(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0083062
(43) 공개일자 2022년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/215 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) *G01N 33/569* (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/215 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2020-0172923
(22) 출원일자 2020년12월11일
심사청구일자 2020년12월11일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
이상수
서울특별시 양천구 목동중앙로7길 32, 105동 901호(목동, 이편한세상)
아쉬시 란잔 샤르마
강원도 춘천시 성심로 67
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김남혁

전체 청구항 수 : 총 11 항

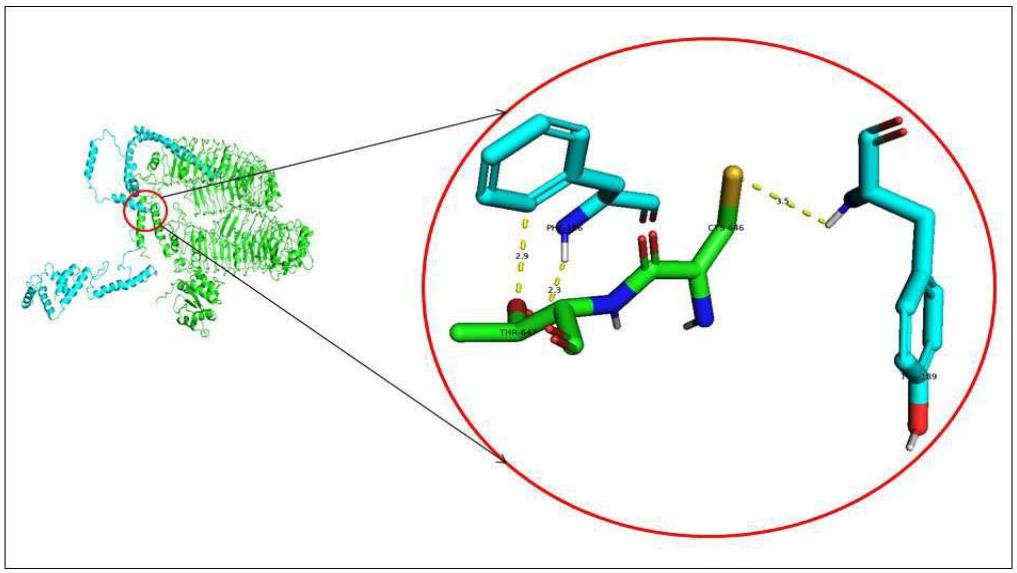
(54) 발명의 명칭 **사스코로나바이러스-2로부터 분리된 에피토프 및 이를 포함하는 코로나바이러스 다중-에피토프 백신 조성물**

(57) 요 약

본원은 사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는 코로나바이러스에 대한 백신 조성물 및 이의 다양한 용도에 관한 것이다.

본 발명의 사스코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는 백신 조성물에 따르면, TLR(Toll-like receptor) 단백질에 결합하여 면역 캐스케이드(immune cascade)를 일으키고, ₩비알레르기항원성을 나타내는 바, 본 발명의 선별된 에피토프로 구성된 SARS-CoV-2에 대한 펩타이드-기반 백신 후보는 코로나바이러스, 구체적으로 신종코로나바이러스의 치료 또는 예방에 효과적으로 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
C07K 16/10 (2013.01)
G01N 33/56983 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/70 (2013.01)
C12N 2770/20034 (2013.01)
G01N 2333/165 (2013.01)
(72) 발명자
가리마 샤르마
강원도 춘천시 성심로 67
마노짓 바타차리아
인도, 웨스트 벵갈주, 웨스트미드나포르시, 자그람동, 아르빈다나가르 D-24
키란지브 챠크라바티
인도, 웨스트 벵갈주, 24피지에스노던시, 칼린디동, 칼린디 아파트 P-121동 6호

명 세 서

청구범위

청구항 1

사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는 코로나바이러스에 대한 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 에피토프는 서열번호 1 내지 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 것인 백신 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 에피토프는 TLR(Toll-like receptor) 단백질에 결합하는 것인, 백신 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

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, 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프 및 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프를 포함하는 것인, 백신 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 에피토프는 링커에 의해 연결되는 것인 백신 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

약학적으로 허용 가능한 담체, 또는 면역증강제(adjuvant)를 더 포함하는 백신 조성물.

청구항 7

사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 포함하는 코로나바이러스 감염증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 항체 단편은 scFv, dsFv, Fab, Fab', F(ab')2, sdAb 및 나노바디(nanobody)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 코로나바이러스 감염증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 9

사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는, 코로나바이러스를 표적화하는 면역세포 또는 항체 검출용 조성물.

청구항 10

사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는, 코로나바이러스 에피토프 펩타이드.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 코로나바이러스 에피토프 펩타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 코로나바이러스 에피토프 펩타이드.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본원은 사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는 코로나바이러스에 대한 백신 조성물 및 이의 다양한 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 신종코로나바이러스(2019 novel Coronavirus, 2019-nCoV)는 2019년 12월 발생한 신종코로나바이러스감염증(우한 폐렴)의 원인 바이러스로, 인체 감염 7개 코로나바이러스 중 하나다. 신종코로나바이러스는 감염자의 비말(침방울)이 호흡기나 눈·코·입의 점막으로 침투될 때 전염되는 것으로 보고되었으며, 감염되면 약 2~14일(추정)의 잠복기를 거친 뒤 발열(37.5도) 및 기침이나 호흡곤란 등 호흡기 증상, 폐렴이 주 증상으로 나타나지만 무증상 감염 사례도 드물게 나오고 있다. 세계보건기구(WHO)는 2020년 1월 24일 신종코로나바이러스의 전파력이 사스(SARS, 중증급성호흡기증후군)보다는 낮지만, 메르스(MERS, 중동호흡기증후군)보다는 높은 것으로 파악한다고 밝혔다.

[0003] 질병관리본부의 보고에 따르면 신종코로나바이러스의 유전자 염기서열은 박쥐 유래 유사 코로나바이러스와 가장 높은 상동성(89.1%)을 보였으며, 메르스와는 50%, 사스와는 77.5%의 상동성이 나타났다. 코로나바이러스는 알파(Alpha)·베타(Beta)·감마(Gamma)·델타(Delta) 등 4속(屬)으로 분류되는데, 신종코로나바이러스는 베타(Beta)군에 속하는 것으로 분류되었다. 현재까지 확인된 인체 전염 코로나바이러스는 총 7종으로 HCoV 229E, HCoV NL63, HCoV OC43, HCoV HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV, 2019-nCoV가 이에 해당한다.

[0004] 코로나바이러스는 계절유행성 감기를 유발하는 바이러스 중 하나다. 하지만 가볍게 여길 것은 결코 아니다. 그간 대규모 감염사태가 벌어졌던 2002년 사스(SARS중증급성호흡기증후군)와 2015년 메르스(MERS중동호흡기증후군)의 원인 역시 코로나바이러스였다. 이번에 발견된 2019-nCoV도 빠른 전파와 함께 심각한 호흡기증후군 증상을 나타내는 환자 수가 늘어나면서 전 세계적으로 큰 사회적 문제를 야기하고 있다.

[0005] 코로나바이러스를 투과전자현미경(TEM)으로 관찰하면, 바이러스 막 바깥쪽 표면에 돌기형태의 단백질(스파이크 단백질)이 촘촘히 달려있는 구조를 볼 수 있다. 그 형태가 태양의 코로나와 비슷해 코로나바이러스라는 이름이 붙었다. 축구화 밑바닥의 스파이크가 미끄러짐을 방지하는 것처럼, 스파이크단백질은 숙주세포와 강하게 결합하여 바이러스가 숙주세포로 빠르게 침투하도록 지지해준다. 따라서, 스파이크 단백질은 초기에 바이러스가 인체에 감염되는 데에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

[0006] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 면역정보학 기술을 적용하여, 사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 다중-에피토프 백신을 개발하고, 인 실리코 방법을 통해 항원성을 검증하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu j, Xu M, Shi Z, Hu Z, Zhong W, Xiao G. 2020. Remdesvir and choloquinie effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus(2019-nCoV) in vitro. Cell Research 30: 269-271

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본원은 사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는 코로나바이러스에 대한 백신 조성물, 상기 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 포함하는 코로나바이러스 감염증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 상기 에피토프를 포함하는 코로나바이러스를 표적화하는 면역세포 또는 항체 검출용 조성물 등을 제공하고자 한다.

[0009] 본원의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본원의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 원의 실시예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본원의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본원의 제 1 측면은, 사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는 코로나바이러스에 대한 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본원의 제 2 측면은, 사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 포함하는 코로나바이러스 감염증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 본원의 제 3 측면은, 사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는, 코로나바이러스를 표적화하는 면역세포 또는 항체 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본원의 제 4 측면은, 사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는, 코로나바이러스 에피토프 펩타이드를 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 사스코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는 백신 조성물에 따르면, TLR(Toll-like receptor) 단백질에 결합하여 면역 캐스케이드(immune cascade)를 일으키고, 비알레르기항원성을 나타내는 바, 본 발명의 선별된 에피토프로 구성된 SARS-CoV-2에 대한 펩타이드-기반 백신 후보는 코로나바이러스, 구체적으로 신종코로나바이러스의 치료 또는 예방에 효과적으로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 TLR 단백질과 설계된 백신 후보 사이의 비-공유 상호작용을 나타내는 분자 도킹 결과를 보여준다.

도 2는 TLR에 의해 유도되는 면역 반응 경로를 대략적으로 나타내는 도면이다.

도 3은 NMA 분석 결과로서, 단백질 도메인의 NMA 이동성을 나타낸 도면이다.

도 4는 NMA 분석 결과로서, NMA 및 PDB의 B-factor 플롯을 나타낸 도면이다.

도 5는 NMA 분석 결과로서, 원자 변동의 변형 가능성 플롯(deformability plot of atomic fluctuation)을 나타낸 도면이다.

도 6은 NMA 분석 결과로서, 고유값 플롯을 나타낸 도면이다.

도 7은 NMA 분석 결과로서, 공분산 매트릭스 플롯(covariance matrix plot)을 나타낸 도면이다.

도 8은 NMA 분석 결과로서, 탄성 네트워크 플롯(elastic network plot)을 나타낸 도면이다.

도 9는 pET28a(+) 발현 벡터 내에서 백신 후보의 in-silico 클로닝의 개략도를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0018] 본원의 제 1 측면은, 사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는 코로나바이러스에 대한 백신 조성물 을 제공한다.

[0019] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 코로나바이러스는 인간 코로나바이러스일 수 있으며, 구체적으로 인간 코로나바이러스 229E (HCoV-229E), 인간 코로나바이러스 OC43 (HCoV-OC43), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 인간 코로나바이러스 NL63 (HCoV-NL63, 뉴헤븐 코로나바이러스), 인간 코로나바이러스 HKU1, 중동호흡기증후군 코로나바이러스 (MERS-CoV), 또는 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2 (SARS-Cov-2 또는 2019 novel coronavirus 또는 2019-nCoV)일 수 있으며, 보다 구체적으로 SARS-Cov-2일 수 있다.

[0020] 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, 앱 보고에서 볼 때 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.

[0021] 본 명세서에서 사용되는 용어, "스파이크(spike) 단백질"은 바이러스의 표면에 배열돼 있는 돌기상(突起狀) 구조물로서, 길이는 10~15nm로 세포막에 있는 단백질 수용체와 결합해 우리 몸에 침투하는 일을 전담하고 있다. 따라서, 바이러스가 사람의 세포 속으로 들어갈 때 중요한 역할을 하고 있는 것이 상기 스파이크 단백질이다. 특히 바이러스는 스파이크 단백질의 결합 능력에 따라 감염되는 숙주가 달라진다. 따라서, 스파이크 단백질을 이용해 바이러스 치료용 백신, 항체 및 진단 개발에 활용할 수 있다.

[0022] 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 펩티드 구조, 또는 전하를 의미한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 에피토프는 서열번호 1 내지 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 서열번호 1 내지 13의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 에피토프는 MHC Ⅰ에 인식되는 것일 수 있고, 서열번호 14 내지 16의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 에피토프는 MHC Ⅱ에 인식되는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구현예 있어서, 상기 에피토프는 B-세포 매개된 면역반응 및 T-세포가 매개된 면역반응을 둘다 유도할 수 있는 B-세포 및 T-세포의 공통된 에피토프인 것일 수 있다.

[0026] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "백신"은 특정 항원에 대해 면역 반응을 이끌어내기 위해서 개체에 투여하기 위한 면역원성 조성물을 지칭한다. 상기 용어, "면역원성"은 항원보강제의 존재 또는 부재 하에서, 단독으로든 또는 담체에 결합된 경우든, 면역 반응을 유발, 유도, 자극 또는 촉진하거나, 또는 특정한 항원에 대한 기존 면역 반응을 개선, 증대, 증가 또는 연장시키는 물질의 능력을 지칭한다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 백신 조성물은 다중-에피토프 백신 조성물일 수 있다. 상기 용어, "다중-

에피토프 백신"은 상술한 에피토프가 2개 이상 포함되어 있는 백신 조성물을 의미한다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 에피토프는 TLR(Toll-like receptor) 단백질에 결합하는 것일 수 있으며, 구체적으로 TLR4 및/또는 TLR5에 결합하는 것일 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 용어, "TLR(Toll-like receptor, 톨유사수용체) 단백질"은 선천 면역에서 중요한 역할을 하는 단백질이다. TLR은 세포막에 박혀있는 비촉매성 단일 단백질 수용체로, 선천 면역의 과정에서 주로 마크로파지, 수지상 세포 등의 보초병 세포의 표면이나 점막상피세포, 중성구 등에 발현되며, 구조적으로 미생물로부터 유래된 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)를 인식하여 어댑터 단백질을 통해 신호 전달 경로를 활성화시킨다. 이후 염증성, 항염증성 사이토카인이나 케모카인이 분비되고, 면역 반응을 유도하여 적응 면역을 조절한다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 백신 조성물은 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, 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프, 서열번호 15의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프 및 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 에피토프를 포함하는 것일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 에피토프는 직접적으로 또는 간접적으로 연결되어 있을 수 있으며, 간접적으로 연결될 경우 링커에 의해 연결되는 것일 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 링커는 링커로 연결된 결합체의 활성을 유지하거나 향상시키는 효과를 나타내게 하는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 펩타이드 및/또는 핵산으로 구성된 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 상기 링커는 펩타이드 링커일 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 또는 면역증강제(adjuvant)를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0034] 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 에피토프를 백신 조성물로 이용하는 경우, 상기 유효성분은 단독으로 이용되기 보다는 약학으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 이용하는 것이 적합할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함할 수 있다.

[0035] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "면역증강제"는 일반적으로 항원에 대한 체액 또는 세포 면역 반응을 증가시키는 임의의 물질을 의미한다. 면역증강제는 백신 조성물의 면역 유도 효과를 증대시키고, 백신 조성물의 부작용을 억제하거나 개선시키기 위하여 사용될 수 있으며, 백신 조성물 또는 항암제와 병용하여 환자에게 투여될 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 백신 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다. 특히, 액상 제제의 경우에는 박테리아 포획 필터 등을 통한 여과에 의해 살균제 등을 혼입시켜 살균하는 것이 바람직하다.

이렇게 살균된 조성물은 예를 들면 동결건조에 의해 고형화시킬 수 있으며, 사용시에 이를 무균수 또는 무균 희석액에 용해시킨다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 백신 조성물은 소, 쥐, 마우스, 가축, 개, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 백신 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 별다른 부작용 없이 개체에 면역보호반응을 유도하기에 필요한 양은 면역원으로서 사용된 에피토프 및 부형제의 임의 존재에 따라 다양할 수 있다. 본 발명에 따른 백신 조성물은 필요에 따라 초기 용량에 이어 임의로 반복된 항원 자극을 수행할 수 있다.

[0039] 본원의 제 2 측면은, 사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 포함하는 코로나바이러스 감염증의 치료 또는 예방용 약학적 조성물, 및 이를 투여하는 단계를 포함하는 코로나바이러스 감염증의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 제1측면과 중복되는 내용은 제2측면의 약학적 조성물 및 치료 또는 예방 방법에도 공히 적용된다.

[0040] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "코로나바이러스 감염증"은 코로나바이러스의 감염에 의해 발생하는 증상, 질병 및 병증을 모두 포함하는 것으로서, 발열, 무기력, 마른기침, 호흡 곤란, 급성 호흡 장애, 쇼크, 혈액응고 장애, 혼수상태, 구역질, 구토, 설사, 결막염, 가벼운 근육통 등의 증상이 발생할 수 있고, 호흡기 증상만 있는 경우 경증~중증 폐렴, 급성 호흡곤란 증후군, 패혈증 쇼크 등이 이에 포함될 수 있다. 또한, 인간의 장기에 따라 하기와 같이 다양한 증상이 나타날 수 있다.

[0041] - 폐: 폐포에 염증이 발생하여 산소 유입이 감소한다.

[0042] - 간, 신장: 면역체계가 과부하되어 중증 손상을 입는다.

[0043] - 장: 부검 결과 하복부에까지 코로나 19가 퍼지는 경우가 많으며, 20% 이상의 환자에서 설사가 보고된다.

[0044] - 뇌: 뇌졸중, 뇌염, 정신착란이 발생한다.

[0045] - 두피 : 다발성 원형탈모 증세가 발생한다.

[0046] - 눈: 중증 환자일 경우 결막염 증세가 있는 경우가 많다.

[0047] - 코: 냄새를 맡지 못하는 경우가 많다.

[0048] - 입: 맛을 느끼지 못하는 경우가 많다

[0049] - 심장 및 혈액: 혈액이 응고되어 심혈관질환 또는 심장마비가 일어나는 경우가 많다. 또한, 혈액응고로 인한 혈액순환장애로 인해 손발이 붓는 일명 'covid fingers' 혹은 'covid toes' 현상이 보고된다.

[0050] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 에피토프는 서열번호 1 내지 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 항체 단편은 scFv, dsFv, Fab, Fab', F(ab')2, sdAb 및 나노바디(nanobody)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상인 것일 수 있다.

[0052] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “항체”는 IgA, IgE, IgM, IgD, IgY, IgNAR, heavy chain antibody 및 IgG로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역글로불린으로, 목표 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 항체는 경쇄(light chain)와 중쇄(heavy chain) 각각 2개씩 모여 이루어지며, 각각의 사슬은 아미노산 서열이 가변적인 가변영역(variable domain)과 일정한 서열을 가지는 고정영역(constant domain)으로 이루어져 있다. 상기 항체는 가변영역의 3차원구조 말단에 항원이 결합하는 부위가 위치하며, 이 부위는 경쇄와 중쇄에 각각 3개씩 존재하는 상보성결정부위 (complementarity determining region)들이 모여서 형성된다. 상기 상보성결정부위는 가변영역 중에서도 아미노산 서열의 가변성이 특히 높은 부분이며, 이러한 높은 가변성에 의해 다양한 항원에 대해 특이적 항체가 찾아질 수 있다. 본원의 범위에는 완전한 항체 형태뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.

[0053] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “항체 단편”은 항체의 임의의 일부분을 의미하는 것으로서, scFv, dsFv, Fab, Fab', F(ab')2, sdAb 및 나노바디(nanobody) 등 및 이들의 조합이 항체 단편에 해당될 수 있으며, 상기 항체 단편은 항원인식 부위를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 Fab는 경쇄 및 중쇄

의 가변 영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1 도메인)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')2 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv(variable fragment)는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각을 의미한다. 이중디설파이드 Fv(dsFv)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고, 단쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되어 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하며 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')2 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다. 또한, 상기 sdAb 및 나노바디는 단일 가변 도메인 항체단편으로, 예를 들어 자연적으로 발생하는 단일 가변 도메인(VH)과 2개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 포함하는 중쇄(heavy chain) 항체 중 그 가변 도메인을 단백질 가수분해 혹은 유전자 재조합 기술을 통하여 제작한 항체단편 및 항체 경쇄 혹은 중쇄 가변 도메인을 인공적으로 변형하여 제작한 단일 도메인 항체단편을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “항원인식 부분”은 항체의 항원-결합 활성을 보유하는 본 발명의 항체의 임의의 단편을 지칭하는 것으로서, “항원 결합 단편” 및 “펩타이드의 결합 단편” 등과 호환적으로 사용된다.

[0055] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 “항체 Fc 영역”은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변 영역, 중쇄 불변영역 1(CH_1)과 경쇄 불변영역(CL_1)을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH_2) 및 중쇄 불변영역 3(CH_3)부분을 의미하며, 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함하기도 한다. 상기 항체 Fc 영역은 생체 내에서 대사되는 생분해성의 폴리펩타이드이기 때문에, 약물의 캐리어로 사용하기에 안전하다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린 전체 분자에 비해 상대적으로 분자량이 적기 때문에 결합체의 제조, 정제 및 수율 면에서 유리할 뿐만 아니라 아미노산 서열이 항체마다 다르기 때문에 높은 비균질성을 나타내는 Fab 부분을 제거함으로써 물질의 동질성이 크게 증가되고 혈중 항원성의 유발 가능성도 낮아지게 되는 효과도 기대할 수 있다. 상기 항체의 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성 (hybrid)에 의한 Fc 영역 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "예방"은 본 발명의 사스코로나바이러스-2 스파이크 단백질로부터 분리된 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 유효성분으로 하는 조성물의 투여로 코로나바이러스 감염증을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0057] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "치료"는 본 발명의 사스코로나바이러스-2 스파이크 단백질로부터 분리된 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편을 유효성분으로 하는 조성물의 투여로 상기 코로나바이러스 감염증의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0058] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "주사" 또는 "투여"는 투여대상의 나이, 성별, 체중 등에 따라 투여량이 달라질 수 있고, 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서도 백신의 투여량이 달라질 수 있다.

[0059] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본원의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 전형적으로 막을 통과한 이동을 용이하게 하는 계면활성제를 포함할 수 있다. 이러한 계면활성제는 스테로이드에서 유도된 것이거나 N-[1-(2,3-디올레오일)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(DOTMA) 등의 양이온성 지질, 또는 콜레스테롤 헤미숙시네이트, 포스파티딜 글리세롤 등의 각종 화합물 등이 있다.

[0060] 본원의 제 3 측면은, 사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는, 코로나바이러스를 표적화하는 면역세포 또는 항체 검출용 조성물을 제공한다. 제1측면 및 제2측면과 중복되는 내용은 제3측면의 면역세포 또는 항체 검출용 조성물에도 공히 적용된다.

[0061] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 에피토프는 서열번호 1 내지 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 군

으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0062] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "면역세포"는 유기체 (예컨대, 포유류, 조류, 어류 등의 동물)의 생체의 면역계에서 면역원 (예컨대, 외래 면역원 및/또는 내재적 면역원)을 특이적 인식/결합, 비특이적 결합, 또는 내포 작용을 하는 모든 세포일 수 있다. 구체적으로, 상기 면역세포는 호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, 림프구, 쿠퍼 세포, 소교세포 (microglia), 폐포의 대식세포, 결합조직의 대식세포 (Hystocyte), 또는 수지상세포와 같은 대식세포, 비만세포, B세포, T세포, 자연살해세포(natural killer: NK cell), 면역세포 유래 세포주, 및 줄기세포 유래 면역세포로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 상기 "면역세포 유래 세포주"는 면역세포에서 유래한 세포주를 지칭하고, 상기 "줄기세포 유래 면역세포"는 줄기세포로부터 당업계에 공지된 기술에 의해 분화된 면역세포를 지칭한다.

[0063] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 면역세포 또는 항체는 검출 가능한 표지 물질로 표지된 것일 수 있다. 상기 표지 물질은 통상적인 방법으로 검출 가능한 모든 물질 (소분자 화합물 또는 단백질 또는 폴리/올리고 펩타이드 등) 일 수 있으며, 예컨대, 형광 물질, 발광 물질 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0064] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 면역세포 또는 항체 검출용 조성물은 개체의 면역세포의 활성화 정도를 평가하는데 이용될 수 있다. 상기 개체로부터 분리된 시료에 포함된 면역세포와 상기 조성물에 포함된 에피토프의 결합에 의해 상기 면역세포가 상기 에피토프와 상호작용할 수 있다.

[0065] 상기 "개체"는 면역세포의 활성화 정도를 평가하고자 하는 대상을 의미하는 것으로, 인간, 원숭이 등의 영장류, 랫트, 마우스 등의 설치류, 말, 소, 돼지, 양, 염소 등의 우제류, 말과, 개과, 고양이과, 등으로 이루어진 군에서 선택된 포유류, 조류, 어류 등에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0066] 상기 "시료(sample)"는 생체 시료일 수 있다. 상기 생체 시료는 사람을 포함하는 포유동물로부터 단리된 체액(예를 들어, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 객담 또는 소변), 기관, 조직, 분획, 및 세포일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 또한, 생체 시료로부터의 추출물, 예를 들어, 생물학적 유체 (예를 들어, 혈액 또는 소변)으로부터의 항체, 단백질 등을 포함할 수 있다. 상기 시료는 면역세포를 포함하는 것이라면 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 혈액, 소변, 대변, 타액, 림프액, 뇌척수액, 활액, 낭종액(cystic fluid), 복수, 간질액, 또는 안구액(ocular fluid)을 포함할 수 있다.

[0067] 상기 "면역세포의 활성화 정도"는 감염 또는 면역 이상에 의해서 면역세포의 에피토프와의 상호작용이 증가되었거나 저하된 정도를 지칭할 수 있다.

[0068] 본원의 제 4 측면은, 사스코로나바이러스-2(SARS-CoV-2) 스파이크(spike) 단백질로부터 분리된 에피토프를 포함하는, 코로나바이러스 에피토프 펩타이드를 제공한다. 제1측면 내지 제3측면과 중복되는 내용은 제4측면의 에피토프 펩타이드에도 공히 적용된다.

[0069] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 코로나바이러스 에피토프 펩타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 16의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0071] **[실시예]**

[0073] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0075] **실시예 1: SARS-CoV-2 다중 에피토프 선정 및 백신 설계**

[0076] SARS-CoV-2 스파이크 단백질을 이용하여 다중 에피토프를 선별하였으며, 다양한 실험 방법을 이용하여 백신의 효과를 분석했다. 하기 실시예 및 실험예에서는 백신 구조에 대해 여러가지 생물정보학 평가가 수행되었다.

[0077] 상기 내용들을 기반으로 13개의 MHC-I의 9mer 에피토프 및 3개의 MHC-II의 9mer 에피토프를 수집하였고(표 1), 이를 포함하는 SARS-CoV-2에 대한 백신을 구축했다.

표 1

[0079]

Sl. no	MHC-I 대립 유전자를 만나는 에피토프(Epitope encountering MHC-I Allele)	서열 번호	Sl. no	MHC-II 대립 유전자를 만나는 에피토프(Epitope encountering MHC-I allele)	서열 번호
1	SQCVNLTTR	1	1	IHVSGTNGT	14
2	GVYYHKNNK	2	2	VYYHKNNKS	15
3	GKQGNFKNL	3	3	FKNHTSPDV	16
4	GIYQTSNFR	4			
5	VSPTKLNDL	5			
6	KIADYNYKL	6			
7	KVGGNYNYL	7			
8	EGFNCYFPL	8			
9	GPKKSTNLV	9			
10	SPRRARSVA	10			
11	LGAENSVAY	11			
12	FKNHTSPDV	12			
13	DEDDSEPVL	13			

[0081] **실시예 2: 백신 성분의 알레르기항원성(Allergenicity) 분석**

[0082] 신규 백신은 강력한 성능을 위해 알레르기항원성이 없어야 한다. 따라서, 두 개의 서버 AllerTOP 및 AllergenFP를 백신 후보의 알레르기항원성 평가에 사용하였다. 두 서버 모두 아미노산의 물리 화학적 특성을 기반으로 하는 ACC (Auto Cross-Covariance) 및 알레르기항원성 평가 방법에서 작동한다.

[0083] 상기의 AllerTOP 및 AllergenFP 서버를 이용하여 상기 실시예 1에서 설계한 에피토프의 알레르기항원성을 분석한 결과, 상기 백신 성분인 에피토프 모두 비-알레르기 특성을 나타내는 것을 확인하였다. 따라서 상기 에피토프를 백신 성분으로 하여 백신을 제작하고, 이를 투여할 경우 유해한 알레르기 반응을 보이지 않을 것을 알 수 있다.

[0085] **실시예 3: 분자 도킹 및 정상 모드 분석 (Normal mode analysis, NMA) 이동성**

[0086] 안정적인 단백질-단백질 상호 작용 및 관련 세포 기능을 연구하기 위해 분자 도킹을 수행했다. 이를 위해, ClusPro 2.0 서버를 사용하였으며, ClusPro 2.0는 분자 도킹에 사용되는 단백질-단백질 도킹 서버이다. ClusPro 서버에서, 강체(rigid body) 도킹 단계는 FFT (Fast Fourier Transform) 상관 관계 접근 방식을 기반으로 하는 PIPER 도킹 프로그램을 사용하였다. PIPER는 '형태 E(form E)'의 발현을 사용하여 두 단백질 간의 상호 작용 에너지를 나타낸다;

[0087] $E = w_1 E_{rep} + w_2 E_{attr} + w_3 E_{elec} + w_4 E_{DARS}$

[0088] (상기 식에서, E_{rep} 과 E_{attr} 은 반데르발스(van der Waals) 상호 작용 에너지에 대한 끌어당기거나 반발하는 기여도를 나타내며, E_{elec} 은 정전기 에너지를 나타낸다. EDARS는 쌍 구조(pairwise structure) 기반 포텐셜(potential)로 구성되며, 이는 주로 탈용매화 기여도, 즉 계면에서 물 분자를 제거하는 것에 의한 자유 에너지 변화를 나타낸다. 또한, 계수 w_1, w_2, w_3 및 w_4는 해당 잔기의 가중치를 정의한다.)

[0089] NMA 이동성은 대규모 이동성과 거대 분자의 안정성에 대해 조사할 수 있게 하였다. iMODS 서버는 단백질-단백질 구조 복합체를 기반으로 내부 좌표 분석을 수행하였다. 상기 서버는 Cα 원자의 2면 좌표의 NMA와 함께 거대 분자의 결합된 운동을 계산한다. 또한, iMODS는 B-인자 (단백질 원자의 장애), 구조적 변형성을 계산하고 고유값을 산출하였다.

[0090] 상기 방법으로 백신 성분인 실시예 1에서 설계한 에피토프와 TLR4/5 단백질 사이의 분자 도킹 분석을 수행한 결과, ClusPro 2.0의 분자 도킹 결과는 TLR4/5 단백질과 백신 성분 간의 도킹 분석에 대해 최상위 단백질-단백질

도킹 복합체의 높은 음의 에너지(-1362.3kcal/mol)를 나타냈다. 또한, TLR4/TLR5의 시스테인 646(cys-646)은 백신 구조물의 티로신 189(tyr-189)와 비공유 결합 (3.5 Å)을 형성한 반면, TLR4/TLR5의 트레오닌 647(thr-647)은 페닐알라닌 186(phe-186)과 두 개의 비공유 결합 (2.9 Å 및 2.3 Å)을 형성하는 것을 확인하였다(도 1). TIRAP 수용체 단백질에서 백신 후보의 가능한 면역 캐스케이드(cascade) 메커니즘은 도 2에 구체적으로 기재하였다.

[0091] 다음으로, 실시예 1에서 설계한 백신 성분인 에피토프와 수용체 단백질(TLR5)의 NMA 이동성 분석을 수행한 결과, 상기 에피토프와 수용체 단백질(TLR5)은 NMA 이동성에 따라 결합 시 서로를 향하게 되는 것을 확인하였다(도 3). 이러한 결과는 백신 설계 시에 매우 중요한 부분이다. 변형성 플롯(deformability plot)은 약간의 변동을 보여주는(도 5) 반면, NMA B-계수는 PDB B-계수에서 매우 최소화되는 것을 확인하였다(도 4).

[0092] 또한, 고유값은 단백질-단백질 도킹 복합체의 분산과 역관계를 보여주었으며, 추정된 고유값은 $1.129951e^{-07}$임을 확인하였다 (도 6). 이 작업에서, 공분산 행렬은 그래픽 표현 (흰색, 빨간색 및 파란색을 통해)을 통해 설명된다. 상기 색상 변이는 각각 아미노산 잔기와 상관 관계가 없거나(uncorrelated), 상관 관계가 있거나(correlated), 반대로 상관 관계가 있는(anti-correlated) 쌍을 나타낸다(도 7).

[0093] 또한, 원자 접촉 스프링(Springs of atomic contact)은 탄성 네트워크 모델(elastic network model)에서 회색 점으로 표시되며, 여기서 접촉 강성은 회색 색상의 기울기에 비례한다 (도 8).

[0094] 상기 결과를 종합해보면, NMA 이동성 분석 결과를 토대로 본 발명의 백신 후보는 TLR4/TLR5와 결합 부위에서 서로에 대한 안정된 상호 작용 움직임을 가지고 있음을 알 수 있다. 또한, 변형성 플롯(deformability plot) 결과에서 상당히 낮은 피크가 있기 때문에 복합체는 쉽게 변형되지 않음을 알 수 있다.

[0096] **실시예 4: 펩타이드 기반 백신 대조의 In-silico 클로닝 및 물리 화학적 특성 평가**

[0098] 먼저, 인간과 대장균의 코돈 사용빈도(codon usage)의 차이로 인해, 코돈 사용빈도를 이해하기 위한 코돈 적응 도구가 사용되었다. 원핵 생물 내에서 코돈을 적응시키고 발현율을 높이는 것이 필요하다. 백신 성분의 클로닝을 위해, 대장균 균주 K12를 숙주로 선택하였다. Java Codon Adaptive Tool (JCat)은 백신 성분의 코돈 최적화를 위해 사용되었다. 다음으로, 클로닝을 위해 pET28a(+) 발현 벡터를 선택하였고, 'Addgene' 벡터 데이터베이스에서 뉴클레오티드 서열을 수집했다[18]. WebDSVver 2.0 (http://www.molbiotools.com/WebDSV/)은 SARS-CoV-2에 대한 펩티드 기반 백신 성분의 in silico 클로닝을 추적하는 데 사용되었다. 백신 후보의 1차 서열에 대한 용해도 및 물리 화학적 특성 평가는 필수적이며, 이는 백신의 상태, 안정성 및 접근성을 결정한다. 구축 백신의 용해도는 ProteinSol 웹 서버에서 대장균 단백질의 평균 용해도에 대해 예측되었다. 또한, 설계된 백신의 다양한 물리 화학적 특성을 추가로 분석하기 위해 ProtParam 서버에 접속하였다

[0100] In-silico 클로닝 기술은 주어진 시간 내에 강력한 다중 에피토프 백신을 개발할 가능성을 평가하는 빠른 방법이다. 상기의 JCat 서버를 이용하여 구축된 SARS-CoV-2 펩타이드 기반 백신의 최적화된 염기 서열의 CAI(Codon Adaptation Index) 및 GC 함량을 계산했다. 그 결과, 값은 각각 1.0 및 46.61654로 표시되었으며, 상기 값은 숙주에서 구성 백신의 가능한 효율적인 발현을 위한 예외적인 값이다.

[0101] 다음으로, WebDSV 도구는 발현을 위해 pET28a(+) 벡터에 펩티드-기반 백신 후보의 적응된 코돈 서열을 삽입하기 위해 적용하였다 (도 9). 펩타이드 기반 에피토프 백신 후보의 물리 화학적 특성과 용해도와 관련된 세부내용은 하기 표 2에 기재하였다. 본 발명의 백신 후보는 불안정 지수 = 16.64 (<40, 안정) 및 용해도 점수 0.698, 예측 반감기는 1시간 (포유류 망상 적혈구, 시험관 내) 및 > 10시간 (Escherichia coli, 생체 내)인 것으로 확인되었다. 따라서, 본 발명의 백신 후보를 이용하여 효과가 우수한 백신을 제조할 것으로 기대된다.

표 2

[0102]

Sl. no	물리화학적 특성 (Physicochemical property)	분석값 (Analytical values)
1	용해성(Solubility)	0.698 (용해성이 있음)

2	아미노산 개수(Number of amino acids)	399
3	분자량(Molecular weight)	40198.87 Da
4	이론적 등전점(Theoretical Isoelectric point, pI)	8.94
5	총 원자수(Total number of atoms)	5667
6	화학식(Formula)	$C_{1740}H_{2838}N_{510}O_{577}S_2$
7	예측 반감기(Estimated half-life)	1 시간 (포유류 망상 적혈구, 시험관 내) >20시간 (이스트, 생체 내) >10시간 (대장균, 생체 내)
8	불안정 지수(Instability index)	16.64 (안정됨)
9	지방족 지수(Aliphatic index)	61.03
10	GRAVY(Grand average of hydropathicity)	- 0.552

[0104] 또한, 지방족 지수가 61.03인 것은, 백신이 자연에서 열 안정성이 있음을 예측할 수 있으며, 불안정 지수가 40 (16.60) 미만으로서, 발현 후 백신 구조의 안정성이 우수함을 알 수 있다.

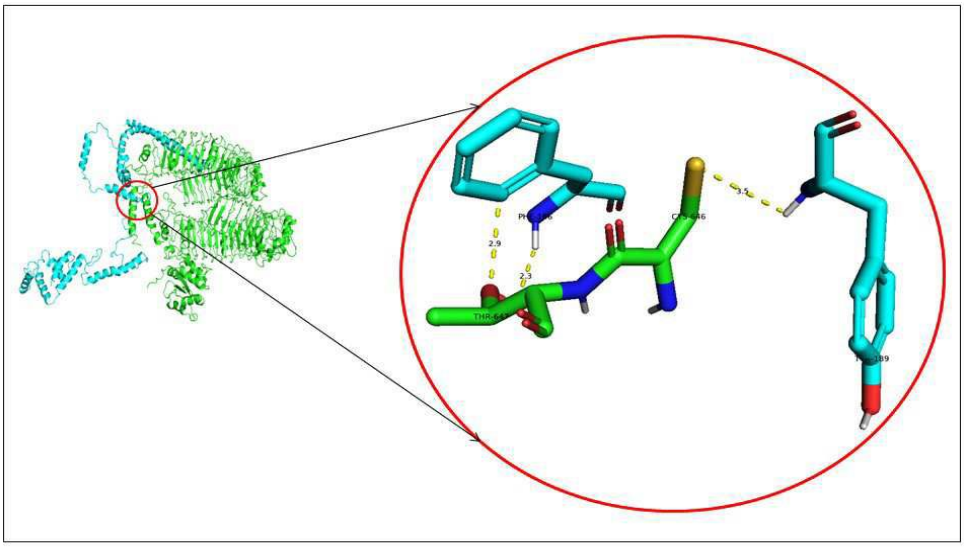
[0105] 상기 실시예들을 종합해보면, 본 발명의 in silico 작업은 설계된 백신 후보가 비알레르기항원성이고, 인간의 TLR 단백질과 효율적이고 안정적인 분자 상호 작용을 가지고 있으며, 백신의 안정성이 우수하다는 것을 보여준다. 이러한 결과는 선별된 에피토프로 구성된 SARS-CoV-2에 대한 펩타이드-기반 백신 후보의 높은 잠재력 및 효과를 기대하게 한다.

[0107] 이제까지 본 발명에 대하여 바람직한 실시예를 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 본 발명을 구현할 수 있음을 이해할 것이다. 그러므로 상기 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 한다.

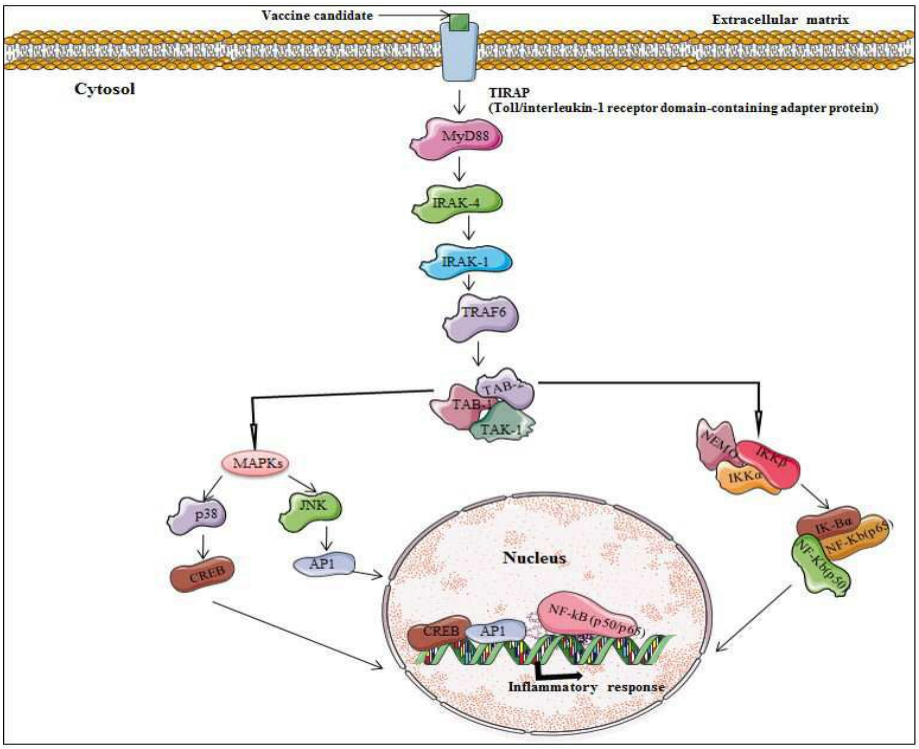
[0108] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술사상과 아래에 기재될 특허청구범위의 균등범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

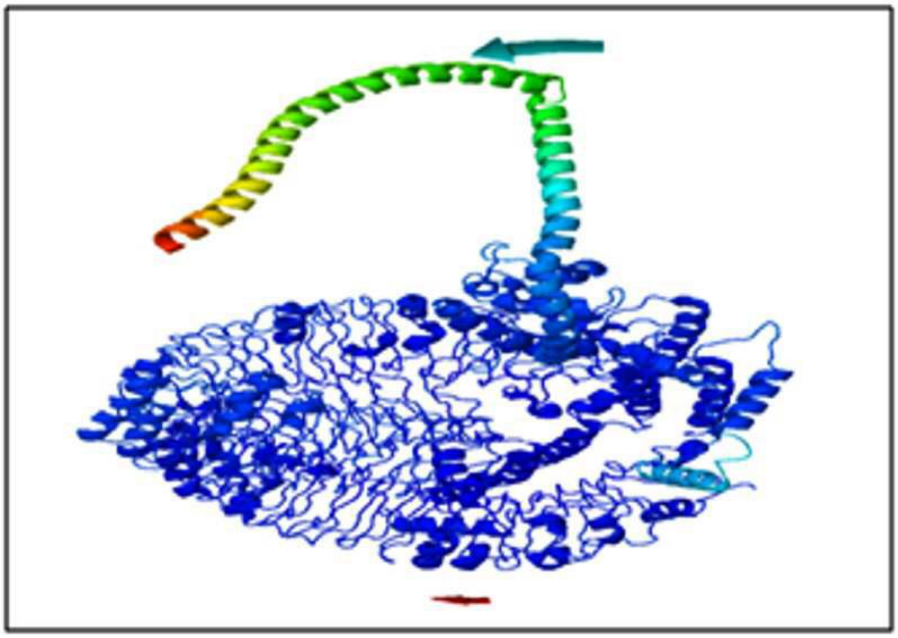
도면1



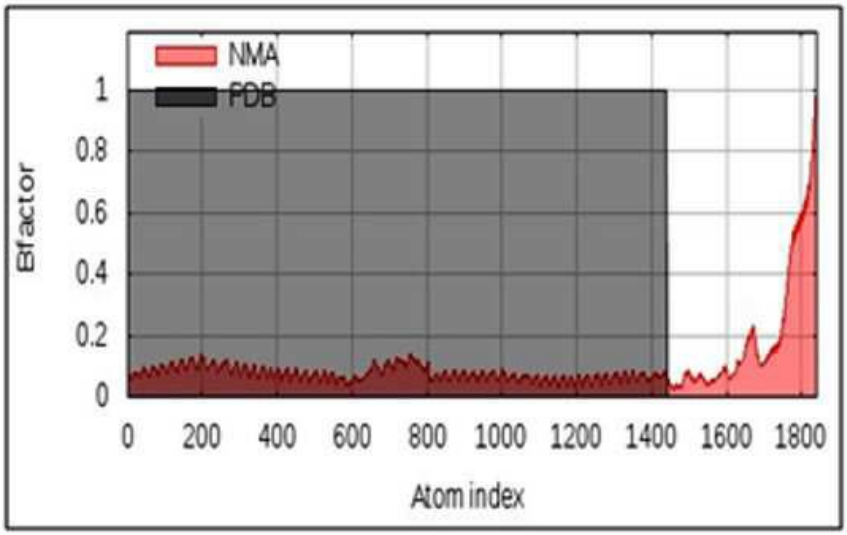
도면2


Vaccine candidate
Extracellular matrix
Cytosol
TIRAP
(Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein)
MyD88
IRAK-4
IRAK-1
TRAF6
TAB-2
TAB-1
TAK-1
MAPKs
p38
JNK
CREB
AP1
NEMO
IKKβ
IKKα
IK-Bα
NF-KB(p65)
NF-KB(p50)
Nucleus
CREB
AP1
NF-kB (p50/p65)
Inflammatory response

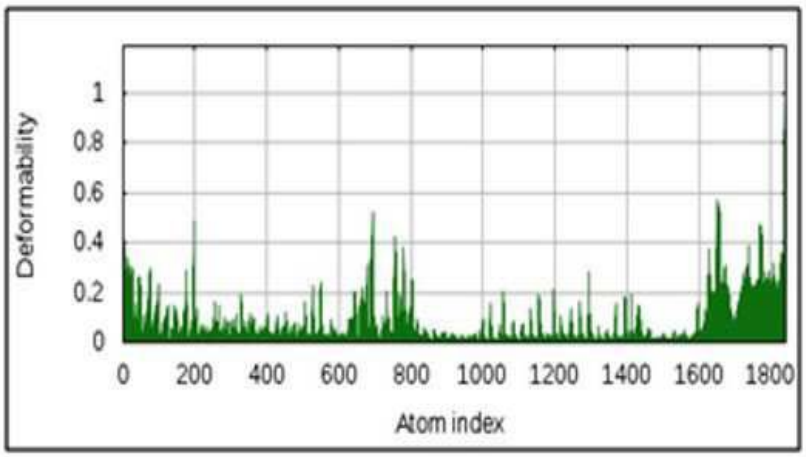
도면3



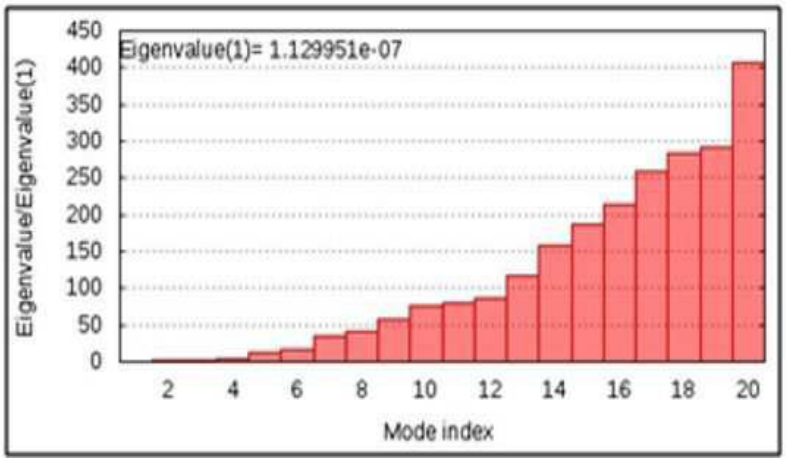
도면4


NMA
PDB
Bfactor
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
Atom index

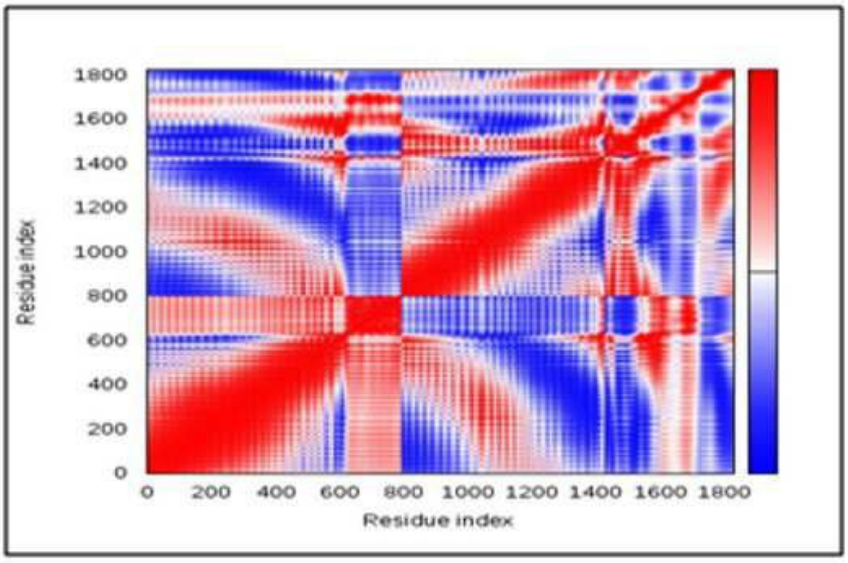
도면5


Deformability
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
Atom index

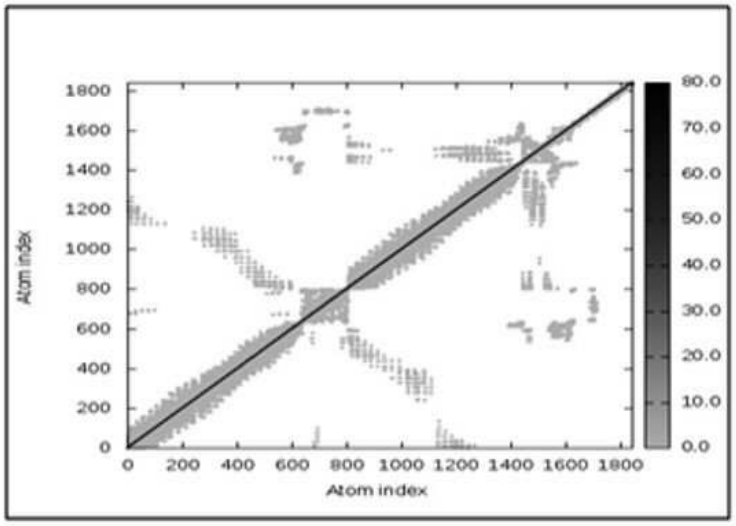
도면6


Eigenvalue(1)= 1.129951e-07
Eigenvalue/Eigenvalue(1)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Mode index

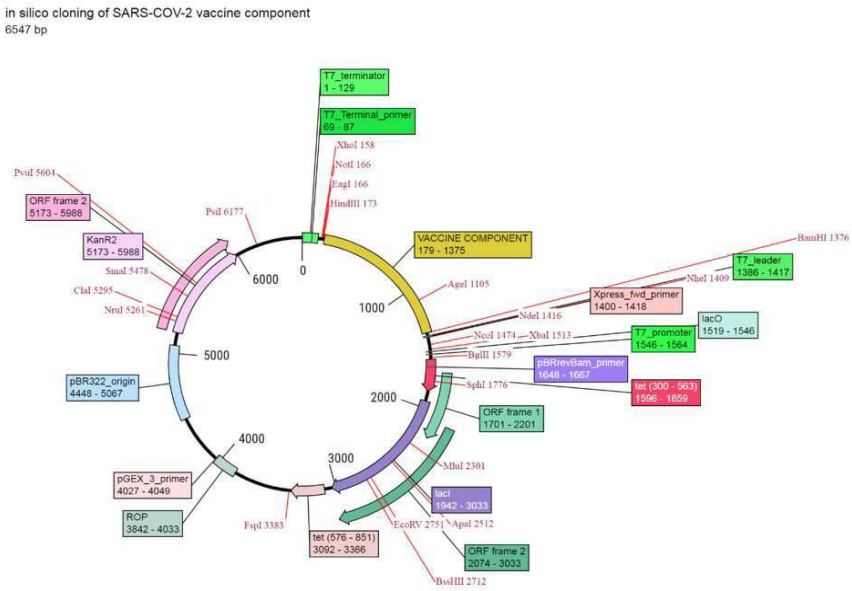
도면7


Residue index
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
Residue index

도면8



도면9



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Epitope identified from SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2 multiple-epitope vaccine composition comprising the same

<130> P202300

<160> 16

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-I_1

<400> 1

Ser Gln Cys Val Asn Leu Thr Thr Arg

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-I_2

<400> 2

Gly Val Tyr Tyr His Lys Asn Asn Lys

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-I_3

<400> 3

Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn Leu

1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-I_4

<400> 4

Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg

1 5

<210> 5

<211> 9

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-I_5

<400> 5

Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-I_6

<400> 6

Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-I_7

<400> 7

Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-I_8

<400> 8

Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-I_9

<400> 9

Gly Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-I_10

<400> 10

Ser Pro Arg Arg Ala Arg Ser Val Ala

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-I_11

<400> 11

Leu Gly Ala Glu Asn Ser Val Ala Tyr

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-I_12

<400> 12

Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-I_13

<

400> 13

Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-II_1

<400> 14

Ile His Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-II_2

<400> 15

Val Tyr Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MHC-II_3

<400> 16

Phe Lys Asn His Thr Ser Pro Asp Val

1 5