(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0174887
(43) 공개일자 2024년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 39/215* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0073457
(22) 출원일자 2023년06월08일
심사청구일자 2023년06월08일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
이상수
강원도 춘천시 후석로 459, 101동 1504호
마노짓 바타차리아
인도, 웨스트 벵갈주, 웨스트미드나포르시, 자그람동, 아르빈다나가르 D-24
키란지브 챠크라바티
인도, 웨스트 벵갈주, 24피지에스노던시, 칼린디동, 칼린디 아파트 P-121동 6호
(74) 대리인
특허법인본

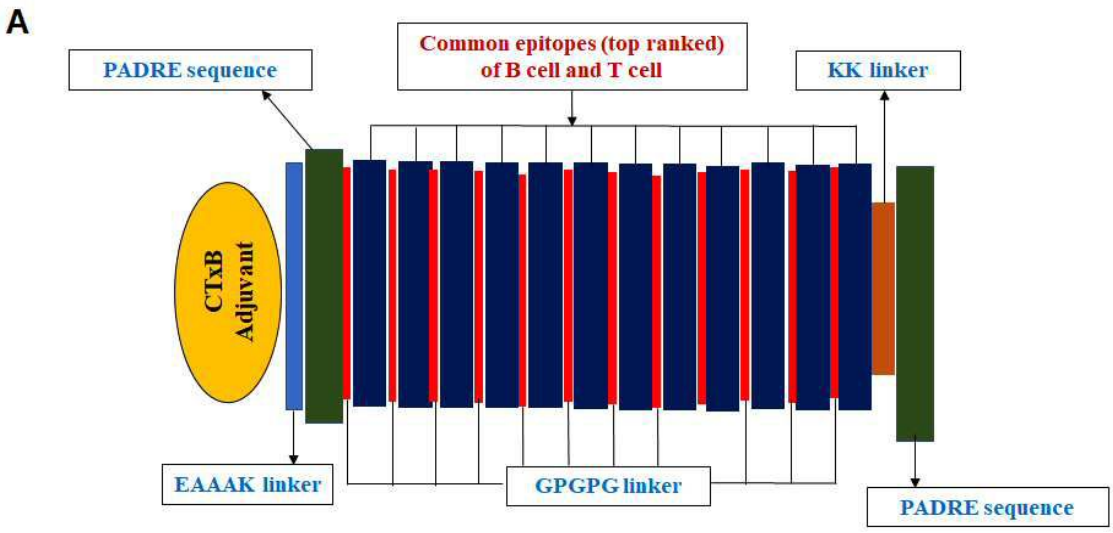
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 에피토프 펩타이드 및 이를 포함하는 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 백신 후보 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 에피토프 펩타이드 및 이를 포함하는 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 백신 후보 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프를 포함하는 에피토프 펩타이드를 제공한다.

대 표 도 - 도4a



(52) CPC특허분류
A61K 39/215 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)
A61K 2039/55544 (2013.01)
C12N 2770/20022 (2013.01)
C12N 2770/20034 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프를 포함하는 에피토프 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 에피토프들은 펩타이드 링커에 의해 연결되는 것인, 에피토프 펩타이드.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 펩타이드 링커는 GPGPG 링커인, 에피토프 펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 에피토프는 SARS-CoV-2 바이러스 변이체의 S-단백질에서 MHC 대립유전자에 대한 공통 B 및 T 세포 에피토프인, 에피토프 펩타이드.

청구항 5

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프를 포함하는 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 백신 후보 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 상기 에피토프들은 펩타이드 링커에 의해 연결되는 것인, 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 백신 후보 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 펩타이드 링커는 GPGPG 링커인, 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 백신 후보 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

약학적으로 허용 가능한 담체, 또는 면역증강제(adjuvant)를 더 포함하는, 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 백신 후보 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 면역증강제는 콜레라 엔테로톡신 서브유닛 B인, 사스코로나바이러스-2에 대한 백신 후보 조성물.

청구항 10

사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 에피토프 기반 펩타이드 백신을 개발하기 위한, 적어도 하나의 서버의 제어 방법에 있어서,

사스코로나바이러스-2 변이체의 S 단백질의 아미노산 서열 정보를 수득하는 단계;

상기 아미노산 서열 정보에서 S-단백질의 RBD 영역에서 돌연변이된 에피토프를 식별하는 단계;

상기 식별된 돌연변이된 에피토프의 항원성을 분석하여 후보 에피토프를 선택하는 단계;

상기 식별된 후보 에피토프를 펩티드 링커와 연결하여 백신 성분을 결정하는 단계;를 포함하는, 서버의 제어 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 후보 에피토프는 SARS-CoV-2 바이러스 변이체의 S-단백질에서 MHC 대립유전자(클래스 I 및 클래스 II)에 대한 공통 B 및 T 세포 에피토프인, 서버의 제어 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 에피토프 펩타이드 및 이를 포함하는 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 백신 후보 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 면역 정보학 접근법을 이용한 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 에피토프 펩타이드 및 이를 포함하는 백신 후보 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] SARS-CoV-2의 발발은 대유행을 일으켰고 전 세계 수백만 명의 사망에 책임이 있다. 이 바이러스는 β 코로나바이러스 계열에 속하며 SARS-CoV 및 MERS-CoV 바이러스와 밀접한 관련이 있다. 지난 2년 동안 심각한 전염병이 점차 약해진 후 중국, 인도, 호주 등과 같은 일부 국가에서는 상황이 통제되었다. 대조적으로, 미국, 브라질, 맥시코 등의 일부 국가에서는 장기간 고통받았다. COVID-19는 감염 및 사망에 대한 다양한 영향으로 전 세계적으로 흘러간다. 그러나 이러한 확장된 감염 상태는 SARS-CoV-2의 새로운 돌연변이 변이체의 출현으로 인해 여러 국가에서 발생했다.

[0003] SARS-CoV-2 및 그 변이체로부터 보호하기 위해 다양한 연구 개발이 진행되어 왔다. 예를 들어, 본 발명자들은 면역정보학 접근법을 사용하여 SARS-CoV-2의 야생 변이체에 대한 다중 펩타이드 기반 에피토프 백신 구성을 설계했다. 또한, 본 발명자들은 SARS-CoV-2의 중요한 신흥 변이체의 대체 에피토프를 사용하여 차세대 백신 구조를 개발했다. 이 외에도, 기존 연구자들은 대유행 바이러스와 싸우기 위한 성공적인 백신 구조를 개발하기 위해 엄청난 노력을 기울였다. 전산 도구와 기술을 사용하여 SARS-CoV-2 바이러스에 대항하여 연구원들에 의해 총 33개 이상의 펩타이드 기반 백신 구조가 보고되었다. 동시에 12개의 COVID-19 백신이 SARS-CoV-2 감염에 대해 전 세계적으로 승인되었다.

[0004] 그러나 이러한 백신 후보는 SARS-CoV-2 변이체, 특히 다른 돌연변이로 인해 생성된 Omicron 및 그 하위 변이체에 대해 광범위한 보호를 제공하지 않는다는 점에 주목했다. 따라서 모든 종류의 SARS-CoV-2 변이체 및 하위 변이체의 감염에 대한 광범위한 보호가 절실히 필요한다.

[0005] 수많은 연구에서 SARS-CoV-2의 새로운 변이체에서 발생하는 중요한 비동의(non-synonymous) 또는 포인트(point) 돌연변이 및 뉴클레오타이드 결실이 확인되었다. 이러한 변이체와 가능한 영향은 SARS-CoV-2 바이러스 암호화 단백질의 포괄적인 구조와 기능을 반영한다. 따라서 돌연변이로 인한 스파이크 당단백질의 구조적 변화는 기능에 영향을 미치며 예방접종 프로그램에 의한 보호를 방해하는 원인이 된다. 새로 출현하는 변이체는 특징적인 특징을 변경하고 세포 침입력을 높이다. 따라서 대부분 중요한 SARS-CoV-2 변이체를 유발하는 새로운 돌연변이 방지할 수 있는 변형 백신 후보가 시급히 필요하다. 또한 우리는 이전에 앞으로 나올 모든 변이체 및 하위 변이에 대해 강력한 면역 보호를 제공할 수 있는 돌연변이 방지 백신 구조를 촉구했다.

[0006] 이러한 사실을 고려하여 본 연구는 기존의 모든 변이체, 특히 RBD 회복 변이를 고려한 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 후보를 설계하는 것을 목표로 한다. 여기서 목표 중 하나는 백신 후보가 숙주 세포의 체내에서 적응 및 선천 면역 반응을 효율적으로 자극해야 한다는 것이다. 또한 이 돌연변이 방지 백신은 SARS-CoV-2의 모든 미래 변이체 및 하위 변이체로부터 보호하기 위한 광범위한 면역 부스터 역할을 해야 한다.

선행기술문헌

[0007] 한국등록특허 제10-2425492호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 에피토프 펩타이드 및 이를 포함하는 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 백신 후보 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 또한, 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 에피토프 기반 펩타이드 백신을 개발하기 위한, 적어도 하나의 서버의 제어 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프를 포함하는 에피토프 펩타이드를 제공한다.

[0012] 상기 에피토프의 서열번호는 표 6에 나타나 있다.

[0013] 상기 에피토프들은 펩타이드 링커에 의해 연결되는 것일 수 있다.

[0014] 상기 펩타이드 링커는 GPGPG 링커일 수 있다.

[0015] 상기 에피토프는 SARS-CoV-2 바이러스 변이체의 S-단백질에서 MHC 대립유전자에 대한 공통 B 및 T 세포 에피토프일 수 있다.

[0016] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프를 포함하는 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 백신 후보 조성물을 제공할 수 있다.

[0017] 상기 에피토프들은 펩타이드 링커에 의해 연결되는 것일 수 있다.

[0018] 상기 펩타이드 링커는 GPGPG 링커일 수 있다.

[0019] 상기 백신 후보 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 또는 면역증강제(adjuvant)를 더 포함할 수 있다.

[0020] 상기 면역증강제는 콜레라 엔테로톡신 서브유닛 B일 수 있다.

[0021] 본 발명은 또한, 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 에피토프 기반 펩타이드 백신을 개발하기 위한, 적어도 하나의 서버의 제어 방법에 있어서, 사스코로나바이러스-2 변이체의 S 단백질의 아미노산 서열 정보를 수득하는 단계; 상기 아미노산 서열 정보에서 S-단백질의 RBD 영역에서 돌연변이된 에피토프를 식별하는 단계; 상기 식별된 돌연변이된 에피토프의 항원성을 분석하여 후보 에피토프를 선택하는 단계; 상기 식별된 후보 에피토프를 펩티드 링커와 연결하여 백신 성분을 결정하는 단계;를 포함 하는, 서버의 제어 방법을 제공할 수 있다.

[0022] 상기 후보 에피토프는 SARS-CoV-2 바이러스 변이체의 S-단백질에서 MHC 대립유전자(클래스 I 및 클래스 II)에 대한 공통 B 및 T 세포 에피토프일 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 에피토프 펩타이드 및 이를 포함하는 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 백신 후보 조성물을 제공할 수 있다.

[0024] 본 발명은 또한, 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 에피토프 기반 펩타이드 백신을 개발하기 위한, 적어도 하나의 서버의 제어 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1a는, AI 및 항원성 분석을 통해 중요 돌연변이를 선택하는 과정을 나타낸다.

도 1b는, 다양한 사스코로나바이러스-2 변이체(알파, 델타, 베타, 감마, 오미크론)의 S-단백질 RBD 영역에서 최종 선택된 9개의 돌연변이와 해당 에피토프를 나타낸다.

도 1c는, 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 백신 후보 조성물의 특성을 확인하는 순서도를 나타낸다.

도 2a는, 백신 후보 구조체의 3D 공간 채우기 모델을 나타낸 것이다.

도 2b는, 백신 후보 구조체의 3D 리본 모델(도 2B)을 나타낸 것이다.

도 2c는, 우리가 선택한 RBD 돌연변이와 SARS-CoV-2 변이체의 발생 사이의 관련성을 설명한 것이다.

도 2d는, 백신 구조체에 대해 선택한 돌연변이의 다른 순위 위치를 설명하기 위한 히트맵을 표시한 것이다.

도 3a는, MHC 클래스 I 대립유전자에 대한 최상위 돌연변이 중첩된 12 개의 필터링된 에피토프에 대한 모집단 범위를 나타낸 것이다.

도 3b는, MHC 클래스 II 대립유전자에 대한 최상위 돌연변이 중첩된 12 개의 필터링된 에피토프에 대한 모집단 범위를 나타낸 것이다.

도 4a는, 본 발명자들이 디자인한 백신 후보 조성물의 구조를 간략히 나타낸 것이다.

도 4b는, 본 발명의 백신 후보 조성물의 3D 구조를 표면 모델로 간략히 나타낸 것이다.

도 4c는, 본 발명의 백신 후보 조성물의 3D 구조를 리본 모델로 간략히 나타낸 것이다.

도 5a 및 5b는, 본 발명의 백신 후보 조성물의 구조적 특성의 2차 구조 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은, 본 발명의 백신 후보 조성물의 고급 순위 품질(advanced ranking quality)을 나타낸다.

도 7은, 본 발명의 백신 후보 조성물의 구조적 검증 결과를 나타낸다.

도 8a 및 8b는, 본 발명의 백신 후보 조성물의 정상 모드 분석(normal mode analysis) 결과를 나타낸다.

도 9는, 본 발명의 백신 후보 조성물의 면역 시뮬레이션 평가 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2)"은 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 또는 임시 명칭 2019년 신종 코로나바이러스(2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)는 유전적 배열(DNA sequencing)상 전도 기능(Positive sense) 단일 가닥 RNA(single-stranded RNA) 코로나바이러스로서, 인간에게 전염성이 있고 코로나바이러스감염증-19의 원인으로 알려져 있다. 발행된 학술 문헌이 아닌 일부 언론에서는 천산갑과 같은 매개 숙주가 이 바이러스에 연관되었다고 생각하는 이들이 있지만, 일반적으로 학계에서는 SARS-CoV-2가 기원했을 법한 박쥐 중증급성호흡기증후군-유사 코로나바이러스(Bat SARS-like coronavirus)와 강한 유전적 유사성을 지니고 있는 것으로 본다. SARS-CoV-2는 중국 우한시에서 일어나 국제적 공중보건 비상사태로 나아간 코로나바이러스감염증-19 유행의 원인이다. 이러한 관계 때문에 그 바이러스를 구어에서 여러 별칭 중 '우한 코로나바이러스'라고 부르지만, 세계보건기구는 다른 이름 중에서도 도시, 국가, 지방, 대륙 등 지명에서 딴 감염증 명칭의 사용을 피하며, 중증급성호흡기증후군 감염증과 혼동하지 않도록 세계보건기구는 가끔 공중보건 의사소통에서 이 바이러스를 "2019년 코로나바이러스감염증 바이러스"나 "2019년 코로나바이러스감염증 유책 바이러스"라고 부른다.

[0027] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "에피토프"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. 또한, 상기 에피토프는 항체, T 세포 수용체 또는 HLA 분자에 의해 인식되는 부위를 형성하는 분자로, 일차, 이차 및 삼차 펩타이드 구조, 또는 전하를 의미한다.

[0028] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "백신"은 특정 항원에 대해 면역 반응을 이끌어내기 위해서 개체에 투여하기 위한 면역원성 조성물을 지칭한다.

[0029] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, “사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 백신 후보 조성물”은 사스코로나바이러스-2 변이체에 대한 백신으로서 사용 가능한 조성물을 의미한다.

[0030] 본 발명에서 우리는 생물 정보학 접근 방식을 기반으로 다중 에피토프 펩타이드 서열을 포함하는 돌연변이 방지 단일 구조를 개발했다. 우리 연구의 첫 번째 부분에서 우리는 스파이크 당단백질(S-단백질)로부터, 특히 RBD 돌연변이를 고려하여 백신 구조체를 개발하기 위해 모든 신흥 변이체의 RBD 영역으로부터 CTL (Cytotoxic T-Lymphocyte) 에피토프, HTL(Helper T-Lymphocyte) 에피토프 및 B 세포 에피토프를 선택하였다. 선택한 돌연변이가 있는 특정 에피토프(9-mer)를 백신 개발에 사용했다. 우리는 돌연변이 선택을 위해 AI 지원 접근 방식과 최상위 항원 점수 선택 방법을 사용했다. 우리 연구의 두 번째 부분에서는 선택된 최상위 순위의 가장 유망한 공통 항원 B 세포 및 T 세포 에피토프(CTL 및 HTL)가 백신 구조의 N-말단 내에서 적절한 링커에 의해 추가된 면역증강제 및 PADRE 서열과 연결된다. 연구의 세 번째 부분에서는 물리화학적 특성, 항원성, 알레르기성 등과 같은 백신 구조의 여러 특성을 분석했다. 동시에 백신 후보의 3D 구조를 모델링하고 면역반응 유도 효능 확인을 위해 TLR-4/MD2 복합체에 도킹하였다.

[0032] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0033] **재료 및 방법**

[0034] 우리는 돌연변이 방지 다중 에피토프 펩타이드 백신을 합리화하기 위해 고급 계산 도구, 서버 및 프로그램을 사용하였다. 돌연변이 선택을 위해 AI 기반 도구와 서버를 사용했다. 기계 학습 접근법은 면역 시뮬레이션에 사용되었다. SARS-CoV-2 변이체의 S-단백질 서열에서 선택된 모든 에피토프는 돌연변이 위치 내에서 확인된다.

[0035] **사스코로나바이러스-2 변이체의 S 단백질에서 아미노산 서열 정보 획득 및 중요한 돌연변이 선택**

[0036] 우리는 SARS-CoV-2 게놈(구조적 및 비구조적 단백질 코딩)의 모든 중요한 돌연변이를 연구하고 수집했다. 보고된 돌연변이도 표 1에 나열되어 있다. 여기에서 S-단백질은 이 바이러스의 모든 구조 단백질에 비해 주요 항원성분을 포함하고 있기 때문에 백신 설계를 위해 S-단백질을 고려했다. 이러한 중요한 돌연변이는 알파(B.1.1.7), 델타(B.1.617.2), 베타(B.1.351), 오미크론(B.1.1), 감마(P.1) 등 5가지 SARS-CoV-2 변이체의 S-단백질 내에서 발견되었고, 표 2에 기재된 AI 기반 도구 및 최상위 항원 점수 선택 방법을 사용하여 돌연변이를 선택하는 데 사용되는 기타 변이체는 표 2에 기재되어 있다. RBD 돌연변이는 면역 지배적이고, SARS-CoV-2의 S-단백질의 다른 도메인과 비교하여 백신 탈출을 담당한다. 따라서 우리는 최종적으로 연구를 위해 서로 다른 VOC 및 VOI의 RBD 돌연변이에 집중한다. 이 연구에서는 현재까지 보고된 모든 RBD 변이를 고려하고 이러한 변이는

SARS-CoV-2 Mutation Analyzer 데이터베이스와 표 2에서 수집되었다.

표 1

[0037]

Sl. No.	Part of the SARS-CoV-2 genome	Mutations
1.	nsp1	R24C, E37D, E37K, H45Y, D48G, V56I, E57G, V60I, D75E, D75G, M85V, E87D, L92F, H110Y, K120N, R124C, N126S, D144A, S166G
2.	nsp2	G220D, R218C, H237R/Y, L180S, N133D, A302V, A306V, G313D, K384N, Q427H, T434I, G438C, P624L, G584C, V485I, T44I, T85I, G339S, G285V, Q496P, K500N, G313D, D144G, G165S, V381A, I513V, T265I
3.	nsp3	F106F, T1198K, S1197R, P1213L, K38R, V1069I, Δ1265, L1266I, A1892T
4.	nsp4	F308Y, M2796I, T492I
5.	nsp5	K236R, N142L, K90R, A7V, L75F, C22N, H246Y, I43V, P132H
6.	nsp6	L37F, L3606F, Δ105-107, A189V
7.	nsp7	L71F,
8.	nsp8	T4159K
9.	nsp9	-
10.	nsp10	A20V
11.	nsp11	-
12.	nsp12	P323L, A97V, D135Y, G671S
13.	nsp13	P504L, Y541C
14.	nsp14	I42V
15.	nsp15	-
16.	nsp16	A116S, P7S, P236L, L111F, N285D
17.	Spike (S)	A67V, Δ69-70, T95I, G142D, Δ143-145, Δ211, L212I, ins214EPE,T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, R346S D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, D427N, N440K, Y449S, G446S, S477N, T478K, F490S, E484A, Q493K, G496S, Q498R, N501Y, S494P, Y505H, A522S, K417T, L452Q, N439K, E484K, N501Y, L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, R357K, L452R, T1027I, T19R, R158G, P384L, E484Q, N501T, A520S, P681R, D950N,

[0038]

		E156del, F157del, L425R, R346K, L452Q, F490S, HV69-
18.	ORF 3A	G196V, Q57H, G251V, S253P, L53F, S26L, Q38P, L95F, R195I
19.	E	T9I
20.	M	V10A, A194V, D3G, Q19E, A63T, I82T
21.	ORF 6	I33T
22.	ORF 7A	T28I, V82A, T120I, Δ115
23.	ORF 7B	F19L
24.	ORF 8	L84S, E92K, ins28269-28273
25.	N	S197L, R203K, G204R, P13L, S194L, I292T, R202K, G204R, R40C, Δ31-33, P80R, D63G, R203M, D377Y
26.	ORF 10	F11S, F11L, L16P, S23P, S24F, R24C, I4L

표 2

Variants name	Mutations in Spike (S) glycoprotein	
	Other than RBD region	RBD region
Alpha (B.1.1.7)	HV 69–70 deletion, Y144 deletion, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H	E484K, N501Y, A522S
Beta (B.1.351)	L18F, D80A, D215G, R246I, D614G A701V	K417N, E484K, N501Y
Delta (B.1.617.2)	G142D, T19R, R158G, D614G, P681R, D950N, E156del, F157del	P384L, V401L, A411S, L452R, T478K, E484Q, F490S
Gamma (P.1)	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027I, D614G,	K417T, E484K, N501Y, A520S
Lambda (C.37)	G75V, T76I, Δ246-252, D614G T859N	L452Q, F490S
Omicron (B.1.1.529)	A67V, Δ69-70, T95I, G142D, Δ143-145, Δ211, L212I,ins214EPE,T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F	G339D, R346S, S371L, N501T, S373P, S375F, K417N, D427N, N439K, L452R, N440K, G446S, Y449S, S494P, T470N, A475V, S477N, T478K, E484A, Q493K, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, R357K

[0039]

[0040] 돌연변이 선택을 위해 다음 단계를 수행했다. 먼저, 서로 다른 주요 변이바이러스(VOC) 및 기타 변이바이러스(VOI)의 S-단백질의 RBD(receptor binding domain)에서 총 853개의 돌연변이(n=853)를 고려했다(돌연변이 분석 데이터베이스 및 표에 언급된 RBD 돌연변이). 이어서, 돌연변이의 추가 선별을 위해 AI를 사용하였다. 우리는 853개의 돌연변이 중에서 30개의 돌연변이(n1=30)를 선택했다(표 2). 이어서, 최상위 항원 점수 선택 방법은 또 다른 돌연변이 선택에 사용되었으며 최종적으로 현재 백신 디자인에 대해 9개의 돌연변이(n2=9)를 결정했다(도 1A). 지금, 돌연변이 선택의 수는 다음과 같이 설명할 수 있다.

[0041] n → n1 → n2

[0042] 여기서 n, n1 및 n2는 다양한 단계에서 선택된 돌연변이의 서로 다른 수이다. 그리고 마지막으로 현재 백신 설계에서 n2개의 돌연변이를 선택했다.

[0043] RBD의 S 단백질에 있는 SNP를 고려하여 돌연변이 데이터베이스가 개발되었다. SARS-CoV-2에서 보고된 방대한 BFE 변화가 있다. BFE 변화를 고려하여 853개의 돌연변이로 구성된 데이터베이스가 개발되었다. 데이터베이스의 데이터 세트는 AI/기계 학습 모델을 사용하여 돌연변이 선택에 사용되었다. 동일한 모델을 사용하여 수학적 AI를 사용하여 돌연변이 방지 COVID-19 단일 클론 항체를 설계되었다. 853개의 돌연변이 중에서 표 3에 나열된 35개의 돌연변이를 선택했다. 마찬가지로 기존 연구자들은 모든 중요한 신흥 변이체에서 상위 25개 돌연변이 목록을 준비했다. 우리가 선택한 35개의 돌연변이에는 이 25개의 돌연변이가 모두 포함되어 있다. 동시에 우리는 9-mer, top-rank 12 공통 T 세포 및 B 세포 항원 에피토프를 발견했다(표 6). 본 발명에서는 4개의 9-mer 에피토프에 존재하는 9개의 돌연변이에 주목했다. 우리는 백신 설계를 위해 이 4개의 9-mer 에피토프를 사용했다. 우리는 이 4개의 에피토프(9개의 돌연변이 포함)와 함께 백신 설계를 위해 8개의 다른 최상위 항원 에피토프를 사용했다. 따라서 총 12개의 항원 에피토프가 백신 설계에 사용되었다.

표 3

Sl. No.	Mutation with amino acid position	Global rank	Worldwide count
1.	N501Y	3	936596
2.	L452R	2	1990939
3.	T478K	1	2053531
4.	E484K	5	125704
5.	K417T	19	67533
6.	S477N	4	126383
7.	N439K	20	19531
8.	K417N	6	102746
9.	F490S	23	6928
10.	S494P	24	6225
11.	N440K	15	87781
12.	E484Q	21	8852
13.	L452Q	27	3970
14.	A520S	26	5080
15.	N501T	35	2681
16.	R357K	38	2307
17.	A522S	32	3251
18.	R346K	12	7814
19.	V367F	42	1737
20.	N440S	49	1389
21.	P384L	40	1919
22.	Y449S	54	1212
23.	D427N	50	1376
24.	R346S	51	1327
25.	A475V	43	1647
26.	G339D	8	90853
27.	V401L	105	279
28.	A411S	37	2401
29.	T470N	70	657
30.	Y505H	12	90504

[0044]

[0045] **SARS-CoV-2 변이체의 S-단백질에서 중요한 돌연변이 위치가 있는 에피토프 선택**

[0046] SARS-CoV-2 바이러스 변이체의 S-단백질에서 MHC 대립유전자(클래스 I 및 클래스 II)에 대한 공통 B 및 T 세포 에피토프를 스크리닝한다. SARS-CoV-2 바이러스의 우한 균주의 S-단백질 서열을 사용했다. BCPRED 서버를 사용하여 선택된 항원성 S-protein 내의 선형 B 세포 에피토프를 예측했다. 이 서버는 SVM(Support Vector Machine) 알고리즘을 수행하여 FASTA(아미노산 서열)를 입력으로 사용하여 B 세포 수용체에 대한 기본 특이성이 75%인 9mer 에피토프를 식별하고 분류했다. 다중 에피토프 백신의 고급 개발을 위해 가장 높은 점수를 받은 에피토프를 선택했다.

[0047] MHC 클래스 I 결합 예측을 위해 IEDB 서버를 사용하여 다른 MHC I 대립유전자와의 상호작용을 계산했다. 이 서

버는 정확한 MHC 클래스 I 분자에 대한 특정 아미노산 서열의 결합 친화도를 계산하기 위해 다양한 방법을 사용했다. 대조적으로, ANN(인공 신경망) 방법은 MHC I 분자에 결합하는 표적 펩타이드의 최대 억제 농도 값의 절반(IC_{50})을 계산하는 데 사용되었다. IC_{50} 결합 친화도가 100nM 이하인 대립 유전자를 추가 연구를 위해 선택했다.

동시에 변수를 0.5로 설정했다. 유사하게, 특이도와 민감도 설정의 조건은 0.94와 0.89로 간주되었으며, 이에 상응한다. 다중 에피토프 백신 개발을 목표로 하는 T 세포 에피토프 예측을 위해 특별히 설계된 전산 서버(NetCTL1.2 36)는 표적 단백질 서열 내에서 인간 CTL 에피토프를 검출하기 위한 것이다. IEDB v2.24 서버를 이용하여 선택된 에피토프의 MHC 클래스 I 면역원성을 확인하였다.

[0048] 인식된 B 세포 및 T 세포 에피토프에 대한 BCPRED 및 IEDBv2.24 웹 서버의 결과에서 비항원 및 항원 유형의 일반적인 9-mer 에피토프를 추가로 분류했다. 나중에 가장 높은 항원 점수(VexiJen 점수)가 있는 12개의 공통 에피토프(항원성)를 선택했다.

[0049] 동시에 SARS-CoV-2 변이체의 S-단백질 내 아미노산 위치와 에피토프를 분석한 후 중첩 돌연변이 영역(9개 돌연변이에 대해)도 계산하여 표 3에 나열했다. 또한, 다른 중요한 SARS-CoV-2 변이체의 S-단백질 특정 영역의 돌연변이 변화로 인해 이들 선택된 에피토프의 항원성 점수를 비교했다.

[0050] 개략도는 다양한 SARS-CoV-2 변이체(알파, 델타, 베타, 감마, 오미크론)의 S-단백질 RBD 영역에서 최종 선택된 9개의 돌연변이와 해당 에피토프를 모두 보여준다(도 1B).

[0051] **돌연변이 방지 다중 에피토프 펩타이드 백신 후보 구성**

[0052] 에피토프 클러스터 분석 도구(IEDB)는 상위 B 및 T 세포 에피토프 중에서 가장 동일한 펩타이드를 찾기 위해 100%의 가장 낮은 서열 동일성 임계값에서 작동했다. 클러스터 및 전용 에피토프를 사용하고 재조합하여 다중 에피토프 백신 분자를 만들었다. 최상위 에피토프는 각각의 일련 디자인에서 먼저 배치되었고, 면역증강제(adjuvant)가 그 뒤를 따랐다. 일반적으로 면역증강제는 백신 후보가 보다 면역원성이 되도록 도와준다. 이는 백신 후보가 TLR과 상호작용할 수 있게 하여 숙주 세포 내에서 보다 안정적이고 강력한 면역학적 반응을 생성하는 데 도움을 준다. 그 후, 선택된 에피토프는 효과적인 면역증강제와 혼합되고 적절한 펩타이드 링커와 연결된다. 펩타이드 링커는 MHC 클래스 I 및 클래스 II 수용체에 대한 에피토프 제시 및 후속 면역 처리에서 에피토프 분리 및 지원을 개선하는 데 중요한 역할을 수행했다. TLR4 작용제는 바이러스 당단백질이 TLR4를 검출하기 때문에 필수 면역증강제로 활용되었으며, 면역증강제는 단백질 번역 및 합성 제한을 극복하는 데 필요한다. 따라서 펩타이드의 N말단 부분에 면역증강제(CTxB; 콜레라 엔테로톡신 서브유닛 B)를 첨가하여 백신 구조물의 면역원성을 개선하고자 하였다. 상기 면역증강제를 이기능성(bi-functional) 링커(EAAAK)를 사용하여 백신접종 구성체 전면에 추가로 연결하였다. 또한 넓은 범위의 펩타이드 사슬 길이 내에서 약하게 상호 작용하는 두 도메인으로 분리된다. 반대로, GGPPG 및 AAY 펩타이드 링커는 B 세포 및 T 세포의 선택된 공통 에피토프를 부착하는 데 사용되었다.

[0053] 면역 처리를 가능하게 하는 GPGPG 펩타이드 링커를 사용하여 '접합 에피토프'를 피한다. 반면 바이-라이신 KK 링커는 별개의 면역원성 특징으로 백신 구성물을 유지하는 데 도움을 준다. 마지막으로, 여분의 PADRE 서열(13개 아미노산 사슬)을 백신 구조물의 C-말단 끝에 추가하여 숙주 세포의 면역원성을 증가시켰다.

[0054] **백신 후보물질의 항원성 및 알레르기성 예측**

[0055] 다중 에피토프 백신 구조의 항원성은 VaxiJen 웹서버를 통해 예측되었다. 표적 펩타이드 서열의 ACC(Auto Cross Covariance) 변경을 기반으로, 이 서버는 특히 항원 예측을 위한 새로운 정렬 독립적 방법을 추적했다. 이 서버는 바이러스 및 기타 연구 유기체를 대상으로 하는 기본 모드에서 임계값 점수를 포함하는 펩타이드 항원성 수준을 사용하여 보호 항원을 예측하기 위한 꾸준하고 일관된 서버이다.

[0056] 결과적으로 AllerTop 2.0 웹 서버는 백신 구조 알레르기성을 인식하는 데 사용되었다. ACC 방식을 기반으로 하는 이 특수 웹 서버는 아미노산 서열의 사슬을 동일한 길이의 벡터로 변환한다.

[0057] **백신 후보의 1차, 2차 구조 및 물리화학적 분석**

[0058] ExpasyProtParam 도구는 다중 에피토프 백신 구조의 1차 구조를 예측하고 접근하기 위해 적용되었다. 그 후, 지방족 인덱스, 등전점(pI), 아미노산 수, GRAVY(수치료성의 대평균), 분자량, 순 전하, 불안정 지수 및 평가된 반감기를 포함하여, 인풋 펩타이드 시퀀스의 물리화학적 특성을 분석하였다. "N-말단 규칙"에 의존하고 단백질의 반감기를 N-말단 잔기의 정체와 관련시키는 특수 도구 "ProtParam"이 사용된다. 예측은 3가지 모델 유기체(인간, 효모 및 대장균)에 대해 제공된다. N-말단 규칙은 단백질의 N-말단 잔기의 정체성이 생체 내 모델의 안

정성을 결정하는 데 중요한 역할을 한다는 관찰에서 비롯되었다. 제안된 백신 후보의 2차 구조(transmembrane helices, globular region, bend region, random coil, coiled-coil region) 분석을 위해 SOPMA(Secondary Structure Prediction Method) 전산 도구와 PSIPRED 4.0 서버가 사용된다.

[0059] **백신 후보의 3차원(3D) 모델링 및 구조 개선**

[0060] 3차원(3D) 단백질 모양의 원자 수준에서 분자 기능을 이해하면 필수 정보를 얻을 수 있다. 여기서는 I-TASSER 웹서버를 이용하여 개발된 백신의 3차원 구조를 예측하였다. 이 서버는 sequence-to-structure-to-function의 패러다임에서 자동화된 단백질 기능 예측 및 구조 기반 접근을 목표로 하는 통합 플랫폼을 수행했다. 그것은 다른 알려진 단백질 구조와 동일한 정확한 좌표 형성을 포함하는 고품질 모델을 개발했다. 또한 GalaxyWEB 서버를 사용하여 백신 후보의 예측 3D 모델을 개선했다.

[0061] **펩타이드 기반 백신 구조의 구조적 검증**

[0062] 백신의 예측된 3D 모델 단백질 구조를 정확하게 검증하기 위해 두 개의 중요한 웹 서버인 ProSA 및 PROCHECK가 사용되었다. ProSA 서버는 단백질 3차 구조를 확인하기 위해 적용되었으며, 전체 품질 점수는 로컬 품질 모델과 'Z' 플롯에 의해 고려되었다. 반면 PROCHECK 웹 서버는 단백질 구조의 입체화학적 품질을 연구하여 여러 PostScript 플롯을 생성하고 Ramachandran 플롯을 형성하여 잔류물별 구조를 분석한다.

[0063] **인간 TLR4/MD2 복합체와 백신 후보의 분자 도킹 및 결합 친화도 예측**

[0064] 미생물 감염에 대한 적절한 면역 반응을 유도하기 위해 인간 TLR4/MD2 복합체는 숙주 세포에서 중요한 역할을 수행했다. 따라서 에피토프 펩타이드 기반 백신과 표적 면역 세포 단백질의 상호 작용은 적절한 면역 반응을 생성하는 데 훨씬 더 중요한다. 백신 후보와 인간 TLR4/MD2 복합체(PDB ID: 4G8A)의 분자 도킹을 수행하기 위해 우리는 HawkDock 서버를 사용했다. HawkDock 서버는 최상위 모델을 기반으로 MM/GBSA 자유 에너지의 컴퓨팅 메커니즘 소스와의 바인딩 상호 작용 패턴을 계산한다. 이러한 상호작용 분자 패턴은 상호작용 분자 점수(원자 접촉 에너지)를 시작하기 위해 원자 수준에서 기본 구조에 따라 선택되었다.

[0065] 또한 TLR4/MD2 복합체와 제안된 백신 구조의 단백질-단백질 결합 상호작용을 계산하기 위해 교차 플랫폼 분자 그래픽 도구인 PyMoL을 사용했다. 이 독점 분자 시각화 시스템은 PDB 구조의 정확한 좌표에서 원하지 않는 요소를 제거한다. PRODIGY 웹 서버를 사용하여 37° C 온도에서 TLR4/MD2 복합체와의 백신 구성물의 명확한 상호 작용 패턴 및 해리 상수(KD) 값을 결정하는 Gibbs 자유 에너지(ΔG) 형태의 결합 친화도를 예측했다.

[0066] **다중 에피토프 펩타이드 기반 백신의 정상 모드 분석**

[0067] iMODS 서버는 정상 모드 분석(NMA)으로서 내부 좌표 내 정상 모드에 대한 펩타이드 기반 다중 에피토프 백신의 협동 운동을 검증하기 위해 적용되었다. 그 후, EDM(Essential Dynamics Simulation)으로 식별되는 iMOD의 추가 프로그램을 적용하여 백신과 TLR4/MD2 도킹된 복합체의 안정성과 거대분자 이동성을 인식했다. 이 도킹된 복합체의 평가된 매개변수는 변형 가능성 플롯, 탄성 모델, B-인자, 공분산 및 고유값이라는 특수 용어로 표시되는 가능한 동작으로 간주된다.

[0068] **기계 학습 접근법을 사용한 펩타이드 기반 다중 에피토프 백신 후보의 면역 시뮬레이션 프로파일링**

[0069] 우리는 제안된 백신 후보의 면역 반응 프로필을 해석하기 위해 C-ImmSim 서버를 사용했다. 이 서버는 하위 세포 지역화 수준(mesoscopic scale) 내에서 병원체(박테리아, 바이러스, 원생동물 등)의 면역원성 요소가 존재하는 포유류 면역 체계 내의 체액 및 세포 반응을 정의한다. 또한 "위치별 점수 매기기 매트릭스" 및 단축 기계 학습 접근 방식을 통해 명확한 항원 매개 면역 반응을 평가했다. 임의 속도(12345), 시뮬레이션 볼륨(30) 및 시뮬레이션 단계(1000)와 같은 이 시뮬레이션 서버에 대한 일부 추가 필수 매개변수가 채택되었다. 동시에 제안된 면역 시뮬레이션을 수행하기 위해 계획된 4주 이중 주입 간격을 사용했다. 그럼에도 불구하고 나머지 추가 매개변수는 기본 상태로 사용되었다. 작업을 완료하기 위한 포괄적인 방법론을 보여주기 위해 순서도가 묘사되었다(도 1C).

[0071] **결과**

[0072] **AI 접근 방식을 사용하여 SARS-CoV-2 변이체에서 중요한 돌연변이 선택 및 최상위 항원 점수 선택 방법**

[0073] 우리는 SARSCoV-2 변이체 게놈의 다른 단백질 코딩 부분에서 모든 중요한 돌연변이를 문서화했다. SARSCoV-2의

26가지 유형의 구조 및 비구조 유전자에서 몇 가지 중요한 돌연변이가 보고되었다(표 1). 게놈의 이러한 총 돌연변이에서 6개의 SARS-CoV-2 변이체, 즉 알파, 델타, 베타, 람다, 감마 및 오미크론의 S-단백질(RBD 및 비 RBD 영역 모두) 내의 중요한 돌연변이는 표 2에 나열되어 있다. 이러한 돌연변이는 AI를 통해 SARS-CoV-2 돌연변이 분석기 데이터베이스를 이용하여 돌연변이를 선택하기 위해 사용되었다. AI 접근 방식을 사용한 후 S-단백질의 RBD 영역에서 총 30개(n1=30)개의 돌연변이가 선택되었다(표 3).

[0074] 이어서, 30개의 돌연변이 중에서 최상위 항원 점수 선택 방법을 사용하여 S-단백질의 RBD 내에서 9개의 돌연변이(n2=9)를 선택했다(표 4). 이 9개의 돌연변이는 5개의 SARS-CoV-2 변이체(알파, 베타, 델타, 감마, 오미크론)과 기타 신흥 변이체에 존재한다. Alpha, Beta, Gamma 및 Omicron의 네 가지 변형에 존재하는 N501Y와 같은 일부 선택된 돌연변이는 일반적이다.

표 4

[0075]

Variants name	Mutations in RBD region of Spike (S) glycoprotein	Mutations and their corresponding epitopes (9-mer) used for our vaccine designing
Alpha (B.1.1.7)	N501Y	FQPTYGVGH
Beta (B.1.351)	N501Y	FQPTYGVGH
Delta (B.1.617.2)	V401L, A411S, T478K	VRQIAPGLT, VRQISPGQT, YQVGNKPCN
Gamma (P.1)	N501Y	FQPTYGVGH
Omicron (B.1.1.529)	G339D, T470N, A475V, S477N, T478K, N501Y, Y505H	YRRKPDLPD, FNPQPGVVN, YQVGNKPCN, FQPTYGVGH

[0076] 다시 말하지만, 백신 구조에 대해 선택한 RBD 돌연변이의 위치를 보여주기 위해 두 가지 유형의 3D 모델이 생성되었다. 모델은 3D 공간 채우기 모델(도 2A)과 3D 리본 모델(도 2B)이다. 동시에, 우리가 선택한 RBD 돌연변이와 SARS-CoV-2 변이의 발생 사이의 관련성을 설명하기 위해 십자선 다이어그램을 사용하여 또 다른 모델을 묘사했다(도 2C). 또한 백신 구조에 대해 선택한 돌연변이의 다른 순위 위치를 설명하기 위해 히트맵을 표시했다(도 2D). 여기서 우리는 Mutation Analyzer 데이터베이스를 사용하고 Heatmapper를 사용하여 히트맵을 통해 묘사한 3개의 글로벌 순위(전세계 관찰 순위, BFE 변경 순위 및 항체 파괴 순위)를 사용했다.

[0077] **SARS-CoV-2 변이체의 S-단백질에서 에피토프 선택 및 중요한 돌연변이 위치**

[0078] 항원성이 높은 공통(B 세포 및 T 세포) 에피토프 선택은 가능한 백신 설계에 필수적이다. MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 에피토프를 확인하기 위해 가장 높은 항원 점수를 갖는 에피토프 서열(9mer) 12개를 획득했다. SARS-CoV-2 바이러스(우한 균주)의 S-단백질 내 이들 에피토프 영역의 아미노산 위치를 고려한다(표 5). 우리는 아미노산의 위치 내에서 중첩된 특정 돌연변이의 통합 후 12개 에피토프의 항원성을 다시 계산했다. 표 4는 선택된 공통 에피토프(B 세포 및 T 세포) 부분 내에서 4개의 중요한 SARS-CoV-2 변이체의 특정 돌연변이를 나열했다. 표 6은 에피토프 영역에 돌연변이가 있거나 없는 백신 개발을 위해 선택된 S-단백질에서 SARS-CoV-2 변이체의 비교 항원성 점수 및 돌연변이를 보여준다. 표 6은 에피토프 영역에서 돌연변이 전과 돌연변이 후 에피토프의 항원성 점수를 비교한다. 번호 4, 6, 7, 10, 11, 12번의 에피토프는 돌연변이가 없었고, 나머지 에피토프에는 돌연변이가 있었으며, 돌연변이가 있는 에피토프의 경우 변경된 아미노산으로 인해 항원성 점수가 증가되었다. 따라서 이러한 돌연변이 에피토프는 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 개발을 위한 강력한 후보가 될 수 있다.

표 5

번호	공통 B 및 T 세포 에피토프	MHC-I 대립 유전자	MHC-II 대립유전자	위치	항원성 점수
1.	VRQIAPGQT	HLAB*2702 HLAB*2705	DRB1_0101 DRB1_0102 DRB1_1104 DRB1_1106 DRB1_1107 DRB1_1307 DRB1_1311 DRB5_0101 DRB5_0105	407-415	0.8675 (**Probable ANTIGEN**)
2.	YQAGSTPCN	HLAB*2702 HLAB*5401 HLA-B*51	DRB1_0305 DRB1_0309	473-481	0.4992 (**Probable ANTIGEN**)
3.	FQPTNGVGF	HLAB*2702 HLAB*2705 HLAB*3501 HLAB*4403 HLAB*5301 HLAB*5401 HLA-B*51 HLA-B62 HLACw*0702 MHC-Db MHC Db revised MHC-Dd	DRB1_0701 DRB1_0703 DRB5_0101 DRB5_0105	497-505	**0.5711** (Probable **ANTIGEN**)
4.	ILPDPSKPS	MHC-Dd	DRB1_0301 DRB1_0305 DRB1_0306 DRB1_0307 DRB1_0308 DRB1_0309 DRB1_0311 DRB1_0401 DRB1_0421	805-813	1.2217 **(Probable ANTIGEN)**

[0079]

			DRB1_0426 DRB1_1107		
5.	VRQIAPGVT	HLA-B*2702 HLA-B*2705	DRB1_0101 DRB1_0102 DRB1_1104 DRB1_1106 DRB1_1107 DRB1_1307 DRB1_1311 DRB5_0101 DRB5_0105	394-402	0.8675 **(Probable ANTIGEN)**
6.	LTPRSVRSV	HLA-B*51 HLA-B*5801 HLA-B61 MHC-Dd	DRB1_0402 DRB1_0801 DRB1_0802 DRB1_0804 DRB1_0806 DRB1_1102 DRB1_1120 DRB1_1121 DRB1_1301 DRB1_1302 DRB1_1322 DRB1_1327 DRB1_1328	745-753	1.1039 (**Probable ANTIGEN**)
7.	LGNSTGIDF	HLA-B*5301 HLA-B*51 HLA-B*5801 HLA-B62 MHC-Dd MHC-Ld	DRB1_0701 DRB1_0703	1223- 1231	0.9917 (**Probable ANTIGEN**)
8.	YRRKPDLPN	HLA-B*2702 HLA-B*2705 HLA-B*5401 HLA-B*51	DRB1_0801 DRB1_0802 DRB1_0817	331-339	1.1352 (**Probable ANTIGEN**)
9.	FTPQPGAVS	HLA-A20 Cattle HLA-B*3902 HLA-B*5401 HLA-B*51	DRB1_0309 DRB5_0101 DRB5_0105	469-477	1.3768 (**Probable ANTIGEN**)

[0080]

[0081]

		HLA-B*5801 MHC-Dd			
10.	VKSGSPGDS	HLA-A20 Cattle	DRB1_0301 DRB1_0305 DRB1_0309 DRB1_1107	531-539	1.0477 (**Probable ANTIGEN**)
11.	VRPRNSSDN	HLA-B*2702 HLA-B*2705 MHC-Db	DRB1_0402 DRB1_0801 DRB1_0802 DRB1_0804 DRB1_0806 DRB1_0813 DRB1_0817	745-753	0.9475 (**Probable ANTIGEN**)
12.	ITAYDPRSC	HLA-B*5801	DRB1_0802 DRB1_0804 DRB1_1102 DRB1_1121 DRB1_1322	525-533	0.8468 (**Probable ANTIGEN**)

표 6

서열번호	돌연변이 후 공통 B 및 T 세포 에피토프	MHC-I 대립유전자	MHC-II 대립유전자	위치	돌연변이 전후 항원성 비교		돌연변이
					돌연변이 전 항원성 점수	돌연변이 후 항원성 점수	
1.	VRQISPGQT	HLAB*2702 HLAB*2705	DRB1_0101 DRB1_0102 DRB1_1104 DRB1_1106 DRB1_1107 DRB1_1307 DRB1_1311 DRB5_0101 DRB5_0105	407-415	0.8675 (**Probable antigen**)	1.1298 (**Probable antigen**)	A411S
2.	YQVGNKPCN	HLAB*2702 HLAB*5401 HLA-B*51	DRB1_0305 DRB1_0309	473-481	0.4992 (**Probable antigen**)	0.6648 (**Probable antigen**)	A475V S477N T478K
3.	FQPTYGVGH	HLAB*2702 HLAB*2705 HLAB*3501 HLAB*4403 HLAB*5301 HLAB*5401 HLA-B*51 HLA-B62 HLACw*0702 MHC-Db MHC Db revised MHC-Dd	DRB1_0701 DRB1_0703 DRB5_0101 DRB5_0105	497-505	**0.5711** (**Probable antigen**)	**0.691** (**Probable antigen**)	N501Y Y505H
4.	ILPDPSKPS	MHC-Dd	DRB1_0301 DRB1_0305 DRB1_0306 DRB1_0307 DRB1_0308 DRB1_0309 DRB1_0311	805-813	1.2217 (**Probable antigen**)		

[0082]

			DRB1_0401 DRB1_0421 DRB1_0426 DRB1_1107				
5.	VRQIAPGLT	HLA-B*2702 HLA-B*2705	DRB1_0101 DRB1_0102 DRB1_1104 DRB1_1106 DRB1_1107 DRB1_1307 DRB1_1311 DRB5_0101 DRB5_0105	394-402	0.8675 **(Probable antigen)**	1.1175 **(Probable antigen)**	V401L
6.	LTPRSVRSV	HLA-B*51 HLA-B*5801 HLA-B61 MHC-Dd	DRB1_0402 DRB1_0801 DRB1_0802 DRB1_0804 DRB1_0806 DRB1_1102 DRB1_1120 DRB1_1121 DRB1_1301 DRB1_1302 DRB1_1322 DRB1_1327 DRB1_1328	745-753	1.1039 (**Probable antigen**)		
7.	LGNSTGIDF	HLA-B*5301 HLA-B*51 HLA-B*5801 HLA-B62 MHC-Dd MHC-Ld	DRB1_0701 DRB1_0703	1223-1231	0.9917 (**Probable antigen**)		
8.	YRRKPDLPD	HLA-B*2702 HLA-B*2705 HLA-B*5401 HLA-B*51	DRB1_0801 DRB1_0802 DRB1_0817	331-339	1.1352 (**Probable antigen**)	1.5874 (**Probable antigen**)	G339D

[0083]

9.	FNPQPGVVN	HLA-A20 HLA-B*3902 HLA-B*5401 HLA-B*51 HLA-B*5801 MHC-Dd	DRB1_0309 DRB5_0101 DRB5_0105	469-477	1.3768 (**Probable antigen**)	1.3319 (**Probable antigen**)	T470N A475V S477N
10.	VKSGSPGDS	HLA-A20 Cattle	DRB1_0301 DRB1_0305 DRB1_0309 DRB1_1107	531-539	1.0477 (**Probable antigen**)		
11.	VRPRNSSDN	HLA-B*2702 HLA-B*2705 MHC-Db	DRB1_0402 DRB1_0801 DRB1_0802 DRB1_0804 DRB1_0806 DRB1_0813 DRB1_0817	745-753	0.9475 (**Probable antigen**)		
12.	ITAYDPRSC	HLA-B*5801	DRB1_0802 DRB1_0804 DRB1_1102 DRB1_1121 DRB1_1322	525-533	0.8468 (**Probable antigen**)		

[0084]

[0085] **에피토프 모집단 범위 예측**

[0086] 모집단 범위는 병렬 대립유전자 특이적(MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II) 모집단 범위(에피토프 기반) 분석을 기반으로 개발되었다. 사용된 웹 서버는 두 대립 유전자의 에피토프에 대한 모집단 범위를 정의했다. MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 대립유전자 모두에 대한 최상위 돌연변이 중첩된 12 개의 필터링된 에피토프에 대한 모집단 범위가 도 3A 및 도 3B에 도시되어 있다.

[0088] **백신 후보의 항원성 및 알레르기성 예측**

[0089] 본 발명의 백신 구조의 항원성 평가는 항원성 점수가 0.5703인 강력한 항원임을 보여주었다(표 7). 이 점수는 PADRE 서열 및 면역증강제를 포함하는 설계된 다중 에피토프 펩타이드 기반 구조물이 숙주 체내에서 면역 반응을 강화할 수 있음을 뒷받침한다. 도 4a에서 개발된 백신 구성을 보여준다. 가능성 있는 백신 후보의 알레르기성 계산은 예측된 결과였으며 백신 후보가 안전한 백신임을 언급했다.

표 7

Sl. No.	Features	Assessment	Remark
1.	Antigenicity	0.5703 (antigenic score)	Probable antigen
2.	Allergenicity	Confirmed by AllerTOP v.2.0 server	Probable non-allergen
3.	Solubility	0.569	Soluble
4.	Number of amino acids	205	Suitable
5.	Molecular weight	19974.55 Dalton	Average
6.	Theoretical Isoelectric point (pI)	9.33	Basic
7.	Total number of atoms	2805	Suitable
8.	Formula	$C_{888}H_{1392}N_{264}O_{259}S_2$	-
9.	Estimated half-life	1 hours (mammalian reticulocytes, *in vitro*) 30 min (yeast, *in vivo*) >10 hours (*Escherichia coli*, *in vivo*)	-
10.	Instability index	24.39	Stable
11.	Aliphatic index	48.10	Thermostable
12.	Grand average of hydropathicity (GRAVY)	0.632	Hydrophilic

[0090]

[0091] **백신 후보 물질의 1차, 2차 구조 및 물리화학적 분석**

[0092] 알파 나선(16.59%), 확장 가닥(7.32%), 베타-턴(2.93%) 및 무작위 코일(73.17%)과 같은 본 발명의 백신의 구조적 특성의 2차 구조 분석한 결과를 도 5에 나타낸다. 출력물은 2차 구조(스트랜드, 나선 및 코일)를 포함하는 펩타이드 기반 백신의 고급 순위 품질을 지정한다(도 6). 백신 후보의 12가지 중요한 물리화학적 특성을 측정한다(표 7). 이론적 등전점(pI)은 9.33, 분자량(MW)은 19974.55 Da였다. Hydropathicity의 총 평균(GRAVY)은 0.632로 계산되었다. 백신 후보 단백질로 지정된 양성으로서의 GRAVY 점수는 소수성이어야 한다. 펩타이드 사슬의 이러한 소수성 특성은 향후 백신의 순조로운 정제 및 개선된 설계에 도움이 될 수 있다. 이어서, 펩타이드 구조체의 지방족 지수(Thermo-stability)는 48.10으로 계산되었다. 이 제안된 백신의 반감기는 효모(체내)에서

30분, 포유류 망상적혈구(체외)에서 1시간, 대장균에서 >10시간으로 계산되었다. 동시에 불안정 지수는 24.39로 계산되었다. 이 값은 SARS-CoV-2에서 파생된 S-단백질의 안정적인 다중 에피토프 백신 구조를 나타냅니다.

[0093] **펩타이드 기반 백신 구성의 구조적 검증**

[0094] 펩타이드 기반 백신 구조의 구조적 검증은 백신 개발에서 중요한 단계이다. 이 연구에서는 두 개의 웹 서버(PROCHECK 및 ProSA)가 펩타이드 기반 구성 구조를 정확하게 검증했다. 이러한 도구는 백신 구조의 전반적인 품질을 평가한다. 예측된 Ramachandran 플롯으로부터 정제된 백신 모델은 잔류물이 선호(58.6%), 관대하게 허용됨(7.8%), 추가 허용됨(27.1%) 및 허용되지 않는 영역(6.5%)의 4가지 특정 상태로 존재함을 보여주었다(도 7A, 표 8). 당사가 개발한 고급 모델 형태의 백신의 'Z-점수'는 -2.86으로 계산되었다(도 7B). 음수 'Zscore'는 개발된 단백질의 우수한 3D 모델을 지정한다. 이후 ProSA 웹서버를 적용하여 로컬 품질 모델을 연구하기 위한 추가 구성을 개발했다. 이 서버는 허용 가능한 펩타이드 모델의 전반적인 품질을 보여주는 중요한 플롯으로 표시된다(도 7C). 우리가 디자인한 백신 단백질의 3D 구조는 도 4B(표면 모델) 및 4C(리본 모델)에 나와 있다.

표 8

[0095]

Amino acid position	Residue number	Percentage (%)	Total
Favoured region	94	58.6%	157
Additional allowed region	44	27.1%	
Generously allowed region	16	7.8%	
Disallowed region	13	6.5%	
End-residues			18
Glycine residues			12
Proline residues			9
Total residues			205

[0096] **인간 TLR4/MD2 복합체와 백신 후보의 분자 도킹 및 결합 친화도 예측**

[0097] 분자 도킹은 TLR4/MD2 및 백신 구조물 도킹된 복합체(단백질-단백질 복합체)를 생성하고 결합 친화도를 나타냈다. 단백질-단백질 도킹 복합체는 이 복합체가 ACE 값을 기준으로 상위 10개 모델 중 하나임을 알아냈다. 결합 상호 작용을 시각화하고 해석하기 위해 가장 높은 분자 결합 점수(-319.56)를 포함하는 도킹 클러스터를 선택했다. 또한 HawkDock 도구 프로그램은 MM/GBSA로 훈련된 특정 기계 학습 접근 방식으로 분자 도킹 복합체를 제공하기 위해 참여했다. 또한 도킹된 분자 복합체와 관련된 결합 자유 에너지(BFE)가 -96.67 kcal/mol인 것으로 나타났다. 이 중요한 점수는 개발된 다중 에피토프 백신 모델(리간드 분자)과 인간 TLR4/MD2 복합체(수용체 요소) 사이에 더 큰 결합 친화성을 확립했다(도 8A).

[0098] 도킹 점수(HADDOCK 점수)(a.u.)는 -157.9+/- 8.6으로 표시되며 백신 구조와 인간 TLR4/MD2 복합체 간의 적절한 상호 작용을 지정한다. 점수는 묻힌 표면적(BSA)이 2864.3 +/- 99.1 Å2이며, 단백질 결합 표면의 인접성과 덜 물에 노출된 면적으로 밝혀졌다. 도킹 단지(HADDOCK을 통해 생성됨)의 작은 RMSD 값은 좋은 품질의 도킹 단지 개발을 식별한다. 계산된 반 데르 발스 에너지, 탈용매화 에너지, 억제 위반 에너지, 정전기 에너지 및 Z-Score 값이 표 9에 나와 있다. 동시에 표 10에는 두 상호 작용 단백질 분자 사이의 수소 결합이 나열되어 있다. 이어서, 프로디지 웹 서비스를 통해 분석된 도킹된 복합체의 해리상수(Kd) 값과 깁스 자유 에너지(ΔG)의 결합 친화도는 4.5E-09M 및 12.7 kcal mol-1이다(표 9). 또한 분자 도킹 복합체의 음의 값이 열역학적으로 안정한 단백질

-단백질 도킹 구조를 지정했다는 점에 주목했다.

표 9

Vaccine construct and TLR4/MD2	
Docking score (HADDOCK score (a.u.))	-157.9+/- 8.6
Cluster size	9
RMSD from the overall lowest-energy structure	1.9 +/- 0.7
Van der Waals energy (kcal mol^{-1})	-73.6 +/- 1.5
Electrostatic energy (kcal mol^{-1})	-316.4 +/- 32.7
Desolvation energy (kcal mol^{-1})	-13.5 +/- 2.8
Restraints violation energy (kcal mol^{-1})	3.4 +/- 2.6
Buried surface area ($Å^2$)	2864.3 +/- 99.1
Z-Score	-2.8
Binding score of the docked protein- protein complex (PRODIGY binding score)	Gibbs free energy (ΔG) -12.7 kcal mol^{-1} and dissociation constant (Kd) 4.5E-09M

[0099]

표 10

Vaccine construct (Atom)	TLR4/MD2 (Atom)	Distance (A°)
H:11305	O:15341	3.17
H:14316	H:12133	3.54
C:14163	H:20742	4.12
O:16837	H:21355	4.71
H:15312	C:12415	4.86
O:5241	H:12656	3.19
H:4872	H:22131	4.01

[0100]

[0101] **다중 에피토프 펩타이드 기반 백신의 정상 모드 분석**

[0102] 우리는 NMA(Normal mode analysis)를 통해 생물학적 고분자의 단백질-단백질 상호 작용 기계 및 유연성을 분석했다. 분자 운동과 구조적 유연성이 계산되고 분자 도킹 복합체의 좌표와 결합된다. 결과는 단백질 도메인의 이동성을 보여주며 클러스터를 지시하는 유색 아핀 화살표로 나타냅니다. 마지막으로 NMA 이동성을 나타냅니다(도 8B). 동시에, 복합 변형성은 주로 개별 잔기(Cα 원자)의 왜곡에 의존하며, 이는 또한 복합 사슬 내의 컬러 경첩을 통해 제시된다(도 8C).

[0103] 또한 서버는 고유값을 2.428517e-05로 계산했다(도 8E). 마찬가지로 고유값과 분산은 각 NMA에 반대로 연결된다(도 8D). 또한, B-인자 그래프는 평균 RMS 값을 표시함과 동시에 B-인자 플롯은 도 8D에 제시된 도킹된 분자의 정상 구조를 나타냅니다. 공분산 행렬은 상관(빨간색), 상관되지 않은(흰색) 및 반상관(파란색)이 있는 개별 색상 그래프로 특징된다(도 8F). 탄성 네트워크 모델은 특정 강도의 "스프링"(강한 스프링의 어두운 회색 기호)과 상호 연결된 도킹된 단백질 분자(Cα) 원자를 표시한다(도 8G).

[0104] **기계 학습 접근법을 사용한 펩타이드 기반 다중 에피토프 백신 후보의 면역 시뮬레이션 프로파일링**

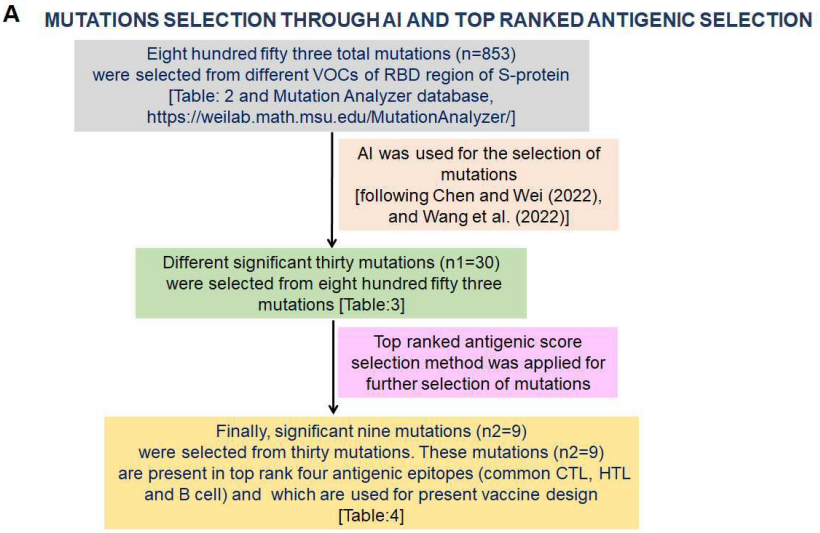
[0105] 개발된 백신 후보의 면역 시뮬레이션 프로파일링을 위한 in silico 기술은 기억 세포, HTL, CTL 및 관련 면역세포(NK 세포, DC 세포 등)로 구성된 면역계를 활성화하여 1차 및 2차 면역 반응을 지원했다. 특정 면역글로불린(IgM+IgG)의 수준은 제안된 백신 구조를 투여한 후 급격하게 증가하여 검출되었다. 확장된 면역 반응은 IgG 및 IgM의 높은 역가 값을 통해 SARS-CoV-2에 대해 성공적으로 설명되었다(도 9A). 휴식기 및 작용기 동안, B 세포 집단 및 숙주 신체에서의 선천적 면역은 IgM, B-기억 세포 및 그의 이소타입으로 증가되었고, 이는 또한 680-740 세포/mm^3로 확장되었다(도 9A-C). 유사하게, CTL 세포도 백신에 의해 적용된 면역화 후 최대 1127개 세포/~8일까지 증가 및 확장되었고 24일 후에 점차 감소하였다(도 9D).

[0106] 또한, 활성기 및 휴지기 동안 T 세포는 가장 높은 수준의 T 세포 집단을 나타내었다(도 9E). 마찬가지로, 상승된 HTL 세포(활성 및 휴식기 모두)는 SARS-CoV-2 감염에 대한 적응 면역 반응을 생성하는 데 중요한 역할을 수행했다. 상승된 세포는 최대 메모리 세포 수를 생성할 수 있다(도 9F-G). 기억세포는 병원균과의 만남으로 인한 자기기억의 기회에서 바이러스 감염과 재감염을 예방하고 조절하는데 중요한 역할을 한다. 따라서, 이 설계된 백신 작제물의 효과적인 투여는 면역계의 추가된 조절자 요소(예를 들어, 사이토카인, 인터류킨, DC 세포 및 NK 세포)를 효율적으로 상승시켰다(도 9F-L). 따라서 이러한 결과는 제안된 다중 에피토프 펩타이드 백신이 SARS-CoV-2 바이러스에 의한 감염에 대응하는 강력한 면역 반응을 유발하는 효과적인 차세대 펩타이드 기반 백신으로

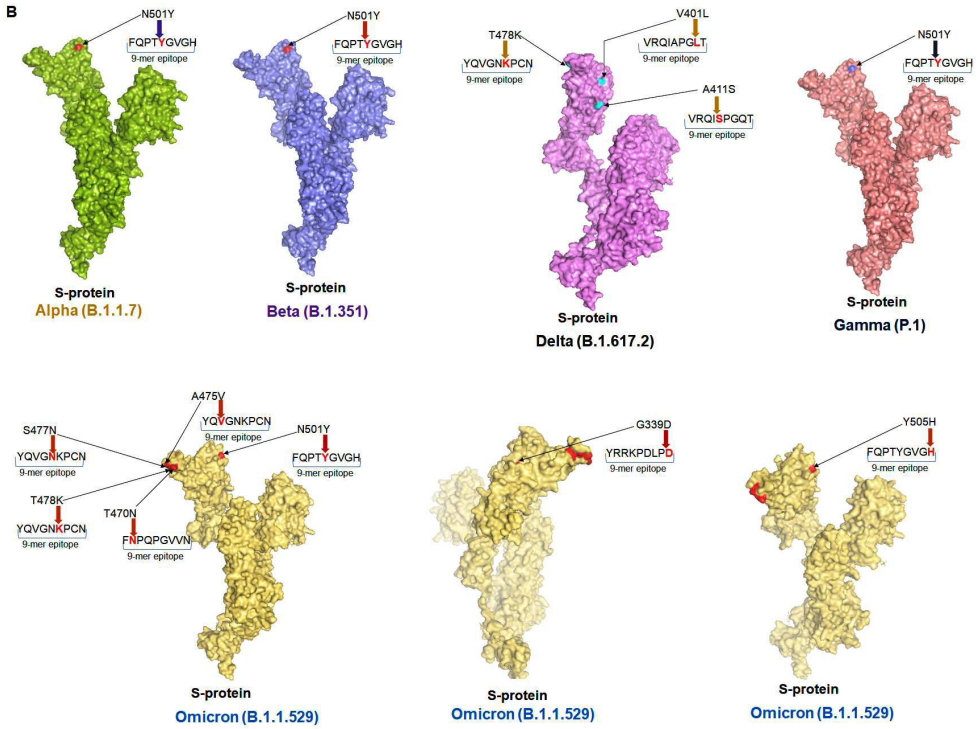
간주될 수 있음을 지정한다.

도면

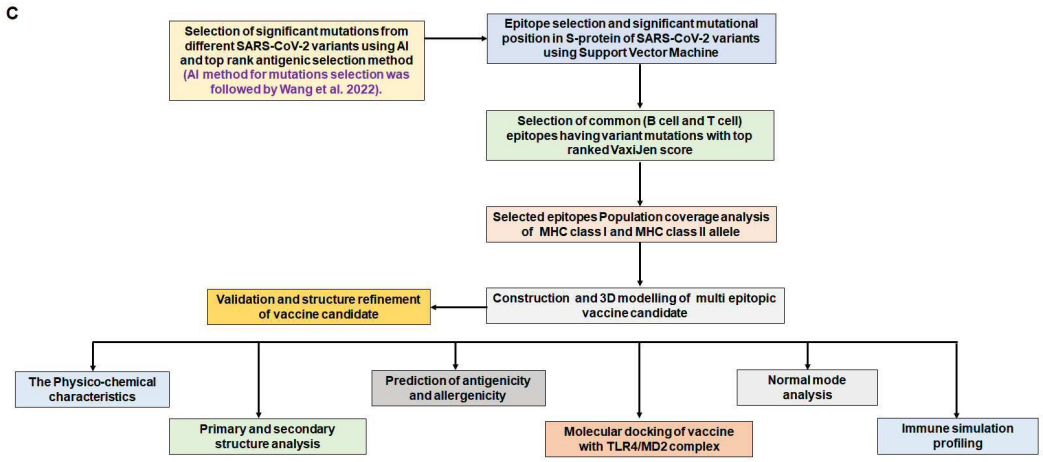
도면1a



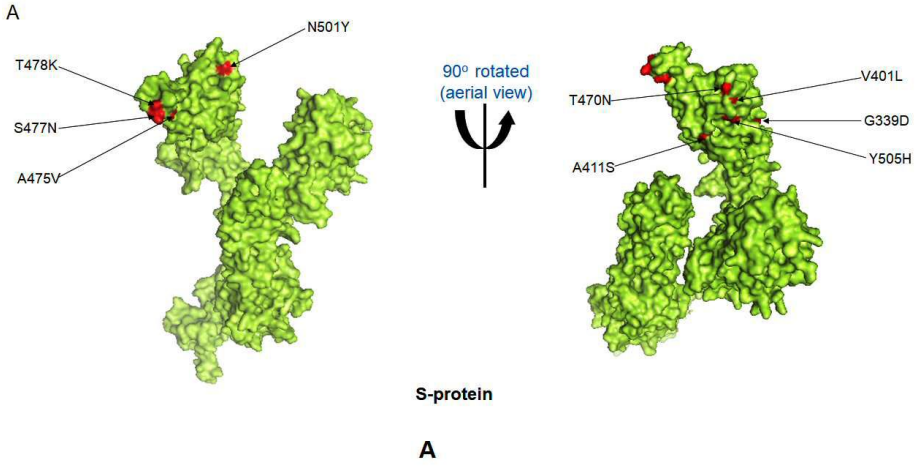
도면1b



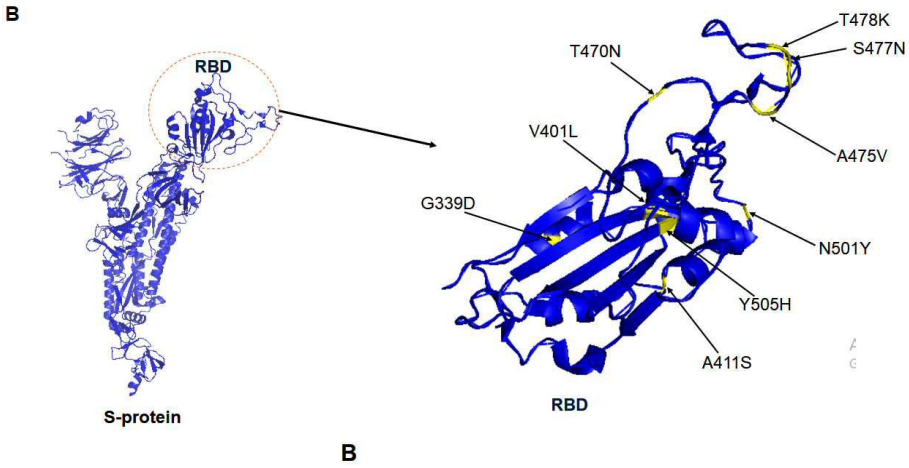
도면1c



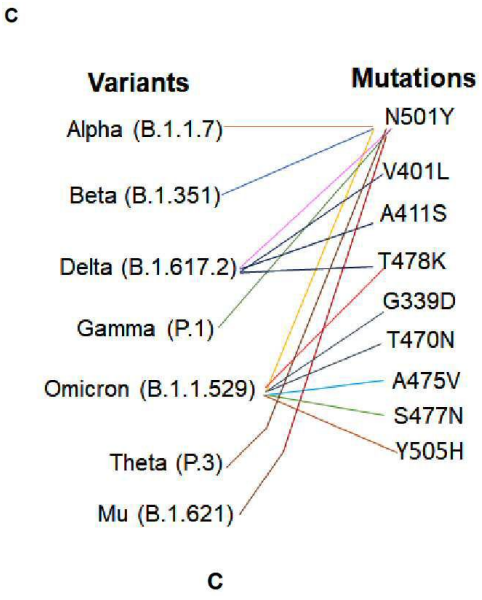
도면2a



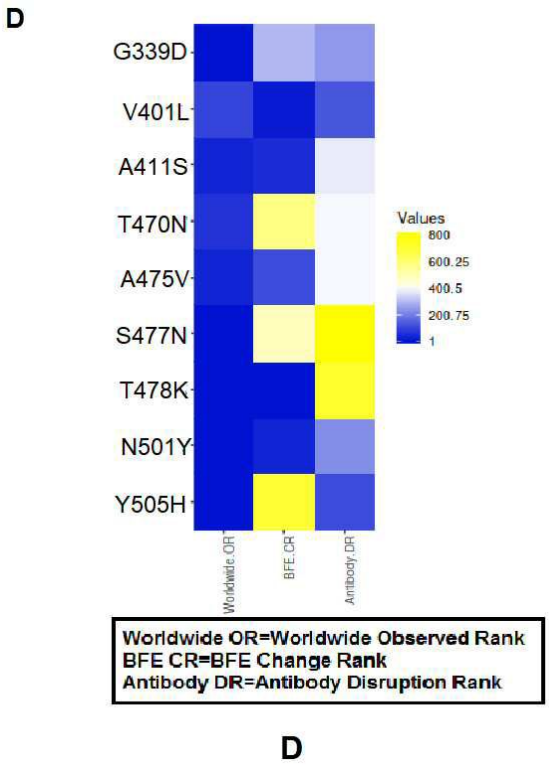
도면2b



도면2c


C
Variants
Mutations
Alpha (B.1.1.7)
Beta (B.1.351)
Delta (B.1.617.2)
Gamma (P.1)
Omicron (B.1.1.529)
Theta (P.3)
Mu (B.1.621)
N501Y
V401L
A411S
T478K
G339D
T470N
A475V
S477N
Y505H
C

도면2d

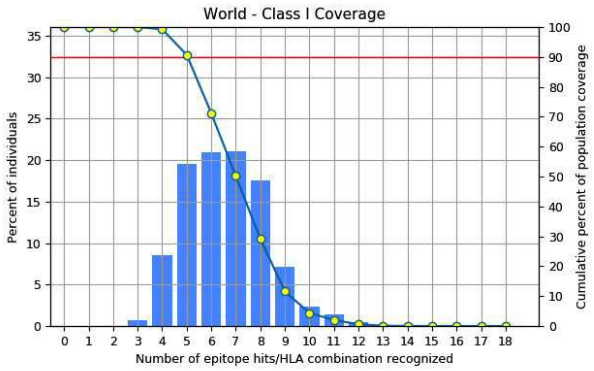

D
G339D
V401L
A411S
T470N
A475V
S477N
T478K
N501Y
Y505H
Worldwide.OR
BFE.CR
Antibody.DR
Values
800
600.25
400.5
200.75
1
Worldwide OR=Worldwide Observed Rank
BFE CR=BFE Change Rank
Antibody DR=Antibody Disruption Rank
D

도면3a

A

Population: World

MHC class	Coverage	Average hit	PC90
I	100.0%	6.59	5.04

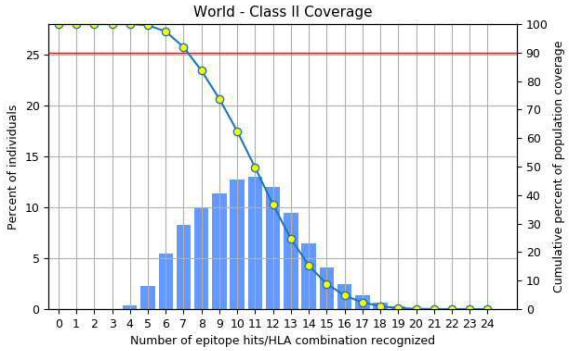


도면3b

B

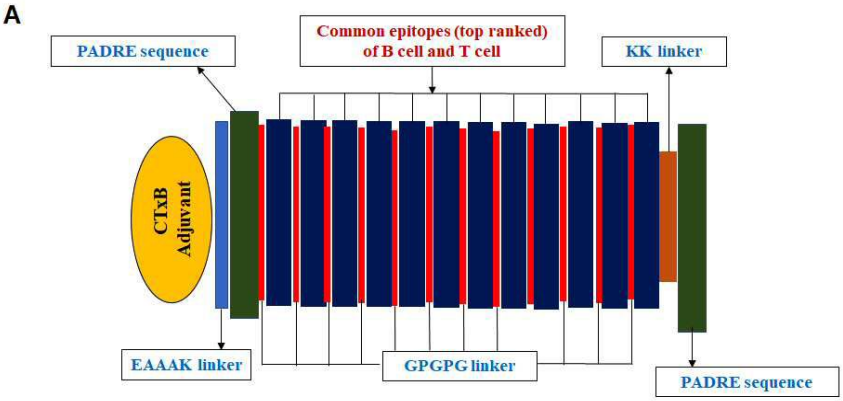
Population: World

MHC class	Coverage	Average hit	PC90
II	100.0%	10.53	7.23

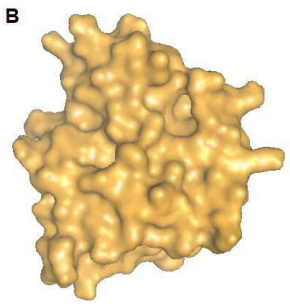


도면4a

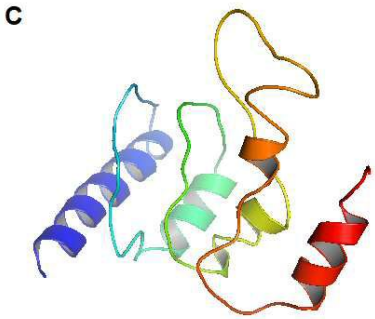
A



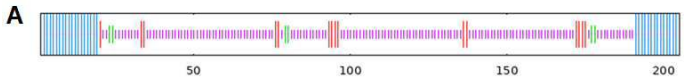
도면4b



도면4c



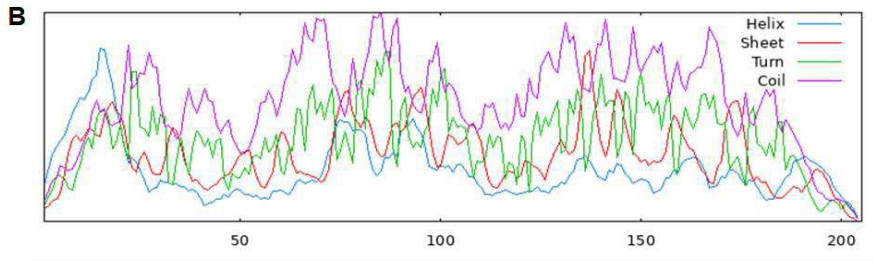
도면5a



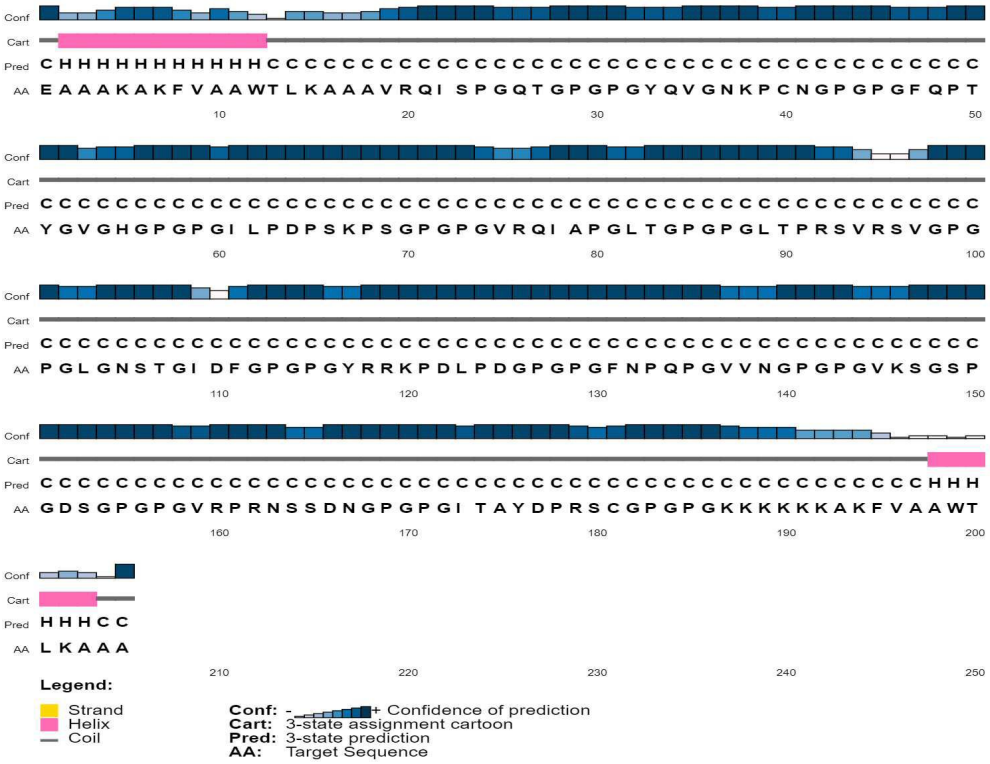
SOPMA :

Alpha helix	(Hh) :	34 is	16.59%
3_{10} helix	(Gg) :	0 is	0.00%
Pi helix	(Ii) :	0 is	0.00%
Beta bridge	(Bb) :	0 is	0.00%
Extended strand	(Ee) :	15 is	7.32%
Beta turn	(Tt) :	6 is	2.93%
Bend region	(Ss) :	0 is	0.00%
Random coil	(Cc) :	150 is	73.17%
Ambiguous states (?)	:	0 is	0.00%
Other states	:	0 is	0.00%

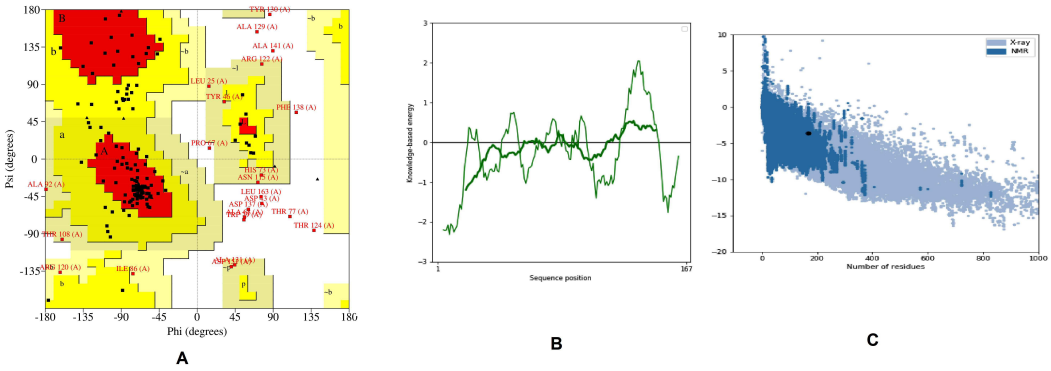
도면5b



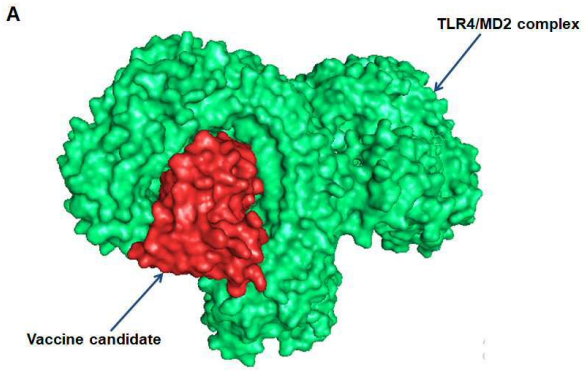
도면6


Conf
Cart
Pred
AA
Legend:
Strand
Helix
Coil
Conf: - + Confidence of prediction
Cart: 3-state assignment cartoon
Pred: 3-state prediction
AA: Target Sequence

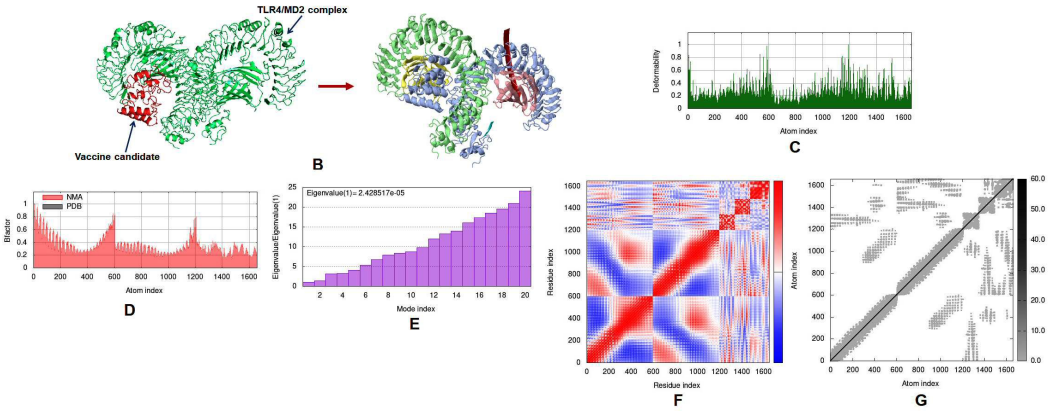
도면7


Psi (degrees)
Phi (degrees)
A
Knowledge-based energy
Sequence position
B
X-ray
NMR
Number of residues
C

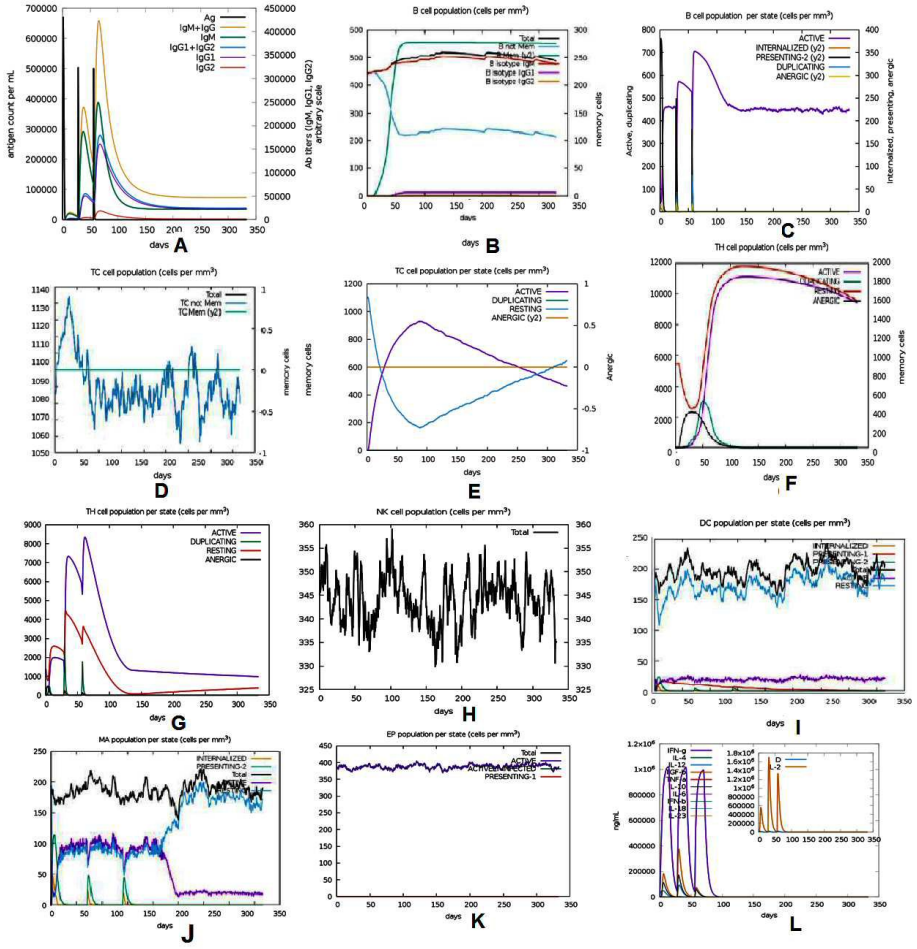
도면8a


A
TLR4/MD2 complex
Vaccine candidate

도면8b



도면9



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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