포 에피토프를 포함할 수 있다. 상기 항원 단백질은 MHC 클래스 I 결합 모티프를 포함하며 MHC 클래스 I 분자에 의해 세포 표면에 제시될 수 있는 펩티드 서열인 CD8+ T 세포 에피토프를 포함할 수 있다. 상기 항원 단백질은 또한 CD4+ T 세포 에피토프 및 CD8+ T 세포 에피토프 둘 다를 포함할 수 있다.
- [116] 본 명세서에서 "MHC (major histocompatibility complex)" 또는 "구조적합성복합체"는 면역 세포가 자기, 비자기 분자를 구분할 수 있도록 항원 조각을 면역 세포에 제공하는 역할을 하는 단백질로서, MHC 클래스 I 과 MHC 클래스 II의 두 종류가 있으며, MHC 클래스 I은 핵이 있는 모든 세포에 있는 반면, MHC 클래스 II는 항원제시세포에서 발견된다. MHC 클래스 I 분자는 CD8+ 세포독성 T 세포와 상호작용을 하며 장기이식의 거부반응이나 감염된 세포를 파괴하는데 중요한 역할을 한다. MHC 클래스 II 분자는 CD4+ 보조 T

세포와 상호작용을 통해 비자기 항원을 인지하여 세포성 면역을 야기하는데 중요한 역할을 한다.

- [117] 일반적으로, 후천적 (adaptive) 면역 반응에서, 항원이 체내에 들어오면 항원제시세포가 이를 섭취하여 짧은 펩티드 단편으로 분해시키고, 펩티드는 세포 내에서 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 분자와 결합하여 세포 표면으로 운반될 수 있다. 이와 같이 항원의 펩티드가 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II에 결합하여 항원제시세포의 세포 표면에 제시되면, T 세포가 T 세포 수용체 (TCR)를 통해 이를 인식하여 활성화되고 면역 반응을 시작하게 된다. 이러한 측면에서, 본원 항원 단백질은 T 세포의 에피토프에 해당할 수 있다.
- [118] 상기 항원 단백질 (예컨대, T 세포 에피토프)은 종양 항원, 감염원의 항원, 자가 항원 또는 알레르기 유발 항원에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 항원 단백질 (예컨대, T 세포 에피토프)은 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 분자에 결합하는 것으로 예측되거나 알려진 종양 항원, 감염원의 항원, 자가 항원 또는 알레르기 유발 항원의 일부분을 포함할 수 있다. 상기 항원들은 CD8+ 또는 CD4+ T 세포 에피토프일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [119] 상기 항원 단백질 (예컨대, T 세포 에피토프)은 대상체에서 면역 반응, 예컨대 T 세포 또는 B 세포 반응을 유도할 수 있는 천연 또는 비천연 아미노산 서열, 번역 후 변형을 갖는 아미노산, 또는 펩티드 모방체를 포함할 수 있다. 예컨대, 항원 단백질 (예컨대, T 세포 에피토프)은 약 5 내지 약 100개, 또는 약 5 내지 약 50개의 아미노산일 수 있거나, 약 7 내지 35개의 아미노산, 예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35개의 아미노산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [120] 본 명세서에서 "종양 항원(tumor antigen)"은 "암 항원(cancer antigen)"과 상호교환적으로 사용될 수 있으며, 종양(암)에서 발현하는 항원으로서 면역 반응을 일으키는 분자를 말한다. 이러한 면역 반응은 항체 생성, 또는 특정 면역학적-적격 세포의 활성화, 또는 둘 모두를 수반할 수 있다.
- [121] 상기 종양 항원은 종양을 가진 유기체, 사멸되거나 비활성화된 전체 종양 세포, 또는 용해질로부터 유래될 수 있으며, 종양에서 유래한 임의의 항원을 포함한다. 용해질은 세포의 정상 구조의 분열을 야기시키는 과정의 적용으로부터 발생하는 물질을 말한다. 또한, 종양 항원은 종양 세포에 포함되고 정상 세포에서와는 상이하게 발현되는, 항원 특성을 지니는 임의의 단백질 또는 기타 물질을 포함한다.
- [122] 상기 종양 항원은 종양-관련 항원 (Tumor-associated antigen; TAA), 종양-특이적 항원 (Tumor-specific antigen; TSA) 또는 종양유래 신생항원 (neoantigen)을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [123] 상기 종양-관련 항원(TAA)은 정상 세포보다 암 세포에서 많이 나타나거나 정상 세포와 다른 분화단계에서 나타나는 항원으로, 정상 세포에서도 미량

존재하는 종양 공유 항원(tumor shared antigen)이다. 따라서 이를 이용한 면역반응은 자기 세포의 손상을 방지하기 위한 면역억제 기전인 자가관용에 의해 무산될 가능성이 높고 혹은 반대로 자가면역으로 인해 원치 않는 장기가 공격받을 수 있다.

- [124] 상기 종양-관련 항원 (TAA)은 mTrp2, CT (Cancer-testis) 항원, EGFR, Ova, Melan-A, PSMA(Prostate Specific Membrane Antigen), 서바이빈(Survivin), ADAbp (adenosine deaminase-binding protein), 사이클로필린 b (cyclophilin b), gp100, CRC (Colorectal associated antigen)-C017-1 A/GA733, CEA (carcinoembryonic antigen), CAP-1, CAP-2, etv6, AML1, PSA (Prostate Specific Antigen), PSA-1, PSA-2, PSA-3, MAGE (흑색종 항원 E) (예컨대, MAGE-A, MAGE-A3 등), GAGE (G 항원), BAGE (B 흑색종 항원), RAGE (신장 종양 항원), LAGE (L 항원), NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, p53, 티로시나아제, Muc1(뮤신1), HER2/neu, p21ras, N-RAS, K-RAS, RCAS1, α -페토프로테인, E-카드헤린, α -카테닌, β -카테닌, γ -카테닌, p120ctn, PRAME, NY-ESO-1, TRP2, 맘마글로빈-A(Mammaglobin-A), 메탈로판스티뮬린-1(metallopanstimulin-1, MPS-1), 시토크롬 P450 이소형 (isoform) 1B1, 90K/Mac-2 결합 단백질, Ep-CAM (MK-1), HSP-70, hTERT (TRT), LEA, TAGE-1, 5T4, gp70, SCP-1, cmyc, 사이클린 B1, MDM2, p62, Koc, IMP1, TA90, OA1, CT-7, HOM-MEL-40/SSX-2, SSX-1, SSX-4, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HDAC5, MBD2, TRIP4, NY-CO-45, KNSL6, HIP1R, Seb4D, KIAA1416, IMP1, 90K/Mac-2 결합 단백질, MDM2, 또는 LMNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [125] 상기 종양-특이적 항원(Tumor-specific antigen; TSA)은 암 세포에만 특이적으로 존재하는 항원을 의미하고, 구체적으로, M12, M20, M21, M30 또는 M44일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 특히, 암 환자에서 종양이 증식할 때 암 세포 특이적인 유전자 돌연변이가 발생하여 T 세포를 자극할 수 있는 새로운 항원 에피토프가 생성되는데 이를 신생항원 (neoantigen)이라고 한다. 즉, 신생항원 (neoantigen)은 암세포 특이적인 유전자 돌연변이를 포함할 수 있고, 정상 세포에서도 미량 발현되는 종양 공유 항원과는 달리 암 세포에서만 선별적으로 발현되기 때문에 자가면역체계에 의해 비-자기 외부 에피토프 (non-self foreign epitope)로 인식되어 강한 항암 면역활성을 유발한다.
- [126] 변이가 일어난 DNA를 통해 생성된 펩타이드가 세포 표면의 MHC에 전시되면 T 세포의 수용체(TCR)가 이를 인식하는데, 정상 세포나 조직에서는 돌연변이가 발생하지 않기 때문에 신생항원-특이적 T 세포는 자가관용이나 자가면역 문제에서 자유롭다. 이러한 장점 때문에 신생항원은 T 세포 기반의 암 면역치료에 이상적인 타겟으로 여겨지고 있다.
- [127] 신생항원이 발생하는 원인으로서는 DNA를 이루는 뉴클레오티드가 하나 또는 그 이상이 부가 또는 결실됨으로써 유전 암호의 해독이 어긋나는 프레임-시프트(frame-shift deletion or insertion), 하나의 뉴클레오티드가 다른

것으로 치환됨으로써 발생하는 점 돌연변이(point mutation), 그 외 미스센스 돌연변이 (Missense mutation), 스플라이스 부위(splice-site) 돌연변이, 리드쓰루(read-through) 돌연변이 또는 유전자 융합(gene-fusion) 돌연변이 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [128] 신생항원은 개별 암 환자의 특정 암세포 유전체 분석을 통해 예측되며, 일례로, 환자의 종양에서 암세포를 얻어 DNA를 추출한 뒤 염기서열을 분석하고, 이를 정상 세포의 염기서열과 비교 분석해 변이가 발생한 부분을 선별한 후, 변이가 발생한 여러 부분의 염기 서열 가운데 T 세포를 자극하는 신생항원을 동정할 수 있다. 여기에는, 차세대 염기서열 분석법(Next generation sequencing, NGS), 전체 엑솜 시퀀싱(whole-exome sequencing, WES) 또는 RNA 시퀀싱(RNA sequencing)과 같은 빅데이터의 처리, MHC 결합 예측 컴퓨터프로그램, 또는 신생항원 예측을 위한 인공지능(artificial intelligence, AI) 등이 활용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 환자마다 변이 형태가 공유되지 않기 때문에 신생항원은 개인 맞춤형 항암 백신(personalized cancer vaccine)으로 제작 가능하다.
- [129] 상기 종양유래 신생항원(neoantigen)은 암 세포에 특이적으로 발현되는 돌연변이를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [130] 상기 종양 항원은 서열번호 51, 53, 55, 57 또는 59의 아미노산 서열 또는 상기 아미노산 서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 종양 항원을 암호화하는 유전자는 서열번호 52, 54, 56, 58 또는 60의 염기서열 또는 상기 염기서열과 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [131] 상기 감염원의 항원은 바이러스, 박테리아, 기생충, 또는 진균에서 유래한 항원인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [132] 상기 바이러스 유래 항원은 수두 바이러스, 천연두 바이러스, 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스(Marburg virus), 탕기열 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스(parainfluenza virus), 호흡기 세포 융합 바이러스, 홍역 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 인유두종 바이러스(human papillomavirus), 수두대상포진 바이러스(varicella-zoster virus), 단순포진 바이러스, 거대세포바이러스(cytomegalovirus), 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스, JC 바이러스, 랍도바이러스(rhabdovirus), 로타바이러스(rotavirus), 리노바이러스(rhinovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 유두종바이러스, 파보바이러스(parvovirus), 피코르나바이러스(picornavirus), 소아마비바이러스(poliovirus), 유행성 이하선염(mumps) 유발 바이러스, 광견병(rabies) 유발 바이러스, 레오바이러스(reovirus), 풍진바이러스(rubella virus), 토가바이러스(togavirus), 오르토믹소바이러스(orthomyxovirus), 레트로바이러스(retrovirus),

헤파드나바이러스 (hepadnavirus), 콕사키바이러스 (coxsackievirus), 마 뇌염 바이러스 (equine encephalitis virus), 일본 뇌염 바이러스, 황열 바이러스 (yellow fever virus), 리프트 계곡 열 바이러스 (Rift Valley fever virus), A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스 또는 E형 간염 바이러스 유래 항원일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [133] 박테리아 유래 항원은 보렐리아 종 (*Borrelia species*), 탄저균 (*Bacillus anthracis*), 부르그도르페리 (*burgdorferi*), 백일해균 (*Bordetella pertussis*), 캄필로박터 제주니 (*Camphylobacter jejuni*), 클라미디아 종 (*Chlamydia species*), 클라미디아 시타시 (*Chlamydial psittaci*), 클라미디아 트라코마티스 (*Chlamydial trachomatis*), 클로스트리듐 종 (*Clostridium species*), 파상풍균 (*Clostridium tetani*), 클로스트리듐 바툴리눔 (*Clostridium botulinum*), 클로스트리듐 퍼프린젠스 (*Clostridium perfringens*), 코리네박테리움 디프테리아 (*Corynebacterium diphtheriae*), 콕시엘라 종 (*Coxiella species*), 장구균 종 (*Enterococcus species*), 엘리카 종 (*Erichia species*), 대장균 (*Escherichia coli*), 야토균 (*Francisella tularensis*), 헤모필루스 종 (*Haemophilus species*), 헤모필루스 인플루엔자 (*Haemophilus influenzae*), 헤모필루스 파라인플루엔자 (*Haemophilus parainfluenzae*), 유산균 종 (*Lactobacillus species*), 레지오넬라 종 (*Legionella species*), 레지오넬라 병 (*Legionella pneumophila*), 랩토스피라 인테로간스 (*Leptospiriosis interrogans*), 리스테리아 종 (*Listeria species*), 리스테리아모노사이토제네스 (*Listeria monocytogenes*), 미코박테리움 종 (*Mycobacterium species*), 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*), 나병균 (*Mycobacterium leprae*), 미코플라즈마 종 (*Mycoplasma species*), 미코플라즈마 폐렴 (*Mycoplasma pneumoniae*), 나이세리아 종 (*Neisseria species*), 수막염 (*Neisseria meningitidis*), 임균 (*Neisseria gonorrhoeae*), 폐렴균 종 (*Pneumococcus species*), 슈도모나스 종 (*Pseudomonas species*), 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 종 (*Salmonella species*), 장티푸스 균 (*Salmonella typhi*), 살모넬라 엔테리카 (*Salmonella enterica*), 리케차 종 (*Rickettsia species*), 리케차 리케츠시 (*Rickettsia rickettsii*), 리케차 티피 (*Rickettsia typhi*), 시겔라 종 (*Shigella species*), 포도상구균 종 (*Staphylococcus species*), 황색 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*), 연쇄상구균 종 (*Streptococcus species*), 연쇄상구균 폐렴 (*Streptococcus pneumoniae*), 농화성 연쇄상구균 (*Streptococcus pyogenes*), 골저원성 연쇄상구균 (*Streptococcus mutans*), 트레포네마 종 (*Treponema species*), 매독 트레포네마 (*Treponema pallidum*), 비브리오 시피시스 (*Vibrio species*), 비브리오 콜레라 (*Vibrio cholerae*), 또는 예르시니아 페스트 (*Yersinia pestis*) 유래 항원일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [134] 진균 유래 항원은 칸디다 (*Candida*) 종, 크립토코쿠스 (*Cryptococcus*) 종, 코시디오이테스 (*Coccidioides*) 종, 히스토플라즈마 (*Histoplasma*) 종 및 아스퍼길러스 (*Aspergillus*) 종으로부터 선택된 진균류 유래 항원일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [135] 기생충 유래 항원은 플라스모디움 (Plasmodium), 트립파노솜 (Trypanosome), 스킴스토솜 (Schistosoma) 또는 레이쉬마니아 (Leishmania) 유래 항원일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [136] 상기 자가항원은 자가면역을 유발하는 것으로 공지되어 있거나 의심되는 항원일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [137] 상기 알레르기 유발 항원 (알레르겐)은 알레르기를 유발하는 것으로 공지되어 있거나 또는 의심되는 항원일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [138]
- [139] 컨쥬게이트의 면역화 용도
- [140] 다른 예는 상기 컨쥬게이트를 포함하는 면역화용 조성물 및/또는 백신 조성물을 제공한다.
- [141] 상기 조성물은 암, 감염성 질환, 자가면역질환 및/또는 알레르기성 질환의 예방, 개선 및/또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [142] 본 명세서에서 "면역화용 조성물"은 면역 반응을 유도할 수 있는 임의의 조성물을 의미하고, "백신"은 면역 반응을 유도하여 질환 또는 감염의 위험을 감소 또는 예방하거나, 기존의 질환 또는 감염을 개선 또는 치료하기 위한 면역화용 조성물을 말한다. 상기 면역화용 조성물은 암, 감염성 질환, 자가면역질환 및/또는 알레르기성 질환에 대한 면역화용 조성물일 수 있다.
- [143] 구체적으로, 상기 면역화용 조성물은 상기 항원에 대한 항체 생성을 통해 면역 반응을 유도할 수 있는 조성물을 의미할 수 있다.
- [144] 상기 조성물은 면역 반응을 유발하기 위하여 본 명세서에서 제공하는 컨쥬게이트를 포함하고 피검체에 투여될 수 있는 형태의 제형일 수 있다. 상기 조성물은 질환을 예방하거나 개선시키거나 치료하기 위해 편리하게 사용될 수 있다. 피검체 또는 숙주로 도입된 후, 조성물은 면역 반응을 유발할 수 있으며, 바람직하게는 T-세포 매개성 면역반응을 유발할 수 있다.
- [145] 상기 백신은 종양 항원, 예를 들어 환자종양 분석에서 얻어진 종양항원 서열, 특히 신생항원 서열 (neoantigen sequence)을 포함하는 항암 백신일 수 있으며, 이에 의해 환자맞춤형 항암 T 세포의 증식 및 활성화를 최대한으로 촉발하여 항암 면역 효과를 증대시킬 수 있다.
- [146] 상기 조성물은 또한 백신의 유효성을 증강시키는 추가의 면역보강제 (adjuvant)를 포함할 수 있다. 적합한 면역보강제는 (1) 알루미늄염 (명반), 예를 들어 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 황산알루미늄 등; (2) 수중유 에멀전 제제 (뮤라밀 랩티드 또는 세균 세포벽 성분과 같은 특정 면역자극제를 포함하거나 포함하지 않음), 예를 들어 (a) 마이크론 이하의 입자로 제제화된 5% 스쿠알렌, 0.5% 트윈 80 및 0.5% 스펠 85 (필수적이지는 않지만, 선택적으로 다양한 양의 N-아세틸뮤라밀-L-알라닌-D-이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1',2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민(MTP-PE)을 포함함)를 포함하는 MF59 (WO90/14837), (b) 마이크론 이하의 입자로 마이크로유체화되거나 큰

입자 크기의 에멀전을 생성하도록 진탕된, 10% 스쿠알렌, 0.4% 트윈 80, 5% 플루로닉-블록화 중합체 및 N-아세틸-뮤라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP)을 포함하는 SAF, 및 (c) 모노포스포릴리피드 A (MPL), 트레할로오스 디마이콜레이트 (TDM), 및 세포벽 골격(CWS)으로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 세균 세포벽 성분, 2% 스쿠알렌, 및 0.2% 트윈 80을 포함하는 RibiTM 면역보강제 시스템 (RAS); (3) 사포닌 면역보강제; (4) 프로인트의 완전 면역보강제(CFA) 및 불완전 면역보강제 (IFA); (5) 사이토카인, 예를 들어 인터루킨 (예를 들어, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 등), 인터페론 (예를 들어, 감마 인터페론), 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF), 종양 괴사 인자 (TNF) 등; (6) 세균의 ADP-리보실화 독소, 예를 들어 콜레라 독소 (CT), 백일해 독소 (PT), 또는 대장균 (E. coli)의 열에 불안정한 독소(LT), 특히 LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129의 탈독소화된 돌연변이체 (WO93/13302 및 WO92/19265); 및 (7) 백신의 유효성을 증강시키는 면역자극제로서 작용하는 기타 물질을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [147] 상기 조성물은 필요에 따라서 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제를 통상적으로 사용되는 양으로 추가로 포함할 수 있다.
- [148] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [149] 상기 컨쥬게이트 및/또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물은 당업자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [150] 예컨대, 상기 조성물은 현탁되거나 용해된 통상적인 염수 또는 완충된 수용액 배지를 포함할 수 있다. 예를 들어, 통상적으로 희석제, 예를 들어 물, 염수, 글리세롤, 에탄올 등을 포함할 수 있으며, 보조 물질, 예를 들어 습윤제, 유화제, pH 완충제 등이 조성물 중에 존재할 수 있다.
- [151] 주사용으로 적합한 형태는 멸균 주사용액 또는 분산액의 즉석 제조용 멸균 수성용액 (수용성) 또는 분산액 및 멸균분말을 포함한다. 이들은 제조 조건하에서 안정해야 하고, 세균 또는 진균과 같은 미생물의 오염에 대항하여 보존되어야 한다. 미생물의 오염은 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등을 사용하여 예방할 수 있다. 많은 경우에서, 등장화제, 예를 들어 당 또는 염화나트륨을 포함하는 것이

바람직하다. 주사 조성물의 장시간 흡수는 흡수를 지연시키는 약제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 또는 젤라틴을 조성물 중에 사용함으로써 가능할 수 있다.

- [152] 전술한 용매 중에 필요량의 컨쥬게이트와 앞에서 열거한 다양한 기타 성분을 결합시키고, 필요에 따라 컨쥬게이트 및/또는 열에 민감한 면역보강제 사이토카인 등을 제외한 나머지 성분들, 예를 들면 PBS와 같은 완충용액을 여과 멸균함으로써 멸균 주사용액을 제조한다. 일반적으로, 기본적인 분산배지 및 전술한 것으로부터 필요한 기타 성분을 포함하는 멸균 비히클 내로 다양한 멸균화 활성성분을 포함시킴으로써 분산액을 제조한다. 멸균 주사용액의 제조용 멸균분말의 경우, 바람직한 제조방법은 진공건조 및 동결건조 기법이다. 이러한 기법에 의해 활성성분, 및 전술한 이의 멸균-여과된 용액으로부터 임의의 목적하는 성분의 분말을 얻는다.
- [153] 상기 컨쥬게이트 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여 대상 환자는 포유류, 예컨대 인간, 원숭이 등을 포함하는 영장류, 래트, 마우스 등을 포함하는 설치류 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [154] 본 발명의 또 다른 측면은 인간, 예를 들어 암 환자에서 항원에 대한 면역반응을 일으키거나, 유도하거나, 또는 촉진하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 상기 조성물 또는 컨쥬게이트의 유효량을 환자, 예를 들어 암 환자에 투여하는 것을 포함한다.
- [155] 본 명세서에서 "면역반응"은 세포성 또는 사이토카인 중개를 통하여 직접 또는 간접적으로 자극의 결과로서, 면역 체계의 세포, 예컨대 B 세포, T 세포 또는 단핵구의 활성화에 있어서의 변화를 말한다. 상기 면역반응은 특이적 (T 세포 및/또는 B 세포) 및/또는 비특이적 면역반응일 수 있다.
- [156] 본 발명의 작용을 어떤 식으로든 제한하지 않으면서, 본 발명에 따라 컨쥬게이트를 전달하는 것은 면역반응을 유도하는데, 특히 T 세포 반응, 예를 들어 항원에 대한 CD4+ T 세포 반응 또는 CD8+ T 세포 반응을 유도하는데 특히 유용하다. CD4+ T 세포 반응과 CD8+ T 세포 반응은 체액성 반응 또는 기타 특이적이거나 비특이적인 면역반응과 함께 또는 독립적으로 일어날 수 있다.
- [157] 본 발명의 또 다른 측면은 질병 상태의 치료 및/또는 예방에 관련하여 상기 컨쥬게이트를 사용하는 것에 관계된다. 본 발명의 방법에 따라 치료될 수 있는 질병의 예로는 각종 암 질환, 감염성 질환, 자가면역질환 및 알레르기성 질환을 포함한다.
- [158] 상기 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있고, 구체적으로, 유방암, 폐암, 전립선암, 난소암, 뇌암, 간암, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁암, 결장암, 대장암, 결장직장암, 직장암, 신장암, 콩팥모세포종, 피부암, 경구 편평 상피암, 표피암, 비인두암, 두경부암, 골암, 식도암, 방광암, 림프관암(예를들어, 호지킨 림프종 또는 비-호지킨 림프종), 위암, 췌장암, 고환암, 갑상선암, 갑상샘소포암, 흑색종, 골수종, 다발성 골수종, 중피종, 골육종, 골수이형성 증후군, 간엽 기원의 종양,

연조직 육종, 지방육종, 위장 기질 육종, 악성 말초 신경집 종양 (MPNST), 유잉 육종, 평활근육종, 간엽 연골육종, 림포육종, 섬유육종, 횡문근육종, 기형암종, 신경모세포종, 수모 세포종, 신경교종, 피부의 양성 종양, 또는 백혈병일 수 있다. 폐암은, 예를 들어 소세포폐암종(SCLC) 또는 비-소세포폐암종(NSCLC)일 수 있다. 백혈병은, 예를 들어 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 급성 림프구성 백혈병(ALL) 또는 만성 림프구성 백혈병(CLL)일 수 있다. 치료되는 피검체는 2차적인 항-과다증식 요법을 받고 있는 피검체일 수 있다. 예를 들어, 2차적인 항-과다증식 요법은 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 광선요법, 냉동요법, 독소요법, 호르몬요법, 또는 외과수술일 수 있다.

[159] 다른 예는 상기 컨주게이트 및/또는 상기 조성물을 면역화를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 면역화 방법을 제공하고, 구체적으로, 암에 대한 면역화를 필요로 하는 개체에 투여하여 암에 대한 면역화 방법을 제공한다.

[160] 다른 예는 상기 조성물을 이용하여 면역반응을 증강시킴으로써 질환, 예를 들어 암, 감염성 질환, 자가면역질환, 또는 알레르기성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 여기서, 상기 조성물의 투여는, 질병 상태의 발병 또는 진행을 저해하거나, 중지시키거나, 지연시키거나, 예방하는 면역반응을 일으키거나, 유도하거나 또 다르게는 촉진한다.

[161] 상기 조성물의 직접 전달은 일반적으로 전신적, 피하, 피내, 복강내, 혈관내 (정맥내), 근육내 또는 국소 전달될 수 있고, 또는 조직의 간극으로 전달된다. 조성물은 또한 병변으로 투여될 수 있다. 투여 요법은 단일 용량 또는 다중 용량 스케줄일 수 있다.

[162] 본 명세서에서 "유효량"은 인간을 비롯한 개체에게 투여하였을 때, 원하는 결과를 달성하는데 충분한 양, 예를 들어 암을 치료 또는 예방하는데 효과적인 양을 의미한다. 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중 등의 인자들에 따라 달라질 수 있다. 투여량 또는 치료 용법은 당업자들이 이해하는 바와 같이 최적의 치료 반응을 제공하도록 조정할 수 있다.

[163] 치료학적 유효량을 이용한 개체의 치료 용법은 1회 투여로 구성되거나, 또는 다른 예로, 일련의 적용을 포함할 수 있다. 치료기의 기간은 질환의 중증도, 개체의 연령, 백신의 농도, 백신에 대한 환자의 반응성 또는 이들의 조합과 같은 다양한 인자에 따라 결정된다. 또한, 치료에 사용되는 백신의 유효 투여량은 개별 치료 용법의 코스 동안 높이거나 낮출 수 있는 것으로 이해될 것이다. 투여량에 변화가 생길 수 있으며, 당해 기술 분야에 공지된 표준 진단 분석을 통해 명확해질 수 있다. 본 발명의 백신, 예를 들어 암 백신은, 통상적인 항암제, 방사선치료, 호르몬 치료, 바이오테라피 및/또는 외과적 종양 절제를 이용한 치료 전에, 치료 중에 또는 치료 후에, 투여할 수 있다.

발명의 효과

- [164] 본 발명은 항원 단백질의 mRNA, 상기 항원 단백질의 mRNA 5' 말단 및/또는 3' 말단에 연결된 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA를 포함하는 컨쥬게이트 및 이를 포함하는 면역화용 조성물 및/또는 백신 조성물에 관한 것으로, 상기 항원 단백질의 발현을 안정적으로 높이도록 하는 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

- [165] 도 1 및 2는 각각 캐리어 단백질 스크리닝에 사용할 mRNA 제작을 위해 사용되는 pUC57-T7-MP-A118 및 pEGFP의 벡터맵을 나타내었다.
- [166] 도 3은 캐리어 단백질 스크리닝에 사용할 mRNA 제작을 위해 사용되는 캐리어 단백질 벡터의 모식도를 나타내었다.
- [167] 도 4는 pUC57-T7-CP12G 캐리어 단백질 벡터의 벡터맵을 나타내었다.
- [168] 도 5는 캐리어 단백질 1차 스크리닝을 위해 Proteasome Inhibitor 및 Lysosomal inhibitor 처리 시 CD4/CD8 항원이 각각 processing/presentation pathway로의 전달 가능성을 확인한 결과를 나타내었다.
- [169] 도 6은 SORT1 및 Lamp의 cytosolic domain에 transmembrane domain이 추가된 경우 세포 발현 모식도를 나타내었다.
- [170] 도 7은 캐리어 단백질 2차 스크리닝을 위해 Proteasome Inhibitor 및 Lysosomal inhibitor 처리 시 CD4/CD8 항원이 각각 processing/presentation pathway로의 전달 가능성을 확인한 결과를 나타내었다.
- [171] 도 8은 캐리어 단백질 및 에피토프가 포함된 벡터 제작을 위해 사용된 벡터의 모식도를 나타내었다.
- [172] 도 9는 pUC57-T7-5epitopes의 벡터맵을 나타내었다.
- [173] 도 10은 캐리어 단백질 및 에피토프가 포함된 벡터 제작을 위해 사용된 pLRK33-empty 공벡터의 모식도를 나타내었다.
- [174] 도 11은 캐리어 단백질 및 에피토프가 포함된 벡터 제작 과정 중 에피토프, 캐리어 단백질 등을 포함하는 단편이 공벡터에 삽입되는 과정을 보여주는 모식도를 나타내었다.
- [175] 도 12는 pLRK33-hTrx_WT의 벡터맵을 나타내었다.
- [176] 도 13은 캐리어 단백질이 포함되지 않는 비교예 벡터를 제작하기 위해 사용된 pLRK33-hTrx_m 벡터의 벡터맵을 나타내었다.
- [177] 도 14는 K562 세포주에서 캐리어 단백질 포함 여부에 따른 mRNA 내 에피토프의 발현양을 확인한 결과를 나타내었다.
- [178] 도 15는 인간 수지상 세포에서 캐리어 단백질 포함 여부에 따른 mRNA 내 에피토프의 발현양을 확인한 결과를 나타내었다.
- [179] 도 16은 인간 수지상 세포에서 캐리어 단백질 포함 여부에 따른 에피토프에 대한 면역원성을 측정한 결과를 나타내었다.

발명의 실시를 위한 형태

- [180] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 제한되지 아니한다.
- [181]
- [182] 실시예 1. 캐리어 단백질 (carrier protein) 스크리닝
- [183] 실시예 1-1. 캐리어 단백질을 암호화하는 mRNA 제작
- [184] 캐리어 단백질 (carrier protein)을 암호화하는 mRNA에 의해 CD4/CD8 항원이 각각 적합하게 processing/presentation pathway로 전달되는지 여부를 확인을 통해 캐리어 단백질 1차 스크리닝을 진행하였다.
- [185] 구체적으로, in vitro transcription을 위해 pUC57 벡터 (Cosmogenetech)를 기반으로 GeneWiz 사에 필요한 벡터 제작을 의뢰하여 pUC57-T7-MP-A118를 제작하였고, 해당 벡터의 벡터맵을 도 1에 나타내었다.
- [186] 상기 제작된 벡터에 AscI (Enzynomics; R068M) 및 EcoRI (Enzynomics; R002M) 제한효소를 처리하고 Expin Gel SV (Gene all, Cat#102-102)로 정제하였다. 상기 정제 과정을 거쳐, 절단된 벡터 가닥 중 AscI site가 N 말단, EcoRI site가 C 말단에 위치하는 벡터 가닥에 대해, 하기 표 2의 조합으로 벡터의 N 말단 및 C 말단 각각에 캐리어 단백질을 위치하도록, 하기 표 2 조합에 따른 캐리어 단백질에 해당하는 하기 표 3의 T7 올리고뉴클레오타이드를 사용하고 Platinum™ SuperFi II Green PCR Master Mix (ThermoFisher; cat#: 12369050)를 이용하여 EZ-fusion HT Cloning kit (Enzynomics; Cat#: EZ015TL)를 통해 PCR을 수행하여 AscI site와 EcoRI site에 캐리어 단백질을 삽입하여, 하기 표 2의 pUC57-T7-CP01G 내지 pUC57-T7-CP50G 플라스미드를 제작하였고, 각 캐리어 단백질의 구체적인 준비과정을 하기 기재한다:
- [187] (i) mODC
- [188] C 말단에 삽입하기 위한 mODC를 하기 표 3의 oCmODC-BE1-F1, omODC-R2, omODC-F3, oCmODC-X1-R4 올리고뉴클레오타이드를 모두 섞은 후 PCR을 수행하여 제작하였고, C 말단에 사용하는 mODC를 상기 N 말단에 삽입하기 위해 제작된 mODC PCR product를 정제하고 하기 표 3의 oNmODC-A1-F1과 oNmODC-BE1-R2를 사용하여 PCR을 수행하여 제작하였다.
- [189] (ii) cmyc
- [190] N 말단에 삽입하기 위한 cmyc를 하기 표 3의 oNcmyc-A1-F1, oNcmyc-BE1-R2 올리고뉴클레오타이드를 모두 섞은 후 PCR을 수행하여 제작하였고, N 말단에 사용하는 cmyc를 상기 C 말단에 삽입하기 위해 제작된 cmyc PCR product를 정제하고 하기 표 3의 oCcmyc-BE1-F1과 oCcmyc-X1-R2를 사용하여 PCR을 수행하여 제작하였다.
- [191] (iii) Lamp
- [192] N 말단에 삽입하기 위한 Lamp를 하기 표 3의 oNli-A1-F1, oNli-BE1-R2 올리고뉴클레오타이드를 모두 섞은 후 PCR을 수행하여 제작하였고, N 말단에

사용하는 Lamp를 상기 C 말단에 삽입하기 위해 제작된 Lamp PCR product를 정제하고 하기 표 3의 oCli-BE1-F1과 oCli-X1-R2를 사용하여 PCR을 수행하여 제작하였다.

[193] (iv) SORT1

[194] C 말단에 삽입하기 위한 SORT1를 하기 표 3의 oCSORT-BE1-F1, oSORT-R2, oSORT-F3, oCSORT-X1-R4 올리고뉴클레오타이드를 모두 섞은 후 PCR을 수행하여 제작하였고, C 말단에 사용하는 SORT1를 상기 N 말단에 삽입하기 위해 제작된 SORT1 PCR product를 정제하고 하기 표 3의 oNSORT-A1-F1 및 oNSORT-BE1-R2를 사용하여 PCR을 수행하여 제작하였다.

[195] (v) TRX

[196] 하기 표 3의 oNhTRX-A1-F, oNhTRX-BE1-R, oTRXwt-1F, oTRXwt-2R, oTRXwt-3F, oTRXwt-4R, oTRXwt-5F, oTRXwt-6R, oTRXwt-3F1 올리고뉴클레오타이드를 모두 섞은 후 PCR을 수행하여 제작하였다.

[197] (vi) PSBD

[198] 하기 표 3의 oChPSBD-BE1-F, oChPSBD-X1-R 올리고뉴클레오타이드를 모두 섞은 후 PCR을 수행하여 제작하였다.

[199] (vii) Ub 및 UbR

[200] N 말단에 삽입되는 Ub의 가장 마지막 서열 알라닌 (A)이 아르기닌 (R)로 치환되면 잘 분해되는 특징이 있는 바, N 말단에 Ub를 삽입하는 경우 마지막 서열에 R이 되도록 하기 표 3의 oNUbR-BE1-R5 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 Ub를 삽입하였다 (UbR).

[201] 구체적으로, 하기 표 3의 oNUbR-A1-F1, oUbR-R2, oUbR-F3, oNUbR-BE1-R5를 사용하여 PCR을 수행하여, UbR을 제작하였고, UbR PCR product를 정제하고 하기 표 3의 oCub-BE1-F1과 oCub-X1-R2를 사용하여 PCR을 수행하여 하였습니다 Ub를 제작하여 삽입하였다.

[202] [표2]

플라스미드 종류	CP_N	CP_C
pUC57-T 7-CP01G	TRXmt (Thioredoxin)	PSBD (peripheral sub unit-binding domain)
pUC57-T 7-CP11G	UbR (ubiquitin A77R mutant)	mODC (mouse ornithine decarboxylase)
pUC57-T 7-CP12G	UbR	SORT1 (sortilin 1)
pUC57-T 7-CP13G	Lamp	mODC

pUC57-T 7-CP14G	Lamp	SORT1
pUC57-T 7-CP21G	UbR	cmcy
pUC57-T 7-CP22G	UbR	Lamp
pUC57-T 7-CP23G	mODC	SORT1
pUC57-T 7-CP24G	cmcy	mODC
pUC57-T 7-CP25G	cmcy	SORT1
pUC57-T 7-CP26G	Lamp	Ub (ubiquitin)
pUC57-T 7-CP27G	Lamp	cmcy
pUC57-T 7-CP28G	SORT1	mODC
pUC57-T 7-CP31G	mODC	Ub
pUC57-T 7-CP32G	mODC	cmcy
pUC57-T 7-CP33G	mODC	Lamp
pUC57-T 7-CP34G	cmcy	Ub
pUC57-T 7-CP35G	cmcy	Lamp
pUC57-T 7-CP36G	SORT1	Ub
pUC57-T 7-CP37G	SORT1	cmcy

pUC57-T 7-CP38G	SORT1	Lamp
pUC57-T 7-CP41G	TRXwt	cmcy
pUC57-T 7-CP42G	TRXwt	Lamp
pUC57-T 7-CP43G	TRXwt	mODC
pUC57-T 7-CP44G	TRXwt	SORT1
pUC57-T 7-CP45G	TRXwt	Ub
pUC57-T 7-CP46G	Cmyc	TRXwt
pUC57-T 7-CP47G	Lamp	TRXwt
pUC57-T 7-CP48G	mODC	TRXwt
pUC57-T 7-CP49G	SORT1	TRXwt
pUC57-T 7-CP50G	UbR	TRXwt
pUC57-T 7-CP112G	TRXwt-UbR	SORT1
pUC57-T 7-CP113G	TRXwt-Lamp	mODC
pUC57-T 7-CP123G	TRXwt-mODC	SORT1
pUC57-T 7-CP131G	TRXwt-mODC	Ub
pUC57-T 7-CP133G	TRXwt-mODC	Lamp

pUC57-T 7-CP134G	TRXwt-cmyc	Ub
pUC57-T 7-CP136G	TRXwt-SORT1	Ub
pUC57-T 7-CP138G	TRXwt-SORT1	Lamp
pUC57-T 7-CP201G	TRXwt	SORT1 w/ TM
pUC57-T 7-CP202G	Lamp w/ TM	TRXwt

[203] (상기 표 2에서 TRXwt는 TRX의 wild type, 변이가 없는 자연으로부터 획득 가능한 TRX를 의미하고, TRXmt는 서열번호 11의 TRX 아미노산 서열의 N-말단으로부터 32번째, 35번째, 62번째, 69번째 및 73번째 위치에 해당하는 시스테인 (Cysteine; C)이 세린 (Serine; S)으로 치환된 것을 의미한다)

[204] [표3]

종류	올리고뉴클레오타이드 명칭	서열(5'→3')	서열번호
Ub(R)	oNubR-A1-F1	caggcctccacaaccggcgcgccaccatgcagatcttcgtgaaa accctgaccggcaagaccatcacactggaagtggaaccagcgaca	67
	oUbR-R2	cggcgaagatcagtctctgctggtcaggaggatgccctctttgtc ctggatcttggccttcacgttctcgatggtgtcgtgggttc	68
	oUbR-F3	gagactgatcttcgccggcaagcagctggaagatggcagaaccc tgagcgactacaacatccagaaagagtctaccctgcacctggtgct	69
	oNubR-BE1-R5	tccaccagatcctccgcctc cgga accgcctcttcacctctcagt ctcagcaccaggtgcagggtta	70
	oCub-BE1-F1	ggcgggt tcggg aggcggaggatctggtggacagatcttcgtgaa aacc	71
	oCub-X1-R2	gcaagaaagcgagctctcgagtttatccacctctcagtct	72
mODC	oCmODC-BE1-F1	ggcgggt tcggg aggcggaggatctggtggactgatgaagcagat ccagagccacggcttcccacctga	73

	omODC-R2	ccggactcttgggcacagctcataggcagggtgccatcgtcctgtt ctccacctcaggtgggaagccgt	74
	omODC-F3	tgcccaagagtcggcatggatagacatcctgccgcctgtgccag cgccagaatcaatgttatgta	75
	oCmODC-X1-R4	gcaagaaagcagctctcgagtttacataacattgattctggcgct ggcacaggcggcaggatgtct	76
	oNmODC-A1-F1	caggcctccacaaccggcgccaccatgctgatgaagcag	77
	oNmODC-BE1-R2	tccaccagatcctccgcct ccgga accgccataacattgattct	78
cmyc	oNcmyc-A1-F1	caggcctccacaaccggcgccaccatgcacaggaaacccc t	79
	oNcmyc-BE1-R2	tccaccagatcctccgcct ccgga accgccctttccacgtgac	80
	oCmyc-BE1-F1	ggcgggt ccgga ggcggaggatctggtggacacaggaaaccc ctccaaccacaagcagcagcagcaggagaagaaca	81
	oCmyc-X1-R2	gcaagaaagcagctctcgagtttactttccacgtgacgacgtc gatctcttctcgtcctcttgttcttctcgtcgtcgtgc	82
Lamp	oNli-A1-F1	caggcctccacaaccggcgccaccatggacgaccagaggga cctgatcagcaacaacgagcagctgcccatgctcggcagaag	83
	oNli-BE1-R2	tccaccagatcctccgcct ccgga accgcctctgctacatttgcct caggagcggcaggccttctgccgagcatggg	84
	oCli-BE1-F1	ggcgggt ccgga ggcggaggatctggtggagacgaccagagg gac	85
	oCli-X1-R2	gcaagaaagcagctctcgagtttatctgctacatttgcct	86
	oLAMPwTM-1F	caggcctccacaaccggcgccaccatggacgaccagaggga cctgatcagcaacaacgagcagctgccca	87
	oLAMPwTM-2R	agcggcaggccttctgccgagcatgggcagctgctcgtt	88
	oLAMPwTM-3F	aggcctggcgctcctgagagcaaatgtagcagaggcgctctgtac accggctttagcatcctggtcacact	89
	oLAMPwTM-4R	tccaccagatcctccgcct ccgga accgccgtacagaaagtagg ctgtggtagcctgtccggccagcagcagtgtagcaggatgctaa	90
Sortilin (SORT1)	oCSORT-BE1-F1	ggcgggt ccgga ggcggaggatctggtggaaagaatacgtgtg cggcggcagatt	91
	oSORT-R2	agggcacgcacaccatcaacaccattggcctcggcgctgctgctgc aggacgctatatctgtgcaccaggaatctgccgccgca	92

	oSORT-F3	tggtgtcgtatgccctggataccgccagccacacaaacaagagcg gctaccacgacgacagcgacgaggatctgcttgagtaa	93
	oCSORT-X1-R4	gcaagaaagcgagctctcgagtttactcaagcagatcctcgctgct gtcgtcgtgtag	94
	oNSORT-A1-F1	caggcctccacaaccggcgccaccatgaagaatacgtgtgc	95
	oNSORT-BE1-R2	tccaccagatcctccgcct tcgga accgccctcaagcagatcctc	96
	oSORTwTM-1F	ggcggt tcgga ggcgaggatctggtggaagcgtgccaatcat cctggccatcgtggcctgatgctggttaca	97
	oSORTwTM-2R	cgctatatctgtgcaccaggaatctgccgccgacacgtatttctta acgatcagcacgccggcaaccactgtaaccagcatcaggccca	98
	oSORTwTM-3F	ctggtgcacagatatagcgtcctgcagcagcacgccgaggccaa tggtgttgatggtgtcgtatgccctggataccgccagccacacaaa	99
	oSORTwTM-4R	gcaagaaagcgagctctcgagtttactcaagcagatcctcgctgct gtcgtcgtgtagccgctcttgttgtgtggtggcggtat	100
TRX	oNhTRX-A1-F	caggcctccacaaccggcgccaccatggtgaagcagatcga g	101
	oNhTRX-BE1-R	tccaccagatcctccgcct tcgga accgccccaccagctcgttgat	102
	oTRXwt-1F	caggcctccacaaccggcgccaccatggtcaagcagatoga gagcaagaccgcctccaagaggcccttgatgccgctggcgata	103
	oTRXwt-2R	gcagggggcgccaagtggcggaataatccaccaccaccagc ttatcgccagcggtatc	104
	oTRXwt-3F	gcggcccctgcaagatgatcaagccattcttcacagcctgagcg agaagta	105
	oTRXwt-4R	cgcactcagaggccacatcctggcagtcgtccacgtccactcca ggaagatcacgttgctgtactctcgctcaggctgtggaagaat	106
	oTRXwt-5F	tggcctctgagtgcgaagtgaagtgcacccaccttcagttcttc aagaaaggccagaaaagtggcgagttcagcgcccaacaaa	107
	oTRXwt-6R	tctcgcgttctcctccgccagatccgccaactagttcgttgatgg tggcttcagcttctcttggcgccgctgaa	108
PSBD	oChPSBD-BE1-F	cacttggtgcggcccctgcaagatgatcaagccattcttcacagc ctgagcgagaagta	109
	oChPSBD-BE1-F	ggcggt tcgga ggcgaggatctggtggagtgtatgccatgcc t	110

	oChPSBD-X1-R	gcaagaaagcgagctctcgagttaagccagccaagcgtc	111
EGFP	oEGFP-BE1-F	ggcgggt tcgga ggcgaggatctggtggagtgagcaagggcgag	112
	oEGFP-BE1-R	tccaccagatcctccgcct tcgga accgccctgtacagctcgtc	113

- [205] (상기 표 3에서, 굵은 글씨로 표시된 "tcgga"는 BspEI site에 해당하여, 캐리어 단백질 삽입과 동시에 BspEI site가 삽입되었다)
- [206] 캐리어 단백질 삽입 후, BspEI (NEB, R0540S) 제한효소를 처리하고 Expin Gel SV (Gene all, Cat#102-102)로 정제하였다.
- [207] 그 이후, template으로 EGFP reporter가 포함되어 있는 pEGFP 벡터 (Clontech, cat.no. 6077-1, GenBankU76561.1)를 10 ng을 준비하여, 상기 표 3의 EGFP 올리고뉴클레오타이드 (oEGFP-BE1-F 및 oEGFP-BE1-R) 각각을 10 pmole 씩, 그리고 PlatinumTM SuperFi II Green PCR Master Mix (ThermoFisher; cat#: 12369050) 100 μ l를 준비하고, 이를 이용하여 PCR을 수행하였다.
- [208] PCR 수행 후 BspEI (NEB, R0540S) 제한효소를 처리하고, 상기 정제한 각 캐리어 단백질 조합을 발현할 수 있는 플라스미드에 서브 클로닝 (sub-cloning)하여, EGFP가 삽입된 캐리어 단백질 벡터를 얻었다.
- [209] 상기 pEGFP 벡터의 벡터맵을 도 2, 제작된 캐리어 단백질 벡터의 모식도를 도 3에, 예시적으로 제작된 pUC57-T7-CP12G 플라스미드의 벡터맵을 도 4에, 상기 N 말단 및 C 말단 각각에 삽입된 캐리어 단백질의 아미노산 및 염기 서열 정보를 각각 하기 표 4 및 5에 나타내었다.

[표4]

캐리어 단백질 종류	삽입 위치	서열 (5' -> 3')	서열 번호
UbR	N-term	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGGR	1
Ub	C-term	QIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGGR	2
Lamp	N-term	MDDQRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSR	3
	C-term	DDQRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSR	4
mODC	N-term	MLMKQIQSHGFPPEVEEQDDGTLPMSCAQESGMDRHPAACASARINVM	5
	C-term	LMKQIQSHGFPPEVEEQDDGTLPMSCAQESGMDRHPAACASARINVM	6

cmc	N-term	MHEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEK	7
	C-term	HEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEK	8
SORT1	N-term	MKKYVCGGRFLVHRYSVLQQHAEANGVDGVD ALDTASHTNKSGYHDDSDEDLLE	9
	C-term	KKYVCGGRFLVHRYSVLQQHAEANGVDGVDA LDTASHTNKSGYHDDSDEDLLE	10
TRXwt	N-term	MVKQIESKTAFQEALDAAGDKLVVVDIFSATWC GPCMKIKPFFHSLSEKYSNVIFLEVDVDDCQDV ASECEVKCMPTFQFFKKGQKVGEFSGANKEKL EATINELV	11
	C-term	VKQIESKTAFQEALDAAGDKLVVVDIFSATWCG PCKMIKPFFHSLSEKYSNVIFLEVDVDDCQDVA SECEVKCMPTFQFFKKGQKVGEFSGANKEKLE ATINELV	12
PSBD	C-term	VIAMPSVRKYAREKGVDIRLVQGTGKGGRVLK EDIDAWLA	13
TRXwt-UbR	N-term	MVKQIESKTAFQEALDAAGDKLVVVDIFSATWC GPCMKIKPFFHSLSEKYSNVIFLEVDVDDCQDV ASECEVKCMPTFQFFKKGQKVGEFSGANKEKL EATINELVGGSGGGGGSGGQIFVKTLTGKTITLEV EPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLE DGRTLSDYNIQKESTLHLVLRGR	14
TRXwt-Lamp	N-term	MVKQIESKTAFQEALDAAGDKLVVVDIFSATWC GPCMKIKPFFHSLSEKYSNVIFLEVDVDDCQDV ASECEVKCMPTFQFFKKGQKVGEFSGANKEKL EATINELVGGSGGGGGSGGDDQRDLISNNEQLPM LGRPGAPESKCSR	15
TRXwt-mODC	N-term	MVKQIESKTAFQEALDAAGDKLVVVDIFSATWC GPCMKIKPFFHSLSEKYSNVIFLEVDVDDCQDV ASECEVKCMPTFQFFKKGQKVGEFSGANKEKL EATINELVGGSGGGGGSGGLMKQIQSHGFPPEVE EQDDGTLPMSCAQESGMDRHPAACASARINVM	16
TRXwt-cmc	N-term	MVKQIESKTAFQEALDAAGDKLVVVDIFSATWC GPCMKIKPFFHSLSEKYSNVIFLEVDVDDCQDV ASECEVKCMPTFQFFKKGQKVGEFSGANKEKL	17

		EATINELVGGSGGGGSGGHEETPPTTSSDSEEEQ EDEEEIDVVSVEK	
TRXwt-SORT1	N-term	MVKQIESKTAFQEALDAAGDKLVVVD FSATWC GPCMKIKPFFHSLSEKYSNVIFLEVDVDDCQDV ASECEVKCMPTFQFFKKGQKVGEFSGANKEKL EATINELVGGSGGGGSGGKKYVCGGRFLVHRY SVLQQHAEANGVDGVDALDTASHTNKS GYHD DSDEDLLE	18
SORT1 w/ TM	C-term	SVPIILAIVGLMLVTVVAGVLIVKKYVCGGRFL VHRYSVLQQHAEANGVDGVDALDTASHTNKS GYHDDSDEDLLE	19
Lamp w/ TM	N-term	MDDQRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGAL YTGF SILVTL LLAGQATTAYFLY	20
TRXmt	N-term	MVKQIESKTAFQEALDAAGDKLVVVD FSATWS GPSMKIKPFFHSLSEKYSNVIFLEVDVDDSDQDVA SESEVKSMP TFQFFKKGQKVGEFSGANKEKLEA TINELV	145

[211] (상기 표 4에서 캐리어 단백질이 N-term에 삽입되는 경우, 각 단백질의 5' 말단에 atg 염기서열을 갖는 메티오닌 (M)이 추가되어 삽입되고, 상기 밑줄로 표시된 부분인 GS linker 서열에 해당한다)

[212] [표5]

캐리어 단백질 종류	삽입 위치	서열 (5' -> 3')	서열 번호
UbR	N-term	atgcagatcttcgtgaaaaccctgaccggcaagaccatcacactggaagtgg aaccagcgacaccatcgagaacgtgaaggccaagatccaggacaaaga gggcatccctcctgaccagcagagactgatcttcgccggcaagcagctgga agatggcagaaccctgagcgactacaacatccagaaagagtctaccctgca cctggtgctgagactgagaggtggaaga	21
Ub	C-term	cagatcttcgtgaaaaccctgaccggcaagaccatcacactggaagtggaa cccagcgacaccatcgagaacgtgaaggccaagatccaggacaaagagg gcatccctcctgaccagcagagactgatcttcgccggcaagcagctggaag atggcagaaccctgagcgactacaacatccagaaagagtctaccctgcacct ggtgctgagactgagaggtgga	22
Lamp	N-term	atggacgaccagaggacgtgatcagcaacaacgagcagctgccatgct cggcagaaggcctggcgctcctgagagcaaatgtagcaga	23

	C-term	gacgaccagagggacctgatcagcaacaacgagcagctgccccatgctcgg cagaaggcctggcgctcctgagagcaaatgtagcaga	24
mODC	N-term	atgctgatgaagcagatccagagccacggcttcccacctgaggtggaagaa caggacgatggcacccctgcctatgagctgtgcccaagagtcggcatggat agacatcctgccgcctgtgccagcgccagaatcaatgttatg	25
	C-term	ctgatgaagcagatccagagccacggcttcccacctgaggtggaagaacag gacgatggcacccctgcctatgagctgtgcccaagagtcggcatggataga catcctgccgcctgtgccagcgccagaatcaatgttatg	26
cmYC	N-term	atgcacgaggaaacccctccaaccacaagcagcgacagcgaggaagaac aaggagcagaggaagagatcgacgtcgtcagcgtggaaaag	27
	C-term	cacgaggaaacccctccaaccacaagcagcgacagcgaggaagaacaag aggacgaggaagagatcgacgtcgtcagcgtggaaaag	28
SORT1	N-term	atgaagaatacgtgtgcggcggcagattcctggtgcacagatatagcgtcc tgcagcagcacgccgaggccaatggtgttgatggtgtcgalccctggatac cgccagccacacaacaagagcggctaccacgacgacagcgacgaggat ctgcttgag	29
	C-term	aagaaatacgtgtgcggcggcagattcctggtgcacagatatagcgtcctgc agcagcagcgccgaggccaatggtgttgatggtgtcgalccctggataccg ccagccacacaacaagagcggctaccacgacgacagcgacgaggatct gcttgag	30
TRXwt	N-term	atggtcaagcagatcgagagcaagaccgccttccaagaggcccttgatgcc gctggcgataagctggtggtggtgattttccgccacttggtgcggcccctg caagatgatcaagccattctccacagcctgagcgagaagtacagcaacgtg atcttctggaagtggacgtggacgactgccaggatgtggcctctgagtgcg aagtgaagtgcattgccaccttccagttctcaagaaaggccagaaagtggg cgagttcagcggcgccaacaagaagaagctggaagccaccatcaacgaac tagtt	31
	C-term	gtcaagcagatcgagagcaagaccgccttccaagaggcccttgatgccgt ggcgataagctggtggtggtgattttccgccacttggtgcggcccctgcaa gatgatcaagccattctccacagcctgagcgagaagtacagcaacgtgatct tcttggaagtggacgtggacgactgccaggatgtggcctctgagtgcgaag tgaagtgcattgccaccttccagttctcaagaaaggccagaaagtggcgga gttcagcggcgccaacaagaagaagctggaagccaccatcaacgaactagt t	32

PSBD	C-term	gtgatcgccatgcctagcgtgcggaagtacgccagagaaaaaggcgtgga catccggctgggtgcaaggcactggaaaaggcggcagagtgtgaaagagg acatcgacgcttggtggct	33
TRXwt-UbR	N-term	atggtcaagcagatcgagagcaagaccgcctccaagaggcccttgatgcc gctggcgataagctgggtgggtggattttccgccacttggtgcggcccctg caagatgatcaagccattctccacagcctgagcgagaagtacagcaacgtg atcttctggaagtggacgtggacgactgccaggatgtggcctctgagtgcg aagtgaagtgcatacccacctccagttctcaagaaaggccagaaaagggg cgagttcagcggcgccaacaaagagaagctggaagccaccatcaacgaac tagttggcggatctggcggcgagggaagcggaggacagatcttcgtaaaa ccctgaccggcaagaccatcacactggaagtggaaaccagcgacaccatc gagaacgtgaaggccaagatccaggacaaagagggcacccctctgacca gcagagactgatcttcggcggaagcagctggaagatggcagaaccctga gcgactacaacatccagaaagagtctaccctgcacctggtgctgagactgag agggtggaaga	34
TRXwt-Lamp	N-term	atggtcaagcagatcgagagcaagaccgcctccaagaggcccttgatgcc gctggcgataagctgggtgggtggattttccgccacttggtgcggcccctg caagatgatcaagccattctccacagcctgagcgagaagtacagcaacgtg atcttctggaagtggacgtggacgactgccaggatgtggcctctgagtgcg aagtgaagtgcatacccacctccagttctcaagaaaggccagaaaagggg cgagttcagcggcgccaacaaagagaagctggaagccaccatcaacgaac tagttggcggatctggcggcgagggaagcggaggagacgaccagaggga cctgatcagcaacaacgagcagctgccatgctcggcagaaggcctggcg ctcctgagagcaaatgtagcaga	35
TRXwt-mODC	N-term	atggtcaagcagatcgagagcaagaccgcctccaagaggcccttgatgcc gctggcgataagctgggtgggtggattttccgccacttggtgcggcccctg caagatgatcaagccattctccacagcctgagcgagaagtacagcaacgtg atcttctggaagtggacgtggacgactgccaggatgtggcctctgagtgcg aagtgaagtgcatacccacctccagttctcaagaaaggccagaaaagggg cgagttcagcggcgccaacaaagagaagctggaagccaccatcaacgaac tagttggcggatctggcggcgagggaagcggaggactgatgaagcagatc cagagccacggctccacctgagggtggaagaacaggacgatggcaccct gcctatgagctgtgccaaagagtccggcatggatagacatctgccgcctgt gccagcgccagaatcaatgttatg	36
TRXwt-cmyc	N-term	atggtcaagcagatcgagagcaagaccgcctccaagaggcccttgatgcc gctggcgataagctgggtgggtggattttccgccacttggtgcggcccctg	37

		caagatgatcaagccattctccacagcctgagcgagaagtacagcaacgtg atcttctggaagtggacgtggacgactgccaggatgtggcctctgagtgcg aagtgaagtgcaccccacttccagttctcaagaaaggccagaaaagtggg cgagttcagcggcgccaacaagagaagctggaagccaccatcaacgaac tagttggcggatctggcggcgagggaagcggaggacagaggaaacccc tccaaccacaagcagcgacagcgaggaagaacaaggagcagaggaaga gatcgacgtcgtcagcgtggaaaag	
TRXwt- SORT1	N-term	atggtgaagcagatcgagagcaagaccgcctccaagaggcccttgatgcc gctggcgataagctggtggtggtggattttccgccacttggtggcgccctg caagatgatcaagccattctccacagcctgagcgagaagtacagcaacgtg atcttctggaagtggacgtggacgactgccaggatgtggcctctgagtgcg aagtgaagtgcaccccacttccagttctcaagaaaggccagaaaagtggg cgagttcagcggcgccaacaagagaagctggaagccaccatcaacgaac tagttggcggatctggcggcgagggaagcggaggaaagaaatacgtgtgc ggcggcagattcctggtgcacagatatagcgtcctgcagcagcacgccgag gccaatggtgtgatggtgtcgtatgccctggataccgccagccacacaaaca agagcggctaccacgacgacagcgacgagagatctgcttgag	38
SORT1 w/ TM	C-term	agcgtgccaatcatcctggccatcgtgggcctgatgctggttacagtggttgc cggcgtgctgatcgttaagaaatacgtgtgcggcgagattcctggtgcac agatatagcgtcctgcagcagcacgccgaggccaatggtgttgatggtgtc atgccctggataccgccagccacacaaacaagagcggctaccacgacgac agcgacgaggatctgcttgag	39
Lamp w/ TM	N-term	atggacgaccagaggacgtgatcagcaacaacgagcagctgcccattgct cggcagaaggcctggcgctcctgagagcaaatgtagcagaggcgctctgta caccggctttagcatcctggtcacactgttctgctggccggacaggctaccaca gcctactttctgtac	40
TRXmt	N-term	atggtgaagcagatcgagagcaagaccgcctccaagaggcccttgatgcc gctggcgataagctggtggtggtggattttccgccacttgagcggcccca gcaagatgatcaagccattctccacagcctgagcgagaagtacagcaacgt gatcttctggaagtggacgtggacgacagccaggatgtggcctctgagag cgaagtgaagtccatgcctaccttccagttctcaagaaggccagaaagtc ggcgagttcagcggcgccaacaagagaagctggaagccaccatcaacga gctggtg	146

[213] (상기 표 5에서 캐리어 단백질이 N-term에 삽입되는 경우, 각 단백질의 5' 말단에 atg 염기서열이 추가되어 삽입되고, 상기 밑줄로 표시된 부분인 GS linker 서열에 해당한다)

- [214] 상기 제작된 캐리어 단백질 벡터에 대해 mMESSAGE mMACHINE™ T7 ULTRA Transcription Kit (ThermoFisher, AM1345)을 이용하여 in vitro transcription하여 하기 구조식 1의 mRNA를 제작하였고, 하기 5'UTR 및 3'UTR에 해당하는 서열 정보를 하기 표 6에 나타내었다.
- [215] [구조식 1]
- [216] 5'UTR (TE) - (캐리어 단백질 I) - GGS GGG GSGG - EGFP - GGS GGG GSGG - (캐리어 단백질 II) - 3'UTR (2X HBB)
- [217] (상기 구조식 1에서 GGS GGG GSGG는 링커 서열을 의미하고, 캐리어 단백질 I (CP #1)는 상기 제작된 벡터의 N 말단에 삽입된 캐리어 단백질, 캐리어 단백질 II (CP #2)는 C 말단 각각에 삽입된 캐리어 단백질에 대응되고, 상기 5'UTR (TE)는 하기 표 6의 서열번호 41의 서열을 갖고, 상기 3'UTR (2X HBB)는 하기 표 6의 서열번호 42의 서열을 갖는다)
- [218] [표6]

구분	서열 (5' -> 3')	서열 번호
5UTR_TE	ccggcggtttctgacatccggcggtttctgacatccggcggtttctgacatccg gcgggtttctgacatccggcggtttctgacatccggcggtttctgacatccggcg ggtttctgacatccggcggtttctgacatccggcggtttctgacatccggcggtt tctgacattcacaaccaggcctccacaacc	41
3UTR_2X_HBB	agctcgctttctgctgtccaatttctattaaagggttcctttgttcctaagtccaactact aaactgggggatattatgaaggccttgagcatctggattctgcctaataaaaaacat ttatttcattgctgcggatctagctcgctttctgctgtccaatttctattaaagggttcctt gttcctaagtccaactactaaactgggggatattatgaaggccttgagcatctgga ttctgcctaataaaaaacatttatttcattgctgc	42

- [219]
- [220] 실시예 1-2. 캐리어 단백질 1차 스크리닝
- [221] Proteasome inhibitor인 BTZ (bortezomib)에 의해서 발현양상이 변화하면 CD8 항원으로 적합하게 processing/presentation pathway로 전달될 수 있고, Lysosomal inhibitor인 CHQ (Chloroquine)에 의해서 발현양상이 변화하면 CD4 항원으로 적합하게 processing/presentation pathway로 전달될 수 있어, BTZ, CHQ 처리를 통해 CD8, CD4 항원으로 processing/presentation이 되는지 여부를 확인할 수 있어, BTZ 및 CHQ를 처리하였다.
- [222] 구체적으로, 상기 제작된 mRNA 각각을 4D-nucleofector system (Lonza)을 이용하여 K562 Cell line (ATCC, CCL-243)에 트랜스펙션하였다. 상기 트랜스펙션된 세포는 Proteasome Inhibitor인 Bortezomib (BTZ)과 Lysosomal

Inhibitor인 Chloroquine (CHQ)을 이용하여 각 Inhibitor에 대한 반응을 확인하기 위해, 상기 세포에 BTZ 또는 CHQ를 처리하고 16시간 후에 형광 활성 세포 선별기 (FACS)를 이용하여 반응성이 나오는지 확인하여 proteasome 또는 lysosome에 의한 분해가 억제되었는지 확인하여 HLA Class I 과 Class II pathway로 전달할 수 있는 가능성을 확인하였고, 상기 조합의 전달 가능성을 확인한 결과를 도 5a 내지 5k 에 나타내었다.

- [223] 구체적으로, 상기 도 5a 내지 5k에서 C는 CHQ 처리, B는 BTZ 처리, BC는 BTZ와 CHQ 함께 처리, X는 아무것도 처리하지 않은 것을 의미하고, 상기 X와 비교했을 때 C에 의해서 GFP 발현이 증가하면 CD4 항원으로, X와 비교했을 때 B에 의해서 발현이 증가하면 CD8 항원으로, X와 비교했을 때 BC에 의해서 발현이 증가하면 CD4와 CD8 항원 모두로 잘 갈 수 있는 가능성이 높은 것을 의미한다.
- [224] 전달 가능성을 확인한 결과, 변이된 TRX가 삽입된 CP01 (TRXmt-PSBD) 조합은 BTZ 및 CHQ 영향 없이도 EGFP의 발현이 잘되는 것을 확인하였고, 상기 표 1의 CP12, CP13, CP23, CP31, CP33, CP34, CP36 및 CP38 조합은 BTZ 영향을 받는 것을 확인하였고, CHQ 영향을 받는 조합은 없는 것을 확인하여, 상기 CP01 조합에 의해 CD4 및 CD8 항원이 processing/presentation pathway로 전달되고, 상기 CP12, CP13, CP23, CP31, CP33, CP34, CP36 및 CP38 조합에 의해 CD8 항원이 processing/presentation pathway로 전달되는 것을 확인하였다. 또한, CP21 (UbR-cmyc), CP27 (Lamp-cmyc) 조합은 BTZ, CHQ로 인한 영향을 구분할 수는 없었다.
- [225]
- [226] 실시예 1-3. 캐리어 단백질 2차 스크리닝
- [227] 상기 실시예 1-2에서 CP01 조합이 CD4 및 CD8 항원 모두가 processing/presentation pathway로 전달되도록 하는 것을 확인한 바, CP01 조합의 TRX를 상기 실시예 1-2에서 CD8 항원이 processing/presentation pathway로 전달되도록 하는 것이 확인된 상기 CP12, CP13, CP23, CP31, CP33, CP34, CP36 및 CP38 조합에 추가하는 디자인을 하였다.
- [228] 구체적으로, 상기 실시예 1-1에서 제작한 pUC57-T7-CP12G, pUC57-T7-CP13G, pUC57-T7-CP23G, pUC57-T7-CP31G, pUC57-T7-CP33G, pUC57-T7-CP34G, pUC57-T7-CP36G 및 pUC57-T7-38G 각 Plasmid를 template으로 하여, 하기 표 7의 올리고뉴클레오타이드 oCCP12G-F1 및 oCCPxxG-R1를 프라이머로 PCR을 수행하고, 각 product를 정제하였다.

[229] [표7]

구분	서열 (5' -> 3')	서열
		서열

		번호
oCCP12G-F1	ggaggaagcggaggacagatcttcgtgaaa	43
oCCPxxG-R1	gcaagaaagcgagctctcgagtta	44

[230] 정제 후, 상기 실시예 1-1에서 plasmid 제작 과정 중 만들어진 TRX PCR product와 함께, 실시예 1-1에서 제작한 pUC57-T7-CP12G, pUC57-T7-CP13G, pUC57-T7-CP23G, pUC57-T7-CP31G, pUC57-T7-CP33G, pUC57-T7-CP34G, pUC57-T7-CP36G 및 pUC57-T7-38G 각 Plasmid 각각에 AscI (Enzymomics; R068M) 및 XhoI (Thermo Scientific™ FastDigest; #FD0694) 제한 효소를 처리하여 정제한 Backbone 부분에 EZ-fusion 방법으로 삽입하여 최종적으로 N 말단에 TRX가 추가된 플라스미드를 제작하였고, 제작된 플라스미드는 원형 플라스미드의 숫자 앞에 1을 추가하여 명명하였다 (예컨대, pUC57-T7-CP12G에 TRX가 추가된 플라스미드: pUC57-T7-CP112G).

[231] 추가로, CP12, CP13, CP21, CP31 및 CP33 조합에 대해 N 말단의 캐리어 단백질을 TRX로 변경하였다 (CP41 내지 CP45).

[232] 구체적으로, 상기 실시예 1-1의 pUC57-T7-CP21G, pUC57-T7-CP33G, pUC57-T7-CP-13G, pUC57-T7-CP12G 및 pUC57-T7-CP31G 플라스미드를 template로 하여, 하기 표 8의 올리고뉴클레오타이드 oGS-EGFP-F 및 oCCPxxG-R1을 프라이머로 하여 PCR을 수행하고, 각 product를 정제하여, EGFP와 C 말단에 Carrier protein이 연결된 단편을 확보하였다.

[233] [표8]

구분	서열 (5' -> 3')	서열 번호
oGS-EGFP-F	ggcggatctggcggcgaggaggaagcggaggagttagcaagggcgag	45
oCCPxxG-R1	gcaagaaagcgagctctcgagtta	46

[234] 그 후, 상기 실시예 1-1에서 제작된 TRX PCR product와 함께, 상기 실시예 1-1에서 제작한 pUC57-T7-CP21G, pUC57-T7-CP33G, pUC57-T7-CP-13G, pUC57-T7-CP12G 및 pUC57-T7-CP31G 각 플라스미드 각각에 AscI (Enzymomics; R068M) 및 XhoI (Thermo Scientific™ FastDigest; #FD0694) 제한 효소를 처리하여 정제한 Backbone 부분에 EZ-fusion 방법으로 삽입하여 최종적으로 상기 각 플라스미드 N 말단에 캐리어 단백질이 TRX인 플라스미드를 제작하였다 (pUC57-T7-41G, pUC57-T7-CP42G, pUC57-T7-CP43G, pUC57-T7-44G 및 pUC57-T7-CP45G)

[235] 또한, CP34, CP27, CP23, CP36 및 CP21 조합에 대해 C 말단의 캐리어 단백질을 TRX로 변경하였다 (CP46 내지 CP50).

- [236] 구체적으로, 상기 실시예 1-1의 pUC57-T7-CP34G, pUC57-T7-CP27G, pUC57-T7-CP23G, pUC57-T7-CP36G 및 pUC57-T7-CP21G 플라스미드를 template으로 하여, 하기 표 9의 oM13F 및 oGS-EGFP-R을 프라이머로 하여 PCR을 수행하고, 각 product를 정제하여, EGFP와 N 말단에 Carrier protein이 연결된 단편을 확보하였다.

- [237] [표9]

구분	서열 (5' -> 3')	서열 번호
oM13F	gtaaaacgacggccagt	47
oGS-EGFP-R	tcctcgcgttcctcgcgcgcagatccgccctgtacagctcgc	48

- [238] 그 후, 실시예 1-1에서 제작된 pUC57-T7-CP01G를 template으로 하고 하기 표 10의 올리고뉴클레오타이드 oCTRXwt-F1 및 oCTRXwt-R1을 프라이머로 하여 PCR을 수행하여, C 말단에 연결할 TRX 단편을 확보하여, 상기 EGFP와 N 말단에 Carrier protein이 연결된 단편과 EZ-fusion 방법으로 AscI (Enzymonics; R068M) 및 XhoI (Thermo Scientific™ FastDigest; #FD0694) 제한효소가 처리된 각 pUC57-T7-CP34G, pUC57-T7-CP27G, pUC57-T7-CP23G, pUC57-T7-CP36G 및 pUC57-T7-CP21G에 각각에 삽입하여 최종적으로 pUC57-T7-46G, pUC57-T7-CP47G, pUC57-T7-CP48G, pUC57-T7-49G 및 pUC57-T7-CP50G 플라스미드를 제작하였다.

- [239] [표10]

구분	서열 (5' -> 3')	서열 번호
oCTRXwt-F1	ggcggatctggcggcggaggaagcggaggagtcaagcagatcgag	49
oCTRXwt-R1	gcaagaaagcgagctctcgagtttaaactagttcgttgat	50

- [240] 디자인된 벡터의 N 말단 및 C 말단 각각에 삽입된 캐리어 단백질 정보를 상기 표 2에 나타내었고, 상기 캐리어 단백질 중 TRX가 추가된 캐리어 단백질의 아미노산 서열 및 염기 서열 정보를 각각 상기 표 4 및 5에 나타내었다.

- [241] 또한, 캐리어 단백질 중 SORT1과 Lamp는 membrane protein으로 transmembrane이 존재하기 때문에 각 단백질의 기존 cytosolic domain에 transmembrane domain을 추가하고, (SORT1 w/ TM 및 Lamp w/ TM), SORT1 w/ TM이 C-term에 위치하고 TRX가 N-term에 위치하도록, 또는 Lamp w/ TM이 N-

term에 위치하고 TRX가 C-term에 위치하도록 하였고 (CP201 및 CP202), 세포 내 발현 모식도를 도 6에 나타내었다.

- [242] 구체적으로, 상기 SORT1 w/ TM은 상기 표 3의 oSORTwTM-1F, oSORTwTM-4R, oSORTwTM-2R 및 oSORTwTM-3F의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 SORT1과 실질적으로 동일한 방법으로 PCR을 수행하여 제작하였고, 상기 Lamp w/ TM은 상기 표 3의 oLAMPwTM-1F, oLAMPwTM-4R, oLAMPwTM-2R, oLAMPwTM-3F의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 SORT1과 실질적으로 동일한 방법으로 PCR을 수행하여 제작하였다.
- [243] 상기 제작된 벡터의 transmembrane domain이 추가된 캐리어 단백질 정보를 상기 표 2에 나타내었고, transmembrane이 추가된 캐리어 단백질의 아미노산 서열 및 염기 서열 정보를 각각 상기 표 4 및 5에 나타내었다.
- [244] 상기 제작된 캐리어 단백질 벡터에 대해 상기 실시예 1-1과 실질적으로 동일한 방법으로, mRNA 제작 후 HLA Class I 과 Class II pathway로 전달할 수 있는 가능성을 확인하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [245] 전달 가능성을 확인한 결과, TRX가 추가된 CP136 조합은 기존 반응이 강화된 것을 확인하였고, transmembrane이 추가된 CP201 및 CP202 조합에서 SORT1 및 Lamp가 transmembrane이 있을 때, CHQ에 대한 반응이 나타난 것을 확인하여 반응이 전체적으로 강화된 것을 확인하였다.
- [246]
- [247] 실시예 2. 캐리어 단백질이 삽입되고 에피토프가 포함된 벡터 제작
- [248] 실시예 2-1. 캐리어 단백질 벡터 제작
- [249] 상기 실시예 1에서 HLA Class I 과 Class II pathway로의 전달 가능성이 확인된 CP12, CP13, CP23, CP31, CP33, CP34, CP36, CP38, CP47, CP48, CP50, CP136, CP201 및 CP202 조합이 에피토프 (epitope)의 발현 효율에 미치는 영향을 확인하기 위해, 상기 캐리어 단백질 조합이 포함된 새로운 형태의 벡터를 제작하였다.
- [250] 구체적으로, 상기 조합에서 N 말단에 삽입되는 캐리어 단백질 (CP_N; 캐리어 단백질 1)과 C 말단에 삽입되는 캐리어 단백질 (CP_C; 캐리어 단백질 2) 사이에 linker로 5개의 에피토프가 연결되어 있고 캐리어 단백질 2의 C-말단에는 EGFP가 P2A 서열로 연결되는 형태의 벡터를 제작하였고, 제작된 벡터의 모식도를 도 8에 나타내었다. 상기 실시예 1의 벡터는 두 캐리어 단백질 사이에 EGFP가 위치하지만 상기 제작된 벡터는 실제 적용 예처럼 에피토프가 위치해 있고 발현량을 측정하기 위한 EGFP가 C-말단에 연결되어 있다.
- [251] 상기 벡터를 제작하기 위해, 도 8처럼 4개의 단편으로 나누어 클로닝을 위한 유전자에 해당하는 insert를 제작하였다. 첫 번째 단편 (CP_N 단편; CP#1)은 캐리어 단백질 1부터 첫 번째 linker 일부를 포함하고, 두 번째 단편 (에피토프 단편; Epitope_2)은 첫 번째 linker 일부와 에피토프 및 linker, 그리고 여섯 번째 linker 일부를 포함하고, 세 번째 단편 (CP_C 단편; CP#3)은 여섯 번째

linker 일부와 캐리어 단백질 2, P2A 서열 일부를 포함하고 네 번째 단편(P2A-EGFP 단편; GFP_4)은 P2A 서열 일부와 EGFP 서열을 포함한다. 두 번째 단편 및 네 번째 단편은 캐리어 단백질 조합과 무관하게 공통적으로 사용된다.

- [252] 상기 표 2의 CP12, CP13, CP23, CP31, CP33, CP34, CP36, CP38, CP47, CP48, CP50, CP136, CP201 및 CP202 조합에 맞게 하기 표 11의 조합으로 하기 캐리어 단백질을 증폭할 수 있는 표 12의 primer를 이용하여, 상기 실시예 1에서 제작한 상기 조합 각각의 벡터에 대해 PCR을 수행하여 첫 번째 및 세 번째 단편을 증폭하였다. 하기 표 12의 에피토프 (Epitope_2) 및 P2A-EGFP (GFP_4)를 증폭할 수 있는 primer를 이용하여 pUC57-T7-5epitopes 플라스미드 (도 9)에 대해 PCR을 수행하여 두 번째 단편을 증폭하고, 상기 실시예 1-1의 pUC57-T7-CP12G 플라스미드를 주형으로 하여 네 번째 단편도 증폭하였다. 추가로, N 말단에 TRX가 삽입되고 C 말단에 캐리어 단백질이 삽입되지 않은 플라스미드를 준비하기 위해 하기 표 12의 프라이머를 이용하여 표 11의 조합으로 PCR을 수행하였다 (TRX_WT).

- [253] [표11]

조합명	CP #1 cloning 시 사용된 primer 종류	CP #2 cloning 시 사용된 primer 종류
hTrx_WT	TrxWT_1_F / TrxWT_1_R	-
CP12	Ubi_1_F / Ubi_1_R	SORT1_3_F / SORT1_3_R
CP13	Lamp_1_F / Lamp_1_R	mODC_3_F / mODC_3_R
CP23	mODC_1_F / mODC_1_R	SORT1_3_F / SORT1_3_R
CP31	mODC_1_F / mODC_1_R	Ubi_3_F / Ubi_3_R
CP33	mODC_1_F / mODC_1_R	Lamp_3_F / Lamp_3_R
CP34	cMyc_1_F / cMyc_1_R	Ubi_3_F / Ubi_3_R
CP36	SORT1_1_F / SORT1_1_R	Ubi_3_F / Ubi_3_R
CP38	SORT1_1_F / SORT1_1_R	Lamp_3_F / Lamp_3_R
CP47	Lamp_1_F / Lamp_1_R	TrxWT_3_F / TrxWT_3_R
CP48	mODC_1_F / mODC_1_R	TrxWT_3_F / TrxWT_3_R
CP50	Ubi_1_F / Ubi_1_R	TrxWT_3_F / TrxWT_3_R
CP136	TrxWT_1_F / TrxWT_SORT1_1_R	Ubi_3_F / Ubi_3_R
CP201	TrxWT_1_F / TrxWT_1_R	SORT1_TM_3_F / SORT1_3_R
CP202	Lamp_1_F / Lamp_TM_1_R	TrxWT_3_F / TrxWT_3_R

- [254] [표12]

프라이머 이름	서열 (5' -> 3')	서열 번호
Epitope_2_F	GGCTACCGTCTCAAGGAAGCGGAGGTGAGTTCAAG CACATCAAGGCC	114
Epitope_2_R	GGCTACCGTCTCTACTGCCGCCATCTCTGACGCTGT AGTAGTG	115
GFP_4_F	GGCTACCGTCTCACTACTAACTTCAGCCTGCTGAAG CAGGCTGGCGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTGT GAGCAAGGGCGAGGA	116
GFP_4_R	GGCTACCGTCTCTCGAGTTTACTTGTACAGCTCGTCC ATG	117
cMyc_1_F	GGCTACCGTCTCACCATGCACGAGGAAACCCC	118
cMyc_1_R	GGCTACCGTCTCATCCTCCGCCGCCAGATCCGCCCT TTCCACGCTGACGAC	119
Lamp_1_F	GGCTACCGTCTCACCATGGACGACCAGAGGGAC	120
Lamp_1_R	GGCTACCGTCTCATCCTCCGCCGCCAGATCCGCCTC TGCTACATTTGCTCTCAGGAG	121
Lamp_3_F	GGCTACCGTCTCTCAGTGGCGGAGGGCGGCTCAGGCG GAGACGACCAGAGGGACCT	122
Lamp_3_R	GGCTACCGTCTCTGTAGCTCCGCTTCCAGCGTAATC TGGAACATCGTATGGGTATCCGGAGCCGCCTCTGCT ACATTTGCTCTCAGGAG	123
Lamp_TM_1_R	GGCTACCGTCTCATCCTCCGCCGCCAGATCCGCCGT ACAGAAAGTAGGCTGTGGT	124
mODC_1_F	GGCTACCGTCTCACCATGCTGATGAAGCAGATC	125
mODC_1_R	GGCTACCGTCTCATCCTCCGCCGCCAGATCCGCCCA TAACATTGATTCTGGCGCT	126
mODC_3_F	GGCTACCGTCTCTCAGTGGCGGAGGGCGGCTCAGGCG GACTGATGAAGCAGATCCAGAGCC	127
mODC_3_R	GGCTACCGTCTCTGTAGCTCCGCTTCCAGCGTAATC TGGAACATCGTATGGGTATCCGGAGCCGCCATAAC ATTGATTCTGGCGCTG	128

SORT1_1_F	GGCTACCGTCTCACCATGAAGAAATACGTGTGCGGC	129
SORT1_1_R	GGCTACCGTCTCATCCTCCGCCGCCAGATCCGCCCT CAAGCAGATCCTCGTCG	130
SORT1_3_F	GGCTACCGTCTCTCAGTGGCGGAGGCGGCTCAGGCG GAAAGAAATACGTGTGCGGC	131
SORT1_3_R	GGCTACCGTCTCTGTAGCTCCGCTTCCAGCGTAATC TGGAACATCGTATGGGTATCCGGAGCCGCCCTCAAG CAGATCCTCGTCG	132
SORT1_3_F	GGCTACCGTCTCTCAGTGGCGGAGGCGGCTCAGGCG GAAGCGTGCCAATCATCCTGG	133
TrxWT_1_F	GGCTACCGTCTCACCATGGTGAAGCAGATCGAGAG	134
TrxWT_1_R	GGCTACCGTCTCATCCTCCGCCGCCAGATCCGCCAA CTAGTTCGTTGATGGTGGC	135
TrxWT_3_F	GGCTACCGTCTCTCAGTGGCGGAGGCGGCTCAGGCG GAGTCAAGCAGATCGAGAGCAA	136
TrxWT_3_R	GGCTACCGTCTCTGTAGCTCCGCTTCCAGCGTAATC TGGAACATCGTATGGGTATCCGGAGCCGCCAACTAG TTCGTTGATGGTGGC	137
TrxWT_S ORT1_1_R	GGCTACCGTCTCATCCTCCGCCGCCAGATCCGCCCT CAAGCAGATCCTCGTCG	138
Ubi_1_F	GGCTACCGTCTCACCATGCAGATCTTCGTGAAAACC C	139
Ubi_1_R	GGCTACCGTCTCATCCTCCGCCGCCAGATCCGCCTC TTCCACCTCTCAGTCTCAG	140
Ubi_3_F	GGCTACCGTCTCTCAGTGGCGGAGGCGGCTCAGGCG GACAGATCTTCGTGAAAACCCTGA	141
Ubi_3_R	GGCTACCGTCTCTGTAGCTCCGCTTCCAGCGTAATC TGGAACATCGTATGGGTATCCGGAGCCGCCCTCCACC TCTCAGTCTCAGC	142

- [255] 상기 제작된 각 조합에 따른 세 종류 또는 네 종류의 단편은 양 말단에 BsmBI 사이트를 포함하여, BsmBI 제한효소 사이트를 가진 공벡터 pLRK33-empty에 NEBridge Golden Gate Assembly-BsmBIv2; NEB # E1602L 키트의 BsmBI 제한효소 및 T4 DNA Ligase를 이용하여 삽입하였고, 상기 에피토프 단편에는 5종의 에피토프가 포함되고, CP_N 단편 위치를 기준으로, M44, M30, M21, M12

및 mTrp2의 순서로 위치하고, 각 에피토프는 GGSGGGSGG 서열의 링커에 의해 연결된다. 상기 M44, M30, M21 및 M12 에피토프는 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4838069> 논문에서 개시된 B16-M44, B16-M30, B16-M21 및 B16-M12에 해당한다.

[256] 상기 공백터의 벡터맵을 도 10에, 각 종류의 단편이 공백터에 삽입되는 과정을 보여주는 모식도를 도 11에, 공백터에 삽입되어 제작된 벡터의 구성 정보를 하기 표 13에 나타내었고, 삽입된 5종의 에피토프 단편의 아미노산 서열 및 염기서열 정보와 상기 5종의 에피토프 단편이 링커에 의해 연결된 형태의 아미노산 서열 및 염기서열 정보 (5종 Epitope)를 하기 표 14에 나타내었고, 삽입된 P2A 및 EGFP의 아미노산 서열 및 염기서열 정보를 하기 표 15에 나타내었다. 예시적으로, 제작된 플라스미드 pLRK33-hTrx_WT의 벡터맵을 도 12에 나타내었다.

[257] [표13]

플라스미드 종류	CP_N 단편	에피토프 단편	CP_C 단편	P2A-EGFP 단편
pLRK33-hTrx_WT	Trxwt	5종 에피토프	-	P2A-EGFP
pLRK33-CP12_m	UbR		SORT1	
pLRK33-CP13_m	Lamp		mODC	
pLRK33-CP23_m	mODC		SORT1	
pLRK33-CP31_m	mODC		Ub	
pLRK33-CP33_m	mODC		Lamp	
pLRK33-CP34_m	cMyc		Ub	
pLRK33-CP36_m	SORT1		Ub	
pLRK33-CP38_m	SORT1		Lamp	
pLRK33-CP47_m	Lamp		Trxwt	
pLRK33-CP48_m	mODC		Trxwt	
pLRK33-CP50_m	UbR		Trxwt	
pLRK33-CP136_m	Trxwt-SORT1		Ub	
pLRK33-CP201_m	Trxwt		SORT1 w/TM	
pLRK33-CP202_m	Lamp w/TM		Trxwt	

[258]

[표14]

종류	서열 (5' -> 3')	서열 번호
M44_PRT	EFKHIKAFDRTFANNPGPMVVFATPGM	51
M44_GENE	gagttcaagcacatcaaggccttcgaccggaccttcgccaacaatcccggacctatggtg gtgttcgccacacctggaatg	52
M30_PRT	PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL	53
M30_GENE	cctagcaagcctagcttccaagagttcgtggactgggagaacgtgtcccctgagctgaact ctaccgaccagccatttctc	54
M21_PRT	SSPDEVALVEGVQSLGFTYLRLKDNYM	55
M21_GENE	tcttccagatgaggtggcactggtggaaggcgtgcagtctctgggcttcacctacctgag actgaaggacaactacatg	56
M12_PRT	TPPPEEAMPFEFNGPAQGDHSQPPLQV	57
M12_GENE	acacctccactgaagaggccatgccttcgagttcaacggacccgctcagggcgatcac tctcagcctccacttcaagtt	58
mTrp2_PRT	PNGTQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRD	59
mTrp2 _GENE	cctaattgaacacagcccatgcgccaactgcagcgtgtacgacttctcgtgtggctgc actactacagcgtcagagat	60
5 Epitop es_PRT	GGSGGGSGGGEFKHIKAFDRTFANNPGPMVVFATPGMG GSGGGSGGSPSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFLGGS GGGGSGGSSPDEVALVEGVQSLGFTYLRLKDNYMGGSG GGGSGGTTPPPEEAMPFEFNGPAQGDHSQPPLQVGGSGGG GSGGPNGTQPQIANCSVYDFFVWLHYYSVRDGGSGGGG SGG	61
5 Epitope s_GENE	ggcggatctggcggcggaggaagcggaggtgagttcaagcacatcaaggccttcgacc ggaccttcgccaacaatcccggacctatggtggtgttcgccacacctggaatgggtggaa gcggaggaggcggctctggaggccctagcaagcctagcttccaagagttcgtggactgg gagaacgtgtcccctgagctgaactctaccgaccagccatttctcggcggatcaggaggc gggggctccggagggtcttctccagatgaggtggcactggtggaaggcgtgcagtctctg ggcttcacctacctgagactgaaggacaactacatgggaggatccggcggcggcggaa gcggggggacacctccactgaagaggccatgccttcgagttcaacggacccgctcag ggcgatcactctcagcctccacttcaagttggcggatctggcggcggcggatcaggtggc	62

	cctaattggaacacagccccagatcgccaactgcagcgtgtacgacttcttcgtgtggctgc actactacagcgtcagagatggcggcagtgggcggaggcggctcaggcgga	
[259]	[표15]	
	종류	서열 (5' -> 3')
	P2A_PRT	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
	P2A_GENE	gctactaacttcagcctgctgaagcaggctggcgacgtggaggagaaccctggacct
	EGFP_PRT	VSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYG KLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQ HDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGI KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYS TQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK
	EGFP_GENE	gtgagcaaggcgaggagctgttcaccggggtgtgcccacctggtcagctggacggc gacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgaggcgaggcgatgccacctacggc aagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgccgtgccctggcccacctcgt gaccacctgacctacggcgtgcagtgttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcac gacttctcaagtcgcatgccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggac gacggcaactacaagaccgcgccgaggtgaagtcgaggcgacacctggtgaaccgc atcgagctgaaggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagt acaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggt gaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctgccgaccactaccag cagaacacccccatggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacc agtccgccctgagcaagacccaacgagaagcgcatcacatggctctgctggagttcgt gaccgccggggatcactctcgcatggacgagctgtacaagtaa

[260]

[261] 비교예 1. 캐리어 단백질이 없이 에피토프만 포함된 벡터 제작

[262] 상기 실시예 2의 에피토프의 N-term부터 EGFP의 C-term을 증폭할 수 있는 insert를 준비하기 위해, 하기 표 16의 NcoI_Epitope_F 및 XhoI_EGFP_R oligo를 이용하여, pLRK33-hTrx_m 벡터에 대해 PCR을 수행하여 해당 부분을 증폭하여 insert를 제작하였다. 상기 pLRK33-hTrx_m 벡터의 벡터맵을 도 13에 나타내었다.

[263]

[표16]

oligo 종류	서열 (5' -> 3')	서열 번호
NcoI_E pitope_F	CCAAGGCCACCATGGAGTTCAAGCACATCAAGGC	143
XhoI_E GFP_R	CTGTATTCTCGAGTTTACTTGTACAGCTCGT	144

- [264] 상기 제작된 insert를 상기 도 10의 pLRK33-empty vector의 NcoI, XhoI site에 NcoI (Thermo Scientific™ FastDigest; #FD0574) 및 XhoI (Scientific™ FastDigest; #FD0694) 제한효소 및 T4 DNA ligase (Thermo Scientific™; #EL0012)를 이용하여 삽입하여, 캐리어 단백질이 삽입되지 않은 비교예 벡터 pLRK33-No_CP_m를 제작하였다.
- [265]
- [266] 실시예 3. 에피토프를 포함한 캐리어 단백질의 mRNA 제작
- [267] 상기 실시예 2 및 비교예 1에서 제작한 벡터 16종 (pLRK33-hTrx_WT, pLRK33-CP12_m, pLRK33-CP13_m, pLRK33-CP23_m, pLRK33-CP31_m, pLRK33-CP33_m, pLRK33-CP34_m, pLRK33-CP36_m, pLRK33-CP38_m, pLRK33-CP47_m, pLRK33-CP48_m, pLRK33-CP50_m, pLRK33-CP136_m, pLRK33-CP201_m, pLRK33-CP202_m 및 pLRK33-No_CP_m)을 template으로 in vitro transcription을 진행하여 mRNA를 제작하였다.
- [268] 구체적으로, in vitro transcription을 진행하기 앞서 원하는 부분까지만 RNA로 transcription이 될 수 있도록 XbaI (Termo Scientific, FD0684)로 poly A 뒷부분을 cut을 하여 벡터를 linearization하였다.
- [269] Linearization 된 벡터 15종을 이용하여 하기 표 17의 조건으로 in vitro transcription을 진행하고, DNase I (Invitrogen, AM2238)을 처리하여 template DNA를 제거하고 RNeasy Mini kit (Qiagen, 74104)를 이용하여 정제하여 mRNA를 제작 완료하였다.
- [270] [구조식 2]
- [271] 5'UTR - (캐리어 단백질 1) - L-E-L-E-L-E-L-E-L-E-L - (캐리어 단백질 2) - P2A - EGFP - 3'UTR - poly A
- [272] (상기 구조식 2에서 L은 링커 서열 GSGGGGSGG 를 의미하고, 캐리어 단백질 1 (CP #1)은 상기 제작된 벡터의 N 말단에 삽입, 캐리어 단백질 2 (CP #2)는 C 말단에 삽입된 각각의 캐리어 단백질에 대응된다)
- [273] [표17]

Component	Volume or amount
-----------	------------------

10X RNA polymerase buffer (NEB #M0460T)	2 μ l
CleanCap AG (3'Ome) (Trilink #N-7413)	0.8 μ l
100 mM ATP (Jena Bioscience # RNT-107-L)	1.8 μ l
100 mM CTP (Jena Bioscience # RNT-107-L)	1.8 μ l
100 mM GTP (Jena Bioscience # RNT-107-L)	1.8 μ l
100 mM N1-methyl pseudo UTP (Jena Bioscience # RNT-107-L)	1.8 μ l
1M DTT (Jena Bioscience # RNT-107-L)	0.8 μ l
T7 RNA Polymerase High co ncentration (NEB #M0460T)	0.5 μ l
Murine RNase Inhibitor (NEB #M0314L)	0.5 μ l
DNA template	1 μ g
DNase/RNase-free water	Up to 20 μ l
Total volume	20 μ l

[274]

[275] 시험예 1. K562 세포주에서 에피토프에 대한 캐리어 단백질의 발현 효율 측정

[276] 탱크에 유지하고 있던 K562 세포주 (ATCC, CCL-243) 일부를 취하여 cell down 후 complete media (RPMI1640, Gibco, 11875-093, 10% FBS, Gibco, 26140-079 및 1% Penicillin-Streptomycin, Gibco, 10378-016)로 resuspension 하였고, cell count하여 3×10^5 cells/ml 농도가 되도록 상기 complete media를 더 추가 또는 다시 cell down 후 complete media로 resuspension 시켜서 3×10^5 cells/ml concentration으로 조정된 배지 20ml를 CO₂ incubator에서 배양하였다.

[277] 상기 배양 중인 K562 세포주를 회수하여 Amaxa 4D-Nucleofector protocol for K562에 따라 SF cell line 4D-Nucleofector X kit S (Lonza, V4XC-2032)를 사용하여, 상기 세포주에 상기 실시예 3에서 준비한 mRNA를 electroporation 진행하고 cell healing을 수행하였다. transfection 시 사용된 mRNA 양은 샘플당 1pmol이었다.

[278] 각 well에서 세포를 harvest하고 cell down한 뒤, FACS buffer (eBioscience, 00-4222-28)에 resuspension 시켜 FACS tube로 이동시켰고, LSRFortessa (BD Biosciences)로 세포 분석을 수행하여 에피토프의 발현양을 확인하였고, 그 결과를 도 14 및 표 18에 나타내었다. 음성대조군으로 mRNA를 transfection 하지 않은 세포주를 준비하여 에피토프 발현양을 확인하였다.

[279] [표18]

	Mean fluorescence intensity	MFI (Fold change)
Negative control	842	0.236849508

No CP	3555	1
CP12	22325	6.279887482
CP13	22827	6.421097046
CP23	28865	8.11954993
CP31	31535	8.870604782
CP33	15108	4.24978903
CP34	26188	7.36652602
CP36	15746	4.429254571
CP38	17939	5.046132208
CP47	25447	7.158087201
CP48	23171	6.517862166
CP50	22971	6.461603376
CP136	22103	6.217440225
CP201	10259	2.885794655
CP202	9405	2.64556962

[280] 세포 분석 결과, 캐리어 단백질이 없는 No CP 대비 캐리어 단백질이 포함된 각 CP 조합이 전반적으로 EGFP 발현 효율이 증가하는 것을 확인하여 CP 조합을 이용하면 에피토프의 발현을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[281]

[282] 시험예 2. 인간 수지상 세포에서 에피토프에 대한 캐리어 단백질의 발현 효율 측정

[283] 액체질소 탱크에 보관하고 있던 cryopreserved human PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) (Stemexpress, PBMNC300C)를 제조사의 protocol에 따라 해동하고, 해동 한 세포에 대하여 cell count를 수행하여, 해당 결과를 토대로 human CD14 microbeads (Miltenyi Biotec, 130-050-201)와 LS column (Miltenyi Biotec, 130-042-401)을 이용하여 사용자 메뉴얼에 따라 세포를 분리하고 (column activation 2ml, cell loading 2ml, wash 3회 2ml, cell elution 5ml씩 buffer 사용), 선택된 세포수를 측정하였다.

[284] 상기 분리된 세포의 monocyte를 1e06 cells/ml의 농도가 되도록 ImmunoCult dendritic cell culture kit (DC culture kit) (Stemcell, 10985)에 동봉된 media (w/ differentiation supplement)로 suspension 하여 monocyte derived dendritic cell (moDC)를 제작하였고, 96 well plate에 1 well 당 100 μ l씩 총 8 well에 seeding하였다.

- [285] 상기 DC culture kit를 이용하여 배양하고 있는 세포의 배지를 제거하고 상기 DC culture kit에 동봉된 differentiation supplement가 첨가된 배지로 100 μ l씩 교체하였고, 상기 DC culture kit에 동봉된 DC maturation supplement를 사용자 메뉴얼에 따라 양을 계산하여 세포 배지에 첨가하였다.
- [286] 하기 표 19에 따라 상기 실시예 3에서 제작된 mRNA, DP buffer, 전달체 순으로 넣고 혼합하였다. 상기 전달체는 공개특허공보 제 10-2024-0035317 호의 실시예 1의 양이온성 화합물 및 음이온성 고분자 화합물 등을 포함하는 약물 전달용 조성물이다.
- [287] 각 물질을 혼합하는 단계마다 충분히 섞이도록 pipet을 이용하여 pipetting 해주고, 제형을 넣은 직후 10회 pipetting 하여 mRNA와 전달체가 혼합된 drug product (DP)를 제조하였고, 제조된 DP를 상기 DC maturation supplement가 첨가되어 배양되고 있는 세포 배지에 하기 표 19의 DP 처리량에 따라 처리하였다. 추가로, DP를 처리하지 않은 음성대조군을 준비하였다.

[288] [표19]

	mRNA (1mg/ml stock)	DP Buffer	전달체	DP
음성대조군	-	-	-	-
No CP	10 μ l	30.4 μ l	9.6 μ l	1.46 μ l
CP23				1.72 μ l
CP31				1.78 μ l
CP33				1.67 μ l
CP38				1.68 μ l
CP48				1.84 μ l
CP50				1.92 μ l

- [289] DP를 처리하고 각 well에서 세포를 harvest 하고 cell down을 시켰다. 이 후 FACS buffer (eBioscience, 00-4222-28) 및 7-AAD (BD biosciences, 559925)를 100:1의 부피비로 혼합한 용액에 resuspension 시켜 FACS tube로 이동시키고, LSRFortessa (BD Biosciences)로 세포 분석을 3번 수행하였고, 그 결과를 도 15 및 표 20에 나타내었다.

[290] [표20]

	MFI (Fold change)
Negative control	0.173425
No CP	1

CP23	2.528538
CP31	2.673939
CP33	2.763781
CP38	2.204154
CP48	2.098567
CP50	1.144419

- [291] (상기 표 20의 값은 상기 세포 분석을 3번 수행하여 MFI의 평균값이다)
- [292] 세포 분석 결과, no CP 대비 CP23, CP31, CP33, CP38 및 CP48 조합에서 2배 이상의 MFI 값을 나타내어 인간 에피토프 발현이 증가한 것을 확인하였다.
- [293]
- [294] **시험예 3. 인간 수지상 세포에서 에피토프에 대한 캐리어 단백질의 면역원성 유도능 측정**
- [295] 상기 시험예 2와 실질적으로 동일한 방법으로 상기 표 19에 따른 DP를 제작하여 상기 moDC를 배양하는 배지에 처리하여 2일 동안 배양하였다.
- [296] 상기 배양이 완료된 당일에는 moDC 제작에 사용한 상기 시험예 2의 human PBMC를 별도로 준비하여, 최초 PBMC의 세포수를 계산하고 이를 토대로 human CD8+ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec, 130-096-495)와 LS column (Miltenyi Biotec, 130-042-401)을 이용하여 사용자 매뉴얼에 따라 CD8+ T 세포를 분리하였다.
- [297] 상기 배양된 moDC 및 분리가 완료된 CD8+ T 세포는 harvest 후 cell down하고 moDC는 5e05 cells/ml, CD8+ T 세포는 2e06 cells/ml 되도록 각각 Immunocult-XF T cell expansion medium (Stemcell, 10981)에 resuspension 하였다. 이 후 각 cell suspension을 부피비 1:1 되도록 혼합하여 각 well 당 2 ml씩 6 well plate에 seeding 하고 moDC, CD8+ T 세포 혼합물을 7일동안 배양하였다.
- [298] 배양이 완료된 세포는 다시 harvest 하고, mouse IFN- γ single-color ELISPOT kit (Immunospot, mIFN γ -2M)에 동봉된 CTL media를 이용하여 1e06 cell/ml 되도록 resuspension 하였다.
- [299] 상기 과정과 별도로 하기 표 21의 5종 에피토프에 해당하는 각 peptide를 CTL media 20 μ M 되도록 희석하여 restimulation peptide media를 제작하였고, 상기 ELISPOT kit에 동봉된 ELISPOT 용 96 well plate의 각 well에 상기 준비된 세포 suspension 및 peptide media를 각 100 μ l씩 분주하고 16시간 이상 배양하였다. 음성 대조군으로 peptide media를 첨가하지 않고 배양하였다.
- [300] [표21]

펩타이드 종류	Peptide sequence	서열 번호
NY-ESO-1	SLLMWITQC	147

MAGE-A3	FLWGPRALV	148
Survivin	LMLGEFLKL	149
Multi MAGE-A	YLEYRQVPV	150
Melan A	ELAGIGILTV	151

- [301] (상기 표 21에서, Multi MAGE-A은 MAGE-A의 여러 subfamily 항원들에서 공통적으로 나타나는 항원 서열을 의미한다)
- [302] 배양 후, 사용자 매뉴얼에 따라 검출 반응을 진행하고, ELISPOT plate analyzer (Immunospot)를 이용하여 분석하였고, 그 결과를 도 16에 나타내었다.
- [303] ELISPOT 분석 결과, no CP 대비 CP23, CP31, CP33 및 CP38 조합에서 다수 에피토프에 대한 면역원성이 증가한 것을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] 항원 단백질의 mRNA;
상기 항원 단백질의 mRNA 5' 말단에 연결된 제1 캐리어 단백질을
암호화하는 mRNA; 및
상기 항원 단백질의 mRNA 3' 말단에 연결된 제2 캐리어 단백질을
암호화하는 mRNA를 포함하는, 컨쥬게이트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 제1 캐리어 단백질 및 제2 캐리어 단백질은
동일하거나 상이하며, 각각 Ub (ubiquitin), UBR (ubiquitin A77R mutant),
Lamp, mODC (mouse ornithine decarboxylase), cmyc, SORT1 (sortilin 1),
TRX (Thioredoxin), PSBD (peripheral subunit-binding domain), TRXwt-UBR,
TRXwt-Lamp, TRXwt-mODC, TRXwt-cmyc, TRXwt-SORT1, SORT1 w/TM
및 Lamp w/TM으로부터 선택된 1종 이상인, 컨쥬게이트.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 제1 캐리어 단백질 및 제2 캐리어 단백질은 다음의
표 1에 나타난 단백질 조합으로부터 선택된 것인, 컨쥬게이트:
[표 1]

CP_set	N-term (제1 캐리어 단백질)	C-term (제2 캐리어 단백질)
CP01	TRXwt	PSBD
CP11	UbR	mODC
CP12	UbR	SORT1
CP13	Lamp	mODC
CP14	Lamp	SORT1
CP21	UbR	c-myc
CP22	UbR	Lamp
CP23	mODC	SORT1
CP24	c-myc	mODC
CP25	c-myc	SORT1
CP26	Lamp	Ub
CP27	Lamp	c-myc
CP28	SORT1	mODC
CP31	mODC	Ub
CP32	mODC	c-myc
CP33	mODC	Lamp
CP34	c-myc	Ub
CP35	c-myc	Lamp
CP36	SORT1	Ub
CP37	SORT1	c-myc
CP38	SORT1	Lamp
CP41	TRXwt	c-myc
CP42	TRXwt	Lamp
CP43	TRXwt	mODC
CP44	TRXwt	SORT1
CP45	TRXwt	Ub
CP46	c-myc	TRXwt
CP47	Lamp	TRXwt
CP48	mODC	TRXwt
CP49	SORT1	TRXwt
CP50	UbR	TRXwt
CP112	TRXwt-UbR	SORT1
CP113	TRXwt-Lamp	mODC
CP123	TRXwt-mODC	SORT1
CP131	TRXwt-mODC	Ub
CP133	TRXwt-mODC	Lamp
CP134	TRXwt-c-myc	Ub
CP136	TRXwt-SORT1	Ub
CP138	TRXwt-SORT1	Lamp
CP201	TRXwt	SORT1 w/ IM
CP202	Lamp w/ IM	TRXwt

[청구항 4]

제2항에 있어서,

상기 UbR은 서열번호 1의 아미노산 서열;

상기 Ub는 서열번호 2의 아미노산 서열;

상기 Lamp는 서열번호 3 또는 4의 아미노산 서열;

상기 mODC는 서열번호 5 또는 6의 아미노산 서열;

상기 cmyc는 서열번호 7 또는 8의 아미노산 서열;
 상기 SORT1는 서열번호 9 또는 10의 아미노산 서열;
 상기 TRXwt는 서열번호 11 또는 12의 아미노산 서열;
 상기 PSBD는 서열번호 13의 아미노산 서열;
 상기 TRXwt-UbR는 서열번호 14의 아미노산 서열;
 상기 TRXwt-Lamp는 서열번호 15의 아미노산 서열;
 상기 TRXwt-mODC는 서열번호 16의 아미노산 서열;
 상기 TRXwt-cmyc는 서열번호 17의 아미노산 서열;
 상기 TRXwt-SORT1는 서열번호 18의 아미노산 서열;
 상기 SORT1 w/ TM는 서열번호 19의 아미노산 서열;
 상기 Lamp w/ TM는 서열번호 20의 아미노산 서열; 또는
 상기 TRXmt는 서열번호 145의 아미노산 서열을 포함하는 것인,
 컨쥬게이트.

[청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 제1 캐리어 단백질 및 제2 캐리어 단백질은 다음의 표 22에 나타난 단백질 조합으로부터 선택된 것인, 컨쥬게이트:

[표 22]

CP_set	N-term (제1 캐리어 단백질)	C-term (제2 캐리어 단백질)
CP12	UbR	SORT1
CP13	Lamp	mODC
CP23	mODC	SORT1
CP31	mODC	Ub
CP33	mODC	Lamp
CP34	c-myc	Ub
CP36	SORT1	Ub
CP38	SORT1	Lamp
CP47	Lamp	TRXwt
CP48	mODC	TRXwt
CP50	UbR	TRXwt
CP136	TRXwt-SORT1	Ub
CP201	TRXwt	SORT1 w/ TM
CP202	Lamp w/ TM	TRXwt

[청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 항원 단백질은 T 세포 에피토프를 포함하는 것인, 컨쥬게이트.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 T 세포 에피토프는 종양 항원, 감염원의 항원, 자가 항원 또는 알레르기 유발 항원에서 유래한 것인, 컨쥬게이트.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 종양 항원은 종양-관련 항원 (Tumor-associated antigen; TAA), 종양-특이적 항원(Tumor-specific antigen; TSA) 또는 종양유래 신생항원 (neoantigen)을 포함하는 것인, 컨쥬게이트.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 종양유래 신생항원(neoantigen)은 암 세포에 특이적으로 발현되는 돌연변이를 포함하는 것인, 컨쥬게이트.

- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 종양-관련 항원(TAA)은 mTrp2, CT (Cancer-testis) 항원, EGFR, Ova, Melan-A, PSMA(Prostate Specific Membrane Antigen), 서바이빈(Survivin), ADAbp (adenosine deaminase-binding protein), 사이클로필린 b (cyclophilin b), gp100, CRC (Colorectal associated antigen)-C017-1 A/GA733, CEA (carcinoembryonic antigen), CAP-1, CAP-2, etv6, AML1, PSA (Prostate Specific Antigen), PSA-1, PSA-2, PSA-3, MAGE (흑색종 항원 E), GAGE (G 항원), BAGE (B 흑색종 항원), RAGE (신장 종양 항원), LAGE (L 항원), NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, p53, 티로시나아제, Muc1(뮤신1), HER2/neu, p21ras, N-RAS, K-RAS, RCAS1, α -페토프로테인, E-카드헤린, α -카테닌, β -카테닌, γ -카테닌, p120ctn, PRAME, NY-ESO-1, TRP2, 맘마글로빈-A(Mammaglobin-A), 메탈로판스티물린-1(metallopanstimulin-1, MPS-1), 시토크롬 P450 이소형 (isoform) 1B1, 90K/Mac-2 결합 단백질, Ep-CAM (MK-1), HSP-70, hTERT (TRT), LEA, TAGE-1, 5T4, gp70, SCP-1, cmyc, 사이클린 B1, MDM2, p62, Koc, IMP1, TA90, OA1, CT-7, HOM-MEL-40/SSX-2, SSX-1, SSX-4, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HDAC5, MBD2, TRIP4, NY-CO-45, KNSL6, HIP1R, Seb4D, KIAA1416, IMP1, 90K/Mac-2 결합 단백질, MDM2, 또는 LMNA인, 킨쥬게이트.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 종양-특이적 항원(Tumor-specific antigen; TSA)은 M12, M20, M21, M30 또는 M44인, 킨쥬게이트.
- [청구항 12] 제7항에 있어서, 상기 감염원의 항원은 바이러스, 박테리아, 기생충, 또는 진균에서 유래한 항원인 것인, 킨쥬게이트.
- [청구항 13] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 킨쥬게이트는 상기 캐리어 단백질에 의해 하기 (i) 및 (ii)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 특성을 갖는 것인, 킨쥬게이트:
(i) CD4/CD8이 각각 processing 및 presentation pathway로 전달; 및
(ii) 상기 항원 단백질의 발현이 증가
- [청구항 14] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 킨쥬게이트를 포함하는, 면역화용 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 면역화용 조성물은 항원 보강제, 효력증강제, 방부제, 완충제, 계면활성제, 담체, 삼투제, 항산화제 및 안정화제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는 것인, 면역화용 조성물.
- [청구항 16] 제14항에 있어서, 비강내, 기관내, 경구, 피내, 근육내, 복막내, 정맥내, 결막 및 피하로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 경로로 투여되는 것인, 면역화용 조성물.
- [청구항 17] 제14항에 있어서, 상기 면역화용 조성물은 암에 대한 면역화용 조성물인 것인, 면역화용 조성물.

[청구항 18] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 컨쥬게이트 또는 이를 포함하는 백신 조성물을 암에 대한 면역화를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암에 대한 면역화 방법.