



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년06월19일  
(11) 등록번호 10-0839807  
(24) 등록일자 2008년06월13일

(51) Int. Cl.  
C07K 14/465 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2003-7004161  
(22) 출원일자 2003년03월21일  
심사청구일자 2006년09월21일  
번역문제출일자 2003년03월21일  
(65) 공개번호 10-2003-0094211  
(43) 공개일자 2003년12월11일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2001/029620  
국제출원일자 2001년09월21일  
(87) 국제공개번호 WO 2002/24746  
국제공개일자 2002년03월28일  
(30) 우선권주장  
09/667,147 2000년09월21일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US 5080895 (1992.01.14.)  
전체 청구항 수 : 총 23 항

(73) 특허권자  
4라이프 리서치, 엘.씨.  
미합중국 유타 84070, 샌디, 사우스 300 웨스트 9850  
(72) 발명자  
헨넬윌리암제이  
미국유타주84663스프링빌사우스1190이스트1159  
리슨비데이비드티  
미국유타주84057오렘이스트1600노스304  
(74) 대리인  
이병호, 장훈

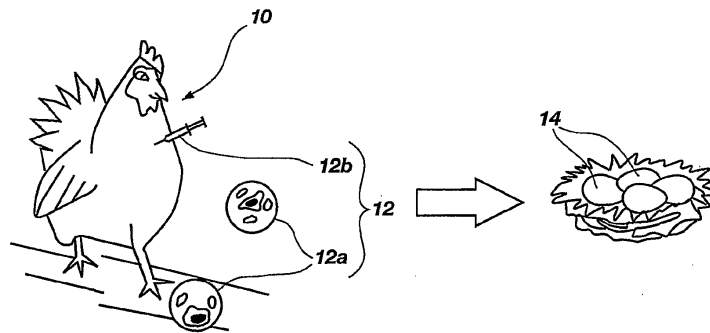
심사관 : 신원혜

(54) 조류 알로부터 수득된 전달인자

(57) 요약

본 발명은 비포유류 전달인자, 당해 비포유류 전달인자를 포함하는 조성물, 당해 비포유류 전달인자를 생성시키고 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 비포유류 전달인자는 1종 또는 그 이상의 항원에 대해 특이성이 있다. 비포유류 전달인자를 사용하는 방법은 항원 특이성 비포유류 전달인자 또는 항원 비특이성 비포유류 전달인자를 포유류에게 투여하여 당해 포유류의 병원성 감염을 치료 또는 예방함을 포함한다.

대표도 - 도1



(81) 지정국

국내특허 : 아랍에미리트, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 싱가포르, 그라나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 세르비아 앤 몬테네그로, 남아프리카, 짐바브웨, 안티구와바부다, 알제리, 벨리즈, 모잠비크, 에쿠아도르, 콜롬비아

AP ARIPO특허 : 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨, 모잠비크

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 터키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 기니 비사우, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 적도 기니

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

비포유류 공급원 동물(non-mammalian source animal)에서 T-세포 매개된 면역 반응을 유도시키는, 포유류 병원체의 1종 이상의 항원 인자(antigenic agent)를 비포유류 공급원 동물에 백신 접종시키는 단계;

비포유류 공급원 동물에서 상기 1종 이상의 항원 인자에 대한 T-세포 매개된 면역 반응을 유도시키는 단계;

T-세포 매개된 면역 반응 후, 비포유류 공급원 동물이 낳은, 생체내에서 포유류에 세포 면역을 전달하는 전달인자를 포함하는 1개 이상의 알을 수거하는 단계; 및

상기 1개 이상의 알에 존재하는 전달 인자를 농축시키는 단계

를 포함하여, 전달인자를 수득하는 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 분자량이 8,000Da 이상인 단백질이나 펩타이드로부터 전달인자를 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 3**

제1항 또는 제2항에 있어서, 비포유류 공급원 동물의 백신 접종 단계가, 조류 공급원 동물에 1종 이상의 항원 인자를 백신 접종시킴을 포함하는 방법.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 조류 공급원 동물의 백신 접종 단계가, 암탉에 1종 이상의 항원 인자를 백신 접종시킴을 포함하는 방법.

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

제1항 또는 제2항에 있어서, 백신 접종 단계가, 비포유류 공급원 동물에 뉴캐슬 바이러스(Newcastle Virus)를 백신 접종시킴을 포함하는 방법.

**청구항 7**

제1항 또는 제2항에 있어서, 백신 접종 단계가, 비포유류 공급원 동물에 홍역-볼거리-풍진(measles-mumps-rubella) 백신을 접종시킴을 포함하는 방법.

**청구항 8**

제1항 또는 제2항에 있어서, 백신 접종 단계가, 비포유류 공급원 동물에 B형 간염 백신을 접종시킴을 포함하는 방법.

**청구항 9**

제1항 또는 제2항에 있어서, 백신 접종 단계가, 비포유류 공급원 동물에 엡스타인-바아 바이러스(Epstein-Barr Virus) 항원을 백신 접종시킴을 포함하는 방법.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 백신 접종 단계가, 비포유류 공급원 동물에 재조합 엡스타인-바아 바이러스 백신을 백신 접종시킴을 포함하는 방법.

**청구항 11**

제1항 또는 제2항에 있어서, 백신 접종 단계가, 비포유류 공급원 동물에 에이취. 파일로리(*H. pylori*) 항원을 백신 접종시킴을 포함하는 방법.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 백신 접종 단계가, 비포유류 공급원 동물에 합성 에이취. 파일로리 백신을 백신 접종시킴을 포함하는 방법.

**청구항 13**

제1항 또는 제2항에 있어서, 백신 접종 단계가, 비포유류 공급원 동물에 복수의 항원을 거의 동시에 백신 접종시킴을 포함하는 방법.

**청구항 14**

제1항 또는 제2항에 있어서, 백신 접종 단계가, 비포유류 공급원 동물에 생백신, 약독 백신, 사멸 백신, 제조합 항원 및 천연 항원 중 1종 이상을 백신 접종시킴을 포함하는 방법.

**청구항 15**

제1항 또는 제2항에 있어서, 1개 이상의 알을 수거하는 단계가 백신 접종한 지 7일 이상 후에 실시되는 방법.

**청구항 16**

제1항 또는 제2항에 있어서, 농축 단계가 1개 이상의 알의 난황의 수용성 분획을 수거하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 17**

제1항 또는 제2항에 있어서, 농축 단계가 1개 이상의 알의 수용성 분획으로부터 거의 모든 항체를 제거함을 포함하는 방법.

**청구항 18**

비포유류 공급원 동물에서 병원체에 대한 2차 면역 반응을 유도하기 위한 1종 이상의 항원 인자를 상기 비포유류 공급원 동물에게 투여하는 단계;

비포유류 공급원 동물에서 상기 1종 이상의 항원 인자에 대한 2차 면역 반응을 유도시켜 상기 2차 면역 반응 결과로 상기 병원체에 특이적인 전달인자를 생성시키는 단계; 및

상기 2차 면역 반응 후 상기 병원체에 특이적인 전달인자를 비포유류 공급원 동물의 1개 이상의 알로부터 수거하는 단계

를 포함하여, 전달인자를 수득하는 방법.

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

제18항에 있어서, 수거 단계가, 1개 이상의 알에 존재하는 분자량이 8,000Da 이상인 다른 단백질이나 펩타이드로부터 전달인자를 정제하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 실질적으로 정제하는 단계가, 다른 단백질이나 펩타이드를 용액으로부터 침전시킴을 포함하는 방법.

**청구항 22**

제18항에 있어서, 투여 단계가, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 볼거리 바이러스, B형 간염 바이러스, 뉴캐슬

바이러스 및 엡스타인-바아 바이러스 중 1종 이상에 대한 2차 면역 반응을 비포유류 공급원 동물에서 유도시키는 1종 이상의 항원 인자를 비포유류 공급원 동물에게 투여함을 포함하는 방법.

**청구항 23**

제18항에 있어서, 투여 단계가, MMR 백신, 뉴캐슬 바이러스 백신, 재조합 엡스타인-바아 바이러스 백신, 실질적으로 정제된 엡스타인-바아 바이러스 항원 및 재조합 B형 간염 백신 중 1종 이상을 투여함을 포함하는 방법.

**청구항 24**

담체, 및

제1항, 제2항, 제18항 또는 제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 기재된 방법으로 수득가능하고 알에 존재하는 것보다 큰 농도로 존재하는 전달 인자 분자를 포함하는, 1종 이상의 알 유래 전달인자를 포함하는 알 추출물을 포함하는, 포유류 또는 비포유류 동물 중 중 1종 이상에서 2차 면역반응을 유도하기 위한 조성물.

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

삭제

**청구항 31**

담체, 및

비포유류 공급원 동물에서 T-세포 매개된 면역 반응을 유도시키는 1종 이상의 항원 인자를 상기 비포유류 공급원 동물에게 투여하는 단계; 비포유류 공급원 동물에서 상기 1종 이상의 항원 인자에 대한 T-세포 매개된 면역 반응을 유도시키는 단계; 및 상기 T-세포 매개된 면역 반응 후 상기 비포유류 공급원 동물로부터, 생체내에서 포유류에 세포 면역을 전달하는 전달인자를 포함하는 1개 이상의 알을 수거하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득된

1종 이상의 전달 인자를 포함하는 알 추출물

을 포함하는, 포유류 또는 비포유류 종의 동물 중 중 1종 이상에서 2차 면역 반응을 유도하기 위한 조성물.

**명세서**

- <1> 발명의 배경
- <2> 발명의 분야: 본 발명은 일반적으로 항원 특이성 전달인자를 생성시키는 방법, 이러한 항원 특이성 전달인자를 함유하는 조성물 및 이 조성물의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 조류 숙주에서 항원 특이성 전달인자를 생성시키는 방법 및 알에서 항원 특이성 전달인자를 수득하는 방법에 관한 것이다.
- <3> 관련 기술의 배경: 많은 치명적 병원체는 동물계로부터 사람에게 전파된다. 예를 들어, 원숭이는 후천성 면역결

핍증(AIDS) 및 천연두와 유사한 원숭이두창을 유발하는 사람 면역결핍 바이러스 I형(HIV-I)의 근원이고, 땅에 사는 포유류가 에볼라 바이러스의 근원인 것으로 추정되고 있으며, 과일박쥐와 돼지는 니파(Nipah) 바이러스의 근원이며, 헨드라 바이러스는 말에서 유래하고, "홍콩감기"는 병아리에서 유래하며, 야생 조류, 특히 오리는 다수의 치명적인 인플루엔자 바이러스의 근원이다. 또한, 많은 질병들은 동물 숙주를 가지고 있다. 예를 들어, 마우스는 한타 바이러스를 보유하고, 래트는 흑사병균을 보유하며 사슴은 라임병균을 보유한다.

- <4> 면역계
- <5> 척추동물의 면역계는 침입성 병원체, 예를 들어 기생충, 세균, 진균류 및 바이러스를 인지하고 이들로부터 신체를 방어하기 위한 것이다. 척추동물의 면역계는 일반적으로 세포성 성분과 비세포성 성분을 포함한다.
- <6> 면역계의 세포성 성분은 여러 종류가 있는 일명 림프구 또는 백혈구를 포함한다. 성숙한 면역계의 세포성 성분은 일반적으로 침입성 병원체에 대해 1차적인 비특이성 반응을 일으키는 것은 물론 병원체에 대해 2차적인 특이성 반응에도 관여하는 것이다.
- <7> 병원체 감염에 대한 1차 또는 초기 반응에서 식세포로 알려진 백혈구 세포는 침입 병원체의 위치를 파악하고 공격한다. 일반적으로, 식세포는 병원체를 내재화하거나 또는 "먹고", 병원체를 소화시킨다. 또한, 백혈구는 병원체를 공격하거나 또는 병원체에 대한 공격 유도를 보조하는 화학물질을 병원체 감염에 대한 반응으로 분비한다.
- <8> 일단 침입성 병원체에 의한 감염이 1차 면역반응을 계속적으로 피해간다면 그 병원체에 대한 특이적인 2차 면역반응이 필요할 것이다. 이와 같은 2차 면역반응은 일반적으로 지연되므로, "지연형 과민성"으로 알려져 있다. 포유류 스스로는 일반적으로 병원체에 감염된 후 약 7일 내지 약 14일이 경과할 때까지 병원체에 대한 2차 면역반응을 유발하지 않는다. 이러한 2차 면역 반응은 특정 병원체에 대한 후천적 면역성이라고도 한다. 병원체는 "항원"이라고 하는 1종 또는 그 이상의 특징적인 단백질을 갖고 있다. 2차 면역 반응에서 B 림프구, 또는 "B-세포"로 알려진 백혈구와 T 림프구 또는 "T-세포"는 병원체의 1종 또는 그 이상의 항원을 인식하기 위하여 "학습"한다. B-세포와 T-세포는 함께 작업하여 병원체의 1종 또는 그 이상의 특정 항원에 특이적인 "항체"라고 하는 단백질을 생성시킨다.
- <9> T-세포는 주로 병원체나 항원 인자(antigenic agent)에 대한 2차적 또는 지연형의 과민성 면역 반응에 주요 역할을 한다. T-세포에는 3가지 종류가 있다: 즉 T-헬퍼 세포, T-억제 세포 및 세포독성("세포 사멸"을 의미함) T-림프구("CTL") 또는 T-킬러 세포라고도 하는 항원 특이성 T-세포. T-헬퍼 및 T-억제 세포는 특정 항원에 특이적이지 않은 반면 감염된 숙주로부터 항원 인자 또는 병원체 제거를 보조하는 조절 기능(예컨대 일반적으로 감염에 따른 염증)을 수행한다.
- <10> 면역계의 비세포 성분 중 단지 일부를 구성하는 항체는 특정 항원을 인식하여 "항원 특이성"이라 한다. 이어서, 생성된 항체는 기본적으로 신체의 병원체의 위치를 파악하여 제거하는 백혈구 세포를 보조한다. 일반적으로, 백혈구 세포가 병원체에 대한 항체를 생성시키면 그 백혈구 세포와 이의 자손들은 모두 그 항체를 계속 생산한다. 감염이 사라지면, 인식된 항원에 대응하는 T-세포와 B-세포의 소수가 "휴지" 상태로 유지된다. 대응하는 병원체 또는 항원 인자가 다시 숙주에 감염되면 "휴지"성의 T-세포와 B-세포가 활성화되고 약 48시간 내에 면역반응을 신속하게 유도한다. 이와 같은 방식으로 대응하여 면역계는 병원체에 대한 2차 면역 반응을 일으키고, 이와 같은 면역계는 그 병원체에 대해 "기억"성이 있다고 한다.
- <11> 포유류 면역계도 역시 감염성 병원체에 대한 2차 면역 반응의 일부로서 "전달인자"로 알려진 보다 작은 단백질을 생산하는 것으로 알려져 있다. 전달인자는 포유류 면역계의 다른 비세포성 부분이다. 항원 특이성 전달인자는 항체와 구조적으로 유사하나 크기가 훨씬 작은 분자인 것으로 추정되고 있다. 항원 특이성 전달인자 및 항체는 모두 항원 특이성 부위를 포함하고, 각각의 작동 세포 상에 존재하는 수용체 부위와 상호작용하는 고도 보존성 영역을 포함하고 있다. 전달인자 및 항체 분자에는 항원 특이성 부위와 고도 보존성 영역을 연결하는 제3의 "링커" 영역이 있다.
- <12> 면역계에서의 전달인자의 역할
- <13> 전달인자는 림프구의 저분자량 분리물이다. 엄밀히 말하면, 전달인자는 단일 항원에 대해 특이성이 있다. 미국 특허 제5,840,700호 및 제5,470,835호(모두 커크패트릭(Kirkpatrick) 등이 특허권자로서 이하 "커크패트릭 특허"라고 총칭한다)에서는 특정 항원에 특이적인 전달인자의 분리에 대하여 개시한다. 보다 포괄적으로 보면, "특이성" 전달인자는 노노클로날 림프구의 세포 배양물로부터 생성된다. 이러한 전달인자들은 단일 병원체에 대하여 생성되지만, 그 병원체의 다양한 항원성 부위에 대하여 특이성을 가진다. 따라서, 이러한 전달인자는 항원

특이성이라기 보다는 "병원체 특이성"이라고 부른다. 이와 마찬가지로, 특정 병원체에 감염된 숙주에서 수득되는 전달인자는 병원체 특이성이다. 이러한 제조물들은 당업계에서 특정 항원이 존재할 때 2차 면역 반응을 유도하는 성질로 인하여 "항원 특이성"이라고 부르지만, 상이한 특이성을 가진 전달인자들이 존재할 수 있다. 따라서, 일명 "항원 특이성"이라고 하더라도 병원체 특이성 전달인자 제조물은 다양한 항원에 특이적일 수 있다.

- <14> 또한, 항원 특이성이며 병원체 특이성인 전달인자는 이 전달인자 분자가 특이성을 나타내지 않는 병원체 또는 항원에 대하여 숙주가 지연형 과민성 면역반응을 유인할 수 있게 하는 것으로 추정되고 있다. 전달인자는 감염성 병원체나 항원 인자에 대하여 최소한 비특이적 T-세포, T-유도인자 및 T-억제세포를 "유인해내어" 감염성 병원체나 항원 인자에 대한 2차 또는 지연형 과민성 면역 반응을 용이하게 유발시킨다.
- <15> 일반적으로, 전달인자는 면역학적 활성이 있는 포유류 공급원(mammalian source)에서 수득되고 분자량이 약 10000달톤(D) 미만인 단백질 분리물을 포함한다. 전달인자는 시험관내 또는 생체내에서 포유류 면역세포계에 첨가되면 수용체 포유류 면역계의 반응을 향상시키거나 정상화시킨다고 알려져 있다.
- <16> 신생아의 면역계는 일반적으로 침입성 병원체에 대하여 신생아를 효과적으로 방어하기에 충분하게 발달되거나 "성숙"되어 있지 않다. 더욱이, 출생하기 전에는 많은 포유류들은 자신의 모친을 통해 다양한 병원체에 대하여 보호받는다. 따라서, 많은 신생 포유류는 다양한 병원체에 대한 2차 반응을 즉시 유도해 낼 수 없다. 오히려, 신생 포유류는 일반적으로 자신의 모친으로부터 병원체에 대한 2차 면역성을 제공받는다. 모친이 신생 포유류의 면역계를 자극하는 알려진 1가지 방식은 전달인자 세트를 신생 포유류에게 제공하는 것이다. 포유류에서 전달인자는 일반적으로 1일 또는 2일 후 모유로 바뀌는 초유를 통해 모친에게서 신생 포유류로 제공된다. 전달인자는 기본적으로 모친의 후천적인 특이성(즉, 지연형 과민성) 면역성을 신생 포유류에게 전달한다. 이와 같이 전달된 면역성은 일반적으로 신생 포유류의 면역계가 스스로 병원체로부터 신생 포유류를 방어할 수 있을 때까지 항원 특이성 방식은 물론 항원 비특이성 또는 병원체 비특이성 방식으로 신생 포유류 면역계 세포가 병원체에 대하여 반응하도록 조정한다. 따라서, 전달인자가 존재하는 경우에는 신생 포유류의 면역계는 일반적인 지연형 과민 반응으로 일어나는 것과 같은 과민 반응으로 병원체에 반응하도록 조정된다. 따라서, 전달인자는 병원체에 대한 면역계의 반응성을 "급상승(jump-start)"시킨다고 한다.
- <17> 전달인자에 관한 많은 연구가 최근 들어 수행되었다. 현재, 전달인자는 약 44개 아미노산 길이의 단백질로 추정되고 있다. 전달인자는 분자량이 약 4000 내지 약 5000달톤(D), 즉 약 4 내지 약 5kD 범위인 것으로 추정되고 있다. 또한 전달인자는 3가지 기능성 분획을 포함한다고 추정되고 있다: 즉 유도인자 분획; 면역 억제인자 분획; 및 항원 특이성 분획이다. 당업자들은 대부분 전달인자가 또한 포유류 면역계의 2차 면역반응을 유인하는 전달인자의 성질을 향상시킬 수 있고 단백질 분자에 연결되거나 분리될 수도 있는 뉴클레오사이드 부분을 포함하고 있다고 추정되고 있다. 뉴클레오사이드 부분은 전달인자의 유도인자 또는 억제인자 분획의 일부분일 수 있다.
- <18> 항원 특이성 전달인자의 항원 특이성 영역은 약 8개 내지 약 12개 아미노산을 포함하는 것으로 추정되고 있다. 약 10개 아미노산으로 이루어진 제2의 고도 보존성 영역은 최고 친화성 T-세포 수용체 결합 영역인 것으로 추정되고 있다. 나머지 아미노산은 두 활성 영역을 연결하는 작용을 하거나 부가적이지만 아직 밝혀지지 않은 성질을 갖고 있을 수 있다. 항체의 공지된 항원 특이성 구조와 유사하나 분자량 크기면에서 훨씬 작은 전달인자 분자의 항원 특이성 영역은 초가변성(hyper-variable)인 것으로 나타나며 1종 또는 그 이상의 병원체에 존재하는 특징적인 단백질을 인식하도록 개조되어진다. 유도인자 및 면역 억제인자 분획은 세포가 자신의 환경에서 병원체 자극에 더욱 충분히 반응성을 나타내도록 면역계의 다양한 세포를 조정하는 성질을 전달인자에 부여하는 것으로 추정되고 있다.
- <19> 비세포성 면역계 성분의 공급원
- <20> 통상적으로, 전달인자는 젖소의 초유에서 수득되어진다. 젖소는 일반적으로 다량의 초유를 생산하고, 이에 따라 비교적 단기간에 다량의 전달인자를 생산하는 반면 젖소는 단지 1년에 약 1일 또는 1.5일 동안에만 초유를 생산한다. 즉, 젖소는 전달인자의 일정한 공급원이나 전달인자의 효과적인 공급원이 아니다.
- <21> 전달인자는 또한 다양한 다른 포유류 공급원에서도 수득되어 왔다. 예를 들어, 연구용 전달인자인 경우에는 전달인자 공급원으로 마우스를 사용하였다. 일반적으로 항원을 마우스내로 경피 투여한 다음, 항원에 대한 지연형 과민성 반응 후에 죽이면, 마우스의 비장 세포로부터 전달인자가 수득되어진다.
- <22> 항체를 생성시키는 데에는 여러 가지 기작이 일반적으로 사용되는 반면 항체의 본래 근원은 또한 포유류이다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 마우스, 토끼 또는 다른 포유류에게 항원을 주사한 뒤, 이 포유류로부터 항체 생



성 세포를 수득하고, 그 다음 항체 생성 세포와 불멸화된 세포를 융합시켜 모노클로날 항체를 세포의 수 세대를 거쳐 장기간 동안 계속 생성하는 하이브리도마 세포주를 제조하여 수득할 수 있다.

- <23> 포유류 병원체에 대한 항체는 마우스, 토끼, 돼지, 소 및 다른 포유류를 비롯한 다양한 공급원으로부터 수득되고 있다. 또한, 일반 감기와 같은 몇가지 사람 질병을 유발하는 병원체는 새가 숙주인 것으로 알려져 있다. 조류(즉, 새) 면역계와 포유류 면역계가 매우 유사하다는 것이 인식되기 시작함으로써 몇몇 연구자들은 항체 생성의 근원으로서 조류를 사용하고 있다.
- <24> 1992년 1월 14일에 도쿄로(Tokoro)가 특허허여받은 미국 특허 제5,080,895호(이하, '895 특허라고 함)는 신생 포유류에서 장염 질환을 유발하는 병원체를 암탉에게 주사하는 것을 포함하는 방법을 개시하고 있다. 이 암탉은 그 다음 상기 병원체에 특이적인 항체를 생산하는데 이 항체는 암탉이 낳은 알에 존재한다. 이 '895 특허는 이 병원체 특이성 항체를 포함하는 조성물과 신생 새끼돼지 및 송아지의 장 질환을 치료 및 예방하는데 사용하기 위한 조성물의 용도를 개시하고 있다. 또한, '895 특허는 병원체 특이성 전달인자 유사 물질이 암탉에서 그 알로 전파된다고 추측하고 있다. 그럼에도 불구하고, '895 특허는 그러한 전달인자 유사 물질이 실제로 알에 존재하는지 또는 이 전달인자 유사 물질을 포함하는 것으로 추측된 알에서 얻어진 무항체 조성물이 실제로 신생 포유류 중의 장 질환을 치료 또는 예방하는지에 대해서는 개시하고 있지 않다. 사실상, '895 특허는 항체로부터 전달인자를 분리하기 위하여 구멍의 직경이 약 0.45 $\mu$ m인 여과기의 사용을 개시하고 있다. 하지만, 당업자라면 잘 알다시피, 항체, 거대 분자, 바이러스 및 심지어 일부 세균은 0.45 $\mu$ m 여과기의 공극을 통해 통과한다. 실제로, 분자량이 약 12,000D 미만인 임의의 단백질 분자를 각각 상기 여과기로 분리할 수는 없는 것이다. 특히, 사용된 여과기의 공극 크기에 근거해 볼 때 항체를 비롯한 각 단백질 분자가 여과기에 의해 분리되었다는 것은 더욱 가능성이 없는 것이다.
- <25> 또한, 포유류 병원체에 특이적인 조류 항체는 항원을 알에 도입시켜 수득한 바 있다.
- <26> 조류 항체를 이용한 포유류의 병원체 감염 치료는 일반적으로 포유류의 면역계가 큰 조류 항체 분자 자체에 대해 면역반응을 유인함으로써 그 항체 분자에 대해 부정적으로 반응할 가능성이 있기 때문에 바람직하지 않다. 더욱이, 포유류 면역계는 조류 항체를 특정 병원체 또는 이 병원체의 항원에 대한 조류 항체의 특이성을 인식하는 성질에 유용한 것으로 인식하지 못하는 바, 조류 항체는 포유류내에 바람직한 면역 반응을 유인해내지 못한다.
- <27> 본 발명자들이 알고 있는 바로는, 비포유류 공급원에서 전달인자를 생성시키는 방법, 이러한 비포유류 공급원, 예컨대 조류원으로부터 전달인자를 수득하는 데 효과적인 방법, 또는 이러한 전달인자를 병원체 감염을 치료 또는 예방하는 데 사용하는 방법을 교시하는 종래 문헌은 전혀 존재하지 않는다.
- <28> 발명의 설명
- <29> 본 발명은 비포유류 공급원에서 전달인자를 생성시키고 비포유류 공급원으로부터 전달인자를 수득하는 방법에 관한 것이다. 또한, 이와 같은 비포유류의 전달인자를 함유하는 조성물도 이 조성물을 사용하는 방법과 함께 본 발명의 영역에 포함되는 것이다.
- <30> 본 발명에 따라 생성, 수득 및 사용되는 비포유류 전달인자는 항원 비특이성이거나 항원 특이성(즉, 1종 또는 그 이상의 항원에 결합하거나 인식하도록 구성됨)일 수 있다. 다른 표현이 없는 한, 본 명세서에 사용된 "전달인자(transfer factor)"란 용어는 종래 기술된 포괄적 정의를 포함하는 것으로서, 병원체 특이성, 항원 특이성 전달인자를 비롯한 다양한 종류의 각 전달인자 및 특정 병원체나 항원 인자에 특이적이지 않은 전달인자를 포함한다. 전달인자와 관련하여 본 명세서에 사용된 "비특이성"이란 용어는 특정 항원에 특이적이지 않은 전달인자 및 상이한 항원 특이성을 가진 전달인자들을 포함하는 혼합물을 모두 의미하는 것이다.
- <31> 비특이성 전달인자로는 비포유류 공급원 동물이 이미 생산하는 전달인자를 포함한다. 이와 같은 공급원 동물에 의해 생산되는 각각의 비특이적 전달인자의 분자는 그 공급원 동물의 환경에 존재하는 병원체를 비롯한 다양한 항원 인자에 특이성이 있을 수 있다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 목적상 단순히 공급원 동물의 환경에 대한 반응에 의해 생성되는 전달인자는 "비특이성"이라 부른다.
- <32> 한편, 항원 특이성 전달인자는 비포유류 공급원 동물을 1종 또는 그 이상의 항원에 노출시킴으로써 생성된다. 비포유류 공급원에서 비특이성 전달인자의 생성을 유도하기 위하여 본 발명자들에 의해 발견된 항원에는 다양한 종류의 병원체의 항원, 예컨대 세균, 바이러스, 진균류 및 기생충의 항원이 있으며, 이것에 국한되는 것은 아니다. 항원 특이성 전달인자는 천연 항원(예컨대, 살아있는 공급원, 불활성화 공급원 및 약독 공급원 유래의



항원) 및 합성 항원 모두에 의해 비포유류 공급원 동물에서 생성시킨 바 있다.

- <33> 비포유류 공급원 동물에서의 전달인자의 생성은 특정 병원체에 특징적인 항원을 암컷의 비포유류 공급원 동물에 도입시킴으로써 유도할 수 있다. 사용될 수 있는 공급원 동물의 종류로는 예컨대 조류, 파충류, 양서류 및 어류가 있으나, 본 발명의 범위가 이것에 국한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 비포유류 공급원 동물은 자주 알을 생산하는 것이 좋다. 따라서, 본 발명의 목적상 비포유류 공급원 동물으로서 특히 암탉이 유용하다. 비포유류 공급원 동물은 이 공급원 동물의 알에서 나타나는 전달인자를 생성한다. 또는, 비포유류 공급원 동물의 알을 항원 인자에 노출시켜(예컨대 알에 항원 인자를 주사하여) 알 자체에 의한 전달인자의 생성을 유도할 수 있다.
- <34> 비포유류 공급원 동물 또는 비포유류 공급원 동물의 알에 의해 생성된 전달인자는 알에서 회수하여 알의 다른 성분들, 예컨대 항체와 같은 분자량이 보다 큰 단백질 등으로부터 분리할 수 있다. 또는, 전달인자는 비포유류 공급원 동물의 1종 이상의 알로부터 정제할 수도 있다.
- <35> 비포유류 전달인자는 포유류 또는 비포유류 피검체에 투여하기 위한 조성물이나 장치에 첨가하거나 또는 피검체에 직접 투여할 수도 있다. 비포유류 전달인자 또는 이와 같은 비포유류 전달인자를 함유하는 조성물은 장 투여(즉, 경구) 또는 비경구(즉, 주사, 경피 등과 같은 비경구 경로)로 투여할 수 있다. 비특이성 및 특이성 비포유류 전달인자의 투여는 포유류내에서 다양한 침입 병원체에 대한 초기의 특이적(즉, 2차적) 면역 반응을 개시시키는 것으로 밝혀져 있다. 따라서, 비포유류 전달인자는 상기 다양한 병원체에 의해 유발될 수 있는 질병을 치료 및 예방하는 데 유용한 것으로 밝혀져 있다.
- <36> 본 발명의 다른 특징과 잇점은 이하의 설명과 첨부되는 도면 및 청구의 범위를 통해 당업자에 의해 분명하게 이해될 것이다.

**도면의 간단한 설명**

- <37> 본 발명의 예시적 구체예를 나타낸 도면에서,
- <38> 도 1은 비포유류 공급원 동물에서 비포유류 전달인자를 생성시키는 방법을 예시한 모식도이다.
- <39> 도 2는 비포유류 공급원 동물의 알에서 비포유류 전달인자를 직접 생성시키는 방법을 예시한 모식도이다.
- <40> 도 3은 알에서 비포유류 전달인자를 수득하는 방법을 예시한 모식도이다.
- <41> 도 4는 용액 중의 전달인자의 존재를 시험하고 병원체에 의한 감염을 예방하거나 병원체 감염을 치료하는데 전달인자를 사용하는 방법을 예시한 모식도이다.
- <42> 발명을 실시하기 위한 최상의 양태(들)
- <43> 전술한 바와 같이, 포유류 모친은 전달인자를 초유를 통해 신생아에게 전달하며 이는 약 1일 또는 2일 후 모유로 대체된다. 초유에 존재하는 전달인자는 특정 항원에 대한 지연형 과민성을 전달하여, 유아가 특정 병원체에 의해 감염된 경우 그 특정 병원체에 대한 신생아 면역계의 응답 반응의 성질을 "급상승"시킨다.
- <44> 최근 들어, 조류(즉, 새) 면역계가 포유류와 매우 유사한 것으로 밝혀졌다. 사실, 면역계 성분들에 대한 초기 연구는 조류에 대한 것이었다. 이와 같은 면역계의 초기 연구 결과, 전술한 백혈구 세포 종류 중 하나인 B-세포는 새의 포낭에서 발견되었기 때문에 그와 같이 명명되었다. 또한, 일반 감기를 유발하는 몇몇 바이러스 및 독감 바이러스를 비롯한 다양한 감염 인자도 조류에서 비롯되어 사람에게 전파되는 것으로 알려져 있다.
- <45> 조류의 면역계는 포유류의 면역계와 일부 유사성이 있으므로, 본 발명자들은 전달인자가 조류 면역계의 성분은 물론 비포유류 척추동물의 면역계 성분인 것으로 생각하였다. 또한, 본 발명자들은 비포유류 모친이 자신의 신생아에게 초유를 먹이지 않을지라도 전달인자에 의해 면역성을 전달하는 것으로 믿었다. 조류와, 다른 산란성 척추동물에서 전달인자를 자신의 새끼에게 제공하기 위한 모친의 1차적인 기회는 성장에 필요한 영양분과 함께 성장 수정란을 공급하는 난황에 있다. 따라서, 본 발명자들은 오래전부터 항원 비특이성 및 항원 특이성 전달인자를 알로부터 수득할 수 있을 것이라 믿어왔다.
- <46> 도 1은 전달인자의 비포유류 공급원 동물(10), 여기에서는 암탉으로부터 목적하는 전달인자를 수득하는 방법을 개략적으로 예시한 것이다. 비포유류 공급원 동물(10)은 환경적 항원 인자(12a) 또는 특이적인 항원 인자(12b)에 노출시킬 수 있다. 비포유류 공급원 동물(10)은 당해 기술분야에 공지된 주사, 경구 또는 다른 방법에 의해

특이적 항원 인자(12b)에 노출시킬 수 있다. 이와 같은 특이적 항원 인자(12b)에 대한 노출은 1회 또는 반복적으로 실시될 수 있다. 간결함을 위해 항원 인자(12a) 및 (12b)는 본 명세서에서 항원 인자(12) 또는 간단히 항원이라고도 한다.

- <47> 또는, 도 2에 도시된 바와 같이 비포유류 동물의 알(14')을 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이 주사 또는 다른 방법 등으로 1종 또는 그 이상의 항원 인자(12)에 직접 노출시킬 수도 있다.
- <48> 도 3과 관련하여, 1종 또는 그 이상의 항원 인자(12)에 직접 노출시킨 비포유류 공급원 동물(10) 또는 비포유류 알(14')에게 항원 인자(12)에 대한 2차 면역반응 또는 지연형의 과민성 면역반응을 유도할 적당한 기회를 제공한 후에 알(14)을 수거한다. 그 다음, 알(14)의 난황(16)과 난백(18)을 서로 분리하고, 난황(16)을 다양한 여과 방법으로 처리하여 전달인자를 포함하는 수용성 분획(20)을 수득한다. 항체와 같은 분자량이 보다 큰 단백질은 공지의 방법, 예컨대 분자량에 근거한 여과법이나 이와 같은 분자량이 보다 큰 단백질을 용액으로부터 침전시킨 뒤(예컨대, 저온 에틸 알코올을 이용하여), 침전물(21)을 수용성 분획(20)으로부터 제거하여(예컨대, 여과에 의해) 항체가 거의 없는 전달인자 함유 용액(22)을 수득하는 방법 등에 의해 난황(16)의 수용성 분획(20)으로부터 제거할 수 있다. 또는, 난황(16)과 난백(18)을 분리할 필요가 없다.
- <49> 또한, 난황(16)의 수용성 분획(20) 또는 용액(22)에 존재하는 항원 특이성 비포유류 전달인자는 공지의 기법을 통해 수용성 분획(20) 또는 용액(22)의 다른 성분으로부터 실질적으로 정제될 수 있는데, 그 기법으로는 미국 특허 제5,840,700호 및 제5,470,835호(이 두 특허 모두 커크패트릭 등이 출원인으로서 이하 총칭해서 "커크패트릭 특허"라고 불리는 것이며, 그 명세서들은 그대로 참고인용되고 있다)에 개시된 겔 투과 및 친화성 크로마토 그래피 기법 등이 있다. 커크패트릭 특허에 개시된 기법은 생체분자, 예컨대 전달인자 및 항체를 용액의 다른 성분들로부터 1종 또는 그 이상의 항원이나 다른 특이적 결합 인자에 대한 상기 생체분자들의 특이성에 기초하여 분리하는데 사용된다. 따라서, 커크패트릭 특허에 개시된 기법이 난황(16)의 항체 및 전달인자 함유 수용성 분획(20)에 사용되는 경우에는 전달인자와 항체 모두 수용성 분획(20)의 나머지에서 분리되어 항체와 전달인자를 모두 함유하는 최종 용액(24)을 수득할 수 있다. 한편, 커크패트릭 특허에 개시된 기법이 항체가 실질적으로 없는 전달인자 함유 용액(22)에 실시되는 경우에는, 그 산물은 1종 또는 그 이상의 항원에 특이적인 전달인자로 이루어진 실질적으로 순수한 용액(26)일 것이다. 물론, 알에서 전달인자를 수득할 수 있는 다른 방법들도 본 발명의 범위에 속하는 것으로서, 그러한 방법에는 알 전체 또는 난황의 분말이나 동결건조물을 비롯한 다양한 알 제조물로부터 전달인자를 수득하는 방법 등이 있다.
- <50> 이제 도 4를 살펴보면, 마우스 족저 검정법으로 알려져 있는, 용액에서 1종 또는 그 이상의 항원에 특이적인 비포유류 전달인자의 존재를 시험하는 예시적 방법이 개략적으로 도시된다.
- <51> 조류의 전달인자에 특이적인 특정 항원이나 병원체에 대하여 마우스가 2차 면역반응을 유발하도록 하는데 있어서 조류의 전달인자의 효과를 시험하기 약 7일 전에 6마리의 암컷 BALB/c 마우스의 포지티브 대조군을 준비한다. 약 9주령 내지 약 10주령인 포지티브 대조군의 각 마우스(30)는 이소플루란으로 마취시켰다. 시험할 조류 전달인자가 특이성을 보이는 특정 항원(36)과 프루인트 보조제(Freund's adjuvant) 50/50(wt/wt) 혼합물 약 0.02ml를 2회의 근육내 주사, 즉 꼬리(38)의 기부(39) 양측에 1회씩 주사하여 각 마우스(30)에게 투여한다. 이와 같은 주사를 마우스 족저 검정을 실시하기 약 7일 전에 시술하면 포지티브 대조군의 마우스는 항원(36)에 대한 자신의 2차 면역반응이나 지연형의 과민반응을 발생시키게 된다.
- <52> 마우스 족저 시험 약 24시간 전에 약 9주령 내지 약 10주령(즉, 포지티브 대조군의 마우스와 대략 동일한 주령)인 6마리의 암컷 BALB/c를 포함하는 1차 시험 집단의 마우스도 역시 이소플루란으로 마취시킨다. 이와 같은 1차 시험 집단의 각 마우스(30)에게 조류의 전달인자와 조류의 항체를 증류수에 재구성시킨 제제를 포함하는 용액(20), (24) 약 0.5ml를 목(40) 뒤에 경피 주사로 투여한다. 이와 같이 처리한 마우스에서 수득되는 결과를, 항체가 실질적으로 없는 제제로 처리한 2차 시험 집단에 해당하는 마우스로부터 수득한 결과와 비교하여 팽창에 미치는 전달인자와 항체의 상대적 영향을 측정할 수 있다. 항체는 2차 면역을 유발하지 않으므로, 본 명세서에 기술된 실험을 수행하기 전에는 1차 시험 집단과 2차 시험 집단의 마우스에서 나타나는 2차 면역반응의 측정값이 매우 유사할 것으로 생각했었다.
- <53> 약 9주령 내지 약 10주령(즉, 포지티브 대조군 및 1차 시험 집단의 마우스와 대략 동일한 주령)인 6마리의 암컷 BALB/c 마우스를 포함하는 2차 시험 집단의 각 마우스도 이소플루란으로 마취시킨다. 6마리 마우스(30)마다 항체가 실질적으로 없는 동결건조된 항원 특이성 조류 전달인자 제제를 증류수에 재구성시킨 용액(22, 26) 약 0.5ml을 뒷목(40)에 경피 주사하여 투여한다.

- <54> 네가티브 대조군도 약 9주령 내지 약 10주령(즉, 다른 3 마우스군과 대략 동일한 주령)인 6마리의 암컷 BALB/c 마우스를 포함한다.
- <55> 마우스 족저 검정을 실시하기 위하여 4개 집단의 각 마우스를 마취시키고 각 마우스(30)의 가장 넓은 우측 후방 족저(32)와 가장 넓은 좌측 후방 족저(34)의 간격을 스타렛(Starrett) 게이지 등을 이용하여 측정한다. 그 다음, 우측 후방 족저(32)에 항원(36) 함유 용액을 경피 주사한다. 대조용으로 사용된 좌측 후방 족저(34)에는 우측 후방 족저(32)에 주사한 용액 부피와 대략 동일한 부피의 대조 용액(37), 예컨대 멸균된 식염수 희석액을 주사한다.
- <56> 충분한 시간(예컨대 약 16시간 내지 약 24시간)이 경과한 후 각 마우스(30)를 다시 마취시키고 우측 후방 족저(32)와 좌측 후방 족저(34) 간격을 다시 측정한다. 마우스 우측 후방 족저(32) 간격 증가로 나타나는 유의적인 팽창은 그 족저(32)에 지연형 과민 반응이 발생하였음을 나타내는 것이다.
- <57> 물론, 상이한 항원에 대한 특이성이 있는 전달인자를 포함하는 상이한 용액 (24)와 (26)은 마우스에게 지연형의 과민 면역성을 전달하는 각 용액의 특성 차이를 측정하기 위하여 여러 마우스 세트를 가지고 시험할 수 있다. 또한, 각 용액의 시험 결과를 포지티브 대조군 및 네가티브 대조군의 마우스(30)에게서 얻은 결과와 비교할 수 있다. 항체가 실질적으로 없는 용액, 예컨대 도 3의 용액 (22) 또는 (26)이 투여된 마우스(30)의 우측 후방 족저(34)에 유의적인 팽창이 일어난다면 이러한 팽창을 유발시키는 지연형 과민 반응의 원인이 투여된 전달인자 때문임을 알 수 있을 것이다.
- <58> 다음 실시예는 본 발명의 교시를 포함하는 전달인자를 생성, 수득 및 사용하는 방법에 대한 구체예를 예시하는 것 뿐이다.
- <59> 실시예 1
- <60> 뉴캐슬(Newcastle) 바이러스에 특이적인 전달인자는 당업계에서 공지된 바와 같이 1일령의 병아리를 0일, 42일 및 84일째 감염성 기관지염/뉴캐슬 바이러스(IBNC) 백신의 미정제 분사액에 노출시켜 생성시켰다. 1차 IBNC 백신 주사 후 약 175일째 이 5마리 암탉이 낳은 알을 수거하였다.
- <61> 실시예 2
- <62> 실시예 1에서 얻은 항원 특이성 전달인자 함유 알의 1차 샘플의 난황을 난백으로부터 분리하고, 탈이온수에 약 6배 내지 약 9배의 부피비율(즉, 난백 약 1부에 약 5부 내지 약 8부의 물을 혼합시킴)로 희석시키고 동결시켰다. 이와 같이 동결된 난황 유래의 지질 층을 난황의 수용성 분획과 기계적으로 분리시켰다. 이 수용성 분획을 그 다음 약 4℃ 내지 약 6℃의 온도로 해동시키고 55mm 직경의 부호너 자기 깔대기를 이용하여 와트만 정성용 여지 상에서 진공여과시켰다. 여과액을 그 다음 다시 55mm 직경의 부호너 깔때기를 사용하여 유리 마이크로섬유 여과기를 통해 진공여과시켰다.
- <63> 그 다음, 3차 여과는 용액으로부터 단백질을 수거하고 지질과 지단백을 제거하기 위해 실시하였다. 3차 여과는 듀라포어(DURAPORE) 친수성 막을 이용하여 실시하였다. 감염성 기관지염 병원체와 뉴캐슬 바이러스에 특이적인 항체와 전달인자를 모두 포함하는 단백질 함유 분획을 당해 기술분야에 공지된 바와 같이 수거, 동결 및 동결건조시켰다.
- <64> 실시예 3
- <65> 실시예 1에서 수거한 알 중 2차 샘플로 만든 희석된 난황 제조물의 수용성 분획은 다시 실시예 2에 전술한 바와 같이 그 지질부로부터 기계적으로 분리한 뒤 여과하였다.
- <66> 본 명세서에 그대로 참고 인용되는 미국 특허 제4,180,627호[클레시우스(Klesius) 등]에 개시된 방법에 따라서, 상기 단백질 함유 분획에 적당부피의 에틸 알코올(EtOH) 또는 에탄올을 첨가하여 알코올-단백질 분획 용액 전체 부피의 약 60% 농도로 에틸 알코올을 희석시켰다. 이 용액을 그 다음 약 4 내지 약 6℃의 온도로, 용액에 존재하는 항체를 비롯한 큰 분자량의 단백질이 용액으로부터 침전하기에 충분한 시간 동안(예컨대, 하룻밤동안 또는 약 10 내지 12시간 동안) 냉각시켰다. 이에 반해, 난황 유래의 임의의 전달인자를 비롯하여 분자량이 작은 분자(예컨대 분자량이 약 8,000D 이하인 단백질)는 용액에 남겨졌다.
- <67> 이어서, 55mm 직경의 부호너 깔때기 중에서 와트만 유리 마이크로섬유 여과기를 통해 용액을 여과함으로써 용액으로부터 저분자량 단백질 함유 침전물을 제거한다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 셀라이트 코포레이션(Celite Corporation)(미국 캘리포니아주 롬포크 소재)에서 시판중인 규조토인 셀라이트(CELITE<sup>®</sup>)를 사용하여,

용액 여과 동안 침전물로 인해 여과기가 막히지 않게 한다. 이어서, 침전물을 거의 함유하지 않는 용액을 수거, 냉동 및 동결시킨다.

<68> 실시예 4

<69> 약 9주령 내지 약 10주령인 BALB/c 마우스 3마리를 포함하는 시험군의 각 마우스를 시험대상으로 하여 IBNV 특이성 조류 전달인자가 마우스에 대하여 조기 2차 면역 반응 또는 지연형 과민성 면역 반응을 부여하는지 여부를 측정하였다. 각 마우스는 이소플루란으로 마취시켰다. 각 마우스의 좌우 뒷발 중 가장 넓은 족저 간격을 스타렛 게이지 등을 이용하여 측정하였다. 그 다음, 각 마우스의 뒷목에 증류수에 재구성시킨 IBNV 특이성 조류 전달인자 약 16중량%를 포함하는 용액 약 0.5ml을 경피 주사하였다.

<70> 약 24시간이 경과한 후 각 마우스를 다시 이소플루란으로 마취시켰다. 각 마우스의 좌측 뒷발의 가장 넓은 족저에 멸균 식염수 0.01ml를 주사하여 이 족저를 대조군으로 사용하였고, 각 마우스의 우측 뒷발의 가장 넓은 족저에는 증류수 약 250ml로 재구성시킨 뉴캐슬 기관지염 백신 약 10,000 용량을 포함하는 용액 약 0.01ml를 주사하였다.

<71> 다시 24시간이 경과하기 전, 마우스 1마리(마우스 #1)가 죽었다. 나머지 2마리 마우스는 다시 이소플루란으로 마취시키고, 뒷발의 가장 넓은 족저를 다시 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다.

**표 1**

<72> 뉴캐슬 바이러스 - 시험 집단

	족저 크기(μm):		
	샘플 주사전	최종	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2150		
우측 발(시험군)	2151		
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2180	2350	50
우측 발(시험군)	2165	2440	85
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2145	2160	15
우측 발(시험군)	2110	2200	90

<73> 좌측 족저의 크기 또는 팽창의 증가(각각 50μm 및 15μm)에 비하여 우측 족저의 보다 큰 증가(85μm 및 90μm)는 IBNV 특이성 조류 전달인자 함유 용액이 뉴캐슬-기관지염 백신의 도입 후 약 24시간 내에 마우스 #2 및 마우스 #3의 우측 발에 지연형 과민성 반응을 유도하였음을 나타내었다.

<74> 나머지 실시예에서는 실시예 1 내지 3에 개시된 것과 거의 동일한 방법을 사용하여 여러 종류의 항원, 예컨대 홍역, 볼거리, 풍진, B형 간염, 엡스타인-바아 바이러스(EBV) 및 에이취. 파일로리(*H. pylori*) 등에 특이적인 조류 전달인자를 생성시켰다.

<75> 포유류의 조기 2차 면역반응 또는 지연형 과민성 면역 반응을 유도하는데 있어서 다양한 종류의 항원 특이성 조류 전달인자 각각의 효과를 마우스 족저 검정으로 시험하였다. 항원 특이성 조류 전달인자의 각 종류를 가지고 도 4와 관련하여 상기 설명한 바와 같이 제조한 포지티브 대조군, 1차 시험 집단, 2차 시험 집단 및 네가티브 대조군을 포함하는 4가지 종류의 마우스 군에 대하여 시험하였다. 각각의 항원 특이성 전달인자에 대한 마우스 족저 검정은 문헌[참조: Petersen EA, Greenberg LE, Manzara T, and Kirkpatrick CH, "Murine transfer factor", I. Description of the model and evidence for specificity, J.Immunol., 126:2480-84(1981), 그 명세서는 전문이 본원에 참고인용됨]의 교시에 따라 수행하였다.

<76> 각 마우스 족저 검정에서 4개 집단의 마우스는 도 4와 관련하여 설명한 바와 같이 제조하였다.

<77> 포지티브 대조군, 1차 시험 집단 및 2차 시험 집단, 네가티브 대조군 각각에 대하여 다양한 마우스 족저 검정을 실시하는데 있어서, 각 마우스는 이소플루란으로 마취시키고, 각 마우스의 좌측 뒷발의 가장 넓은 족저에는 멸



균 식염수 희석액 약 0.01ml를 주사하여 대조군으로 사용하였고, 각 마우스의 우측 뒷발의 가장 넓은 족저에는 조류 전달인자가 특이성을 나타내는 항원 또는 병원체를 포함하는 용액 약 0.01ml을 주사하였다.

<78> 후방 족저에 주사한 후 약 16시간 내지 약 24시간이 경과하면 포지티브 대조군, 시험군 및 네가티브 대조군의 각 마우스를 다시 이소플루란으로 마취시키고 마우스 각각의 좌측 및 우측 후방 족저의 크기를 예컨대 스타레트 게이지로 다시 측정하였다.

<79> 실시예 5

<80> 실시예 1 내지 3에 기술된 절차와 동일하게 홍역, 볼거리 및 풍진(MMR) 백신에 특이적인 조류 전달인자와 조류 항체를 암탉에게서 생성시켰다. 각 암탉에게는 머크(Merck)의 MMR II 백신 1회 투여량을 150일, 163일, 190일, 221일 및 249일째 실시예 1에 기재된 바와 같이 투여하였다. 3차 접종 직후, 때로는 약 192일 내지 약 223일 기간에 이 암탉들의 알을 수거하고 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다. 본 실시예와 다음 실시예들에서 실시된 이와 같은 처리는 알에 전달인자가 높은 수준으로 존재하도록 하기 위함이다. 전달인자는 1차 접종 후 약 7일이 되면 알에 나타나는 것으로 추정되고 있다.

<81> 마우스 족저 검정을 개시하기 약 7일 전에 포지티브 대조군의 각 마우스에게 머크 MMR II 백신을 도 4와 관련하여 이전에 설명한 바와 같이 주사하여 포지티브 대조군 마우스를 준비하였다.

<82> MMR 백신에 특이적인 조류 항체와 조류 전달인자를 함유하는 용액은 약 8중량%의 농도로 실시예 2에 기재된 바와 유사한 동결건조 제제를 증류수에 재구성시켜 제조하였다. 이와 같은 전달인자 및 항체 함유 용액을 도 4와 관련하여 기재된 바와 같은 방식으로 1차 시험 집단의 마우스에게 투여하였다.

<83> 실시예 3에 기재된 바와 유사한 방법으로 제조한 홍역, 볼거리 및 풍진에 특이적인 동결건조된 조류 전달인자는 약 8중량%의 농도로 증류수에 재구성시켰다. 이와 같이 재구성된 MMR 특이성 조류 전달인자는 도 4와 관련하여 이전에 설명한 바와 같이 2차 시험 집단의 마우스에게 투여하였다.

<84> 그 다음, 도 4와 관련하여 설명한 바와 같이 머크 MMR II 백신 1회 투여량 약 0.1ml을 포지티브 대조군, 1차 시험 집단, 2차 시험 집단 및 네가티브 대조군의 각 마우스의 우측 뒷발 중 가장 넓은 족저에 투여하고, 각 마우스의 좌측 뒷발 중 가장 넓은 족저에는 거의 동량의 멸균 식염수 희석액을 투여하였다.

<85> 약 16시간 내지 약 24시간 후 마우스를 다시 마취시키고 각 마우스의 양쪽 뒷발의 가장 넓은 족저 크기를 이전에 설명드린 바와 같이 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다:

**표 2**

<86> MMR 백신 - 제1 시험 집단 (항체 및 전달인자 투여)

	족저 크기(μm):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2159.00	2235.20	76.20
우측 발(시험군)	2133.60	2387.60	254.00
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2133.60	2159.00	25.40
우측 발(시험군)	2133.60	2184.40	50.80
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2159.00	2159.00	0.00
우측 발(시험군)	2159.00	2184.40	25.40
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2209.80	2235.20	25.40
우측 발(시험군)	2286.00	2311.40	25.40
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	2184.40	2184.40	0.00
우측 발(시험군)	2209.80	2260.60	50.80

마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2260.60	2336.80	76.20
우측 발(시험군)	2235.20	2438.40	203.20

<87> 마우스 #6에 대한 데이터는 2차 측정(즉, 약 16시간 내지 약 24시간 사이)이 이루어진 시기에 이 마우스의 후방 족저 중 어느 한쪽이나 양쪽에 모두 물린 표시의 가피(딱지)가 나타났기 때문에 부정확한 것일 수 있다. 그러나, 마우스 #4를 제외한 나머지 1차 시험 집단의 마우스는 각각 2차 족저 측정이 이루어진 시기에 MMR II 백신을 주사한 족저에서 대조용 용액을 주사한 족저보다 더 큰 팽창을 보였다. 마우스 #4에서는 팽창 정도가 좌우 모두의 족저에서 거의 동일하게 나타났다.

<88> 종합해보면, 표 2의 데이터로부터 알 수 있듯이 1차 시험 집단 마우스의 우측 발의 가장 큰 족저에서는 이 마우스의 좌측 발의 가장 큰 족저의 팽창보다 평균 약 67.73 $\mu$ m 더 큰 팽창을 보였다.

**표 3**

<89> MMR 백신 - 제2 시험 집단 (전달인자 단독 투여)

	족저 크기( $\mu$ m):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2082.80	2133.60	50.80
우측 발(시험군)	2108.20	2235.20	127.00
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2336.80	2387.60	50.80
우측 발(시험군)	2387.60	2641.60	254.00
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2184.40	2184.40	0.00
우측 발(시험군)	2184.40	2311.40	127.00
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2133.60	2133.60	0.00
우측 발(시험군)	2133.60	2133.60	0.00
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	2082.80	2540.00	457.20
우측 발(시험군)	2108.20	2235.20	127.00
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2260.60	2286.00	25.40
우측 발(시험군)	2286.00	2362.20	76.20

<90> 항원과 샘플을 주사한 후 약 24시간이 지나서 마우스 #2와 마우스 #5의 족저에서 물린 표시의 가피가 확인되어 이 마우스의 데이터는 부정확한 것으로 간주하였다. 또한, 마우스 #5의 좌측 발의 가장 큰 족저는 마우스 #5의 좌측 발의 상응하는 족저보다 3배 이상 팽창되었고 다른 시험 마우스의 어떤 족저에서 나타나는 팽창보다도 여 러 배 더 큰 팽창을 나타내었다. 따라서, 이와 같이 좌측 발의 족저에서 나타나는 팽창이 과도하여 마우스 #5에 서 수득된 팽창 데이터는 제외시켰다. 마우스 #4에서는 어떤 쪽 족저에서도 팽창 증가가 측정되지 않았다. 이 에도 불구하고, 마우스 #1, 마우스 #3 및 마우스 #6은 각각 대조 용액을 주사한 족저(좌측)에서보다 2차의 실질 적으로 무항체 전달인자 함유 용액을 주사한 족저(우측)에서 더 큰 팽창을 보였다.

<91> 표 3에 제시된 데이터를 기초로 하여 마우스 #1, #3 및 #6의 우측 발의 가장 큰 족저는 이 마우스들의 좌측 발 의 가장 큰 족저보다 평균 약 91.4 $\mu$ m가 더 컸다.

**표 4**

<92> MMR 백신 - 포지티브 대조군

	족저 크기( $\mu\text{m}$ ):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2184.40	2235.20	50.80
우측 발(시험군)	2184.40	2260.60	76.20
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2184.40	2209.80	25.40
우측 발(시험군)	2184.40	2209.80	25.40
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2006.60	2133.60	127.00
우측 발(시험군)	1981.20	2108.20	127.00
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2133.60	2184.40	50.80
우측 발(시험군)	2133.60	2260.60	127.00
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	2108.20	2133.60	25.40
우측 발(시험군)	2108.20	2286.00	177.80
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2082.80	2133.60	50.80
우측 발(시험군)	2057.40	2209.80	152.40

<93> 포지티브 대조군의 마우스 #2와 마우스 #3은 좌측과 우측 뒷발 모두의 가장 큰 족저에서 거의 동일한 팽창을 보이는 반면, 다른 마우스들은 각각 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 팽창이 보다 적은 이들 마우스의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저의 팽창보다 더 큰 팽창을 보였으며, 이것은 이들 마우스의 우측 뒷발의 가장 큰 족저로 투여한 MMR 백신에 대한 2차 면역 반응을 나타내는 것이다.

<94> 표 4의 데이터에 기초해 볼 때, 이 마우스들의 우측 뒷발의 가장 큰 족저의 팽창이 이 마우스들의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저의 팽창보다 평균 약  $59.27\mu\text{m}$ 가 더 크다는 것을 알 수 있다.

**표 5**

<95> MMR 백신 - 네가티브 대조군

	족저 크기( $\mu\text{m}$ ):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2159.00	2159.00	0.00
우측 발(시험군)	2159.00	2209.80	50.80
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2159.00	2159.00	0.00
우측 발(시험군)	2108.20	2133.60	25.40
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2133.60	2133.60	0.00
우측 발(시험군)	2133.60	2133.60	0.00
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2108.20	2133.60	25.40
우측 발(시험군)	2108.20	2108.20	0.00
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	2057.40	2057.40	0.00
우측 발(시험군)	2032.00	2032.00	0.00



마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2082.80	2133.60	50.80
우측 발(시험군)	2032.00	2082.80	50.80

<96> 네가티브 대조군의 마우스 중 2 마리, 즉 마우스 #3과 마우스 #5는 어떤 쪽 뒷발의 가장 족저에서도 전혀 팽창을 보이지 않았다. 마우스 #6의 양쪽 뒷발의 가장 큰 족저에서는 거의 동일한 팽창을 보였다. 마우스 #1과 마우스 #4의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서는 팽창이 나타나지 않고, 우측 뒷발의 족저에서 모두 약간의 팽창을 보인 한편, 마우스 #4의 우측 뒷발의 가장 큰 족저는 전혀 팽창되지 않고 가장 큰 좌측 후방 족저는 다만 약간의 팽창이 나타났다. 사실상, 이 마우스들의 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타나는 팽창은 네가티브 대조군 마우스의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 측정된 팽창보다 단지 평균 약 8.47 $\mu$ m 정도 더 큰 것이었다. 결론적으로, 표 5의 데이터는 네가티브 대조군의 마우스는 MMR 백신에 대한 2차 면역 반응을 유도하지 않았음을 시사하는 것이다.

<97> 표 2 내지 5의 데이터를 종합해보면, 1차 시험 집단, 2차 시험 집단 및 포지티브 대조군에 속하는 마우스는 대부분 2차 면역반응 또는 지연형 과민성 면역 반응을 나타내는 반면, 네가티브 대조군에서는 이와 같은 2차 면역 반응을 전혀 나타내지 않음을 알 수 있다. 따라서, 표 2와 3의 데이터는 MMR 백신에 특이적인 조류 전달인자는 물론 MMR 백신에 특이적인 조류 항체가 포유류에 조기 2차 면역반응을 유도할 수 있다는 것을 시사한다.

<98> 실시예 6

<99> 실시예 1 내지 3에서 이미 기술한 절차를 반복하여, B형 간염 바이러스에 특이적인 조류 전달인자와 조류 항체를, 상표명 엔저릭스(ENGERIX)-B로 시판되는 합성 B형 간염 백신을 사용하여 생성시켰다. 각 암탉에게는 B형 간염 백신 1 투여량을 150일, 163일, 190일, 221일 및 249일째 실시예 1에 기재된 바와 같이 투여하였다. 실시예 1에 기술한 바와 같이 때로 약 193일과 약 223일 사이의 기간에 이 암탉들의 알을 수거하고 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다.

<100> 마우스 족저 검정을 개시하기 약 7일 전에 포지티브 대조군의 각 마우스에게 합성 B형 간염 백신인 엔저릭스-B를 도 4와 관련하여 이전에 설명한 바와 같이 주사하여 포지티브 대조군 마우스를 준비하였다.

<101> B형 간염 백신에 특이적인 조류 항체와 조류 전달인자를 함유하는 제1 용액은 약 16중량%의 농도로 실시예 2에 기재된 바와 유사한 동결건조 제제를 증류수에 재구성시켜 제조하였다. 이와 같은 전달인자 및 항체 함유 용액을 도 4와 관련하여 기재한 바와 같은 방식으로 1차 시험 집단의 마우스에게 투여하였다.

<102> 실시예 3에 기재된 바와 유사한 방법으로 제조한 B형 간염 백신에 특이적인 동결건조된 조류 전달인자는 약 16중량%의 농도로 증류수에 재구성시켰다. 이와 같이 재구성된 전달인자 함유 용액은 도 4와 관련하여 이전에 설명한 바와 같이 2차 시험 집단의 마우스에게 각각 투여하였다.

<103> 적당한 시기에 도 4와 관련하여 설명한 바와 같이 합성 B형 간염 백신을 포지티브 대조군, 1차 시험 집단, 2차 시험 집단 및 네가티브 대조군의 각 마우스의 우측 뒷발 중 가장 넓은 족저에 투여하였다. 이 4개 집단의 각 마우스의 좌측 뒷발 중 가장 넓은 족저에도 이미 전술한 바와 같이 거의 동량의 멸균 식염수 희석액을 거의 동시에 주사하였다.

<104> 약 16시간 내지 약 24시간 후 4개 집단의 각 마우스를 다시 마취시키고 각 마우스의 양쪽 뒷발의 가장 넓은 족저 크기를 이전에 설명드린 바와 같이 다시 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다:

**표 6**

<105> B형 간염 백신 - 제1 시험 집단 (항체 및 전달인자 투여)

족저 크기( $\mu\text{m}$ ):			
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2032.00	2108.20	76.20
우측 발(시험군)	2032.00	2082.80	50.80
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2260.60	2362.20	101.60
우측 발(시험군)	2209.80	2336.80	127.00
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2159.00	2184.40	25.40
우측 발(시험군)	2159.00	2235.20	76.20
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2108.20	2184.40	76.20
우측 발(시험군)	2108.20	2260.60	152.40
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	1930.40	2032.00	101.60
우측 발(시험군)	1930.40	2108.20	177.80
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2184.40	2184.40	0.00
우측 발(시험군)	2184.40	2235.20	50.80

<106> 마우스 #1을 제외한 1차 시험 집단의 각 마우스는 우측 뒷발의 가장 넓은 족저에서 가장 큰 팽창을 보였다. 1차 시험 집단 마우스의 우측 뒷발의 가장 넓은 족저는 이 마우스들의 좌측 뒷발의 가장 넓은 족저보다 평균 약 42.17 $\mu\text{m}$  더 많이 팽창되어 있었다. 즉, 표 6의 데이터는 합성 B형 간염 백신에 특이적인 전달인자와 항체를 포함하는 제제 중의 조류 전달인자가 이 마우스들 마다 조기 2차 면역 반응을 유도했음을 시사하고 있다.

표 7

<107> B형 간염 백신 - 제2 시험 집단 (전달인자 단독 투여)

족저 크기( $\mu\text{m}$ ):			
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	1981.20	2032.00	50.80
우측 발(시험군)	2006.60	2159.00	152.40
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	1981.20	1981.20	0.00
우측 발(시험군)	1981.20	2006.60	25.40
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2006.60	2032.00	25.40
우측 발(시험군)	2032.00	2082.80	50.80
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	1955.80	2133.60	177.80
우측 발(시험군)	1981.20	2108.20	127.00
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	1930.40	2006.60	76.20
우측 발(시험군)	1930.40	2057.40	127.00
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2032.00	2057.40	25.40
우측 발(시험군)	2006.60	2108.20	101.60

<108> 2차 시험 집단 마우스의 우측 뒷발의 가장 넓은 족저는 이 마우스들의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저보다 평균 약 38.10 $\mu$ m가 더 큰 팽창을 보였다. 마우스 #4를 제외한 표 7의 데이터는 B형 간염 백신에 특이적인 조류 전달인자의 투여가 각 마우스의 우측 뒷발의 가장 넓은 족저에 조기 2차 면역반응 또는 지연형 과민성 면역반응을 유도했음을 시사하고 있다.

**표 8**

<109> B형 간염 백신 - 포지티브 대조군

	족저 크기( $\mu$ m):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2108.20	2133.60	25.40
우측 발(시험군)	2108.20	2159.00	50.80
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2032.00	2082.80	50.80
우측 발(시험군)	2006.60	2108.20	101.60
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	1854.20	1930.40	76.20
우측 발(시험군)	1879.60	2032.00	152.40
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2006.60	2108.20	101.60
우측 발(시험군)	2057.40	2209.80	152.40
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	2133.60	2159.00	25.40
우측 발(시험군)	2133.60	2159.00	25.40
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2006.60	2133.60	127.00
우측 발(시험군)	2006.60	2184.40	177.80

<110> 포지티브 대조군 마우스에서는 마우스 #5만이 합성 B형 간염 백신에 대한 2차 면역 반응을 유도하지 못했다. 포지티브 대조군의 다른 마우스들은 각각 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 이 마우스들의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저보다 평균 약 42.33 $\mu$ m 증가된 팽창을 보였다.

**표 9**

<111> B형 간염 백신 - 네가티브 대조군

	족저 크기( $\mu$ m):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2159.00	2159.00	0.00
우측 발(시험군)	2133.60	2133.60	0.00
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2057.40	2057.40	0.00
우측 발(시험군)	2082.80	2082.80	0.00
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2006.60	2032.00	25.40
우측 발(시험군)	1955.80	2032.00	72.60

마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2057.40	2082.80	25.40
우측 발(시험군)	2057.40	2108.20	50.80
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	2133.60	2133.60	0.00
우측 발(시험군)	2133.60	2159.00	25.40
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2082.80	2133.60	50.80
우측 발(시험군)	2082.80	2133.60	50.80

- <112> 네가티브 대조군 마우스 3마리는 좌측과 우측 모두의 뒷발 중 가장 큰 족저에서 거의 동일한 팽창을 보였다. 나머지 3마리 중, 마우스 #3만이 좌측 뒷발보다 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 유의적인 팽창 증가를 보였다. 평균적으로 네가티브 대조군 마우스의 우측과 좌측 뒷발의 가장 큰 족저 간의 팽창 차이는 단지 약 16.33 $\mu$ m 정도였다.
- <113> 표 6 내지 9에 제시된 데이터를 종합해보면, 합성 B형 간염 백신에 특이적인 조류 항체와 조류 전달인자가 합성 B형 간염 백신의 항원에 대한 조기 2차 면역 반응을 포유류가 유도할 수 있을 것이라는 실시예 6의 결과를 시사하는 것으로서 이와 같은 반응은 또한 B형 간염 바이러스에 의해서도 나타날 것이다.
- <114> 실시예 7
- <115> 실시예 1 내지 3에서 이미 기술한 절차와 거의 동일하게 다시 반복하여, 에이취. 파일로리 세균에 특이적인 조류 전달인자와 조류 항체를, 암탉에서 생성시켰다. 각 암탉에게는 에이취. 파일로리 EIA 항원을 150일, 163일, 190일, 221일 및 249일째 실시예 1에 기재된 바와 같이 주사하였다. 실시예 1에 기술한 바와 같이 약 193일과 약 223일 사이의 기간에 이 암탉들의 알을 수거하고 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다.
- <116> 전술한 실시예들에서와 같이 마우스 족저 검정을 개시하기 약 7일 전에 포지티브 대조군의 각 마우스에게 재조합 또는 합성 에이취. 파일로리 EIA 항원을 도 4와 관련하여 이전에 설명한 바와 같이 주사하여 포지티브 대조군 마우스를 준비하였다.
- <117> 에이취. 파일로리 EIA 항원에 특이적인 조류 항체와 조류 전달인자를 함유하는 용액은 약 16중량%의 농도로 실시예 2에 기재된 바와 유사한, 상기 조류 항체와 조류 전달인자를 포함하는 동결건조 제제를 증류수에 재구성시켜 제조하였다. 이와 같은 용액을 도 4와 관련하여 기재한 바와 같은 방식으로 1차 시험 집단의 마우스에게 투여하였다.
- <118> 에이취. 파일로리에 특이적인 조류 전달인자를 포함하는 거의 무항체인 용액은 실시예 3에 기재된 바와 유사한 방법으로 제조한 동결건조된 제제를 약 16중량%의 농도로 증류수에 재구성시켜 제조하였다. 이와 같은 거의 무항체인 조류 전달인자 함유 용액은 도 4와 관련하여 이전에 설명한 바와 같이 2차 시험 집단의 마우스에게 각각 투여하였다.
- <119> 도 4와 관련하여 설명한 바와 같이 포지티브 대조군, 1차 시험 집단, 2차 시험 집단 및 네가티브 대조군의 각 마우스의 우측 뒷발 중 가장 넓은 족저에 에이취. 파일로리 EIA 항원을 투여한 반면, 각 마우스의 좌측 뒷발 중 가장 넓은 족저에도 거의 동량의 멸균 식염수 희석액을 투여하였다.
- <120> 마우스의 우측 발의 가장 큰 족저를 에이취. 파일로리로 감염시킨 후 적당한 시기, 즉 약 16시간 내지 약 24시간 사이에 마우스를 다시 마취시키고 각 마우스의 양쪽 뒷발의 가장 넓은 족저 크기를 이전에 설명드린 바와 같이 다시 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다:

**표 10**

<121> 에이취. 파일로리 - 제1 시험 집단 (항체 및 전달인자 투여)

	족저 크기( $\mu\text{m}$ ):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	1955.80	1981.20	25.40
우측 발(시험군)	1930.40	1955.80	25.40
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2133.60	2133.60	0.00
우측 발(시험군)	2108.20	2260.60	152.40
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2082.80	2082.80	0.00
우측 발(시험군)	2108.20	2133.60	25.40
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2082.80	2184.40	101.60
우측 발(시험군)	2082.80	2286.00	203.20
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	2108.20	2133.60	25.40
우측 발(시험군)	2133.60	2133.60	0.00
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	1955.80	2032.00	76.20
우측 발(시험군)	1930.40	2108.20	177.80

<122> 표 10의 데이터와 특히 마우스 #2와 마우스 #4 및 마우스 #6의 데이터는 에이취. 파일로리에 특이적인 조류 전달인자와 조류 항체 모두를 함유하는 용액의 투여가 1차 시험 집단의 마우스에게 조기 2차 면역반응을 유도하였음을 보여주고 있다. 마우스 #1은 좌측과 우측 발의 가장 넓은 족저에서 거의 동일한 팽창 정도를 보인 반면, 마우스 #3은 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 우측 뒷발의 가장 큰 족저보다 약간 큰 팽창을 보였고, 마우스 #5는 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서보다 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 약간 큰 팽창을 보였다. 평균적으로, 1차 시험 집단 마우스의 우측 뒷발의 가장 큰 족저는 이 마우스들의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저보다 약 59.27 $\mu\text{m}$ 의 팽창 증가를 나타내었다.

**표 11**

<123> 에이취. 파일로리 - 제2 시험 집단 (전달인자 단독 투여)

	족저 크기( $\mu\text{m}$ ):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2235.20	2235.20	0.00
우측 발(시험군)	2184.40	2209.80	25.40
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2006.60	2006.60	0.00
우측 발(시험군)	2006.60	2032.00	25.40
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2082.80	2184.40	101.60
우측 발(시험군)	2133.60	2209.80	76.20
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2133.60	2133.60	0.00
우측 발(시험군)	2133.60	2159.00	25.40

마우스 #5			
좌측 발(대조군)	2159.00	2184.40	25.40
우측 발(시험군)	2159.00	2235.20	76.20
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2057.40	2082.80	25.40
우측 발(시험군)	2032.00	2260.60	228.60

<124>

표 11에 제시된 결과는 표 10에 제시된 결과와 유사하였다. 2마리 마우스, 즉 마우스 #5와 #6은 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서보다 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서보다 큰 팽창 증가를 보였다. 마우스 #1, #2 및 마우스 #4의 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타나는 팽창은 이 마우스들의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타나는 팽창보다 컸으나 그 차이는 미약하였다. 마우스 #3은 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 우측 뒷발의 가장 큰 족저보다 약간 큰 팽창을 보였다. 하지만, 이 마우스들의 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타나는 평균 팽창은 이 마우스들의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타나는 팽창보다 약 50.80 $\mu$ m가 더 큰 것인 바 표 11의 데이터는 에이취. 파일로리에 특이적인 조류 전달인자가 팽창 증가를 유발하였음을 시사하는 것이다.

**표 12**

<125>

에이취. 파일로리 - 포지티브 대조군

	족저 크기( $\mu$ m):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2133.60	2133.60	0.00
우측 발(시험군)	2108.20	2184.40	76.20
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2133.60	2133.60	0.00
우측 발(시험군)	2133.60	2209.80	76.20
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2032.00	2108.20	76.20
우측 발(시험군)	2082.80	2209.80	127.00
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	1981.20	2082.80	101.60
우측 발(시험군)	1879.60	2133.60	254.00
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	2133.60	2159.00	25.40
우측 발(시험군)	2184.40	2336.80	152.40
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2133.60	2133.60	0.00
우측 발(시험군)	2082.80	2260.60	177.80

<126>

실시에 7의 포지티브 대조군 마우스는 각각 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타내는 팽창보다 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타내는 팽창의 유의적 차이를 통해 알 수 있듯이 에이취. 파일로리에 대한 지연형 과민성 면역반응을 유도해내었다. 평균적으로 팽창 차이는 약 110.07 $\mu$ m였다.

**표 13**

<127> 에이취. 파일로리 - 네가티브 대조군

	족저 크기( $\mu\text{m}$ ):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2006.60	2082.80	76.20
우측 발(시험군)	2514.60	2514.60	0.00
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2032.00	2082.80	50.80
우측 발(시험군)	2032.00	2133.60	101.60
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2082.80	2108.20	25.40
우측 발(시험군)	2082.80	2108.20	25.40
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2006.60	2032.00	25.40
우측 발(시험군)	1955.80	2032.00	76.20
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	1930.40	1981.20	50.80
우측 발(시험군)	1955.80	2006.60	50.80
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2133.60	2159.00	25.40
우측 발(시험군)	2133.60	2159.00	25.40

<128> 표 13의 데이터로 알 수 있듯이, 마우스 #3, #5 및 #6의 좌측과 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타나는 팽창은 거의 동일한 것이었다. 마우스 #2의 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타나는 팽창은 이 마우스의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타나는 팽창보다 큰 한편, 마우스 #1의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저는 우측 뒷발의 가장 큰 족저보다 유의적인 팽창 증가를 보였다. 마우스 #4의 우측 뒷발의 가장 큰 족저는 좌측 뒷발의 가장 큰 족저보다 약간 증가된 팽창을 보였다. 네가티브 대조군 마우스의 우측과 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타나는 팽창의 평균 차이는 단지 약  $4.23\mu\text{m}$ 였다.

<129> 표 10 내지 13의 데이터는 에이취. 파일로리에 특이적인 조류 전달인자가 포유류에 조기 2차 면역반응을 용이하게 한다는 것을 시사하는 것이다.

<130> 실시예 8

<131> 다시, 실시예 1 내지 3에서 이미 기술한 절차와 거의 동일하게 다시 반복하여, 엡스타인-바아 바이러스(EBV)의 재조합 핵 항원인 EBNA-1 항원에 특이적인 조류 전달인자와 조류 항체를, 암탉에서 생성시켰다. 각 암탉에게는 EBNA-1의 1 투여량을 150일, 163일, 190일 및 249일째 실시예 1에 기재된 바와 같이 주사하였다. 실시예 1에 기술한 바와 같이 약 193일과 약 223일 사이의 기간에 이 암탉들의 알을 수거하고 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다.

<132> EBNA-1에 특이적인 조류 항체와 조류 전달인자를 함유하는 용액은 실시예 2에 기재된 바와 유사한, 동결건조 제제를 증류수에 재구성시켜 제조하였다. 이와 같은 EBNA-1에 특이적인 조류 항체와 조류 전달인자를 모두 포함하는 동결건조된 제제는 약 16중량%의 농도로 희석하였다. 이 용액을 도 4와 관련하여 기재한 바와 같은 방식으로 1차 시험 집단의 마우스에게 투여하였다.

<133> 또한, EBNA-1에 특이적인 조류 전달인자는 포함하고 EBNA-1에 특이적인 조류 항체는 거의 포함하지 않는 용액은 약 16중량%의 농도로 증류수에 재구성시켜 제조하였다. 이와 같은 용액은 도 4와 관련하여 이전에 설명한 바와 같이 2차 시험 집단의 마우스에게 각각 투여하였다.

<134> 마우스 족저 검정을 개시하기 약 7일 전에 마우스에게 EBNA-1을 주사하여 포지티브 대조군 마우스를 준비하였다.

<135> 재조합 EBNA-1 항원을 그 다음 1차 시험 집단, 2차 시험 집단, 포지티브 대조군 및 네가티브 대조군을 포함하는 4개 집단의 각 마우스의 우측 뒷발 중 가장 넓은 족저에 투여하였다. 각 마우스의 좌측 뒷발 중 가장 넓은 족



저에도 거의 동량의 멸균 식염수 희석액을 투여하였다. 투여 방법은 이미 전술한 바와 동일한 방식으로 시행하였다.

<136> 약 16시간 내지 약 24시간 후 마우스를 다시 마취시키고 각 마우스의 양쪽 뒷발의 가장 넓은 족저 크기를 이전에 설명드린 바와 같이 다시 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다:

**표 14**

<137> EBV EBNA-1 - 제1 시험 집단 (항체 및 전달인자 투여)

	족저 크기( $\mu\text{m}$ ):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2032.00	2057.40	25.40
우측 발(시험군)	2032.00	2057.40	25.40
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2159.00	2159.00	0.00
우측 발(시험군)	2159.00	2184.40	25.40
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2159.00	2159.00	0.00
우측 발(시험군)	2133.60	2286.00	152.40
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2108.20	2108.20	0.00
우측 발(시험군)	2108.20	2209.80	101.60
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	2108.20	2235.20	127.00
우측 발(시험군)	2082.80	2260.60	177.80
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	1981.20	2032.00	50.80
우측 발(시험군)	1981.20	2032.00	50.80

<138> 표 14에서 마우스 3마리는 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서보다 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 유의적인 팽창 증가를 보였다. 마우스 #2는 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서보다 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 팽창 증가를 보였으나, 그 차이는 미약하였다. 2마리 마우스, 즉 마우스 #1과 #6은 좌측과 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 거의 동일한 팽창을 보였다. 그럼에도 불구하고, 1차 시험 집단 마우스의 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타나는 팽창은 이 마우스의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타나는 팽창보다 평균 약 55.03 $\mu\text{m}$  더 컸고, 표 14에 제시된 데이터는 EBNA-1에 특이적인 조류 항체와 전달인자 모두를 포함하는 용액에서 조류 전달인자가 1차 시험 집단 마우스의 재조합 EBNA-1에 대한 조기 2차 면역반응을 유도한다는 것을 보여주는 것이다. 당업계에 공지된 바와 같이, 항체는 2차 면역 반응에 대해 수동적이므로 보통 팽창에 거의 관여하지 않는다.

**표 15**

<139> EBV EBNA-1 - 제2 시험 집단 (전달인자 단독 투여)

	족저 크기( $\mu\text{m}$ ):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2133.60	2159.00	25.40
우측 발(시험군)	2108.20	2159.00	50.80
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2006.60	2032.00	25.40
우측 발(시험군)	1955.80	1955.80	0.00

마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2032.00	2133.60	101.60
우측 발(시험군)	2006.60	2159.00	152.40
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2108.20	2133.60	25.40
우측 발(시험군)	2159.00	2159.00	0.00
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	2184.40	2209.80	25.40
우측 발(시험군)	2159.00	2260.60	101.60
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2057.40	2108.20	50.80
우측 발(시험군)	2082.80	2133.60	50.80

<140> 조류 전달인자 함유 용액으로 처리한 2차 시험 집단 마우스는 또한 재조합 EBNA-1에 대한 조기 2차 면역 반응을 나타냈다. 이와 같은 결과는 특히 마우스 #3과 #5에서 확인되었는데, 이들은 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서보다 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 유의적인 팽창 증가를 나타내었다. 마우스 #1의 우측 뒷발의 가장 큰 족저의 팽창은 좌측 뒷발의 가장 큰 족저의 팽창보다 컸으나 그 차이는 미약한 것이었다. 또한, 마우스 #2와 #4는 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 큰 팽창을 보였으나, 측정된 팽창 정도는 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 측정된 팽창보다 약간 큰 것이었다. 평균적으로 이 마우스들의 우측 뒷발의 가장 큰 족저는 좌측 뒷발의 가장 큰 족저보다 약 16.93 $\mu$ m 더 컸다.

<141> ENBA-1에 특이적인 전달인자는 이에 대응하는 항체로부터 분리될 경우 불안정해질 수 있어 1차 시험 집단 마우스에서 측정된 총 2차 면역 반응에 비해 2차 시험 집단에서 측정된 2차 면역 반응이 보다 낮게 나타나는 것으로 추정된다.

**표 16**

<142> EBV EBNA-1 - 포지티브 대조군

	족저 크기( $\mu$ m):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2209.80	2209.80	0.00
우측 발(시험군)	2235.20	2286.00	50.80
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2184.40	2184.40	0.00
우측 발(시험군)	2209.80	2260.60	50.80
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2159.00	2159.00	0.00
우측 발(시험군)	2133.60	2209.80	76.20
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2159.00	2336.80	177.80
우측 발(시험군)	2133.60	2362.20	228.60
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	2133.60	2133.60	0.00
우측 발(시험군)	2082.80	2260.60	177.80
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2082.80	2082.80	0.00
우측 발(시험군)	2057.40	2209.80	152.40

<143> 포지티브 대조군 마우스들의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저의 팽창보다 각 마우스의 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타나는 팽창 증가로 알 수 있듯이, 포지티브 대조군 마우스 6마리는 모두 재조합 EBNA-1 항원에 대해 지연형

과민성 면역 반응을 나타냈다. 이 마우스들 각각의 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 측정된 팽창은 이 마우스들 각각의 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 측정된 팽창보다 평균 약 93.13 $\mu$ m 더 컸다.

표 17

<144> EBV EBNA-1 - 네가티브 대조군

	족저 크기( $\mu$ m):		
	샘플 주사전 (0시간)	최종 (24시간)	차이
마우스 #1			
좌측 발(대조군)	2133.60	2184.40	50.80
우측 발(시험군)	2082.80	2133.60	50.80
마우스 #2			
좌측 발(대조군)	2133.60	2133.60	0.00
우측 발(시험군)	2159.00	2184.40	25.40
마우스 #3			
좌측 발(대조군)	2108.20	2108.20	0.00
우측 발(시험군)	2133.60	2133.60	0.00
마우스 #4			
좌측 발(대조군)	2082.80	2133.60	50.80
우측 발(시험군)	2159.00	2159.00	0.00
마우스 #5			
좌측 발(대조군)	2057.40	2082.80	25.40
우측 발(시험군)	1955.80	1981.20	25.40
마우스 #6			
좌측 발(대조군)	2108.20	2133.60	25.40
우측 발(시험군)	2108.20	2133.60	25.40

<145> 네가티브 대조군에서 2마리의 마우스, 마우스 #2와 #4만이 이들 뒷발의 가장 큰 족저에서 상이한 팽창을 보였다. 마우스 #2는 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타난 팽창보다 우측 뒷발의 가장 큰 족저에서 나타난 팽창이 보다 큰 반면, 마우스 #4는 우측 뒷발의 가장 큰 족저보다 좌측 뒷발의 가장 큰 족저에서 팽창 증가를 보였다. 사실상, 네가티브 대조군 마우스의 우측 뒷발의 가장 큰 족저는 좌측 뒷발의 가장 큰 족저보다 평균 약 4.23 $\mu$ m 더 적은 팽창 감소를 보였다.

<146> 표 14 내지 17의 데이터는 EBNA-1에 특이적인 조류 전달인자가 EBNA-1 및 이 항원이 존재하는 바이러스와 타 병원체에 대한 포유류의 조기 2차 면역 반응(즉, 포유류가 스스로 2차 면역 반응을 유도하는데 소요되는 통상의 7일 내지 14일에 비해 약 24시간 내에)을 유도할 수 있음을 시사하고 있다.

<147> 이상의 실시예들은 포유류 숙주가 스스로 병원체나 항원 인자에 대한 2차 면역 반응을 유도하는데 일반적으로 소요되는 기간인 7일 내지 14일에 비하여, 본 발명의 교시에 따른 조류 전달인자를 투여했을 때 포유류 숙주가 약 24시간 이내에 2차 면역 반응을 유도할 수 있음을 예시하고 있다.

<148> 각 분석의 1차 및 2차 시험 집단에 속하는 각 마우스의 시험 족저와 대조 족저에서 나타나는 측정값 간의 차이의 유사성은 2차 또는 지연형 과민성 면역 반응이 2차 면역반응에 수동적이고 일반적으로 팽창에 거의 관여하지 않는 항체가 아닌 전달인자에 의해 주로 유도된다는 것을 시사하는 것이다.

<149> 실시예 1 내지 8과 그 결과 데이터는 조류 전달인자가 포유류의 조기 2차 면역반응을 발생시키는 성질이 있음을 입증하고 있다. 당업자라면 용이하게 이해할 수 있듯이, 조류 전달인자는 또한 과충류, 양서류 및 타 비포유류 종의 동물은 물론 다양한 새 종류에서도 조기 2차 면역반응을 발생시킬 것이다.

<150> 조류 전달인자는 마우스에서 조기 지연형 과민성 면역반응을 나타내듯이, 사람을 비롯한 타 포유류에서도 동일한 효과가 있음을 추정하는 것은 당업자에게는 자명한 일이다.

<151> 전달인자는 실시예에서 주사를 통해 마우스에게 투여하였지만 다른 경로를 통한 포유류에 대한 조류 전달인자의 투여도 본 발명의 범위에 속하는 것이다. 예를 들어, 조류 전달인자는 경구, 비경구 주사 또는 주사 이외의 다

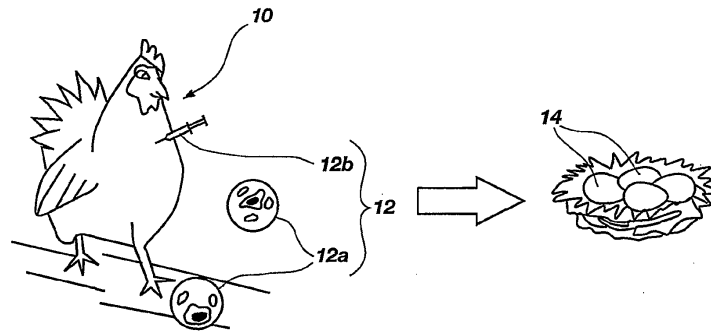
른 비경구 방법, 예컨대 경피, 또는 피부를 통한 방법, 폐를 통한 에어로졸법, 또는 당해 기술분야에 공지된 타 방법으로 투여할 수 있다. 포유류에 대한 조류 전달인자의 경구 투여는 포유류 모친이 초유를 통해 자신의 신생아에게 전달인자를 공급한다는 사실을 통해 지지되듯이 신생아는 경구 섭취한다. 전달인자는 위와 소장의 모든 조건에서 생존하며, 여기에서 전달인자는 신생 포유류의 혈류로 흡수된다. 따라서, 전달인자는 포유류 장관에서도 생존하는 것으로 알려져 있다. 포유류 소화관 조건에 견디는 전달인자의 성질에 대해서는 문헌[참조: Kirkpatrick CH, "Activities and characteristics of transfer factors", Biotherapy, 9:13-16(1996), 그 명세서는 전문이 본원에 참고인용됨]에서 입증되어 있다.

<152>

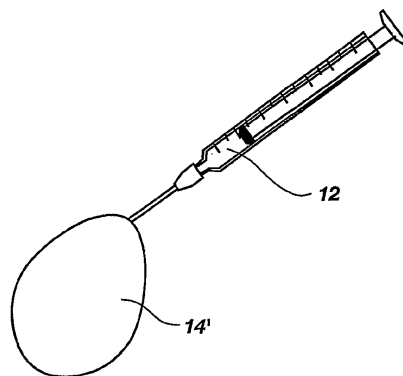
전술한 설명에는 많은 세부 사항들이 포함되어 있지만 이들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안되며 일부 바람직한 구체예들을 설명한 것으로서 해석되어야 한다. 이와 마찬가지로 본 발명의 타 구체예들도 본 발명의 범위나 취지를 벗어나지 않는 한도에서 고안될 수 있다. 여러 구체예들의 특징들은 조합해서 이용될 수도 있다. 따라서, 본 발명의 영역은 전술한 상세한 설명보다는 후속되는 청구의 범위와 이의 법적 대등물에 의해 한정되고 제시되는 것이다. 청구의 범위와 의미내에 속하는 본 명세서에 개시된 본 발명에 대한 모든 부가, 삭제 및 수정도 본 발명에 포함되어야 한다.

**도면**

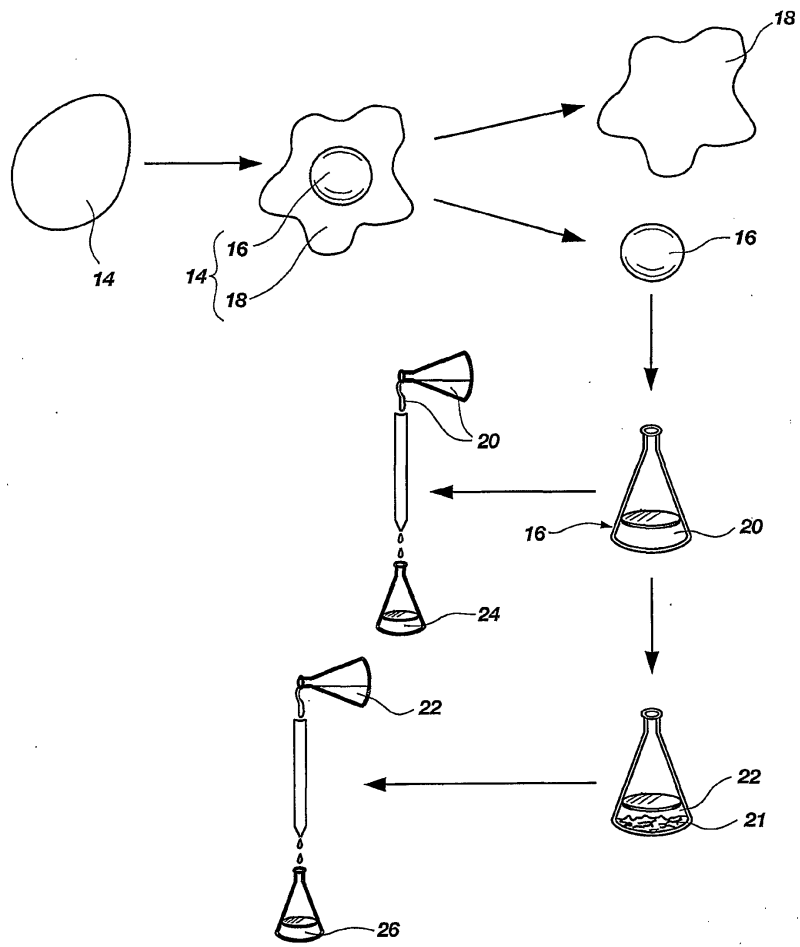
**도면1**



**도면2**



도면3



도면4

