



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0140098
(43) 공개일자 2023년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/00 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/001 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-0038780

(22) 출원일자 2022년03월29일

심사청구일자 2022년03월29일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

이상수

서울특별시 양천구 목동중앙로7길 32, 105동 901호(목동, 이편한세상)

키란지브 차크라바티

인도, 웨스트 벵갈주, 24피지예스노던시, 칼린디동, 칼린디 아파트 P-121동 6호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인본

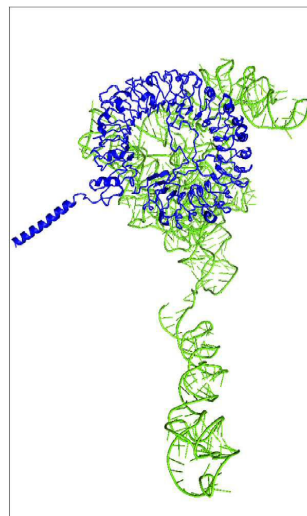
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 코로나 바이러스에 대한 에피토프 기반 유전자 컨스트럭트 및 백신 조성물

(57) 요약

본 발명은 코로나 바이러스에 대한 에피토프 기반 유전자 컨스트럭트 및 백신 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 면역 정보학 접근법에 따른 신규 코로나 바이러스 2019 (SARS-COV-2)에 대한 에피토프들을 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 컨스트럭트를 제공하는 것 및 상기 코로나 바이러스 백신을 제공하는 것이다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)

A61K 2039/53 (2013.01)

C12N 2770/20034 (2013.01)

(72) 발명자

아취시 란잔 샤르마

강원도 춘천시 성심로 67

마노짓 바타차리아

인도, 웨스트 벵갈주, 웨스트미드나포르시, 자그람
동, 아르빈다나가르 D-24

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 42로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는 코로나바이러스 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 서열번호 43 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 더 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 서열은,

서열번호 1, 2, 3, 5 및 7로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 제1 영역;

서열번호 9, 13, 14 및 22로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 제2 영역;

서열번호 25, 39 및 40으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 제3 영역;을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 4

B 세포 에피토프, 세포독성 T 림프구 에피토프 및 헬퍼 T 림프구 에피토프를 포함하는 코로나바이러스 백신 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 B 세포 에피토프는 서열번호 25, 39 및 40으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 포함하고,

상기 세포독성 T 림프구 에피토프는 서열번호 1, 2, 3, 5 및 7로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 포함하고,

상기 헬퍼 T 림프구 에피토프는 서열번호 9, 13, 14 및 22로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 6

서열번호 1 내지 42로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 가닥을 포함하는 유전자 컨스트럭트.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 뉴클레오타이드 가닥은 상기 서열의 cDNA인 것인, 유전자 컨스트럭트.

청구항 8

제6항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 유전자 컨스트럭트를 전달 벡터에 삽입하는 단계를 포함하는 코로나바이러스 백신 제조 방법.

청구항 9

서열번호 1 내지 42로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 가닥을 포함하는 코로나바이러스 백신 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 뉴클레오타이드 가닥은 상기 서열의 mRNA인 것인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 코로나 바이러스에 대한 에피토프 기반 유전자 컨스트럭트 및 백신 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 면역 정보학 접근법에 따른 신규 코로나 바이러스 2019(SARS-COV-2)에 대한 에피토프들을 코딩하는 뉴클레오타이드를 포함하는 컨스트럭트를 제공하는 것 및 상기 코로나 바이러스 백신을 제공하는 것이다.

배경 기술

[0002] SARS-CoV-2에 의한 COVID-19, 즉 코로나바이러스감염증-19는 2019년 12월에 중국에서 발병한 이후 전 세계적으로 높은 이환율과 사망률을 일으키고 있어, 이러한 대유행 상태는 전 세계적으로 혼란을 야기하였다. 그 결과 WHO는 COVID-19를 글로벌 보건 비상사태로 선포하였다. 이전에는 2003년 4월에 SARS, 즉 중증급성호흡기증후군으로 사망률이 약 9.6%를 기록하였고, 2015년에 MERS, 즉 중동호흡기증후군이 중동에서 전 세계로 퍼지면서 사망률이 약 36%를 기록한 바 있었다.

[0003] 상기 COVID-19로 인한 병리학적 진행은 고유한 단계를 따른다. 흡입된 SARS-CoV-2가 비강의 상피 세포에 결합할 가능성이 있는 경우, 감염 초기 하루 내지 이틀 동안 무증상 상태를 거친다. 다음으로 세포의 복제는 제한된 선천적 면역 반응을 발취하여 바이러스의 국소 증식을 유도한다. 감염의 두 번째 단계에서는 바이러스의 전파와 기도로의 이동은 심각한 면역 반응을 일으키는 등 임상 증상이 분명해진다. 감염된 환자의 약 20%는 질병의 세 번째 단계에 들어가는데, 폐 침윤이 발생하여 급성 호흡 곤란 증후군(즉, ARDS)을 유발한다. 폐포 상피 세포의 막대한 손상과 진행성 호흡 부전은 심각한 경우 환자의 사망으로 이어질 수 있다.

[0004] 현재까지 치명적인 COVID-19에 대한 효과적인 치료를 위하여 백신, 올리고 뉴클레오타이드 기반 요법, 소분자 약물, 단일 클론 항체, 인터페론 요법 및 펩타이드의 개발을 포함하여 COVID-19를 예방 또는 통제하기 위해 여러 전략이 진행 중이나, 현재 채택된 치료법들은 덱사메타손, 토실리주맙 및 사릴루맙 등을 사용하여 사이토카인 폭풍을 경감시키는 대증요법에 관한 것 또는 기존 항바이러스제인 렘데시비르 및 파비피라비르 등을 사용하는

것이 있으나 이러한 접근법은 임상 결과를 개선할 수 있는 최적의 수준을 충족하지 못하였다.

[0005] 따라서 면역원성이 증대되어 숙주의 면역체계를 강화하기에 충분하고, 궁극적으로는 SARS-COV-2 예방 효과가 뛰어난 백신을 제공해야 할 필요성이 커지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명으로 항원성 CD4+ 및 CD8+ T 세포와 B 세포 활성화 서열을 발현하는 코로나 바이러스 백신을 개발하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 일 실시예에서, 서열번호 1 내지 42로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는 코로나바이러스 백신 조성물을 제공할 수 있다.

[0009] 또한 본 발명에서, 상기 펩타이드는 서열번호 43 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 더 포함하는 것일 수 있다.

[0010] 또한 본 발명에서, 상기 서열은, 서열번호 1, 2, 3, 5 및 7로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 제1 영역; 서열번호 9, 13, 14 및 22로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 제2 영역; 서열번호 25, 39 및 40으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 제3 영역;을 포함하는 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, B 세포 에피토프, 세포독성 T 림프구 에피토프 및 헬퍼 T 림프구 에피토프를 포함하는 코로나바이러스 백신 조성물을 제공하는 것일 수 있다.

[0012] 또한 본 발명에서, 상기 B 세포 에피토프는 서열번호 25, 39 및 40으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 포함하고, 상기 세포독성 T 림프구 에피토프는 서열번호 1, 2, 3, 5 및 7로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 포함하고, 상기 헬퍼 T 림프구 에피토프는 서열번호 9, 13, 14 및 22로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 서열번호 1 내지 42로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 가닥을 포함하는 유전자 컨스트럭트를 제공하는 것일 수 있다.

[0014] 또한 본 발명에서, 상기 뉴클레오타이드 가닥은 상기 서열의 cDNA인 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 유전자 컨스트럭트를 전달 벡터에 삽입하는 단계를 포함하는 코로나바이러스 백신 제조 방법을 제공하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 서열번호 1 내지 42로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 가닥을 포함하는 코로나바이러스 백신 조성물을 제공하는 것일 수 있다.

[0017] 또한 본 발명에서, 상기 뉴클레오타이드 가닥은 상기 서열의 mRNA인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 에피토프 서열을 포함하는 코로나 바이러스 백신 조성물, 유전자 컨스트럭트 및 이의 제조 방법을 통하여, 코로나 바이러스를 예방 효과가 높은 백신을 제공할 수 있다.

[0019] 본 발명의 효과들은 이상에서 언급된 효과로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 본 발명의 일 예시에 따라 두 가지 서로 다른 mRNA 백신 구성 및 이들의 세포 상호작용에 대한 개략도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 예시에 따라 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질에 대한 mRNA 백신 구성 설계를 나타낸 순서도이다.

도 3은 세계 인구 중 알려진 MHC-I 및 MHC-II 대립유전자에 의한 에피토프 인식의 효능을 결정하기 위해, 인구 범위 평가를 수행하였고, 그 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 세계 인구 중 알려진 MHC-I 및 MHC-II 대립유전자에 의한 에피토프 인식의 효능을 결정하기 위해, 인구 범위 평가를 수행하였고, 그 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 NRM 기반 mRNA 백신 구성을 개략도로 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 SAM 기반 mRNA 백신 구성을 개략도로 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 HLA*06 분자와 QIAPGQTGK의 도킹된 복합체를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 CTL 및 HTL 에피토프와 해당 HLA 분자의 도킹된 복합체를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 TLR-7과 도킹된 mRNA 백신의 복합체를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 특정 병원체에 의해 유발된 실제 면역학적 현상과 유사한 mRNA 기반 백신 구성의 시뮬레이션된 면역 반응을 조사하여, 그 결과들을 나타낸 것이다.

도 11은 특정 병원체에 의해 유발된 실제 면역학적 현상과 유사한 mRNA 기반 백신 구성의 시뮬레이션된 면역 반응을 조사하여, 그 결과들을 나타낸 것이다.

도 12는 특정 병원체에 의해 유발된 실제 면역학적 현상과 유사한 mRNA 기반 백신 구성의 시뮬레이션된 면역 반응을 조사하여, 그 결과들을 나타낸 것이다.

도 13은 특정 병원체에 의해 유발된 실제 면역학적 현상과 유사한 mRNA 기반 백신 구성의 시뮬레이션된 면역 반응을 조사하여, 그 결과들을 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 일 예시에 따라 대장균 K12 숙주에서 발현된 백신 작제물의 in silico 클로닝을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적인 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 안되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0022]

한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속하고, 일 구현예에서 생략된 기제는 다른 구현예에서 기재된 바와 같은 방식으로 해석될 수 있다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0023]

본 발명에 따른 백신은 정상적인 적응 면역계(adaptive immune system)를 사용하여 코로나 바이러스에 대한 예방 효과를 제공하고, 상기 면역성을 제시하는 에피토프는 mRNA 형태 또는 펩타이드 형태로 제공될 수 있다. 적응 면역계는 모든 외래 항원이 상기 외래 항원에 대한 면역 반응을, 항원 제시(antigen presentation)라고 불리

는 과정 도중의 특정 "비자기(non-self)" 항원의 인식에 의하여 특이적으로 유발될 수 있는 것이다.

- [0024] 본 발명에서 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 바이러스의 감염 또는 증식을 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 따른 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0028] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스페이트, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 경구 또는 비경구로 투여하는 것일 수 있고, 상기 비경구 투여는 피하, 피내, 설하, 직장, 정맥내, 동맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 골수내, 심장내, 병소내 및 두개골내 투여일 수 있고, 좌제, 주사 또는 그 밖의 주입기술로 투여할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 식이, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명에 따른 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁제로도 제형될 수 있다.
- [0031] 본 발명에서, 용어 "주요 조직 적합성 복합체(Major histocompatibility complex; MHC)"는 본 발명에 따른 에피토프와 결합하여 MHC-에피토프 복합체를 형성하도록 하는 것이다. 적응 면역계의 세포는 림프구, 특히 B 세포와 T 세포이고, 여기서 상기 B 세포는 체액성 면역 반응에 관여하고, 상기 T 세포는 세포성 면역 반응에 관여하는데, 상기 면역 반응들은 MHC 분자와 복합체로 가공 및 제시되었을 때 이를 인식한다. 상기 T 세포는 세포독성 T 림프구(CTL) 또는 헬퍼 T 림프구(HTL)를 포함하는 것일 수 있다.
- [0032] 본 발명에서, 상기 "세포독성 T 림프구(CTL)"는 바이러스에 감염된 세포에 대한 적응 면역을 유지하기 위한 핵심 면역 체계 구성 요소로, MHC-I 복합체에 의해 표면 수용체에 제공된 바이러스 에피토프를 인식할 수 있으므로, CTL 에피토프의 예측 및 선택은 펩타이드 기반 백신 개발에 중추적이다. 상기 CTL 에피토프의 항원성 또는 알레르기성 예측을 위하여 인공 신경망(ANN) 기반 방법론을 사용할 수 있다. 상기 인공 신경망은 상기 에피토프의 기본 임계값, 항원 제시(TAP) 수송 효율 및 C 말단 절단 가중치에서 선택된 어느 하나를 이용하는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서, 상기 "헬퍼 T 림프구(HTL)"는 바이러스 감염 시 세포 매개 면역과 체액 면역 모두에서 중요한 역할을 한다. 상기 HTL의 MHC-II 매개 세포 표면 수용체는 바이러스 에피토프를 인식하고 반응하는 면역 캐스케이드를 시작하는 것이며, 상기 MHC-II 결합 및 HTL 에피토프는 항원성 및 알레르기 평가를 위하여, 면역 에피토프 데이터베이스(IEDB) MHC-II 결합 예측 모듈, 다른 매개변수 및 전체 HLA 참조 세트를 사용할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서, B 세포 에피토프의 길이는 18개 내지 22개의 아미노산으로 선택되는 것일 수 있고, 20개의 아미노

산으로 선택되는 것일 수 있다.

[0035] 본 발명에서 용어, "에피토프(epitope)"는 특정 항체에 의해 인식되는 항원결합부위의 아미노산 잔기 세트, 또는 T 세포에서는 T 세포 수용체 단백질 및/또는 주요 조직적합성 복합체(Major Histocompatibility Complex; MHC)수용체에 의해 인식되는 잔기이다. 본 발명에서, 상기 에피토프는 항체, T 세포 수용체 또는 HLA 분자에 의해 인식되는 부위를 형성하는 분자로, 일차, 이차 및 삼차 펩타이드 구조, 또는 전하를 의미하는 것일 수 있다. 또한 상기 에피토프는, 본 발명의 mRNA로부터 체내에서 발현되는 것이거나, 체외에서 발현되어 체내로 투여되는 목적 펩타이드 또는 목적 단백질에 해당할 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 따르면,

[0037] 서열번호 1 내지 42로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는 코로나 바이러스 백신 조성물을 제공할 수 있다. 상기 서열번호 1 내지 42의 서열은 하기 표 1과 같이 분류할 수 있다.

표 1

종류	해당 서열
CTL 에피토프	서열번호 1 내지 7
HTL 에피토프	서열번호 8 내지 22
B 세포 에피토프	서열번호 23 내지 42

[0039] 본 발명에서, 상기 펩타이드는 서열번호 43 내지 45로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 더 포함하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 43 내지 45는 링커 내지 스페이서로 기능할 수 있다. 일 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 46의 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 서열번호 43 내지 46은 하기 표 2와 같이 나타낼 수 있다.

표 2

서열번호	서열
43	EAAAK
44	GPGPG
45	KK
46	EAAAKASYQTQTNPSGAGSVASQSGPQPGIDLQELGKYEQYIKGSGRENGPQPGDQLTPTWRVYSTGSNVFQTRGPGPGRQIAPGQTGKKVFLHVTYVKKVRFPNITNLKKQLTPTWRVYKKQIAPGQTGKKKQSLLI VNNATNVV I KKKLLLQYGSFCTQLNRAKKVLSFELLHAPATVCKKTESIVRFPNITNLCPKK

[0041] 본 발명에서, 상기 링커 내지 스페이서는 바이러스 에피토프 서열 간 구비되는 것 또는 에피토프 말단에 구비되는 것일 수 있고, 이를 통하여 에피토프 간 구조적 안정성을 제공할 수 있다.

[0042] 본 발명에서, 상기 서열은, 서열번호 1, 2, 3, 5 및 7로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 제 1 영역; 서열번호 9, 13, 14 및 22로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 제2 영역; 서열번호 25, 39 및 40으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 제3 영역;을 포함하는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명의 다른 구현예에 따르면,

[0044] B 세포 에피토프, 세포독성 T 림프구 에피토프 및 헬퍼 T 림프구 에피토프를 포함하는 코로나바이러스 백신 조성물을 제공하는 것일 수 있다.

[0045] 본 발명에서, 상기 B 세포 에피토프는 서열번호 25, 39 및 40으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 포함하고, 상기 세포독성 T 림프구 에피토프는 서열번호 1, 2, 3, 5 및 7로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 포함하고, 상기 헬퍼 T 림프구 에피토프는 서열번호 9, 13, 14 및 22로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 포함하는 것일 수 있다.

- [0046] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면,
- [0047] 서열번호 1 내지 42로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 가닥을 포함하는 유전자 컨스트럭트 제공에 관한 것일 수 있다. 상기 서열은 코로나바이러스의 에피토프를 포함하는 것으로, 상기 컨스트럭트가 전사 및 번역 과정을 거칠 경우 생성되는 것일 수 있다.
- [0048] 본 발명에서, 상기 뉴클레오타이드 가닥은 상기 서열의 cDNA인 것일 수 있고, 상기 cDNA는 mRNA를 전사할 수 있는 CDS(carrying coding sequence)일 수 있다. 또한, 상기 뉴클레오타이드 가닥은 복제효소를 코딩하는 유전자 서열을 더 포함하여, 전사된 상기 mRNA가 자가복제할 수 있도록 하는 것일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면,
- [0050] 본 발명의 유전자 컨스트럭트를 전달 벡터에 삽입하는 단계를 포함하는 코로나바이러스 백신 제조 방법을 제공하는 것일 수 있다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면,
- [0052] 서열번호 1 내지 42로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 가닥을 포함하는 코로나바이러스 백신 조성물을 제공하는 것일 수 있다.
- [0053] 본 발명에서, 상기 뉴클레오타이드 가닥은 상기 서열의 mRNA인 것일 수 있다.
- [0054] 본 발명에서, 상기 mRNA는 TLR-7과 결합할 수 있는 것일 수 있고, 이를 통하여, 백신 접종된 개체의 TLR-7과 상기 mRNA가 상호작용하여 백신의 효과를 극대화할 수 있다.
- [0055] 본 발명에서, 벡터는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 것으로, 상기 목적 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사와 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있으며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 벡터는 적당한 숙주 내로 형질전환 된 후, 숙주 계통과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계통 그 자체에 통합될 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주세포 중에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며 당 업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합 된 상태의 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, Charon4A, 및 Charon21A를 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescript II 계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계를 사용할 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다.
- [0057] 본 발명에서 상기 컨스트럭트는 발현 조절 서열을 더 포함할 수 있다. 용어 "발현 조절 서열(expression control sequence)"은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 일례로, 고발현용의 프로모터로서 SR α 프로모터와 사이토메가로바이러스(cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 사용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열 중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열의 예에는, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 램다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스파타제의 프로모터들, 예를 들어 Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포

함된다.

- [0059] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)" 된다. 이것은 전사 활성화 단백질과 같은 적절한 한 분자 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열일 수 있다. 예를 들면, 전사(pre-sequence) 또는 분비 리더(leader)에 대한 DNA는 펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미할 수 있다.
- [0060] 본원 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 통상 이중의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어(recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제될 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 이중 DNA가 생성될 수 있다.
- [0061] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되어야만 하고, 적절한 서열 길이를 포함하여야 하는데, 일 예로, 상기 CDS는 500 nts 내지 800 nts인 것일 수 있고, 또는 상기 CDS는 500 nts 이상 550 nts 미만, 550 nts 이상 580 nts 미만, 580 nts 이상 620 nts 미만, 620 nts 이상 650 nts 미만, 650 nts 이상 700 nts 미만, 또는 700 nts 이상 800 nts 미만인 것일 수 있으며, 이 경우 전사과정이 안정되어, 발현 효율을 높일 수 있다.
- [0062] 한편, 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵세포인 경우에는, 발현 벡터는 진핵세포 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.
- [0063] 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 유전자를 발현시키기 위해 매우 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵세포 숙주에 적합한 발현 벡터에는, 예를 들어 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토크갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열을 포함한다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pBluescript, pGEX2T, pUC벡터, colE1, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 E. coli에서 얻는 것을 예시할 수 있는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λ 과 λ NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2μ 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL 941이다.
- [0064] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면,
- [0065] 상술한 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포 제공에 관한 것일 수 있다. 상기 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미하고, mRNA 전사체 또는 목적 단백질을 발현시키도록 형질이 감염된 재조합 숙주 세포를 의미한다. 일예로, 원핵 생물의 경우 대장균, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵 숙주들, 스포도 프테라 프루기페르다(SF9)와 같은 곤충 세포, CHO 및 생쥐 세포같은 동물 세포, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 및 BMT 10과 같은 아프리카 그린 원숭이 세포, 및 조직배양된 인간 세포는 사용될 수 있는 숙주 세포의 예이다.
- [0066] 본 발명에서 상기 유전자를 숙주세포의 염색체상에 삽입하는 방법으로는 통상적으로 알려진 유전자조작방법을 사용할 수 있으며, 비바이러스 전달 방법은 전기천공법, 리포펙션, 미세주사, 탄도법, 비로솜, 리포솜, 면역리포솜, 다가 양이온 또는 지질:핵산 접합체, 네이키드 DNA, 인공 바이론 및 화학물질 촉진 DNA 유입을 포함한다. 소소노포레이션, 예를 들어 Sonitron 2000 시스템(Rich-Mar)을 이용한 방법도 핵산의 전달에 사용할 수 있으며, 다른 대표적인 핵산 전달 시스템은 Amaxa Biosystems(Cologne, Germany), Maxcyte, Inc.(Rockville, Maryland) 및 BTX Molecular Syetem(Holliston, MA)의 방법을 포함한다. 리포펙션 시약은 상업적으로 시판되고 있으며, 예를 들어, Transfectam™ 및 Lipofectin™이 있다. 뉴클레오타이드의 효과적인 리셉터-인식 리포펙션에 적당한 양이온 또는 중성 지질은 Felgner의 지질을 포함하며, 생체 외 도입을 통해 세포로, 생체 내 도입을 통해 표적

조직으로 전달할 수 있다.

[0067] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세하게 설명한다. 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0068] 실시예 1. 실험설계 및 S-단백질 서열의 검색

[0069] 도 1은 본 발명의 일 예시에 따라 두 가지 서로 다른 mRNA 백신 구성 및 이들의 세포 상호작용에 대한 개략도를 나타낸 것이다.

[0070] 도 1에 나타난 것처럼, 본 발명은 자가 증폭 mRNA(SAM) 및 비복제 mRNA(NRM)과 같이 포괄적인 NRM 매개 면역 활성화 메커니즘과 양성 가닥 mRNA 바이러스에서 얻은 유전자 복제 기계(복제본)의 삽입을 수행하는 SAM 백신 구성에 초점을 맞췄다. 바이러스 구조 단백질을 인코딩하는 ORF는 항원-발현 전사체로 대체되고, 바이러스 RNA-의존성 RNA 중합효소(RdRp)는 레플리콘 구조의 직접적인 세포질 증폭을 위해 유지된다.

[0071] 도 2는 본 발명의 일 예시에 따라 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질에 대한 mRNA 백신 구성 설계를 나타낸 순서도이다.

[0072] 도 2에 나타난 것처럼, 단백질 서열 데이터는 펩타이드 기반 mRNA 백신 제형을 위한 기본 전제 조건이다. SARS-CoV-2의 스파이크 당단백질에 대한 필요한 데이터는 GenBank(NCBI 수탁 번호 6VYB_C) 데이터베이스 및 PDB(ID. 6VYB) 데이터베이스에서 획득하였다.

[0073] 실시예 2. CTL 에피토프 예측

[0074] 세포독성 T 림프구(CTL)는 바이러스에 감염된 세포에 대한 적응 면역을 유지하기 위한 핵심 면역 체계 구성 요소이다. 이것은 MHC-I 복합체에 의해 표면 수용체에 제공된 바이러스 에피토프를 인식하므로, CTL 에피토프의 예측 및 선택은 펩타이드 기반 mRNA 백신 개발에 중추적이다. CTL 에피토프는 NetCTL 1.2 서버에 의해 예측되었다. 서버는 에피토프 예측을 실행하기 위해 인공 신경망(ANN) 기반 방법론을 배포한다. 기본 임계값 0.75, 항원 제시(TAP) 수송 효율 0.05와 관련된 수송체 및 0.15의 C 말단 절단 가중치에서 우리는 HLA 대립유전자의 모든 12개 A 및 B 슈퍼타입 중에서 CTL 에피토프를 예측했다. 이렇게 예측된 CTL 에피토프는 항원성 및 알레르기성 평가 후에 백신 제형을 위해 선택되었다. 에피토프의 항원 특성은 Vaxizen 서버를 사용하여 평가되었고, 알레르기 특성은 AllerTOP v2.0 서버를 이용하여 평가되었다.

[0075] 실시예 3. HTL 에피토프 예측

[0076] 헬퍼 T 림프구(HTL)는 바이러스 감염 시 세포 매개 면역과 체액 면역 모두에서 중요한 역할을 한다. HTL의 MHC-II 매개 세포 표면 수용체는 바이러스 에피토프를 인식하고 반응하는 면역 캐스케이드를 시작한다. MHC-II 결합 및 HTL 에피토프는 면역 에피토프 데이터베이스(IEDB) MHC-II 결합 예측 모듈 v2.22(39)를 사용하여 예측되었다. 에피토프를 예측하기 위해 다른 매개변수를 기본 설정으로 유지하면서 전체 HLA 참조 세트를 사용했다. 에피토프 예측 후, 기능적 에피토프는 각각 Vaxijen 및 AllerTOP 서버의 항원 및 알레르기 평가를 기반으로 선택되었다.

[0077] 실시예 4. B cell 에피토프 예측

[0078] B 세포 에피토프는 백신 설계에서 중요한 역할을 한다. 이 작업에서 우리는 BCPREDS 서버를 사용하여 표적 단백질 내의 B 세포 에피토프를 식별했고, 고정 길이 선형 에피토프를 예측하기 위해 BCPred 예측 방법이 적용되었다. 예측된 에피토프의 길이는 20개의 아미노산으로 선택되었다. B 세포 에피토프는 또한 이에 따라 Vaxijen 및 AllerTOP 서버에서 항원 및 알레르기 특성에 대해 스크리닝되었다.

[0079] 실시예 5. NRM 및 SAM 백신 구성 설계

[0080] mRNA 백신은 DNA 백신보다 훨씬 높은 발현을 보인다. mRNA 백신에 사용되는 Non-Replicating mRNA 분자는 mRNA의 수명과 발현에 중요한 5가지 핵심 요소를 포함하는데, 자가 증폭 mRNA 분자 기반 백신 후보를 생성하기 위하여, 복제효소 코딩 유전자 서열과 CDS 측면에 있는 5가지 핵심 요소를 삽입하였다. 이것은 숙주의 신체 내에서 자가 복제하는 능력을 mRNA 백신에 제공하는 것이다. 이전에 선택된 에피토프는 mRNA 백신의 원하는 번역 산물이었다. 에피토프를 함께 연결하기 위해 B 세포 에피토프 사이에 'GPGPG' 링커를 사용하고 CTL 에피토프와 HTL 에피토프 사이에 'KK' 링커를 사용했다. 완전한 에피토프-링커 서열은 EMBL-ESI의 EMBOSS Backtranseq 도구를 사용하여 역번역되었다. 역번역된 DNA 서열은 백신 구축물을 얻기 위해 Bio 모델 전사 및 번역 도구를 적용함으로써 mRNA 서열로 전환되었다.

[0081] 실시예 6. 백신 컨스트럭트 특징

[0082] 또한, mRNA 백신의 번역된 1차 아미노산 서열을 얻었고, 이들의 상이한 물리화학적 특성을 특징을 분석하였다. ExPASy ProtParam 온라인 웹 서버를 사용하여 분자량, 분자식, 이론 등전점(pI), 불안정 지수(II), 지방족 지수(AI), 추정 반감기 및 소수성 총평균(GRAVY)을 포함한 물리화학적 특성을 얻었다. 동시에 VaxiJen 및 AllerTOP 서버를 사용하여 이러한 백신 구조의 항원성과 알레르기성을 각각 평가했다. 마지막으로 온라인 서버인 Protein-Sol을 사용하여 발현된 백신 단백질의 용해도를 평가했다.

[0083] 실시예 7. 에피토프와 HLA 대립유전자 사이의 분자 도킹

[0084] 선택된 CTL 및 HTL 에피토프는 해당 MHC 대립유전자와의 구조적 호환성에 대해 연구되었으며, 결합 상호작용은 분자 도킹 연구를 통해 평가되었다. MHC 대립유전자는 RCSB PDB 데이터베이스에서 검색되었고 불필요한 리간드를 제거하기 위해 PyMOL 소프트웨어를 사용하여 조작되었다. 먼저 에피토프와 대립유전자 간 분자 도킹을 수행하기 위하여, DISTILL 2.0 서버를 사용한 에피토프의 3D 구조 예측을 수행하였다. AutoDock Vina 소프트웨어는 에피토프와 MHC 분자의 도킹에 사용되었는데, 그리드 상자 준비 시 AutoDock 도구 4를 사용하여 기본 매개변수를 설정하였다. 마지막으로 PyMOL 소프트웨어를 사용하여 분자 도킹 복합 시각화 및 준비를 수행했다.

[0085] 실시예 8. 인간 TLR-7과 mRNA 백신의 분자 도킹

[0086] 분자 도킹 연구를 토대로, 항원 발현 및 면역 자극을 지원하고 톨-유사 수용체 7(toll-like receptor 7; TLR-7)에 의해 촉진되는 새로운 효과적인 mRNA 기반 백신을 설계했다. mRNA 분자에 대한 단백질 도킹은 HDock 서버를 사용하여 수행하였다. 이 서버는 템플릿 기반 모델링과 ab initio free docking의 하이브리드 알고리즘을 기반으로 protein-DNA/RNA 도킹을 제공한다. 그러나 TLR-7의 cryo-EM 구조는 현재 RCSB 단백질 데이터 은행 데이터베이스에서 사용할 수 없으므로, ExPASy의 SWISS-MODEL 서버와 GenBank(NCBI accession no. AAZ99026)에서 획득한 단백질 서열을 사용하여 상동성 모델링을 수행하여 이 구조를 얻었다.

[0087] 실시예 9. 백신 컨스트럭트의 면역 시뮬레이션

[0088] 2개의 선택된 mRNA 백신 구성체(NRM 기반 및 SAM 기반)의 면역 반응을 인실리코(in silico) 면역 시뮬레이션을 사용하여 평가했다. 설계된 mRNA 기반 백신 구성의 면역 반응 시뮬레이션을 수행하기 위하여, C-ImmSim으로 알려진 에이전트 기반 온라인 면역 시뮬레이터 서버를 사용하였다. 이 서버는 면역 상호 작용 및 면역 에피토프를 예측하기 위해 기계 학습 기술과 PSSM(위치별 스코어링 매트릭스)을 제공했다. 신종 코로나바이러스에 대한 표적 면역 프로파일링을 위해 4주 간격으로 3회의 주사가 투여되었다. 숙주 신체에서 보존된 HLA 대립유전자의 발현은 면역 프로파일링에 사용되었다. 면역 분석은 주사 후 시간 단계 1, 84 및 168에서 계산되었다(각 시간 단계는 8시간이고 첫 번째 주사 시간은 단계 0임). 면역 실행 시뮬레이션의 볼륨은 25 μ m로 설정되었으며, 시뮬레이션은 1050 단계로 수행되었다.

[0089] 실시예 10. S-단백질 서열의 검색

[0090] SARS-CoV-2(PDB ID. 6VYB_C)의 표적 표면 스파이크 당단백질의 아미노산 서열은 NCBI 데이터베이스에서 검색되

었다. 이 S-단백질은 1281개 아미노산 길이로 동종삼량체 구조를 형성하는 것이며, 두 개의 소단위를 가지고 있는 것이다. 소단위 s1은 숙주 수용체와 상호작용하는 반면, 소단위 s2는 SARS-CoV-2 바이러스 진입을 위한 세포막 융합을 매개한다. 이 단백질은 바이러스의 숙주 세포로의 융합 및 내재화를 매개하므로 바이러스 병원성의 중요한 구성 요소이다.

[0091] 실시예 11. CTL 에피토프 예측

[0092] CTL 에피토프는 VaxiJen v2.0 서버를 사용하여 >1 항원성 점수에 대한 스크리닝에 의해 예측되었다. 구체적으로는, 9개의 아미노산 길이로 이 기준을 충족하는 총 7개의 CTL 에피토프를 스크리닝에서 얻은 후, 이러한 에피토프의 정확한 항원 점수 및 알레르기성을 평가하여 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

순번	에피토프 서열	서열번호	C-score	항원성	알레르기성
1	RQIAPGQTG	1	0.8698	1.7890 Probable antigen	Probable non-allergen
2	VVFLHVTYV	2	1.0304	1.5122 Probable antigen	Probable non-allergen
3	VRFPNITNL	3	1.0215	1.1141 Probable antigen	Probable non-allergen
4	KIADYNYKL	4	0.5524	1.6639 Probable antigen	Probable allergen
5	QLTPTWRVY	5	0.7887	1.2119 Probable antigen	Probable non-allergen
6	KCYGVSP TK	6	0.4067	1.4199 Probable antigen	Probable allergen
7	QIAPGQTGK	7	0.4481	1.8297 Probable antigen	Probable non-allergen

[0094] 상기 표 3에 나타난 것처럼, 7개의 에피토프 중 2개는 알레르기 특성을 나타내어, 나머지 5개의 CTL 에피토프가 백신 통합을 위해 선택되었다.

[0095] 실시예 12. HTL 에피토프의 예측

[0096] IEDB MHC-II 결합 서버는 총 15개의 HTL 에피토프를 예측하였다. 이 15개 에피토프를 mRNA 백신 후보에 통합시키기 위하여, 항원성 및 알레르기성을 확인하여 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

순번	에피토프 서열	서열번호	백분위 순위	대립유전자	항원성	알레르기성
1	FGEVFNATRFASVY A	8	0.03	HLA-DPA1*01:03 DPB1*04:01	0.0415 Probable non-antigen	Probable non-allergen
2	QSL LIVNNATNVVI K	9	0.01	HLA-DRB1*13:02HLA-DRB1*04:01	0.4343 Probable antigen	Probable non-allergen
3	KTQSL LIVNNATNV V	10	0.17	HLA-DRB3*02:02	0.6303 Probable antigen	Probable allergen
4	NDPFLGVVYHKNNK S	11	9.3	HLA-DRB1*04:01	0.8199 Probable antigen	Probable allergen
5	EVFNATRFASVYAW N	12	0.14	HLA-DPA1*01:03 DPB1*04:01	0.0832 Probable non- antigen	Probable allergen
6	LLLQYGSFCTQLNR A	13	1.8	HLA-DRB1*04:05DRB1*15:01	0.9471 Probable antigen	Probable non-allergen
7	VVLSFELLHAPATV C	14	0.03	HLA-DRB1*01:01	0.8618 Probable antigen	Probable non-allergen
8	CPFGEVFNATRFAS V	15	0.18	HLA-DPA1*01:03 DPB1*04:01	0.2975 Probable non- antigen	Probable non-allergen
9	GNVNYLYRLFRKSN L	16	5	HLA-DPA1*01:03DPB1*04:01	0.1801 Probable non- antigen	Probable non-allergen
10	GNVNYLYRLFRKS N	17	3.6	HLA-DRB5*01:01	0.0207 Probable non- antigen	Probable allergen
11	LSFELLHAPATVCG P	18	0.03	HLA-DRB1*01:01	0.5062 Probable antigen	Probable allergen

12	SKTQSLIVNNATN V	19	0.03	HLA-DRB1*13:02	0.6256 Probable antigen	Probable allergen
13	SI IAYTMSLGAENS V	20	1.8	HLA-DPA1*02:01 DPB1*14:01	0.5691 Probable antigen	Probable allergen
14	EGFNCYFPLQSYGF Q	21	2.2	HLA-DQA1*01:01DQB1*05: 01	0.5795 Probable antigen	Probable allergen
15	TESIVRFPNITNLC P	22	0.69	HLA-DRB1*15:01	0.6128 Probable antigen	Probable non-allergen

[0098] 상기 표 4에 나타난 것처럼, 15개 에피토프 중 5개는 VaxiJen v2.0 분석에 의해 비항원성으로 간주되었다. 또한, 안전 조치 때문에 우리는 이 10가지 항원 에피토프에 대해 알레르기를 추가로 스크리닝한 결과, 6개의 에피토프가 알레르기를 일으키는 것으로 나타났다.

[0099] 실시예 13. B 세포 에피토프의 예측

[0100] BCPred 예측 모듈은 SARS-CoV-2 S-단백질(각각 20개 아미노산) 내에서 21개의 선형 에피토프를 식별하였다. 이 21개 에피토프를 mRNA 백신 후보에 통합시키기 위하여, 항원성 및 알레르기성을 확인하여 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

위치	에피토프 서열	서열번호	점수	항원성	알레르기성
1238	YFQGGGSGYIPEAPRDGQA	23	1	-0.0192 Probable non-antigen	Probable allergen
38	TTRTLPPAYTNSFTRGVYY	24	0.986	0.4340 Probable antigen	Probable allergen
691	ASYQTQTNPSGAGSVASQS	25	0.984	0.5617 Probable antigen	Probable non- allergen
1154	NTVYDPLQPELDSFKEELDK	26	0.981	-0.3936 Probable non-antigen	Probable non- allergen
612	GGVSVITPGTNTSNEAVLY	27	0.975	0.4377 Probable antigen	Probable allergen
1082	LHVTYVPAQEKNFTTAPAIC	28	0.971	0.9251 Probable antigen	Probable allergen
133	TQSLIIVNNATNVVIVKCEF	29	0.959	0.2040 Probable non-antigen	Probable non- allergen
1127	NFYEPQIITDNTFVSGNCD	30	0.935	0.2402 Probable non-antigen	Probable allergen
719	GAENSVAYSNNIAIPTNFT	31	0.911	0.4985 Probable antigen	Probable allergen
801	FAQVKQIYKTPPIKDFGGFN	32	0.904	0.0841 Probable non-antigen	Probable non- allergen
112	ASTEKSNIIRGWIFGTLLDS	33	0.899	-0.2274 Probable non-antigen	Probable non- allergen
427	RQIAPGQTGKIADYNYKLPD	34	0.888	1.4102 Probable antigen	Probable allergen
262	ALHRSYLTGDSSSGWTAGA	35	0.888	0.3957 Probable non-antigen	Probable non- allergen
167	NNKSWMESEFRVYSSANNCT	36	0.881	0.1806 Probable non-antigen	Probable allergen
330	GIYQTSNFRVQPTESIVRFP	37	0.871	0.2931 Probable non-antigen	Probable non- allergen
512	QSYGFQPTNGVGYQPYRVVV	38	0.871	0.6459 Probable antigen	Probable allergen
1217	IDLQELGKYEYIKGSGREN	39	0.863	0.6300 Probable antigen	Probable non- allergen
646	DQLTPTWRVYSTGSNVFQTR	40	0.841	0.5975 Probable antigen	Probable non- allergen
1184	DLGDISGINASVNNIQEID	41	0.837	0.8227 Probable antigen	Probable allergen
670	IGAEHVNNSECDIPIGAGI	42	0.821	1.1141 Probable antigen	Probable allergen

[0102] 상기 표 5에 나타난 것처럼, 21개의 선형 에피토프 중 12개의 에피토프가 항원성인 것으로 밝혀졌다. 이들 12개 B 세포 에피토프 중 3개는 항원성인 것 및 비알레르기성인 것으로 확인되었다.

[0103] 실시예 14. 인구 범위 계산

[0104] 세계 인구 중 알려진 MHC-I 및 MHC-II 대립유전자에 의한 에피토프 인식의 효능을 결정하기 위해, 인구 범위 평가를 수행하였고, 그 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0105] 그 결과, 도 3에 나타난 것처럼, MHC-I에 대한 인구 적용 범위는 75.04%로 나타났다. 또한, 도 4에 나타난 것처럼, MHC-II 대립유전자에 대한 모집단 범위는 45.70%로 나타났다.

[0106] 실시예 15. NRM 및 SAM 백신 구성 설계

[0107] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 NRM 기반 mRNA 백신 구성을 개략도로 나타낸 것이고, 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 SAM 기반 mRNA 백신 구성을 개략도로 나타낸 것이다.

[0108] 에피토프 및 이들의 링커를 역번역하여 NRM 및 SAM mRNA 백신 서열을 얻었다. 그들의 총 길이는 각각 588개 및 7098개 뉴클레오티드였고, 이를 베타 글로빈 5' UTR과 알파 글로빈 3' UTR을 사용하여 안정화하였다. mRNA 백신의 시작 부분에 5' m7G 캡을 배치하고 3' 말단에 150개 뉴클레오티드 폴리-A 꼬리를 배치했다. 도 5에 나타난 것처럼, 폴리-A 꼬리는 NRM 백신 구조에서 120-150개의 뉴클레오티드를 가지고 있었다

[0109] 또한, 도 6에 나타난 것처럼, SAM-type mRNA 백신은 숙주 체내에서 자가 증폭을 위한 복제효소인 레플리카제가 필요하므로, CDS 서열의 측면에 있는 EAAAK 펩타이드 링커가 있는 백신 구조 내에 코돈 최적화 복제효소 유전자를 삽입했다.

[0110] 실시예 16. 백신 구성물의 특성화

[0111] 번역된 mRNA 백신 작제물 중 NRM의 물리화학적 특성화는 하기 표 6에 나타내었고, SAM의 물리화학적 특성화는 하기 표 7에 나타내었다.

표 6

[0112]

순번	특성	평가
1	항원성	0.6661 (Probable ANTIGEN) by VaxiJen v2.0
2	알레르기성	Probable non-allergen (AllerTOP v.2.0)
3	용해도	0.850 (Soluble)
4	아미노산 수	196
5	분자량	21368.68 Dalton
6	이론적 등전점 (pI)	10.23
7	총 원자핵 수	3056
8	화학적식	C ₉₅₉ H ₁₅₄₈ N ₂₇₂ O ₂₇₄ S ₃
9	예상되는 반감기	4.4 hours (mammalian reticulocytes, in vitro) >20 hours (yeast, in vivo) >10 hours (Escherichia coli, in vivo)
10	불안정 지수	26.23 (Stable)
11	지방족 지수	78.01
12	친수성의 총평균 (GRAVY)	-0.47

표 7

[0113]

순번	특성	평가
1	항원성	0.4684 (Probable ANTIGEN) by VaxiJen v2.0
2	알레르기성	Probable non-allergen (AllerTOP v.2.0)
3	용해도	0.167 (less Soluble)
4	아미노산 수	2366
5	분자량	272207.15 Dalton
6	이론적 등전점 (pI)	9.14
7	총 원자핵 수	38623

8	화합식	$C_{12330}H_{19448}N_{3246}O_{3508}S_{91}$
9	예상되는 반감기	30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro) >20 hours (yeast, in vivo) >10 hours (Escherichia coli, in vivo)
10	불안정 지수	34.53 (Stable)
11	지방족 지수	99.57
12	친수성의 총평균 (GRAVY)	-0.213

[0114] 상기 표 6 및 표 7에 나타난 것처럼, 각 구성체의 항원성 특징 및 알레르기 효능을 평가한 결과, NRM 및 SAM 암호화 단백질의 항원성은 각각 0.6661 및 0.4684였으며, 두 백신 구성물 모두 알레르기가 없었다. 또한 두 백신 후보의 용해도를 평가한 결과, 모두 1점 만점에 0.850 및 0.120의 점수로 수용성임을 확인하였다. 또한 NRM 및 SAM 분자에 의해 코딩된 1차 펩타이드 서열의 분자량은 각각 21.36868 kDa 및 272.207 kDa였다. 또한 NRM 및 SAM 인코딩 단백질의 이론적 등전점(pI)은 각각 10.23 및 9.14로 나타났다. 각각의 NRM 및 SAM 암호화 1차 아미노산 사슬의 화학식은 $C_{959}H_{1548}N_{272}O_{274}S_3$ 및 $C_{12330}H_{19448}N_{3246}O_{3508}S_{91}$ 이었다. NRM 및 SAM 암호화 단백질의 불안정성 지수는 각각 26.23 및 34.53이었다. NRM 및 SAM 암호화 단백질의 지방족 지수는 각각 78.01 및 99.57이었다. NRM 및 SAM 인코딩 단백질에 대한 GRAVY 점수는 각각 -0.470 및 -0.213으로 관찰되었다.

[0115] 실시예 17. HLA 대립유전자에 대한 에피토프의 분자 도킹

[0116] AutoDock Vina를 사용하여 CTL 및 HTL 에피토프를 모두 해당 HLA 대립유전자와 도킹하였고, HLA 대립유전자가 있는 에피토프의 결합 친화도를 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

종류	에피토프 서열	서열번호	도킹 점수 선호도 (kcal/mol)	결합 대립유전자 (HLA)
CTL	QIAPGQTGK	7	-4.9	HLA*C-06
CTL	QLTPTWRVY	5	-6.5	HLA*C-06
CTL	RQIAPGQTG	1	-5.3	HLA*C-06
CTL	VRFPNITNL	3	-4.4	HLA*C-06
CTL	VVFLHVTYV	2	-7.4	HLA*C-06
HTL	QSLIVNNATNVVIK	9	-5	HLA-DRB1*04:01
HTL	LLLQYGSFCTQLNRA	13	-7.9	HLA-DRB1*15:01
HTL	VVLSFELLHAPATVC	14	-4.7	HLA-DRB1*01:01
HTL	TESIVRFPNITNLCP	22	-8.4	HLA-DRB1*15:01

[0118] 또한, HLA*C-06 분자와 QIAPGQTGK의 도킹된 복합체를 도 7에 나타내었고, 다른 CTL 및 HTL 에피토프와 해당 HLA 분자의 분자 도킹은 도 8에 나타내었다.

[0119] 실시예 18. 인간 TLR-7과 각 mRNA 백신의 분자 도킹

[0120] 세포내 TLR-7과 백신 mRNA 사이의 분자 상호작용의 경우, 결합 형태에서 활성화될 가능성이 가장 높은 결합 홈을 정확하게 정의함으로써 잠재적으로 특성화될 수 있다. HDock 프로그램은 빠르고 유연한 푸리에 변환(FFT) 검색 전략을 사용하여 공동 예측 및 모양 상보성에 초점을 맞춘 RNA 결합을 위한 최상의 결합 형태를 식별하였다. 서버 생성 출력 모델 품질은 음수 점수 진폭과 연관되었다. 204.64 ÅO 리간드 RMSD를 사용하여 가장 중요한 음성 도킹 점수(-399.51)를 선택하여, 이에 따른 TLR-7과 도킹된 mRNA 백신의 복합체를 확인한 결과, 도 9에서 나타난 것처럼 두 거대분자 간의 높은 친화도 결합을 확인하였다.

[0121] 실시예 19. 면역 반응 시뮬레이션

[0122] 특정 병원체에 의해 유발된 실제 면역학적 현상과 유사한 mRNA 기반 백신 구성의 시뮬레이션된 면역 반응을 조

사하여, 그 결과들 도 10, 도 11, 도 12 및 도 13에 나타내었다.

[0123] 도 10 및 도 12에 나타난 것처럼, 시뮬레이션은 2차 및 3차 반응이 1차 반응보다 훨씬 높음을 나타냈고, 상이한 항원 농도에 반응하는 IgG + IgM 항체 농도는 다른 면역글로빈보다 높은 것을 확인하였다.

[0124] 또한, 도 11 및 도 13에 나타난 것처럼, 이 서버는 또한 미래 반응을 매개하는 기억 세포의 발달 가능성을 평가하기 위해 오래 지속되는 B 세포 집단(mm^3 당 세포)을 정량화 하였다. 높은 수준의 활성 TH(헬퍼) 및 TC(세포독성) 세포 집단도 강력한 기억 발달과 함께 관찰되었고, 세포독성 T-세포의 증가는 NRM 백신 투여 약 10일 후 mm^3 당 최대 1130개 세포 및 SAM 백신 투여 후 약 8-10일 후에 mm^3 당 1150개 세포의 최대값에 도달했다. 또한, NRM 및 SAM mRNA 백신을 노출시키는 동안, 더 높은 대식세포 및 수지상 세포 활성화와 함께 자연 살해(NK) 세포 사이에서 꾸준한 증식이 관찰되었다. 마지막으로, 사이토카인(IFN- γ 및 IL-2)의 증가된 수준이 선천적 면역 반응으로 발견되었으며, 더 낮은 심슨 지수(d)를 나타낸 것을 확인한 바, 면역 반응의 다양성이 더 크다는 것을 알 수 있었다.

[0125] 실시예 20. HDOCK를 사용한 추가 분자 도킹 연구

[0126] HDOCK를 사용한 추가 분자 도킹 연구를 수행하였다. 그 결과, 결합 포켓과의 적절한 상호 작용 및 TLR-7 캐스케이드 기계를 통한 타고난 면역의 자극을 나타내는 -399.51의 도킹 점수를 계산하고 genuine interaction을 도출하였다. 또한 용해도 점수 및 불안정성 지수를 포함한 물리화학적 매개변수 역시 적합한 것으로 확인된 바, 본 발명에 따른 mRNA 백신의 경우, 체액 및 세포 면역 반응 결과를 확인하였고, 또한 높은 지속성의 기억 B 세포 및 T 세포의 증가를 확인하였다.

[0127] 실시예 21. 백신 컨스트럭트 발현 확인

[0128] 도 14는 본 발명의 일 예시에 따라 대장균 K12 숙주에서 발현된 백신 작제물의 in silico 클로닝을 나타낸 것이다.

[0129] 백신 접종 후 단백질 발현을 위한 번역 과정 효율을 확인하기 위하여, 벡터 기반 발현 모델 내에서 mRNA 백신 구조의 발현을 조사하는 인 실리코(in silico) 클로닝을 수행했다. 코돈 최적화 후 cDNA 서열의 총 길이는 594 nts였다. 복제를 허용하기 위해 CDS의 업스트림 및 다운스트림에 각각 XbaI 및 XhoI 제한 사이트를 삽입했다. 제조합 플라스미드는 pET28a(+) 벡터의 XbaI(5026)와 XhoI(6318) 제한 부위 사이에 최적화된 코돈 서열 백신을 삽입하여 제작하였다. 제조합 벡터는 5.728kbp의 길이를 가졌다. 이 in silico 복제 방식은 정확한 적용을 위해 제안된 mRNA 백신 후보를 증폭하는 인공 기술을 대체하는 것이다. 이러한 방식으로 구축된 백신은 SARS-CoV-2 감염으로부터 보호하는 데 있어 예상되는 효과를 표시할 수 있었다.

[0130] 또한, in silico 클로닝 모델은 SARS-CoV-2 바이러스에 대해 인식된 에피토프와 함께 mRNA 백신 구성의 효과를 보여주었다. 제안된 mRNA 백신 후보가 COVID-19 감염에 대해 강력한 효율성을 가지고 있음을 확인하였다.

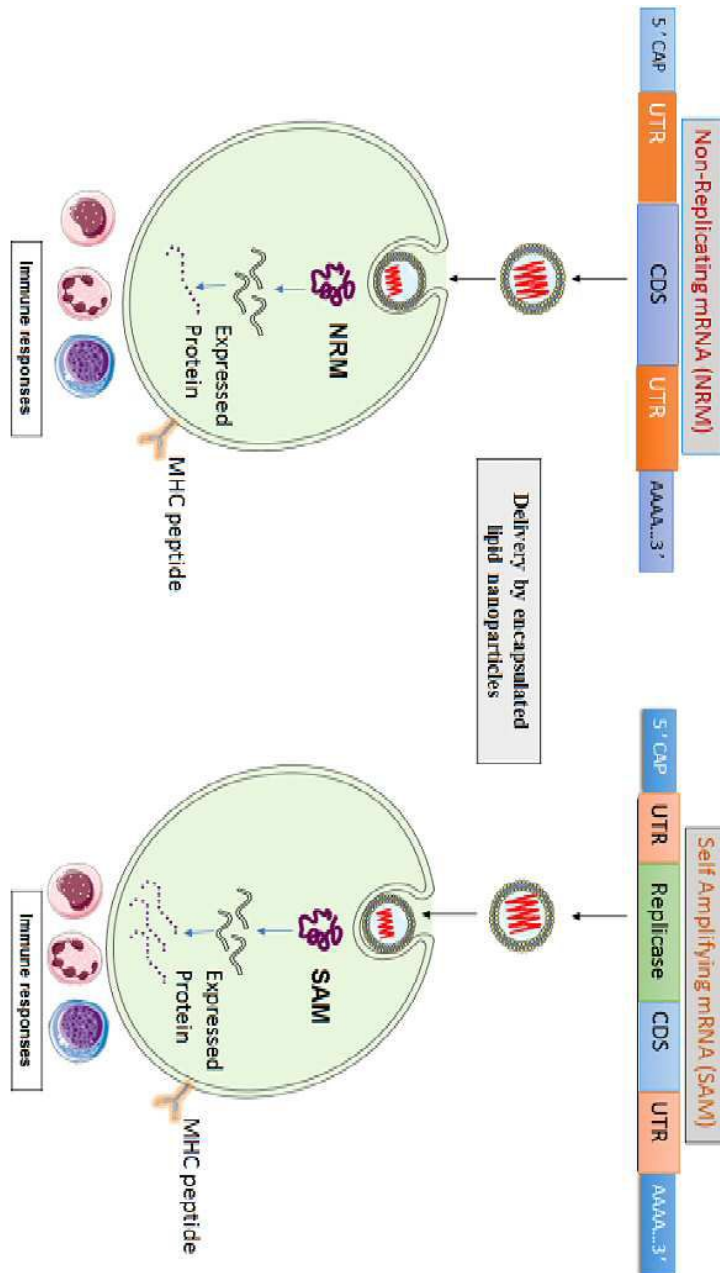
[0131] 엄격하고 광범위한 예측 및 검증을 통해 우리는 SARS-CoV-2에 대한 두 가지 mRNA 백신을 개발했다. 우리는 이 작업에서 면역정보학 접근법을 사용하여 NRM 및 SAM 2개 모두의 mRNA 기반 백신 후보를 개발했다. 이 mRNA 백신은 유연한 펩타이드 스페이스와 연결된 CTL, HTL 및 B 세포 에피토프를 포함하는 단백질 사슬을 생성한다. 상응하는 HLA 분자와 이들 에피토프의 분자 도킹은 우수한 효능, 신속한 인식 및 높은 결합 친화도를 시사한다. 이 에피토프는 항원성이며 면역 세포를 쉽게 감지할 수 있어 면역 체계가 활성화되었다. 이 면역 반응은 기억 B 세포와 T 세포를 생성하여 SARS-CoV-2에 대한 장기간의 면역을 제공할 수 있었다. 백신은 컴퓨터 분석을 통해 유망한 결과를 보여주었다.

[0132] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아닌 점은 명백할

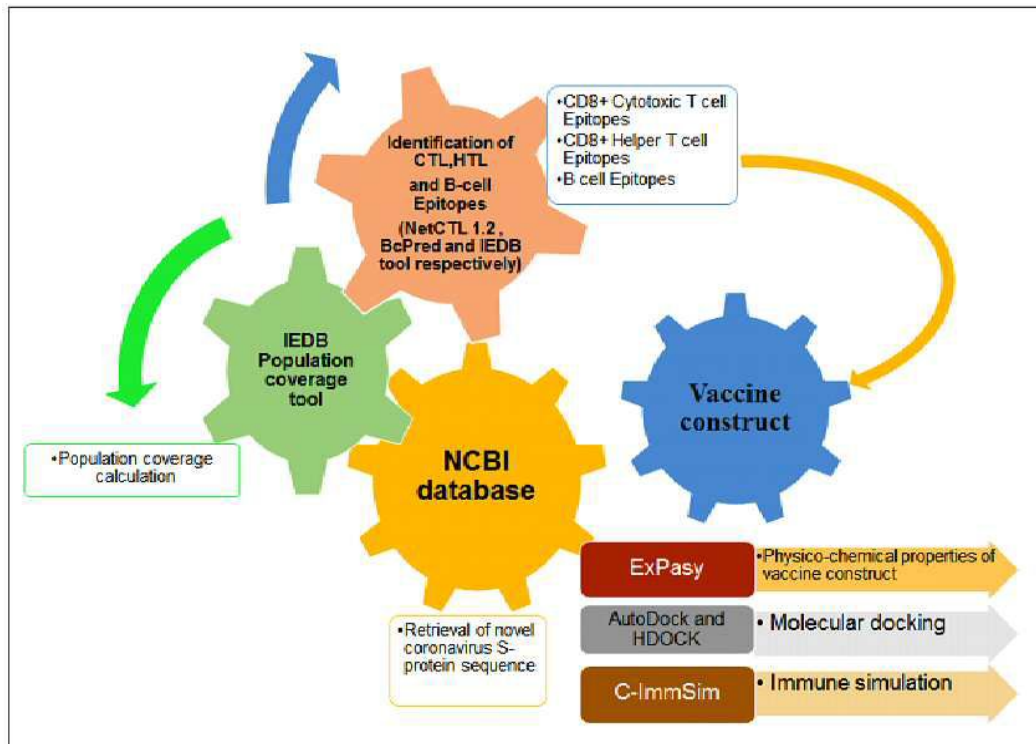
것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

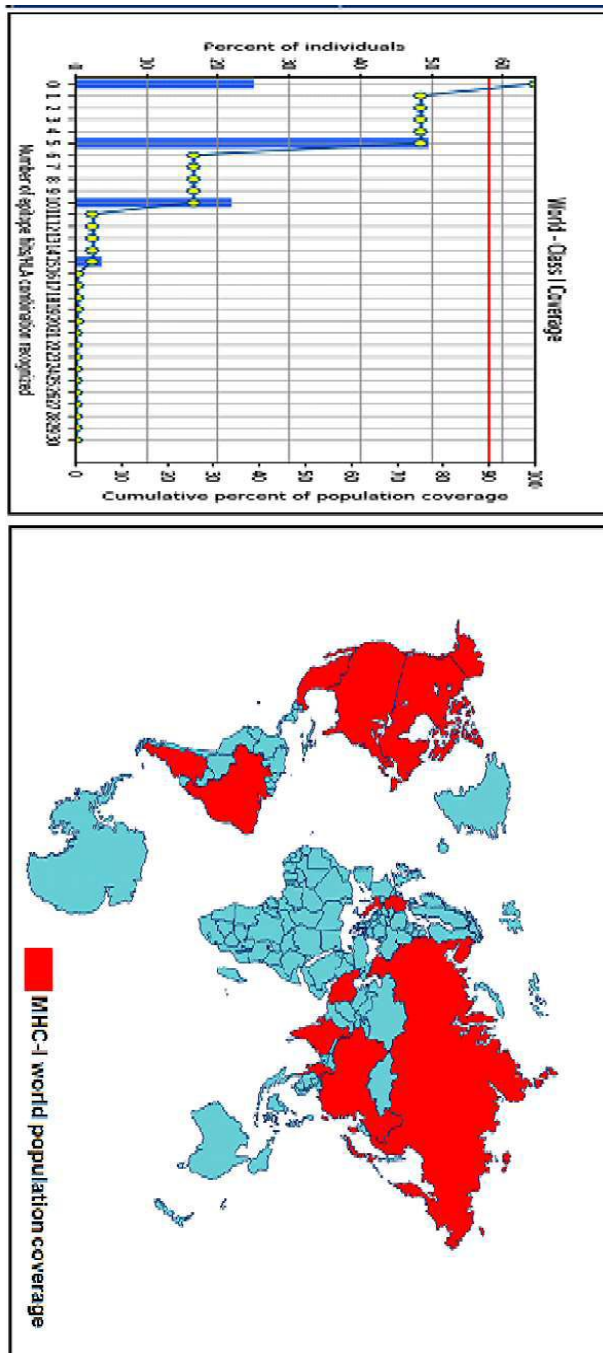
도면1



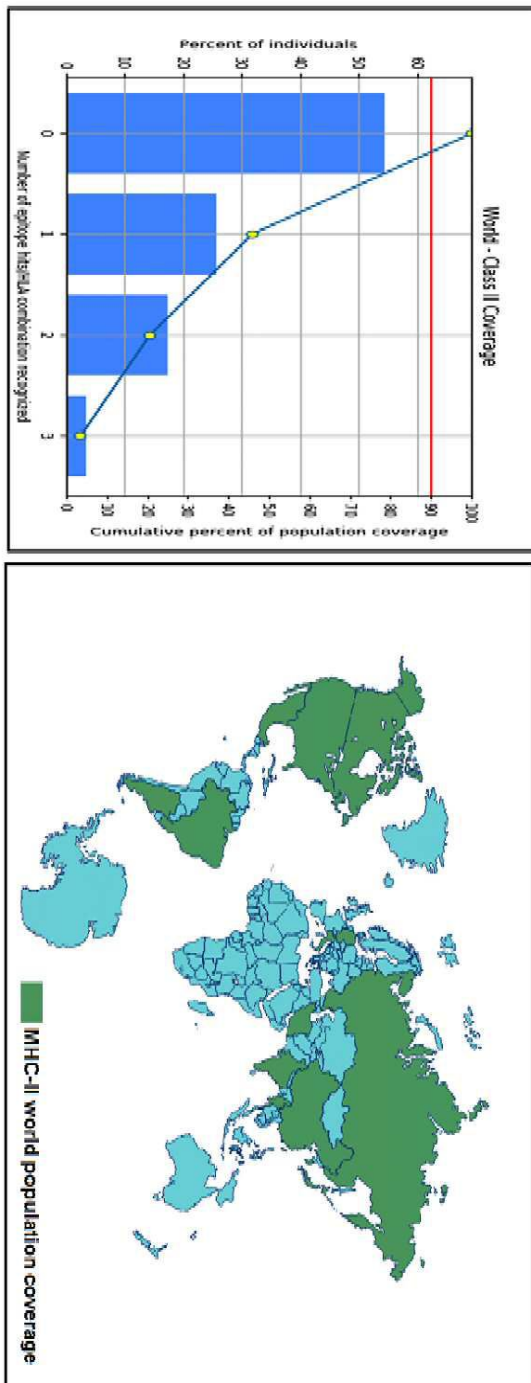
도면2



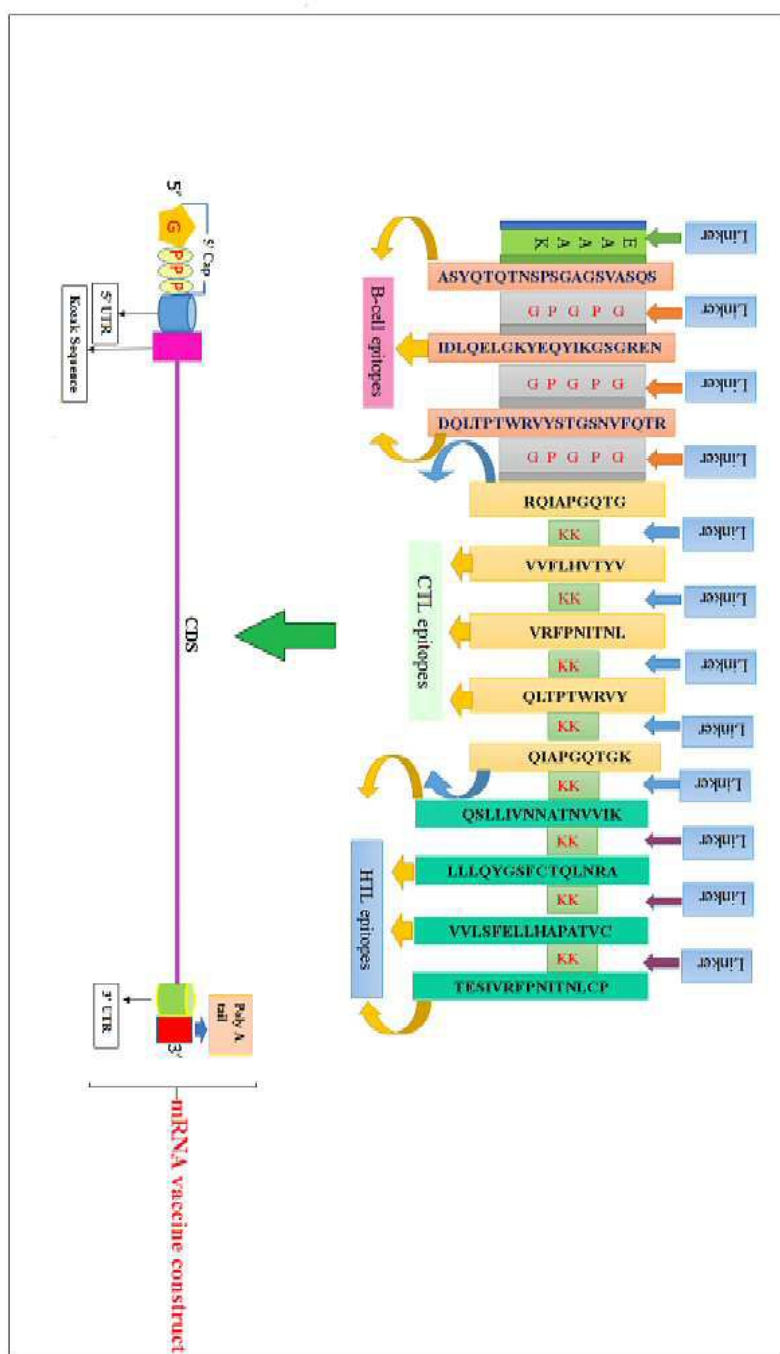
도면3



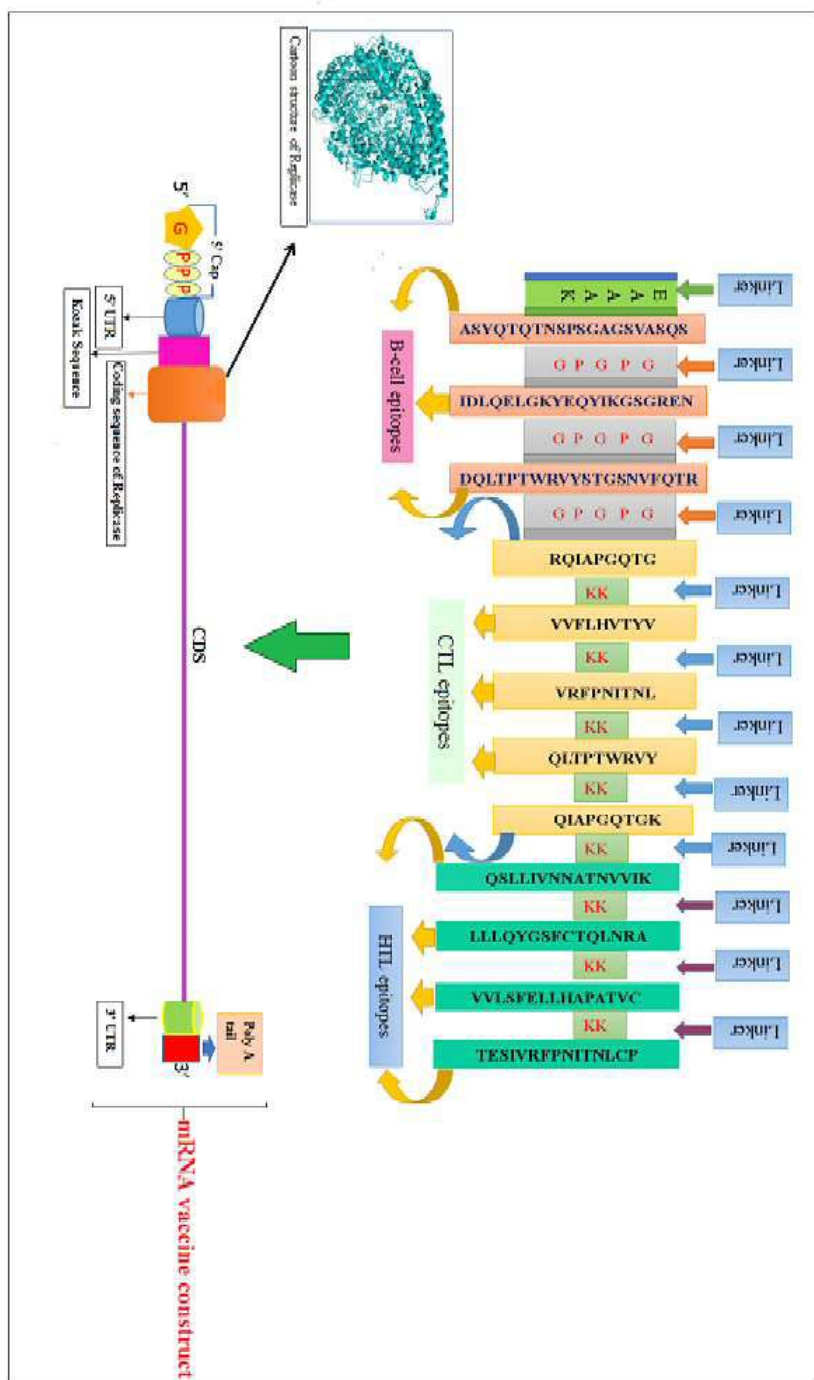
도면4



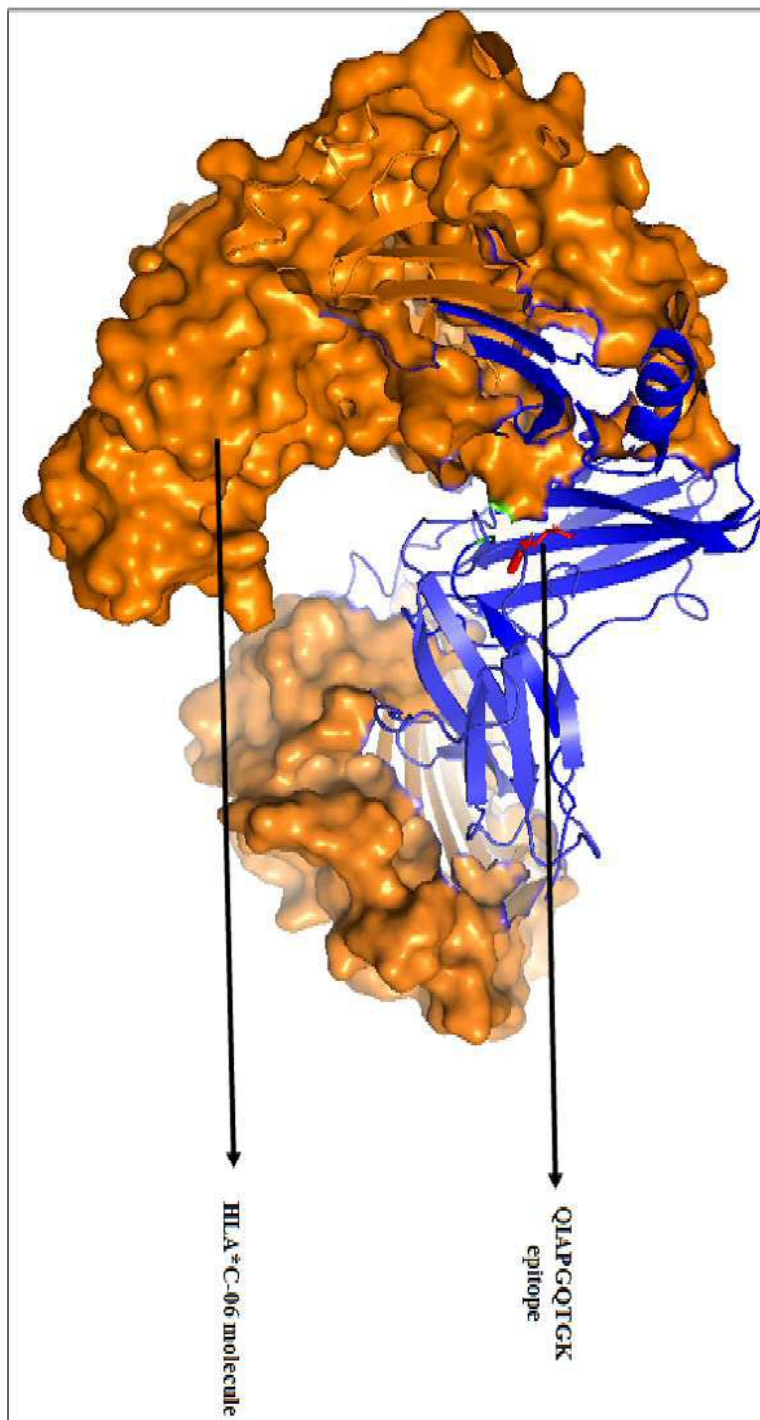
도면5



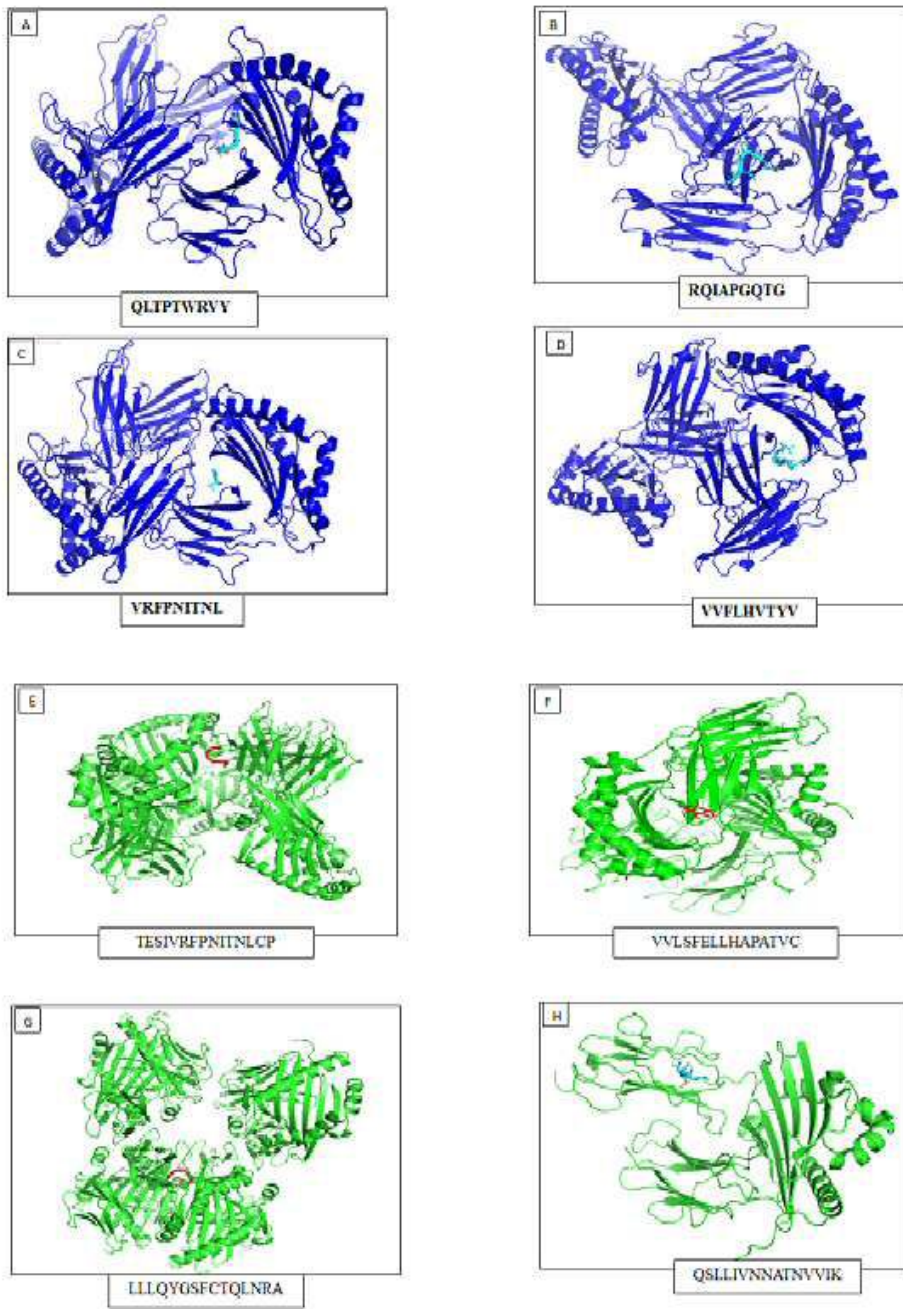
도면6



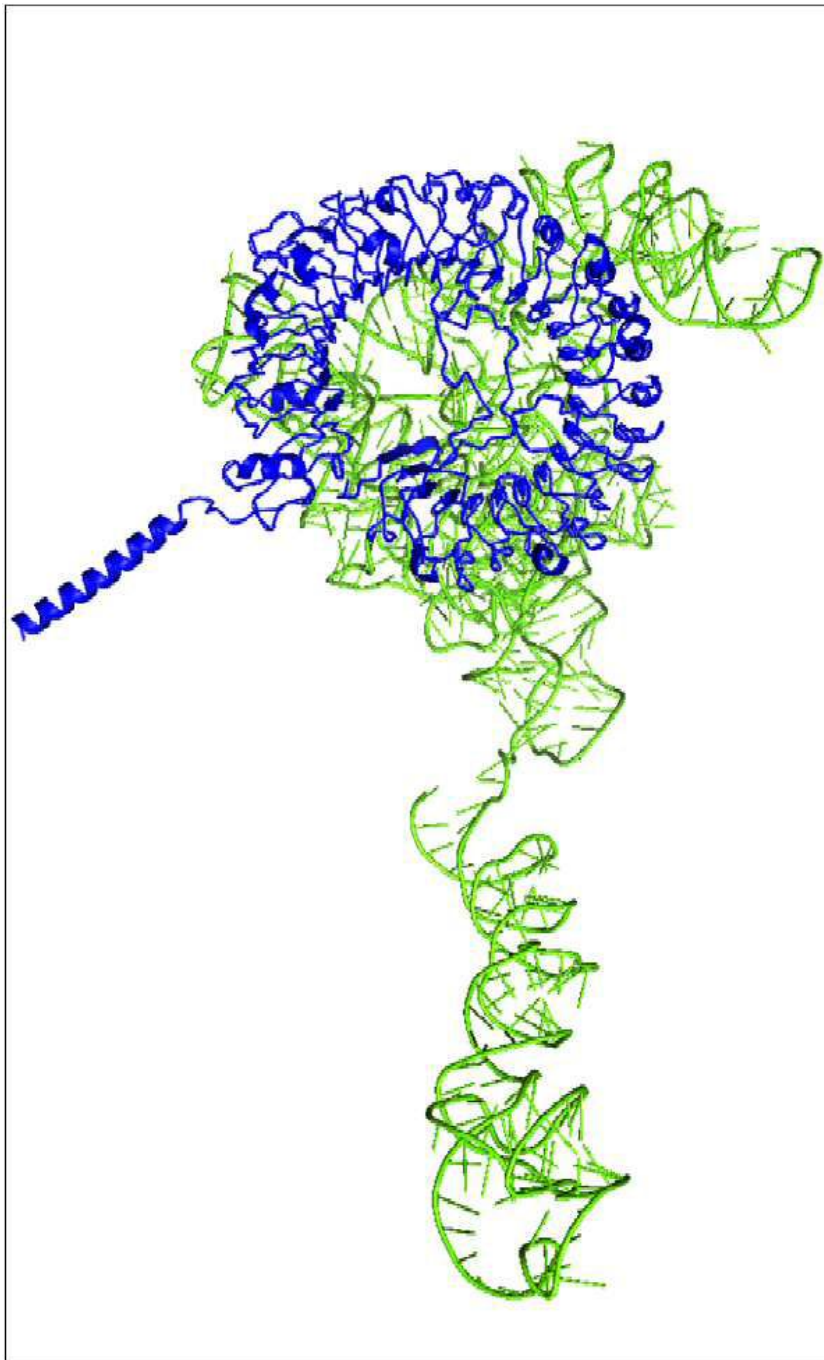
도면7



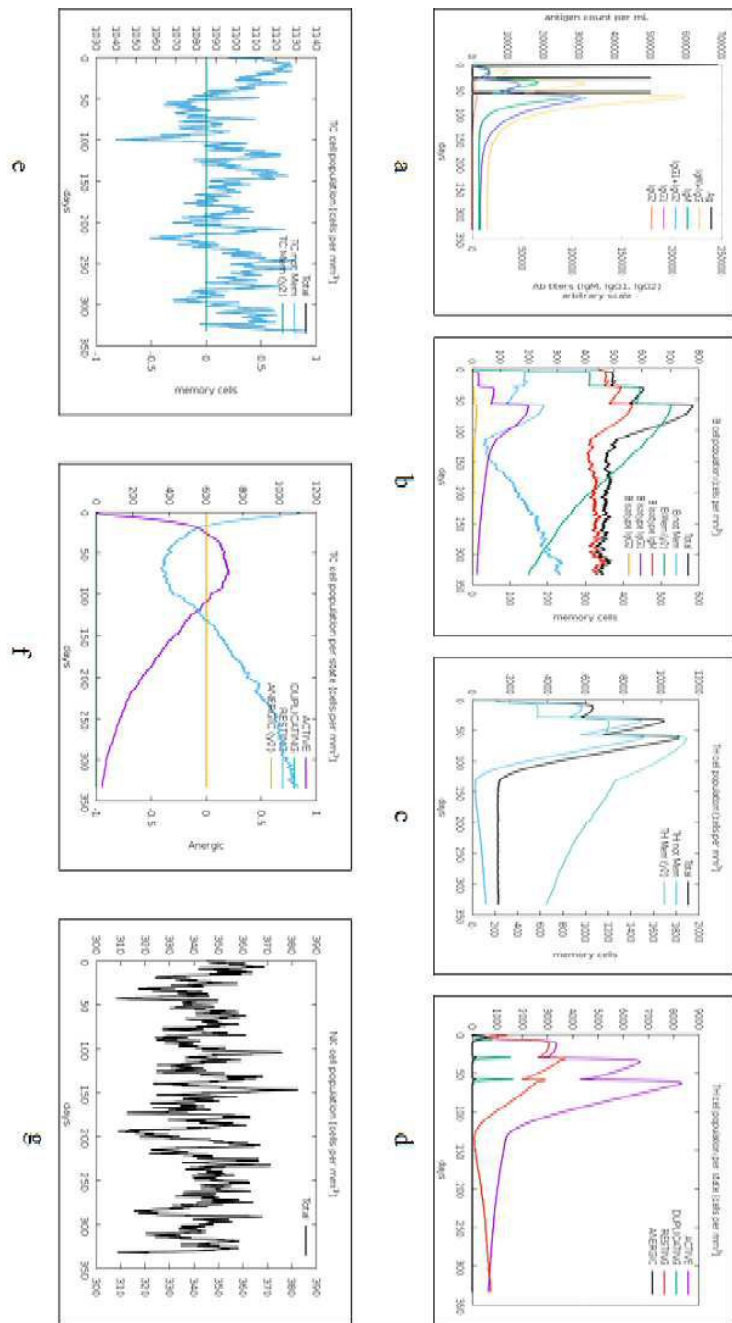
도면8



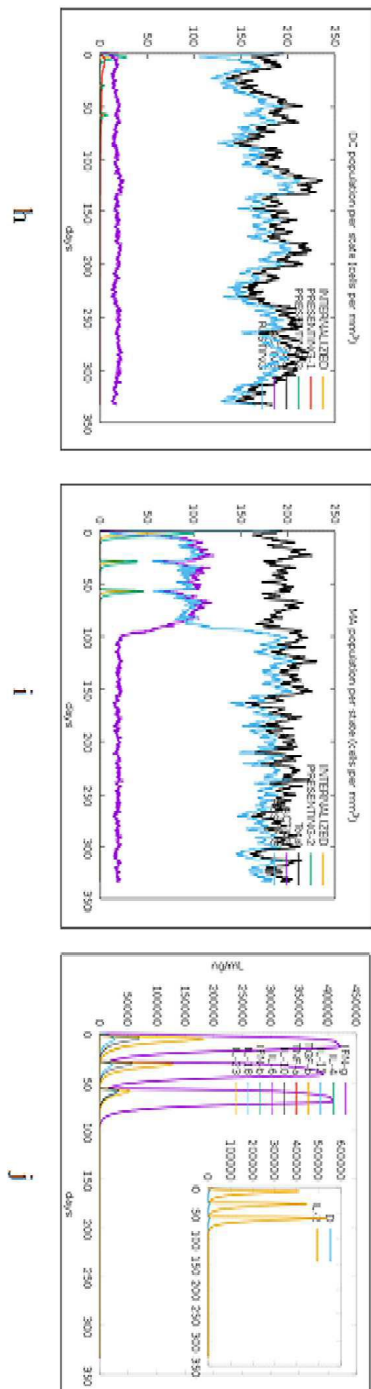
도면9



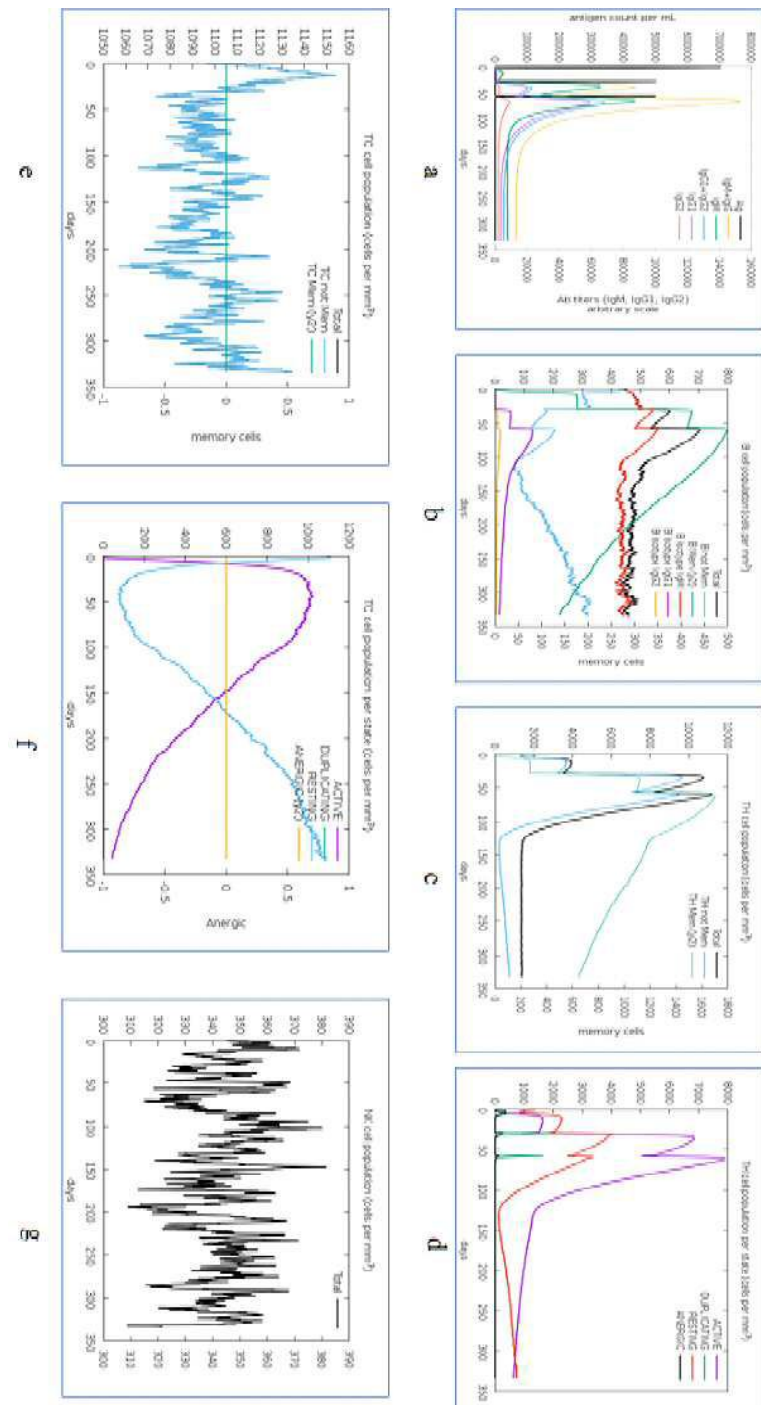
도면10



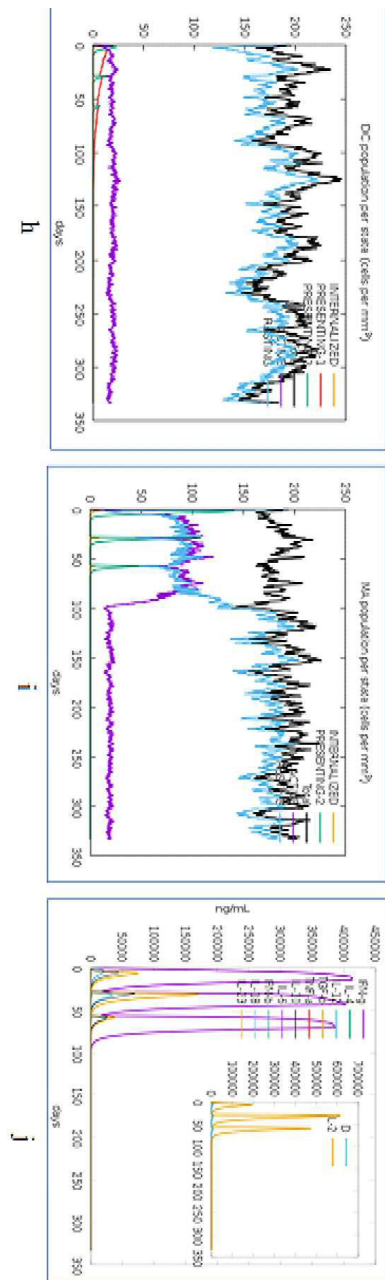
도면11



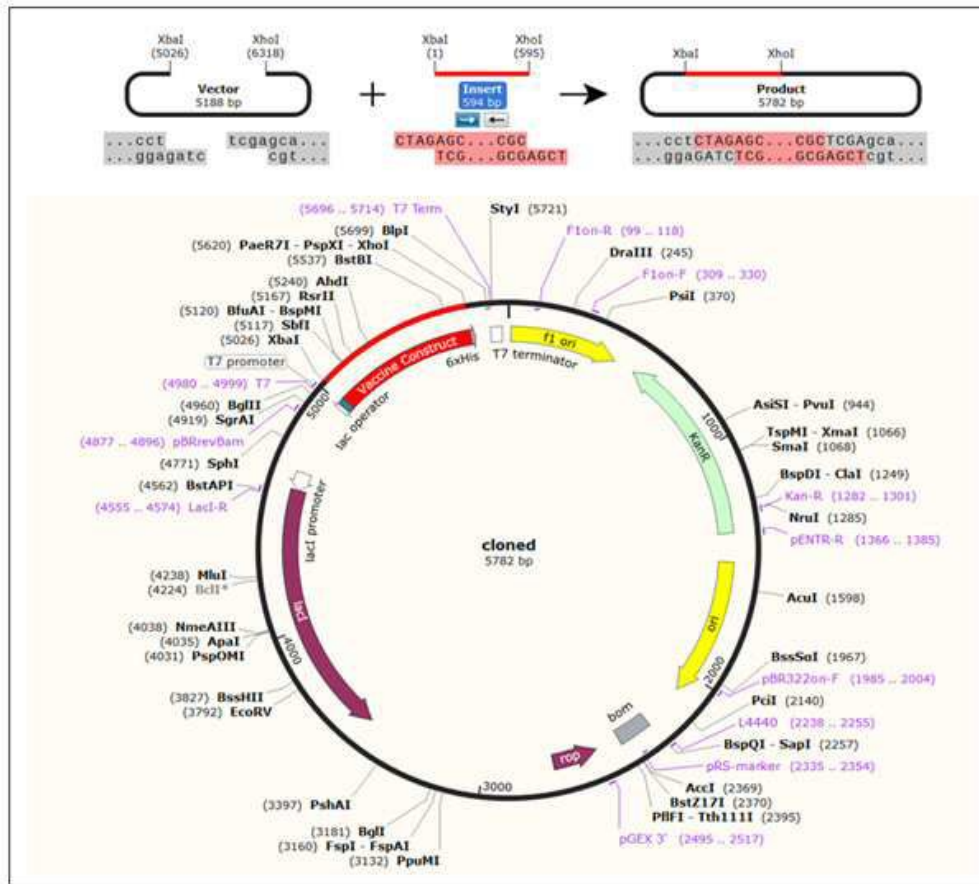
도면12



도면13



도면14



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation Hallym University
- <120> Epitope-based gene constructs and vaccine compositions against coronavirus
- <130> P220130
- <160> 46
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> epitope
- <400> 1
- Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly
- 1 5
- <210> 2

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> epitope
 <400> 2

Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> epitope
 <400> 3

Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu
 1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> epitope
 <400> 4

Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> epitope
 <400> 5

Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr
 1 5

<210> 6
 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 6

Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr Lys

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 7

Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys

1 5

<210> 8

<211> 15

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 8

Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala

1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 9

Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val Ile Lys

1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> epitope

<400> 10

Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val

1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 11

Asn Asp Pro Phe Leu Gly Val Tyr Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser

1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 12

Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 13

Leu Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala

1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 14

Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys
1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 15

Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val
1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 16

Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu
1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 17

Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn
1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 18

Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro

1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

epitope

<400> 19

Ser Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val

1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 20

Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn Ser Val

1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 21

Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln

1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 22

Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro

1 5 10 15
 <210> 23
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> epitope
 <400> 23
 Tyr Phe Gln Gly Gly Gly Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg

1 5 10 15
 Asp Gly Gln Ala
 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> epitope
 <400> 24
 Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr Asn Ser Phe Thr Arg

1 5 10 15
 Gly Val Tyr Tyr
 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> epitope
 <400> 25
 Ala Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Ser Gly Ala Gly Ser Val

1 5 10 15
 Ala Ser Gln Ser
 20
 <210> 26
 <211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 26

Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu

1 5 10 15

Glu Leu Asp Lys

20

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 27

Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Glu Val

1 5 10 15

Ala Val Leu Tyr

20

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 28

Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala

1 5 10 15

Pro Ala Ile Cys

20

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 29

Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val Ile Lys
1 5 10 15

Val Cys Glu Phe
20

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 30

Asn Phe Tyr Glu Pro Gln Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser
1 5 10 15

Gly Asn Cys Asp
20

<210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 31

Gly Ala Glu Asn Ser Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro
1 5 10 15

Thr Asn Phe Thr
20

<210> 32

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 32

Phe Ala Gln Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe
1 5 10 15

Gly Gly Phe Asn

20

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 33

Ala Ser Thr Glu Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe Gly Thr

1 5 10 15

Thr Leu Asp Ser

20

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 34

Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr

1 5 10 15

Lys Leu Pro Asp

20

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 35

Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ser Ser Gly Trp

1 5 10 15

Thr Ala Gly Ala

20

<210> 36

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 36

Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu Ser Glu Phe Arg Val Tyr Ser Ser Ala

1 5 10 15

Asn Asn Cys Thr

20

<210> 37

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 37

Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile

1 5 10 15

Val Arg Phe Pro

20

<210> 38

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 38

Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr

1 5 10 15

Arg Val Val Val

20

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 39

Ile Asp Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Gly Ser
1 5 10 15

Gly Arg Glu Asn
20

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 40

Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly Ser Asn Val
1 5 10 15

Phe Gln Thr Arg
20

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 41

Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val Val Asn Ile Gln
1 5 10 15

Lys Glu Ile Asp
20

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> epitope

<400> 42

Ile Gly Ala Glu His Val Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile
1 5 10 15

Gly Ala Gly Ile

20

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 43

Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 44

Gly Pro Gly Pro Gly

1 5

<210> 45

<211> 2

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 45

Lys Lys

15

<210> 46

<211> 203

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 46

Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Ser

1 5 10 15

Gly Ala Gly Ser Val Ala Ser Gln Ser Gly Pro Gly Pro Gly Ile Asp

20 25 30

Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Arg

35 40 45

Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val

50 55 60

Tyr Ser Thr Gly Ser Asn Val Phe Gln Thr Arg Gly Pro Gly Pro Gly

65 70 75 80

Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Lys Val Val Phe Leu His

85 90 95

Val Thr Tyr Val Lys Lys Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Lys

100 105 110

Lys Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Lys Lys Gln Ile Ala Pro

115 120 125

Gly Gln Thr Gly Lys Lys Lys Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala

130 135 140

Thr Asn Val Val Ile Lys Lys Lys Leu Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe

145 150 155 160

Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Lys Lys Val Val Leu Ser Phe Glu Leu

165 170 175

Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Lys Lys Thr Glu Ser Ile Val Arg

180 185 190

Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Lys Lys

195 200