



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0071176
(43) 공개일자 2025년05월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) A61K 39/215 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/215 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0157677
(22) 출원일자 2024년11월08일
심사청구일자 2024년11월08일
- (30) 우선권주장
1020230155404 2023년11월10일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
대한민국(질병관리청 국립보건연구원장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
- (72) 발명자
윤미란
충북 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 (국
립보건연구원)
김도근
충북 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 (국
립보건연구원)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
곽재근, 이상현

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 사스-코로나바이러스-2 범용 항원 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 범용 항원 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드 및 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이며, 상기 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 유효 성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 감염증 예방용 백신 조성물 및 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대표도 - 도2



(b)

서열번호 1	27	50	52	73	78	132	161	173	213	256	260	324
서열번호 2			52				158	170		253		321
서열번호 3	24	47		70	75	129		170	210	253	257	

본 발명은 와일드 타입의 SARS-CoV-2 및 현존하는 SARS-CoV-2 변이주뿐만 아니라 가상의 SARS-CoV-2 변이주에까지 대응할 수 있는 범용 항원 폴리펩타이드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 또한 본 발명은 상기 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드의 특정 위치의 아미노산을 치환함으로써 구조 안정성을 더욱 향상시킨 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 또한 본 발명은 상기 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 백신 및 약학적 조성물을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)

C12N 2770/20022 (2013.01)

C12N 2770/20034 (2013.01)

(72) 발명자

김유진

충북 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 (국립보건연구원)

황윤호

충북 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 (국립보건연구원)

여진아

충북 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 (국립보건연구원)

전지향

충북 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 (국립보건연구원)

김시현

충북 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 (국립보건연구원)

이태영

충북 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 (국립보건연구원)

김서연

충북 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 (국립보건연구원)

김기순

서울특별시 양천구 목동중앙북로 38 롯데캐슬위너 아파트 105-302

박만성

서울특별시 강남구 삼성로 417, 104동 704호 (대치동, 대치 포스코더샵아파트)

석중현

서울특별시 성북구 종암로13길 22, A동 2층 202호 (종암동, 한빛하이츠빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1776000114
과제번호	2021-NI-027-01
부처명	질병관리청
과제관리(전문)기관명	질병관리청
연구사업명	공공백신개발지원센터 건립 및 운영(R&D)
연구과제명	신변중 코로나바이러스 대응을 위한 mRNA 기반의 백신 후보물질 발굴
과제수행기관명	국립보건연구원
연구기간	2021.04.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1776000407
과제번호	2023-NS-005-00
부처명	질병관리청
과제관리(전문)기관명	질병관리청
연구사업명	신기술기반 백신플랫폼 개발 지원
연구과제명	다가형 코로나19 및 엠폭스 mRNA 백신 후보물질 개발
과제수행기관명	국립보건연구원
연구기간	2023.03.01 ~ 2025.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1776000224
과제번호	2022-ER2403-00
부처명	질병관리청
과제관리(전문)기관명	질병관리청
연구사업명	신기술기반 백신플랫폼 개발 지원
연구과제명	코로나 19 변이주에 광범위한 면역원성을 갖는 범용항원 개발
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.05.04 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711170884
과제번호	2022M3A9I201724112
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발
연구과제명	코로나19 바이러스 변이주 발생 예측 모델 확립 및 통합 기전 분석 기반 예방 플랫폼 기술 개발
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.04.01 ~ 2026.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 참조 서열(reference sequence)로 하여, 하나 이상의 아미노산이 치환된 폴리펩타이드로서,

27번 위치에 상응하는 아미노산의 E로의 치환;

50번 위치에 상응하는 아미노산의 M으로의 치환;

52번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환;

73번 위치에 상응하는 아미노산의 S로의 치환;

78번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환;

132번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환;

161번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환;

173번 위치에 상응하는 아미노산의 S 또는 K로의 치환;

213번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환;

256번 위치에 상응하는 아미노산의 Q 또는 N으로의 치환;

260번 위치에 상응하는 아미노산의 V로의 치환; 및

324번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환;

으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환이 이루어진, 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드.

청구항 2

제1 항에 있어서, 상기 SARS-CoV-2는 SARS-CoV-2의 변이주(variant)를 포함하는 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드.

청구항 3

제2 항에 있어서, 상기 SARS-CoV-2의 변이주는 알파(Alpha) 변이주, 베타(Beta) 변이주, 감마(Gamma) 변이주, 델타(Delta) 변이주 및 오미크론(Omicron) 변이주로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드.

청구항 4

제1 항에 있어서, 상기 아미노산의 치환은,

173번 위치에 상응하는 아미노산의 S 또는 K로의 치환; 및

256번 위치에 상응하는 아미노산의 Q 또는 N으로의 치환;

인 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드.

청구항 5

제1 항에 있어서, 상기 아미노산의 치환은,

52번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환;

161번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환;

173번 위치에 상응하는 아미노산의 S로의 치환;
 256번 위치에 상응하는 아미노산의 Q로의 치환; 및
 324번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환;
 인 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드.

청구항 6

제5 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드.

청구항 7

제1 항에 있어서, 상기 아미노산의 치환은,
 27번 위치에 상응하는 아미노산의 E로의 치환;
 50번 위치에 상응하는 아미노산의 M으로의 치환;
 73번 위치에 상응하는 아미노산의 S로의 치환;
 78번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환;
 132번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환;
 173번 위치에 상응하는 아미노산의 K로의 치환;
 213번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환;
 256번 위치에 상응하는 아미노산의 N으로의 치환; 및
 260번 위치에 상응하는 아미노산의 V로의 치환;
 인 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드.

청구항 8

제7 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드.

청구항 9

서열번호 4 또는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드.

청구항 10

제9 항에 있어서, 상기 SARS-CoV-2는 SARS-CoV-2의 변이주(variant)를 포함하는 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드.

청구항 11

제10 항에 있어서, 상기 SARS-CoV-2의 변이주는 알파(Alpha) 변이주, 베타(Beta) 변이주, 감마(Gamma) 변이주, 델타(Delta) 변이주 및 오미크론(Omicron) 변이주로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드.

청구항 12

제1 항 내지 제11 항 중 어느 하나의 항에 따른 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는, SARS-CoV-2 감염증의 예방용 백신 조성물.

청구항 13

제1 항 내지 제11 항 중 어느 하나의 항에 따른 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는, SARS-CoV-2 감염 증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제1 항 내지 제11 항 중 어느 하나의 항에 따른 상기 폴리펩타이드를 암호화하는, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리뉴클레오타이드.

청구항 15

제14 항에 따른 상기 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는, SARS-CoV-2 감염증 예방용 백신 조성물.

청구항 16

제14 항에 따른 상기 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 범용 항원 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 범용 항원 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드 및 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이며, 상기 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 감염증 예방용 백신 조성물 및 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 코로나바이러스 감염증-19 (Coronavirus disease 2019, COVID-19)는 사스-코로나-바이러스-2 (SARS-CoV-2)를 원인 병원체로 하는 중증 급성 호흡기 증후군(Severe acute respiratory syndrome)을 의미한다. SARS-CoV-2는 인수공통성 RNA (RiboNucleic Acid, 리보핵산) 바이러스로, RNA 바이러스는 DNA 바이러스에 비해 변이가 쉬운 특징이 있어 백신 또는 치료제에 대한 내성을 가진 새로운 바이러스로 빠르게 변이가 가능한 것으로 알려져 있다.

[0003] SARS-CoV-2는 유전체인 RNA가 스파이크 단백질(spike protein)이 둘러싸인 외피(envelope)로 둘러싸인 구형 구조로, SARS-CoV-2의 스파이크 단백질이 숙주세포막의 수용체(ACE2)와 결합하면서 세포 내 침투가 이루어지는 것으로 알려져 있다. 이러한 스파이크 단백질의 변형(특히, 수용체 결합 도메인)은 바이러스 감염성 및 전파력에 큰 영향을 미치며, 백신 및 치료제에 대한 내성을 초래할 수 있다. 현재까지 보고된 주요 변이로 알파(Alpha) 변이주, 베타(Beta) 변이주, 감마(Gamma) 변이주, 델타(Delta) 변이주 및 오미크론(Omicron) 변이주가 있으며, 오미크론 하위변이가 지속적으로 나타나고 있는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 현재 전세계적으로 허가되어 사용되고 있는 SARS-CoV-2 백신은 SARS-CoV-2 감염증을 처음으로 유발한 와일드 타입(Wild type)으로 알려진 우한주의 스파이크 단백질을 기반으로 제조된 백신으로, 다양한 SARS-CoV-2 변이주에 대하여 효과적이고 충분한 대응이 이루어지지 않고 있는 실정이다. 이에 와일드 타입의 SARS-CoV-2 및 현존하는 다양한 SARS-CoV-2 변이주뿐만 아니라 미래에 발생 가능한 가상의 SARS-CoV-2 변이주에까지 보다 안정적으로 효과가 지속되면서도 높은 면역원성을 나타내는 범용성이 있는 백신 및 치료제의 개발이 절실히 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) KR 10-2023-0082071 A

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위하여, 와일드 타입의 SARS-CoV-2 및 현존하는 SARS-CoV-2 변이주뿐만 아니라 가상의 SARS-CoV-2 변이주에까지 대응할 수 있는 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것을 주된 목적으로 한다.
- [0007] 구체적으로 본 발명은 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 범용 항원 아미노산 서열로 이루어진 SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공하는 것을 하나의 목적으로 한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 범용 항원 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 암호화하는 SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것을 다른 하나의 목적으로 한다.
- [0009] 또한 본 발명은 상기 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 감염증의 예방용 백신 및 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 다른 하나의 목적으로 한다.
- [0010] 본 발명의 목적은 상기의 기재에 국한되지 않으며 본 발명을 활용하여 적절한 효과를 얻을 수 있는 모든 경우를 목적으로 하여 제공된다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 범용 항원 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드 및 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이며, 상기 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 감염증 예방용 백신 조성물 및 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명자들은 다양한 SARS-CoV-2 변이주에 대하여 범용적으로 적용할 수 있는 백신 및 치료제를 개발하기 위하여, SARS-CoV-2의 주요 항원으로 작용하는 스파이크 단백질(spike protein)의 S1 서브유닛을 대상으로 SARS-CoV-2의 현존하는 모든 유전형을 포함하는 약 2천여개의 서열을 분석하여 공통보존서열을 도출하였으며, 이로부터 SARS-CoV-2 범용 항원 아미노산 서열에 관한 발명을 완성하였다. 또한 본 발명자들은 상기 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드의 구조 안정화를 위하여, 상기 범용 항원 아미노산 서열의 특정 위치의 아미노산을 치환함으로써 범용 항원 폴리펩타이드의 구조 안정성을 더욱 향상시킨 SARS-CoV-2 범용 항원 최적화 아미노산 서열에 관한 발명을 완성하였다. 또한 상기 SARS-CoV-2 범용 항원 아미노산 서열을 활용하여 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제조하고, 이를 유효성분으로 포함하는 백신 및 치료제를 제조함으로써, 와일드 타입의 SARS-CoV-2 및 현존하는 SARS-CoV-2 변이주뿐만 아니라 가상의 SARS-CoV-2 변이주에까지 대응할 수 있는 범용 백신 및 치료제를 완성하였다.
- [0014] 구체적으로 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 참조 서열(reference sequence)로 하여, 하나 이상의 아미노산이 치환된 폴리펩타이드로서,
- [0015] 27번 위치에 상응하는 아미노산의 E로의 치환; 50번 위치에 상응하는 아미노산의 M으로의 치환; 52번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환; 73번 위치에 상응하는 아미노산의 S로의 치환; 78번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환; 132번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환; 161번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환; 173번 위치에 상응하는 아미노산의 S 또는 K로의 치환; 213번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환; 256번 위치에 상응하는 아미노산의 Q 또는 N으로의 치환; 260번 위치에 상응하는 아미노산의 V로의 치환; 및 324번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환; 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환이 이루어진, 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은 상기 아미노산의 치환이, 173번 위치에 상응하는 아미노산의 S 또는 K로의 치환; 및 256번 위치에 상응하는 아미노산의 Q 또는 N으로의 치환; 인 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0018] 또한 본 발명은 상기 아미노산의 치환이, 52번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환; 161번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환; 173번 위치에 상응하는 아미노산의 S로의 치환; 256번 위치에 상응하는 아미노산의 Q로

의 치환; 및 324번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환; 인 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.

- [0019] 또한 본 발명은 상기 아미노산의 치환이, 27번 위치에 상응하는 아미노산의 E로의 치환; 50번 위치에 상응하는 아미노산의 M으로의 치환; 73번 위치에 상응하는 아미노산의 S로의 치환; 78번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환; 132번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환; 173번 위치에 상응하는 아미노산의 K로의 치환; 213번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환; 256번 위치에 상응하는 아미노산의 N으로의 치환; 및 260번 위치에 상응하는 아미노산의 V로의 치환; 인 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0020] 또한 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0021] 또한 본 발명은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0022] 또한 본 발명은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0023] 또한 본 발명은 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0024] 또한 본 발명은 상기 SARS-CoV-2가 SARS-CoV-2의 변이주(variant)를 포함하는 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0025] 또한 본 발명은 상기 SARS-CoV-2의 변이주가 알파(Alpha) 변이주, 베타(Beta) 변이주, 감마(Gamma) 변이주, 델타(Delta) 변이주 및 오미크론(Omicron) 변이주로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0026] 또한 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는, SARS-CoV-2 감염증의 예방용 백신 조성물을 제공한다.
- [0027] 또한 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0028] 또한 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 암호화하는, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0029] 또한 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는, SARS-CoV-2 감염증 예방용 백신 조성물을 제공한다.
- [0030] 또한 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0032] 이하에서, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명한다.
- [0034] 본 발명은 구체적인 일 양태로,
- [0035] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 참조 서열(reference sequence)로 하여, 하나 이상의 아미노산이 치환된 폴리펩타이드로서,
- [0036] 27번 위치에 상응하는 아미노산의 E로의 치환;
- [0037] 50번 위치에 상응하는 아미노산의 M으로의 치환;
- [0038] 52번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환;
- [0039] 73번 위치에 상응하는 아미노산의 S로의 치환;
- [0040] 78번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환;

- [0041] 132번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환;
- [0042] 161번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환;
- [0043] 173번 위치에 상응하는 아미노산의 S 또는 K로의 치환;
- [0044] 213번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환;
- [0045] 256번 위치에 상응하는 아미노산의 Q 또는 N으로의 치환;
- [0046] 260번 위치에 상응하는 아미노산의 V로의 치환; 및
- [0047] 324번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환;
- [0048] 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환이 이루어진, 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0050] 본 발명에서 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열은 하기 [표 1]과 같다.

표 1

[0051]	[서열번호 1] SARS-CoV-2_Control (우한주) S1 (N → C)
	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFA STEKSNIIIRGWIFGTTLDSTQSLIIVNNATNVVIVKCEFFQCNDFPLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLLMDLEGKQGNF KNLREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPGQFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGDSGGWTAGAAAYVGYLQPTFLLKY NENGTITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPGGEVFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSVLYNSA SFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYLYRLFRKSNLKPFE RDISTEIIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKK FLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLI GAEHVNNSEYCDIPIGAGICASYQTQTNSPRRAR

- [0053] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 상기 아미노산 치환 위치는 다음과 같은 방법을 통하여 도출되었다. 구체적으로 인실리코(in-silico) 분석 기반 딥러닝 기법을 사용한 알파폴드2 (AlphaFold2)를 이용하여 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 도메인의 3차 구조를 모델링하고, 예측한 3차 구조 및 서열을 바탕으로 단백질의 서열 변화 정보 및 원자 기반 로제타 구조 에너지 변화를 계산하는 pSUFER 및 FuncLib 서버를 이용한 인실리코 분석 결과를 반영하여 단백질 접힘 구조의 안정성을 높이는 변이가 도입된 1천 개의 단백질 설계 레퍼토리를 도출하였다. 이들 중 상위 5개 아미노산 변이체들을 1차 후보군으로 선정하고, 이들 1차 후보군의 단백질 발현 및 RNA 안정성과 연관된 용해도(solubility), 공동(cavity), RNA 2차 구조 등의 생리화학적 특성을 Aggrescan 3D(A3D), CASTp-3.0 및 RNAfold 서버 등을 이용한 인실리코 방법으로 추가 예측하였고 이들 예측 결과를 종합하여 최종 돌연변이 위치를 선정하였다.
- [0054] 본 발명에서 상기 아미노산 치환 위치는 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 참조 서열(reference sequence)로 하여, 이를 기준으로 아미노산 서열의 N 말단으로부터 넘버링한 각 위치에 상응하는 아미노산의 위치이다.
- [0055] 본 발명에서 상기 "상응하는(corresponding to)"의 의미는, 아미노산 서열에서 열거되는 위치와 유사하거나 동일하거나 상동하여 대응되는 위치/영역의 아미노산 잔기를 지칭할 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예로, 본 발명의 상기 아미노산의 치환 위치를 확인함에 있어서, 임의의 아미노산 서열을 참조 서열(reference sequence)과 서열 정렬(sequence alignment)을 수행하였을 때, 참조 서열의 N 말단으로부터 넘버링된 위치에 기반하여 그와 유사하거나 동일하거나 상동하여 대응되는 것으로 인정되는 위치/영역의 아미노산을, 각 위치에 "상응하는"아미노산으로 판단하여 해당 아미노산을 치환할 수 있다.
- [0056] 상기 서열 정렬을 수행하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 통상적으로 사용되는 서열 정렬 프로그램, 쌍 서열(pairwise sequence) 비교 알고리즘 등을 사용하여 수행될 수 있다. 상기 서열 정렬 프로그램/알고리즘의 비제한적인 예로 Needleman-Wunsch 알고리즘 (Needleman 및 Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), EMBOSS 패키지의 Needle 프로그램 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite,

Rice et al., 2000), Trends Genet. 16: 276-277), MAFFT 프로그램 (Katoh et al., 2002, Nucleic Acids Res. 30:3059-3066) 등을 이용할 수 있다.

- [0057] 본 발명의 상기 SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드는 임의의 아미노산 서열에 있어서 상기 서열번호 1을 참조 서열로 하여 함께 서열 정렬하였을 때, 상기 제시된 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환이 이루어진 것이라면 제한없이 모두 포함할 수 있으나, 본 발명의 보다 우수한 SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료 효능의 발휘를 위하여, 상세하게는 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 70% 이상 100% 미만의 서열 상동성을 나타내는 것일 수 있고, 보다 상세하게는 80% 이상 100% 미만의 서열 상동성을 나타내는 것일 수 있으며, 더욱 상세하게는 90% 이상 100% 미만의 서열 상동성을 나타내는 것일 수 있다.
- [0058] 본 발명에서 상기 아미노산의 치환은 상기 제시된 군에서 선택되는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개의 치환일 수 있다. 상기 아미노산의 치환이 이루어진 폴리펩타이드의 경우, 구조 안정성이 더욱 향상되는 이점이 있다.
- [0059] 본 발명에서 상기 아미노산 치환에 있어서 구조 안정성이 가장 우수하게 향상되는 치환 위치는 특히 173번 위치에 상응하는 아미노산의 S 또는 K로의 치환; 및 256번 위치에 상응하는 아미노산의 Q 또는 N으로의 치환일 수 있다.
- [0061] 본 발명의 또 다른 일 양태로, 상기 아미노산의 치환이,
- [0062] 52번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환;
- [0063] 161번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환;
- [0064] 173번 위치에 상응하는 아미노산의 S로의 치환;
- [0065] 256번 위치에 상응하는 아미노산의 Q로의 치환; 및
- [0066] 324번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환;
- [0067] 인 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0068] 본 발명의 또 다른 일 양태로, 상기 5개 아미노산의 치환이 이루어진 폴리펩타이드는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드일 수 있다.
- [0069] 본 발명에서 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열은 하기 [표 2]와 같다.

표 2

[0070]	[서열번호 2] SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드(Consensus_dsg; Cds_dsg) MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTDLFLPFFSNVTWFHAI SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFAST EKSNI IRGWIFGTTLD SKTQSLI VNNATNVV I KVC EFQFCNDPFLGVYHKNNKSWMESEFRVYDSANNCTFEYVSSPFLMDLEGKQGNFKNL REFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDL PQGFSALEPLVDLP IGINITRFQTLALHRSYLT PGDSSQGW TAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNN GTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTEKGIYQTSNFRVQPTDSIVRFPNITNLC PFGEVFNATRFASVYAWNRKRI SNCVADYSVLVNSASF TFKCYGVSP TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKL PDDFTGCVI AWNSNNLDSKVGGNYNRYRLFRKSNLKPFERDI STEIYQAGSKPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFGLTGTGVLTESNKKFLP FQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVS VITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAE HVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPA
--------	--

- [0072] 본 발명의 또 다른 일 양태로, 상기 아미노산의 치환이,
- [0073] 27번 위치에 상응하는 아미노산의 E로의 치환;
- [0074] 50번 위치에 상응하는 아미노산의 M으로의 치환;
- [0075] 73번 위치에 상응하는 아미노산의 S로의 치환;
- [0076] 78번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환;
- [0077] 132번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환;

- [0078] 173번 위치에 상응하는 아미노산의 K로의 치환;
- [0079] 213번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환;
- [0080] 256번 위치에 상응하는 아미노산의 N으로의 치환; 및
- [0081] 260번 위치에 상응하는 아미노산의 V로의 치환;
- [0082] 인 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0083] 본 발명의 또 다른 일 양태로, 상기 9개 아미노산의 치환이 이루어진 폴리펩타이드는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것인, SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드일 수 있다.
- [0084] 본 발명에서 상기 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열은 하기 [표 3]과 같다.

표 3

[0085]	[서열번호 3] SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드(Chimeric_dsg; Chi_dsg) MFVFLVLLPLVSSQCVNLITRTQEYTNSTFRGVYYPDKVFRSSVLHMTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGSNGTKYFDNPVLPFNDGVYFASTE KSNIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNVVIVKCYFQFCNDPFLDVYYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSKPFLMDLEGKQGNFKNL REFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLTRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTSGDSSNGWTGAAAYVGYLQPRTFLLKYNNEN GTITDAVDCALDPLSETKCTKLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFHEVFNATTFASVYAWNRKRISNCVADYSVLNFAFPF AFKCYGVSPTKLNLDLCTNVDYADSFVIRGNEVSQIAPGQTGNIDYNYKLPDDFTGCVIAWNSNKLDSKVSNGNYNYLYRLFRKSKLKPFERDI STEIYQAGNKPCNGVAGFNCYFPLQSYGFRPTYGVGHQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLP FQQFGRDIAADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAE HVNNSYECDIPIGAGICASYQTQNSHA
--------	--

- [0087] 본 발명의 또 다른 일 양태로, 서열번호 4 또는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 사스-코로나 바이러스-2 (SARS-CoV-2) 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0088] 본 발명에서 상기 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열은 하기 [표 4]와 같다.

표 4

[0089]	[서열번호 4] SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드(Consensus; Css) MFVFLVLLPLVSSQCVNLITRTQLPPAYTNSTFRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFAST EKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNVVIVKCEYFQFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQFPFLMDLEGKQGNFKNL REFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLRDLPOGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTSGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNNEN GTITDAVDCALDPLSETKCTKLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLNYSASF TFKCYGVSPTKLNLDLCTNVDYADSFVIRGDEVRIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNKLDSKVGNGNYNYRYLFRKSNLKPFERDI STEIYQAGSKPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLP FQQFGRDIAADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAE HVNNSYECDIPIGAGICASYQTQNSPA
--------	---

- [0091] 본 발명에서 상기 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열은 하기 [표 5]와 같다.

표 5

[0092]	[서열번호 5] SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드(Chimeric; Chi) MFVFLVLLPLVSSQCVNLITRTQSYTNSTFRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTE KSNIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNVVIVKCEYFQFCNDPFLDVYYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQFPFLMDLEGKQGNFKNL REFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLRDLPOGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTSGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNNEN GTITDAVDCALDPLSETKCTKLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFHEVFNATTFASVYAWNRKRISNCVADYSVLNFAFPF AFKCYGVSPTKLNLDLCTNVDYADSFVIRGNEVSQIAPGQTGNIDYNYKLPDDFTGCVIAWNSNKLDSKVSNGNYNYLYRLFRKSKLKPFERDI STEIYQAGNKPCNGVAGFNCYFPLQSYGFRPTYGVGHQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLP FQQFGRDIAADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAE HVNNSYECDIPIGAGICASYQTQNSHA
--------	--

- [0094] 본 발명에서 상기 서열번호 4 및 5는 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2)의 다양한 변이주에 대하여 범용적으로 적용할 수 있는 범용 항원 서열을 설계하기 위하여, SARS-CoV-2의 주요 항원으로 작용하는 스파이크 단백질(spike protein)의 S1 서브유닛을 대상으로, SARS-CoV-2의 현존하는 모든 유전형을 포함하는 약 2천여개의 분석 대상 서열로부터 베이지안 추론 기법을 기반으로 한 분자계통분석을 수행하여 공통보존서열을 도출한 것이다.
- [0095] 본 발명은 또 다른 일 양태로, 상기 서열번호 4 또는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드에 있어서, 이의 구조 안정성을 보다 향상시키기 위하여 하나 이상의 아미노산을 치환시킨 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0096] 본 발명에서 상기 아미노산의 치환은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 참조 서열로 하여, 상기 서열번호 4 또는 서열번호 5와 함께 서열 정렬을 수행하였을 때, 참조 서열인 서열번호 1의 아미노산 위치를 기준으로 하여, 27번 위치에 상응하는 아미노산의 E로의 치환; 50번 위치에 상응하는 아미노산의 M으로의 치환; 52번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환; 73번 위치에 상응하는 아미노산의 S로의 치환; 78번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환; 132번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환; 161번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환; 173번 위치에 상응하는 아미노산의 S 또는 K로의 치환; 213번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환; 256번 위치에 상응하는 아미노산의 Q 또는 N으로의 치환; 260번 위치에 상응하는 아미노산의 V로의 치환; 및 324번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환; 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환일 수 있다.
- [0098] 본 발명의 또 다른 구체적인 일 양태에서, 상기 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열의 상기 아미노산의 치환은 상기 서열번호 4의 아미노산 서열의 N 말단으로부터 52번 위치의 Q52T 치환(글루타민(Glutamine, Q)의 트레오닌(Threonine, T)으로의 치환); 158번 위치의 S158D 치환(세린(Serine, S)의 아스파르트산(Aspartic acid, D)으로의 치환); 170번 위치의 Q170S 치환(글루타민(Glutamine, Q)의 세린(Serine, S)으로의 치환); 253번 위치의 S253Q 치환(세린(Serine, S)의 글루타민(Glutamine, Q)으로의 치환); 및 321번 위치의 E321D 치환(글루탐산(Glutamic acid, E)의 아스파르트산(Aspartic acid, D)으로의 치환)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환일 수 있다. 보다 상세하게 상기 아미노산의 치환은 상기 제시된 군에서 선택되는 1, 2, 3 또는 4개의 치환일 수 있으며, 5개 모두의 치환이 이루어질 수 있다. 상기 아미노산의 치환이 이루어진 폴리펩타이드의 경우, 구조 안정성이 더욱 향상되는 이점이 있다.
- [0099] 본 발명에서 상기 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 치환에 있어서 구조 안정성이 가장 우수하게 향상되는 치환 위치는 차례로, 상기 서열번호 4의 아미노산 서열의 N 말단으로부터 253번 위치의 S253Q 치환일 수 있고, 상기 서열번호 4의 아미노산 서열의 N 말단으로부터 170번 위치의 Q170S 치환일 수 있고, 상기 서열번호 4의 아미노산 서열의 N 말단으로부터 52번 위치의 Q52T 치환, 158번 위치의 S158D 치환, 및 321번 위치의 E321D 치환일 수 있다.
- [0101] 본 발명의 또 다른 구체적인 일 양태에서, 상기 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열의 상기 아미노산의 치환은 상기 서열번호 5의 아미노산 서열의 N 말단으로부터 24번 위치의 S24E 치환(세린(Serine, S)의 글루탐산(Glutamic acid, E)으로의 치환); 47번 위치의 S47M 치환(세린(Serine, S)의 메티오닌(Methionine, M)으로의 치환); 70번 위치의 T70S 치환(트레오닌(Threonine, T)의 세린(Serine, S)으로의 치환); 75번 위치의 R75Y 치환(아르기닌(Arginine, R)의 티로신(Tyrosine, T)으로의 치환); 129번 위치의 E129Y 치환(글루탐산(Glutamic acid, E)의 티로신(Tyrosine, T)으로의 치환); 170번 위치의 Q170K 치환(글루타민(Glutamine, Q)의 리신(Lysine, K)으로의 치환); 210번 위치의 G210T 치환(글리신(Glycine, G)의 트레오닌(Threonine, T)으로의 치환); 253번 위치의 S253N 치환(세린(Serine, S)의 아스파라긴(Asparagine, N)으로의 치환); 및 257번 위치의 A257V 치환(알라닌(Alanine, A)의 발린(Valine, V)으로의 치환); 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 치환일 수 있다. 보다 상세하게 상기 아미노산의 치환은 상기 제시된 군에서 선택되는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 치환일 수 있으며, 9개 모두의 치환이 이루어질 수 있다. 상기 아미노산의 치환이 이루어진 폴리펩타이드의 경우, 구조 안정성이 더욱 향상되는 이점이 있다.
- [0103] 본 발명의 또 다른 일 양태로, 본 발명의 상기 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 암호화하는 SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

- [0104] 본 발명에서 상기 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오타이드의 중합체(polymer)로, 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA, 특히 mRNA 가닥일 수 있다.
- [0105] 본 발명의 구체적인 일 양태에서, 상기 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 암호화하는 SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리뉴클레오타이드는 특히 하기 [표 6]의 서열번호 6 내지 9로 표시되는 서열을 포함하는 mRNA일 수 있다.

표 6

[0106]

[서열번호 6] 서열번호 2 (Consensus_dsg; Css_dsg)에 대한 mRNA 서열(5' → 3')	
AUGUUCGUGUUCUUGUGUGUGUGCCUCUGGUCAGCUCUCAGUGCGUAAACCCUGACACACCGGACUCAGCUGCCUCCUGCCUACACCAACUCU UUCACCAGAGGCGUGUACUACCCUGACAGGUGUUCAGAAGCAGCGUGCUGCAGCAGCAGGAGUUCUUCUGCCAUUUUUCAGCAACGUG ACCUUGGUUCCACGCCAUAAAGCGGACCAACCGGCAGAACCGGUUUGAUAAACCCGUGCCUUCUUAACGACGGCGUUAUACUCCAGCACC GAGAAGAGCAUCAUACCCGGGAGUGGUAUCUUCGUAACAACGUGACAGCAAGACCCAGAGCCUGCUGAUCGUGAACAAUUGCCACCAACGUG GUGAUUAGGUGUGCGAGUUCAGUUCUGCAACGACCCUUUUCUGGGCGUGUACCCACAAGAACAAAGAGCUGGAUGGAAAGCGAGUUCAGA GUGUACAGCAGCGCAAACAUAUUGUACCUUUGAGUACGUGUCUCAGCCUUCUGAUGGACCCUGGAGGGCAAACAGGGCAAUUUAAAAACUG AGAGAGUUCGUGUUAAGAUAUCGACGGAUACUUAAGAUCUACAGCAAGCAGCAGCAGCAUACUUGGUGCGGAGUUCGCCCAGGGAUUC UCCGCUUCGGAAACCCUGGUGGACCCUUCGGAUACUUAUAAACCCGUGUACAGCAGCUGCUGGCCUUGCAAGAUUACCGAGACCCCU GGCGAUUCCUCCAGCGGUGGACCCGCGUGCCGUGCCUACUACGUGGGCUACCGCAGCCCGCACCUCUGCUGAAGUACAAUGAAAAC GGAACCAUCACUGAGCCGUGGACUUGCGCCUGGACCCUUCUGCCGAGACAAAGUGUACAGUAGAGCUACAGUGGAGAAGGGCAUCUAU CAGACCCUGAAUUUAGAGUGCAGCCAAAGAAAGCAGCUGGAGAUUCCCAACUACCAACCCUGGCCUUUUGGGCAGGUGUUCACAGCC ACAAGAUUCGCCUCUGUAUUGCCUGGAACAGAAAGAGAAUUCUUAACUGCGUGGCGAGUACUUCGUGUACAAUCAGCCUUCUUUUC ACAUUAAGUGCUACGGCGUGUUCUACGAAGCUGAACGACCGUGUGCUACAAACGUGUACGCCGACAGCUUCGUGAUCAGAGGAGAUAG GUGAGACAGUUCGCCCAGGCCAGACAGGCAAGAUCCGCGACUACAAUUAUAGCUGCCCGAUGAUUUCACAGGGUGCGUGAUCGCCUGGAAC UCAAUAACCCUAGCAUAGCAAGGUGGGCGAAUUAACAACUACCGCUACAGACUGUUCGGAAGAGUAACCUUUAACCUUUCAGAGAGACAU UCCACCGAGAUUACAGGCGCGAUUAAGCCUUGCAAUGGCGUGGAAGGAUUAACUGCUACUUCUUCUGCAGUUCUACGGCUUUCAGCCU ACAAUAGGAGUGGGUACAGCCUACCGUGUGGUGGUGGUGAGCUUAGCUGCUGCAUGCUCCUGCCACCGUCUGCGGCCUUAAGAAGUCU ACCAACCCUGGUGAAGAAAUUGCGUGAACUUAUUAUACGGGUGAGCCGACAGGCGUGCUGACCGAAUUAACAAGAAAUUCCUGCCC UUCAGCAGUUCGGCCGGGACAUUGCCGACACACAGACGCGUGCGGAUCCCCAGACUUGGAAAUUCCUGGACAUACCCCUUUCAGCUUC GGCGCGUGAGCGUGAUUACCCAGGCACCAACAUCUAUUAUAGGUUGCCGUGCUGUACAGGGCGUUAACUGCAGAGAAGUGCCUGUCGCC AUCCACGCGGACAGCUGACCCUACGUGGGCGGUUACAGCAGCGGAGCAACGUGUUCAGACUAGAGCCGGUGCCUGAUCGGCGCCGAG CAGCUGAACAAUAGCUACGAGUGGACAUUCCUACGGCGCCGGAUCUGCGCCUUAUACAGACCCAGACCAACAGCCAGCA	
[서열번호 7] 서열번호 3 (Chimeric_dsg; Chi_dsg)에 대한 mRNA 서열(5' → 3')	
AUGUUCGUGUUCUUGUGUGUGCCUCUGGUGAGCAGCCAGUGCGUAAUUCUGAUUACAAGAACUCAGGAGUACACUAAUCUUCUACCCAGA GGAGUGUACUACCCCGAUAAAGGUGUUUAGGUCAGGCGUGCUGCAGACUACAGGACCGUUCUGCCUUAUUCUUAAGUGACCCUGGUUC CAGCGAAUCCACGUGAGCGGACGACACCGCAGAAUUAUUCGAUUAUUCUGUGCCUUAACGACGCGGUGUACUUCGCCUCCACAGAG AAGUCAAAAUUAUUCGGGGUGGAUUCUGGCACACACUGGACAGUAAACCCAGUCCUGCUGAUCGUGAACAAGUACCAACGUGGUG AUUAAGGUGUGCUACUUCAGUUCGCAUUGAUUCCUGGAGUGUACUACCCACAAGAAACAUAAGUCCUGGAUGGAAAGCGAAUUCAGA GUGAUUCCUUGCAAAUACUGUACAUUCGAGUACGUGUCCAGCCAUUCCUUAUGGACCUUGAAGGCAAGCAGGGGAAUUUAAAAACCU CGGGAGUUUGUGUUUAGAUAUUGAUGGCUACUUAAGAUUUUUAUCCAAACACUCCCAUACACCCUGACCCAGGGACCUCCCGGGCUU UCCGCCUUGGAGCCUUGGUGGACCGUCCCAUUGGCAUUAACAUAUACAAGAUUCCAGACCCUGCUGGCUUCGACAGGUCCUUAUCGACCCU GGCGAUAGCAGCAUUGGUGGACCGUGCGGGCAGCCGCCUUAUACGUGGGAUACCGCAGCCCGGACCUUUCUGCUGAAGUACAAGAGAAC GGCACAUAUCAGACGCGUGGACUUGCGCCUGGACCCAGAGCGAGACUUAAGUGCAGUUCGAAUUAUACUGGAGAAGGGGAUUUAU CAGACAUCUAAUUCAGAGUCCAGCCUACCGAGAGUUAUGUGAGGUUCCCAACAUCACCAACCCUGGCCUUAUACGAGGUGUUUACGCC ACCACCUUCGCCUACUGUUAUGCCUGGAACAGGAAGAGAAUACGAAUUGCGUGGCGAGUACUCCGUGCUGUACAAUUCGCCACCCUUCUUC GCCUUUAAUGUUAACGGCGUGAGCCCCACCAACUGAACGACUUGUGCUACAAAUGUGUACGCCGAUAGUUUUGAUUCCGGGGGAUAG GUGUCUCAAUUCGCCCGGCCAGACCGGAAACUUCGUGAUUAUUAACUACAAGCUGCCCGAUGAUUUUACCGGGUGCGUGAUCGCCUGGAU AGUAAUAAAGCUGGAUAGCAAGUGUGGCAACUUAACUACUUGUACCGGCGUUCAGGAAUCCAAGCUGAAGCCUUCGAGCGGACAU UCUACCGAAAUUUAACAGGCGGUAAACAAGCAUGUAACGGCGUGGUGGCUUUAUUGCUACUUCACUGCAGAGCUACGGGUUCGGGCC ACCUAUGGGGUGGGGCAUAGCCUACCGCGUGGUGUGCUGUCCUUCGAGCUGCUGCAGCGCCAGCUACCGUGUGCGGGCCAAAGAGUCA ACUAAUUGGUAAGAACAAGUGUGUACAUCUACUUAUAGGCGUACUGGGCAGGCGUGCUCACCGAGAGCAACAAGAAAUUCCUGCCU UUUCAGCAGUUCGGCAGGGAUCGCCGACACCAGAUUGCCGUGGGACCCACAGACCCUGGAAAUCCUGGAUUAUACUACUAGCAGCUUC GGCGCGUGUGCCGUGAUUACACCGGAACCAACACAGCAACAGGUGGCGUGCUGUACAGGGCGUGAACUGCAGCGAGGUGCCUGUGGCA AUACACGCCGACAGCUGACUCCCAUGGCGAGUGUAUUAACCGGCUCCAUGUGUUUCAGACUAGAGCCGGUGCCUGAUCGGAGCUGAG CAGGUAUAACUUAUAGAGUGGGAUUAUCCCAUGGAGCGGCAUCUGCGCAUCCUUAUACAGACAGACAAACAGCCAGCC	
[서열번호 8] 서열번호 4 (Consensus; Css)에 대한 mRNA 서열(5' → 3')	

AUGUUCGUGUUCUUGUGCUGGCCUCUGGUCAGCUCUCAGUGCGUAAACCUGACAACCCGGACUCAGCUGCCUCCUGCCUACACCAACUCU UUCACCAGAGGCGUGUACUACCCUGACAAGGUGUUCAGAAGCAGCGUGCUGCACAGCACAGGAUCUGUCCUGCCAUUUUACGCAACGUG ACUUGGUUCCAGGCCAUAAAGCGGCACCAACGGCAGCAGGCGUUGAUAAACCCGUGUCCUUAACGACGGCGUAAUACUUGCCAGCACC GAGAAGAGCAACAUAUCCGGGAUGGAUUCUUGUAACAACGUGGACAGCAAGACCCAGAGCCUGCUGAUCUGUGAACAAGCCACCAACGUG GUGAUUAAAGGUGUGGAGUUCAGUUCUGCAACGACCCUUCUUGGGCGUGUACCACAAGAACAACAAGAGCUGGAUGGAAAGCGAGUUCAGA GUGUACAGCAGCGCAACAUAUUGUACUUGAGUACUGUGUCUACUUCUUGAGUAGGACCGGAGGCAAAACAGGGCAAUUUUACAAAACCG AGAGAGUUCGUGUUAAGAACAUCGACGGAUACUUAAGAUAACAGCAAGCACACCCGAUCAAUCUGUGCGCGGUGUCCGCCAGGGAUUU UCCGCUCUGGAACCCUGGUGGACCUCCUAUCGGCAUCAAUAUAAACCCGGUUCAGACGUGCUGGCCUGCACAGAAGUACCUAGACCCCU GGCGAUUCCUCCAGCGGUGGACCGCGGUGCCGUGCCUACUACGUGGGCUACUUGCAGCCCGCACCUCUUGCUGAAGUACAAUGAAAAC GGAAACUACUGAUGCCGUGGACUGCGCCUGGACCCUCUGUCCGAGACAAAGUGUACACUAGAGCUCACAGUGGAGAAGGGCAUCUAU CAGACCUCGAAUUUAGAGUGCAGCCAACAGAAAGCAUCGUGAGAUUCCCAACAUCACCAACCUGUGCCUUUUGGCGAGGUCUUAACGCC ACAAGAUUCGCCUCUGUAUUGCCUGGAACAGAAAGAGAUCUUAACUGCGUGGACGACUACUUGGUUCUGUACAAUCAGCCUUCUUUUC ACAUUCAAAGUGCUACGGCGUGUCUCCUACGAAGCUGAACGACCUUGUUCUACAAACGUGUACGCCGACAGCUUCGUGAUCAGAGGAGUAG GUGAGACAGUUCGCGCCAGCGCAGACAGGCAAGAUCCGCGACUACAAUUAUAAAGCUGCCGAGUAAUUCACAGGGUGGUGUCCGCGGGAAC UCAAAUAAACUCGAUAGCAAGGUGGGCGAAUUAACAUCACCGCUACAGACUGUUCGGAAGAGUAACCUUAAACCUUUCGAGAGAGACU UCCACCGAGAUUACAGGCGGGAUCUAAAGCCUUGCAUUGGCGUGGAAGGAUUAACUGCUACUUCUCCUGCAGUCUUAACGGCUUACGCCU ACAAUUGAGUGGGUACAGGCCUACCGUGUGGUGUCCUGAGCUUUGAGCUGCUGAUGUCCUGCCACCGUCUGCGGCCUUAAGAGUCU ACCAACCUGGUGAAGAACAAGUGCGUGAACUUAUUAACGGGCGUACCGGCACAGGCGUGCUGACCGAAUUAACAAGAAUUCUGGCC UUCGAGCUGUCCGCCGGGACAUUGCCGACACCACAGACGCGGUGCGGUAUCCCGAGACUUGGAAUUCUGGACAUACCCCUUGCAGCU GGCGGCGAGCGUGAUUACCCAGGCACCAACACAUUAUACAGGUGCGGUGCUGUACAGGGCGUUAACUGCACAGAAAGUGCCUGCGCC AUCACGCGCGACCGUGACCCUACGUGGCGGUGUUAACAGCAGCGGACAGGUGUUCAGACUAGAGCCGGUGCCUGAUGCGGCGCGGAG CACGUAACAUAAGCUACGAGUGGACAUUCCUACGCGCGCGGCAUCUGCGCCUUAACAGACCCAGACCAACAGCCAGCA
[서열번호 9] 서열번호 5 (Chimeric; Chi)에 대한 mRNA 서열(5' → 3')
AUGUUUGUGUUCUGUUCUCCUCCCCUGGUCAGUAGCCAGUGCGUAAAUUCUGAUCACUCGCACACAUAUACAGAAUUCUUCACACGC GGGUGCUAUUAUCCUGAUAAAGUUUUAGAAGUUCUGUACUCCACUCUACACAAGACCUGUCCUGCGGUUUUUCUCCAAAGUAAACUGGUU CACGGAUUAUGUCUCCGGAACGACGGGACAAAACGGUUUGAUAAUCCUGUUCUCCUUUUAAUGACGGGGUUUAUUCGCAAGCAGAG AAGUCAAACAUUAUAGGGGUGGAUUCUUGUACCAUUGGAUUAACAAACACAAAGCCUGCUUAUAGUGAACAAUGCGACCAUUGUGUA AUAAAAGUCUGGAUUAUCCAGUUCUGCAAUGAUCCUUCUUGAUGUCUUAUACACAGAAACAAGAGCUGGAGUGGAGUCCGAUUAUCCGG GUGUAUAGCAGCGUAACAUAUUGUACGUUUGAGUACGUCUCUACCUUUCUUGAUGGACCUUGGAGGUAACAGGGGAACUCAAACAAACCU CGGAAUUCGUUUUAAGAUAUUGACGGCUACUUAUUAUACAGUAAACAUACUCCAUUAACCUUGGACGCGACCUCCACAAGGCUUC AGCGCGUUGAACCAUCUGUAGACCUCCUUAUCGGAUUAUUAUACCCGCUUCCAAACUUCUCCUGCCUCCACCGGUAUUAUCUGACUCC GGUUAUUCUAGCUCUGGUUGGACAGCAGGGGACCGCAUACUAGUGCGGUUAUCUUAACCUUGCAGCUUUCUGCUUAAGUACAACGAAAU GGCACUUAUACCGACGCGUGAUAUUGCGUCUUGACCCGUGAGUGAGAGCAAGUGCACCCUACAGAGCUUAACCGUGGAGAGGGGAUCUAC CAGACGUAUUAUUAAGUACCAACCGACGGAGUCUACGUCGGUUCUUAACAUUAUACUACCUUGUGUACUUAUGAAGUUAUUAUGCA ACGACCUUCGACUUGUGUUGGAAUCGCAAGAGGAUUAUUAUUGCGUUGCUGAUUACUCCGUUUCUUAACUUCGCCCGUUCUUC GCUUUUAGUGCUACGGGUGUUAUUAACUAAACUGAACGACCUUUGCUUACUUAUUGUUAACGAGAUUAUUGUUAUUCGGGCAUUGAA GUCAGCCAGUUCGCCCCUGGCAACCGGGGAUUAAGCUGACUACAAUUAACAGCUGCCGACGACUUAACGGGUGUGUAUUGCGUGGAAC AGUAAUAAACUCGCAAAAGGUUAGUGUAACUUAUUAUUCUUAUAGCGGUGUUAAGAAAGAGUAAAUUAAGCCUUAUUAAGAGGAUUAU UCAACAGAGAUUAUUAAGCGGGAUUAAGCCAUUGCAACGGCGUGGCGGCUUUAACUGUUAUUCUUCUGCAUUAUACGGCUUAUAGACCA ACAUAUGGAGUCGGGAUCAACCCUUAUCGGGUUGUGUUUGUUCUUAUGAGCUGUCCACGACCCGCCACUGAUGCGGCCCCAAAAAAGU ACCAAUUUGGUGAAAAUUAUUGUGAAUUAUUAUUAUACGGGUUGACAGGAACUGGGUACUCACUGAAUUAUAAAAAUUCCUCCCA UUUACAACAUUCCGGGAGAGAUUAAGCAGAUACACAGAUCCGUGCGGACCCCGACAGUUGGAAAUCCUUGAUUAACGCCAUGUCCUUC GGCGGGGAAGCGUUAUAAACCCCGGACGAACACAGUUAUUAAGUUGCGGUCCUUAUACAGGGUGUUAACUGUACGGAAGUUCUGUGGCC AUCCACGUGACCAACUGACGCCAACUUGGAGAGUAUACAGCACUGGCUCAAUGUCUUAUACAGACGCGCGGGUGUCUUAUUGUGUGCUGAG CAUGUCAAUACAGUUAACGAGUGGGAUUAUCCGAUAGGAGUGGCAUUAUGUGCCUUAUACCAACCCAGACGAUUAUUCUUAUGCC

- [0108] 본 발명에서 상기 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 감염증은 SARS-CoV-2 자체의 감염뿐만 아니라, 상기 바이러스의 감염으로부터 발생하는 여러가지 병증(예를 들어, 호흡기 질환, 폐렴 등)을 넓게 포함하는 개념으로 이해될 수 있다.
- [0109] 본 발명에서 상기 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2)는 와일드 타입(Wild type)의 SARS-CoV-2 S형(우한주)뿐만 아니라 SARS-CoV-2의 변이주(variant)를 모두 포함할 수 있다.
- [0110] 상기 SARS-CoV-2는 RNA 바이러스로, 계통 복제 과정에서 높은 변이 빈도로 진화하는 것으로 알려져 있으며, 일반적으로 공통조상에서 파생하여 유전적으로 밀접하게 관련된 바이러스 변이 그룹인 계통을 형성하게 된다. SARS-CoV-2는 팬데믹이 시작된 이후 지속적인 변이를 통해 계통을 형성하고 있으며, 이 중에서 변이비율과 연관된 지역범위, 돌연변이 집단이 의학적 대책에 미치는 효과, 질병의 심각성, 사람간 전파력에 미치는 잠재적 또는 알려진 영향 등을 고려하여 분류 및 관리되고 있다.
- [0111] 세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 공중보건에 미치는 위험도에 따라 SARS-CoV-2 변이 바이러스들을 주요 변이(Variant of Concern, VOC), 기타 변이(Variant of Interest, VOI), 모니터링 변이(Variant Under Monitoring, VUM)로 분류하고 있으며, 각 변이 바이러스들의 발생 현황 및 공중보건에 미치는 영향 등을

평가하여 주기적으로 업데이트하고 있다. 상기 주요 변이(VOC)는 전파력, 병원성, 백신 유효성 등에 부정적 변화가 확인되어 공중보건학적인 조치가 필요한 변이이고, 기타 변이(VOI)는 표준주와 다른 아미노산 변이를 보유하고 지역사회 전파 또는 다수 국가 검출이 확인되고 있으나, 임상역학적 위험도가 확인되지 않은 변이를 의미한다. 그 외 아미노산 변이는 확인되나, 특성 변화와 관련한 증거 불충분한 변이는 모니터링 변이(VUM)로 분류되고 있다.

- [0112] 상기 SARS-CoV-2 변이 바이러스 분류에 있어서, SARS-CoV-2의 알파(Alpha) 변이주, 베타(Beta) 변이주, 감마(Gamma) 변이주, 델타(Delta) 변이주 및 오미크론(Omicron) 변이주가 상기 주요 변이(VOC)로 분류되고 있다.
- [0113] 본 발명에서 상기 SARS-CoV-2의 변이주는 그 구체적인 종류가 특별히 제한되지 않으며, 현존하는 변이주 및 미래에 발생 가능한 가상의 변이주를 모두 포함하는 개념으로 이해될 수 있다. 상기 SARS-CoV-2의 변이주의 비제한적인 예로, 알파(Alpha) 변이주, 베타(Beta) 변이주, 감마(Gamma) 변이주, 델타(Delta) 변이주 및 오미크론(Omicron) 변이주 등일 수 있다.
- [0115] 본 발명의 또 다른 일 양태로, 본 발명의 상기 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 감염증 예방용 백신 조성물을 제공한다.
- [0116] 본 발명의 또 다른 일 양태로, 본 발명의 상기 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 감염증의 예방용 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0117] 본 발명에서 SARS-CoV-2 감염증에 대한 백신 조성물 또는 약학적 조성물은 본 발명의 상기 SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 그대로 항원 단백질로 활용하여 백신 조성물 또는 약학적 조성물로 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 본 발명의 폴리펩타이드 이외의 다른 SARS-CoV-2 관련 항원 단백질 도메인을 함께 포함하도록 구성되어 백신 조성물 또는 약학적 조성물로 제조될 수 있다. 상기 본 발명의 폴리펩타이드와 함께 포함되도록 구성될 수 있는 SARS-CoV-2 관련 항원 단백질 도메인 등의 구체적인 종류는 특별히 제한되지 않으나, 특히 우수한 항원성 발휘를 위하여 상세하게는 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질(spike protein, S)을 구성하는 도메인일 수 있으며, 보다 상세하게는 S2 도메인일 수 있다. 더욱 상세하게는 본 발명의 폴리펩타이드는 S 단백질의 prefusion(융합 전) 상태 구조를 안정하게 하는 6P(K986P, V987P, F817P, A892P, A899P, A942P)를 포함하는 S2 도메인과 연결된 전장 S 단백질 형태로 구성되어 백신 조성물 또는 약학적 조성물의 유효성분으로 제조되어 활용될 수 있다. 구체적으로 S2 서브유닛은 야생형 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 614번 위치의 아스파르트산을 글라이신으로 치환한 서열(D614G)을 포함하고 있다. 선정된 범용 스파이크 단백질의 S2 서브유닛은 추가적으로 단백질 안정화를 위한 HexaPro (F817P, A892P, A899P, A942P, K986P, V987P) 서열 변이(Hsieh 등, Science 369: 1501-05 (2020)) 및 S1/2 cleavage site 변이(682RRAR685 to A)를 도입하여 이용하였다.
- [0118] 본 발명의 상기 폴리펩타이드와 함께 포함되도록 구성될 수 있는 SARS-CoV-2 관련 항원 단백질은 와일드 타입(Wild type)의 SARS-CoV-2 S형(우한주)의 항원 단백질뿐만 아니라 SARS-CoV-2의 변이주(variant), 예를 들어 알파(Alpha) 변이주, 베타(Beta) 변이주, 감마(Gamma) 변이주, 델타(Delta) 변이주, 오미크론(Omicron) 변이주 등의 항원 단백질을 모두 포함하는 개념으로 이해될 수 있다.
- [0120] 본 발명의 또 다른 일 양태로, 본 발명의 상기 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 암호화하는 SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 감염증 예방용 백신 조성물을 제공한다.
- [0121] 본 발명의 또 다른 일 양태로, 본 발명의 상기 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 감염증의 예방 또는 치료용 폴리펩타이드를 암호화하는 SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0122] 본 발명에서 SARS-CoV-2 감염증에 대한 백신 조성물 또는 약학적 조성물은 본 발명의 상기 SARS-CoV-2 감염증의 예방 또는 치료용 폴리뉴클레오타이드를 그대로 활용하여 백신 조성물 또는 약학적 조성물로 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 이외의 다른 SARS-CoV-2 관련 항원 단백질 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함께 포함하도록 구성되어 백신 조성물 또는 약학적 조성물로 제조될 수 있다. 상기 본 발명의 폴리뉴클레오타이드와 함께 포함되도록 구성될 수 있는 폴리뉴클레오타이드의 암호화 대상이 되는 SARS-CoV-2 관련 항원 단백질 도메인 등의 구체적인 종류는 특별히 제한되지 않으나, 특히 우수한 항원성 발휘를 위

하여 상세하게는 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질(spike protein, S)을 구성하는 도메인일 수 있으며, 보다 상세하게는 S2 도메인일 수 있다. 더욱 상세하게는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 활용한 백신 조성물 또는 약학적 조성물은 본 발명의 상기 폴리펩타이드 및 6P를 포함하는 S2 도메인이 연결된 전장 S 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 하여 제조될 수 있다.

[0123] 본 발명의 상기 폴리뉴클레오타이드와 함께 포함되도록 구성될 수 있는 폴리뉴클레오타이드의 암호화 대상이 되는 SARS-CoV-2 관련 항원 단백질은 와일드 타입(Wild type)의 SARS-CoV-2 S형(우한주)의 항원 단백질뿐만 아니라 SARS-CoV-2의 변이주(variant), 예를 들어 알파(Alpha) 변이주, 베타(Beta) 변이주, 감마(Gamma) 변이주, 델타(Delta) 변이주, 오미크론(Omicron) 변이주 등의 항원 단백질을 모두 포함하는 개념으로 이해될 수 있다.

[0125] 본 발명에서 상기 백신(vaccine)은 생체에 면역반응을 일으키는 항원을 함유하는 생물학적인 제제로서, 감염증의 예방을 위하여 대상체에 주사하거나 경구 투여 등으로 투여함으로써 생체에 면역이 생기게 하는 면역원을 말한다.

[0126] 본 발명의 상기 백신 조성물은 리포솜 또는 지질 나노입자(LNP, lipid nanoparticle)를 추가로 함유할 수 있으며, 상기 백신 조성물에 유효성분으로 포함되는 상기 폴리뉴클레오타이드, 특히 mRNA는 리포솜 또는 지질 나노입자의 외부에 흡착(adsorption) 또는 회합되거나, 내부에 캡슐화 또는 봉입(encapsulation)된 상태일 수 있다. 본 발명에서 상기 리포솜 또는 지질 나노입자는 양이온성 지질을 포함하며, 바람직하게는 중성 지질을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0127] 본 발명에서 상기 백신 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 때는 보통 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다.

[0128] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 사용할 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제가 포함된다. 비수용성 제제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0129] 본 발명에서 상기 백신 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투여가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥 내, 근육 내, 관절 내, 활액 낭내, 흉골 내, 경막 내, 병소 내 및 두개골 내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 백신 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0130] 본 발명에 따른 상기 백신 조성물의 투여량은 사용 목적, 대상 질병(그 종류 등), 환자 연령, 체중, 병력 등을 고려하여 다양한 범위로 당업자가 용이하게 결정할 수 있으며, 대상체(또는 환자)의 투여 빈도 또한, 사용 목적, 대상 질병(그 종류, 경중도 등), 환자 연령, 체중, 병력, 경과 등을 고려하여 당업자가 용이하게 결정할 수 있다.

[0131] 본 발명의 백신 조성물은 사용에 따라 면역증강제를 더 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 면역증강제(adjuvant)는 백신 또는 약학적으로 활성 있는 성분들에 첨가되어 면역 반응을 증가시키거나 및/또는 영향을 주는 물질 또는 조성물을 말하며, 면역증강제에 통합되거나 함께 투여된 항원의 면역원성(immunogenicity)을 증진시킬 수 있는 넓은 범위의 물질 또는 전략(stratagem)을 포함한다.

[0132] 본 발명의 백신 조성물과 함께 사용 가능한 면역증강제는 예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄(포타슘 알루미늄 셀레이트), MF59, 비로솜(virosome), AS04[알루미늄 하이드록사이드 및 모노포스포릴 리피드 A(MPL)의 혼합물], AS03(DL- α -tocopherol, squalene 및 유화제인 polysorbate 80의 혼합물), CpG, 플라젤린(flagellin), Poly I:C, AS01, AS02, ISCOMs 및 ISCOMATRIX 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니

다.

- [0133] 본 발명에서 상기 면역증강제 조성물은 백신의 투여와 동시에 또는 다른 시기에 이루어질 수 있으며, 면역증강제 조성물의 투여 빈도는 예를 들어, 매일 내지 수개월마다 투여되거나 또는 매 전염병 유행기 전에 한 번 내지 두 번 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 면역원성이 유지되는 경과를 살펴면서 당업자가 추가 면역 간격을 용이하게 결정할 수 있다.
- [0134] 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 봉해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0135] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틸크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [0136] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0137] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 상기 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0138] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0139] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [0140] 본 발명에서 달리 정의되지 않은 용어들은 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것으로 해석된다. 또한, 본 발명에 기재된 "또는"이라는 표현은 별도의 언급이 없는 경우, "및"을 포함하는 개념으로 해석될 수 있다.
- [0141] 본 발명에서 개시되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한되지 않으며, 본 발명에서 개시되는 각각의 설명 및 실시 형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시되는 다양한 요소들의 모든 가능한 조합이 본 발명의 범주에 속하는 것으로 해석된다. 또한, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험을 통하여 본 발명의 특정 실시예에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있으며, 이러한 등가물은 본 발명의 범주에 속하는 것으로 해석된다.

발명의 효과

- [0142] 본 발명은 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2) 범용 항원 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드 및 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이며, 상기 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 감염증 예방용 백신 조성물 및 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0143] 본 발명은 다양한 SARS-CoV-2 변이주에 대하여 범용적으로 적용할 수 있도록 SARS-CoV-2의 주요 항원으로 작용하는 스파이크 단백질(spike protein)의 S1 서브유닛을 대상으로 SARS-CoV-2의 현존하는 모든 유전형을 포함하

는 약 2천여개의 서열을 분석하여 공통보존서열을 도출하고 이로부터 SARS-CoV-2 범용 항원 아미노산 서열에 관한 발명을 완성한 것으로, 와일드 타입의 SARS-CoV-2 및 현존하는 SARS-CoV-2 변이주뿐만 아니라 가상의 SARS-CoV-2 변이주에까지 대응할 수 있는 범용 항원 폴리펩타이드를 제공하는 이점이 있다.

[0144] 또한 본 발명은 상기 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드의 구조 안정화를 위하여, 상기 범용 항원 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 특정 위치의 아미노산을 치환함으로써 범용 항원 폴리펩타이드의 구조 안정성을 더욱 향상시킨 SARS-CoV-2 범용 항원 최적화 아미노산 서열 및 그에 따른 범용 항원 폴리펩타이드를 제공하는 이점이 있다.

[0145] 또한 본 발명은 상기 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공하며, 상기 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 활용한 백신 및 약학적 조성물을 제공함으로써, 와일드 타입의 SARS-CoV-2 및 현존하는 SARS-CoV-2 변이주뿐만 아니라 가상의 SARS-CoV-2 변이주에까지 대응할 수 있는 SARS-CoV-2 감염증 예방용 백신 및 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0146] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 서열번호 2의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 설계함에 있어서, 서열번호 1을 참조 서열(reference sequence)로 하여 도출한 아미노산 치환 위치 12개를 표시한 도면이다. S1 서브유닛의 2개 도메인(NTD, RBD)을 중심으로 위에 표시된 올리브색 및 빨간색의 5개 위치와 치환 전후 아미노산은 서열번호 2에서 치환이 이루어진 것을 표시한 것이고, 아래에 표시된 하늘색 및 빨간색의 9개 위치와 치환 전후 아미노산은 서열번호 3에서 치환이 이루어진 것을 표시한 것이다. 서열번호 2와 서열번호 3에서 공통으로 아미노산 치환이 일어난 위치를 빨간 색으로 표시하였다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에서 서열번호 1을 참조 서열로 하여 서열번호 2 및 서열번호 3과 함께 서열 정렬을 수행한 결과 및 아미노산 치환 위치를 나타낸 것이다. 도2a에서 박스로 표시된 부분은 각 아미노산 치환 위치를 표시한 것이며, 박스 표시 중, 빨간색 박스(서열번호 1의 넘버링을 기준으로, 173번 및 256번에 상응하는 위치)는 서열번호 2 및 서열번호 3에서 공통적으로 치환이 이루어진 아미노산의 위치를 표시한 것이다. 도 2b는 상기 도2a에 표시된 아미노산 치환 위치에 대하여 간략히 정리한 표이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에서 본 발명의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드(서열번호 4)의 범용성을 확인한 웨스턴 블랏(Western Blot) 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에서 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신의 면역원성 확인을 위한 백신 접종 동물실험에 대한 모식도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에서 본 발명의 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신(서열번호 12)의 중화항체가 확인 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에서 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신(서열번호 12)의 IFN-감마(gamma) 유도능 확인 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에서 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신(서열번호 12)의 감염방어능 평가(체중 변화 및 생존율) 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에서 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신(서열번호 12)의 감염방어능 평가(바이러스 역가) 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에서 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신(서열번호 12)의 면역원성 평가(중화항체가) 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에서 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신(서열번호 13)의 면역원성 평가(중화항체가) 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에서 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신(서열번호 13)의 IFN-감마(gamma) 유도능 확인 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0147] 이하, 구체적인 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 설명하기

위한 예시에 불과하며, 이들 실시예에 의해 본 발명의 범위가 어떠한 의미로도 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.

[0149] [제조예 1 및 2] SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드 서열 설계

[0150] 사스-코로나바이러스-2 (SARS-CoV-2)의 다양한 변이주에 대하여 범용적으로 적용할 수 있는 범용 항원 서열을 설계하기 위하여, SARS-CoV-2의 주요 항원으로 작용하는 스파이크 단백질(spike protein)의 S1 서브유닛을 대상으로, SARS-CoV-2의 모든 유전형을 포함하는 약 2천여개의 분석대상 서열로부터 베이지안 추론 기법을 기반으로 한 분자계통분석을 수행하여 공통보존서열을 도출하였으며, 이로부터 SARS-CoV-2, SARS-CoV-2 변이주 및 가상의 SARS-CoV-2 변이주에까지 대응할 수 있는 범용 항원 서열을 설계하였다.

[0151] 구체적으로, SARS-CoV-2 유전자 정보 공유 데이터베이스인 GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data)에 등록된 유전자 정보를 기반으로 800 여개의 바이러스 유전자 서열을 추출하여 분자계통학적 분석을 통해 유행하고 있는 SARS-CoV-2 변이주 스파이크(spike) 단백질을 도출하였으며, 세계보건기구(World Health Organization, WHO) 지정 주요 변이주(Variants of Concern, VOC)와 동일한 서열임을 확인하였다. 도출된 유행 SARS-CoV-2 변이주에서 항원성을 나타낼 수 있는 변이를 선별하여 스파이크 단백질의 N-말단 도메인(N-terminal domain, NTD), 수용체 결합부위(Receptor binding domain, RBD) 및 S2 서브유닛으로 구획을 나눠, 각 유행 SARS-CoV-2 변이주의 서열을 도입하여 각 변이주에도 백신 효능을 발휘할 수 있도록 범용 항원을 설계하였다.

[0153] [제조예 1] SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드 서열 설계 1

[0154] 상기 과정을 거쳐, SARS-CoV-2의 모든 유전형의 S1 서브유닛을 대상으로 도출한 하기 서열번호 4의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 설계하였다. 하기 서열번호 4의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드는 특히 N-말단 도메인 부분은 알파 변이체 B.1.1.7 서열의 변이 (Δ HV69-70 및 Δ Y144), 수용체 결합 도메인 부분은 델타 변이체 B.1.617.2 서열의 변이 (L452R, T478K) 및 안정화 변이 (R682A, Δ RAR683-685)를 활용하여 설계하였다.

표 7

[0155] [서열번호 4] SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드(Consensus; Css)

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAI SGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFAST EKSNI IRGWIFGTTLDSTQSLI VNNATNVV IKVCEFFQFNDPFLGVYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFMDLEGKQGNFKNL REFVFNIDGYFKIYSKHTPI NLRDLPGFSALEPLVDLP IGINITRFQTLALHRSYLT PGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNEN GTITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGVEVFNATRFASVYAWNRKRI SNCVADYSVLYNSASF TFKCYGVSPTKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGYNYRYRLFRKSNLKPFRDI STEIYQAGSKPCNGVEGFNCFYFPLQSYGFPQTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFGLTGTVLTESNKKFLP FQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAE HVNNSECDIPIGAGICASYQTQTNSPA

[0157] [제조예 2] SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드 서열 설계 2

[0158] 상기 과정을 거쳐, SARS-CoV-2의 모든 유전형의 S1 서브유닛을 대상으로 도출한 하기 서열번호 5의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 설계하였다. 하기 서열번호 5의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드는 특히 N-말단 도메인 부분은 오미크론 변이체 서열의 변이(T19I, Δ 24-26, Δ HV69-70, G142D), 수용체 결합 도메인과 C- 말단 도메인 부분은 오미크론 변이체 BQ.1.1와 BN.1 서열의 변이 (G339H, R346T, S371F, S373P, S375F, T376A, D405N, R408S, K417N, N440K, G446S, N460K, S477N, T478K, E484A, Q498R, N501Y, Y505H, D614G, P681H) 및 안정화 변이 (R682A, Δ RAR683-685)을 활용하여 설계하였다.

표 8

[0159]

[서열번호 5] SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드(Chimeric; Chi)
MFVFLVLLPLVSSQCVNLITRTQSYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSNGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTE KSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNVVIVKVEFQFCNDPFLDVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSSQPFLMDLEGKQGNFKNL REFVFNIDGYFKIYKHTPINLGRDLPGGSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAAYVGYLQPRTFLLKYNN GTITDAVDCALDPLSEKCTKLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFHEVFNATTFASVYAWNRKRI SNVADYSVLYNFAPFF AFKCYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGNEVSQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNKLDSKVSNGYNYLYRLFRKSKLKPFERDI STEIYQAGNKPNCNGVAGFNCYFPLQSYGFRPTYGVGHQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLP FQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVVFQTRAGCLIGAE HVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSHA

[0161]

[제조예 3] SARS-CoV-2 범용 항원 서열 최적화 디자인 서열 설계 - 구조 안정성 향상을 위한 아미노산 치환 위치 도출

[0162]

상기 제조예 1 또는 2에서 도출한 서열번호 4 및 서열번호 5의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드 서열을 기반으로 딥러닝(Deep Learning) 기법을 이용하여 항원 단백질에 대한 구조 모델링을 수행하였으며, 구조 안정화 향상을 위해 인실리코(in-silico) 방법으로 SARS-CoV-2 범용 항원 최적화 디자인 서열을 설계하였다.

[0163]

구체적으로, 인실리코(in-silico) 분석 기반 딥러닝 기법을 사용한 알파폴드2 (AlphaFold2)를 이용하여 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 도메인의 3차 구조를 모델링하고, 예측한 3차 구조 및 서열을 바탕으로 단백질의 서열 변화 정보 및 원자 기반 로제타 구조 에너지 변화를 계산하는 pSUFER 및 FuncLib 서버를 이용한 인실리코 분석 결과를 반영하여 단백질 접힘 구조의 안정성을 높이는 변이가 도입된 1천 개의 단백질 변이 후보들을 도출하였다. 이들 중 상위 5위까지 아미노산 변이체 5개, 1천 개 전체의 공통 아미노산 변이체 1개 및 상위 5개의 공통 아미노산 변이체 1개의 총 7개 아미노산 변이체를 1차 후보군으로 선정하였다. 이들 1차 후보군의 단백질 발현 및 RNA 안정성과 연관된 용해도(solubility), 공동(cavity), RNA 2차 구조 등의 생리화학적 특성을 Aggrescan 3D(A3D), CASTp-3.0 및 RNAfold 서버 등을 이용한 인실리코 방법으로 추가 예측하였고, 이들 예측 결과를 종합하여 서열번호 4의 범용 항원 및 서열번호 5의 범용 항원 각각에 대하여 하나씩의 변이체를 최종 선정하였다. 최종 선정한 변이체에 도입된 돌연변이 위치로, 서열번호 4의 범용 항원에서 5개, 서열번호 5의 범용 항원에서 9개가 도출되었으며, 그 중 2개 위치가 서열번호 4 및 서열번호 5에서 공통으로 발견되었다.

[0164]

구체적으로 상기 서열번호 4의 범용 항원 폴리펩타이드에서 선정된 최종 아미노산 치환 위치 5개는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 52번 위치의 Q52T 치환(글루타민(Glutamine, Q)의 트레오닌(Threonine, T)으로의 치환); 158번 위치의 S158D 치환(세린(Serine, S)의 아스파르트산(Aspartic acid, D)으로의 치환); 170번 위치의 Q170S 치환(글루타민(Glutamine, Q)의 세린(Serine, S)으로의 치환); 253번 위치의 S253Q 치환(세린(Serine, S)의 글루타민(Glutamine, Q)으로의 치환); 및 321번 위치의 E321D 치환(글루탐산(Glutamic acid, E)의 아스파르트산(Aspartic acid, D)으로의 치환)으로 도출되었다(도 1).

[0165]

상기 서열번호 4에서 상기 5개의 아미노산 치환이 모두 이루어진 구조 안정성 최적화 서열은 하기 서열번호 2와 같다.

표 9

[0166]

[서열번호 2] SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드(Consensus_dsg; Cds_dsg)
MFVFLVLLPLVSSQCVNLITRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTTDLFLPFFSNVTWFHAIHVSNGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFAST EKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNVVIVKVEFQFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYDSANNCTFEYVSSQPFLMDLEGKQGNFKNL REFVFNIDGYFKIYKHTPINLVRDLPGGSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAAYVGYLQPRTFLLKYNN GTITDAVDCALDPLSEKCTKLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTDSIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRI SNVADYSVLYNSASF TFKCYGVSPKTLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGYNYRYRLFRKSNLKPFERDI STEIYQAGSKPNCNGVEGFNCYFPLQSYGFPQTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLP FQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVVFQTRAGCLIGAE HVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPA

[0168]

또한 상기 서열번호 5의 범용 항원 폴리펩타이드에서 선정된 최종 아미노산 치환 위치 9개는 아미노산 서열 N

말단으로부터 24번 위치의 S24E 치환(세린(Serine, S)의 글루탐산(Glutamic acid, E)으로의 치환); 47번 위치의 S47M 치환(세린(Serine, S)의 메티오닌(Methionine, M)으로의 치환); 70번 위치의 T70S 치환(트레오닌(Threonine, T)의 세린(Serine, S)으로의 치환); 75번 위치의 R75Y 치환(아르기닌(Arginine, R)의 티로신(Tyrosine, T)으로의 치환); 129번 위치의 E129Y 치환(글루탐산(Glutamic acid, E)의 티로신(Tyrosine, T)으로의 치환); 170번 위치의 Q170K 치환(글루타민(Glutamine, Q)의 리신(Lysine, K)으로의 치환); 210번 위치의 G210T 치환(글리신(Glycine, G)의 트레오닌(Threonine, T)으로의 치환); 253번 위치의 S253N 치환(세린(Serine, S)의 아스파라긴(Asparagine, N)으로의 치환; 및 257번 위치의 A257V 치환(알라닌(Alanine, A)의 발린(Valine, V)으로의 치환)으로 도출되었다.

[0169] 상기 서열번호 5에서 상기 9개의 아미노산 치환이 모두 이루어진 구조 안정성 최적화 서열은 하기 서열번호 3과 같다.

표 10

[0170]

[서열번호 3] SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드(Chimeric_dsg; Chi_dsg)
MFVFLVLLPLVSSQCVNLI TRTQEYTNSTFRGVYYPDKVFRSSVLHMTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSNGSNGTKYFDNPVLPFNDGVYFASTE KSNIIRGWIFGTLDSTKQSLLI VNNATNVV IKVCYFQFCNDPFLDVYYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSKPFLMDLEGKQGNFKNL REFVFKNIDGYFKIYKSHTPINL TRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTTPGDSSNGWTVGAAAYVGYLQPRFTLLKYNN GTITDAVDCALDPLSETKCTLKSTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFHEVFNATTFASVYAWNRKRISNCVADYSVLNYPAPFF AFKCYGVSPTKLNLDLCFTNVYADSFVIRGNEVSQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNKLDSKVSNGNYLYRLFRKSKLKPFERDI STEIYQAGNKPCNGVAGFNCYFPLQSYGFRPTYGVGHQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLP FQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSIVTPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAE HVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTN SHA

[0172] 상기 도출된 아미노산 치환 위치에 대하여, 하기의 서열번호 1을 참조 서열(reference sequence)로 하여 서열번호 2 및 서열번호 3과 서열 정렬(sequence alignment)을 수행한 결과, 상기 아미노산 치환 위치는 서열번호 1의 아미노산 위치 넘버링을 기준으로 27번 위치에 상응하는 아미노산의 E로의 치환; 50번 위치에 상응하는 아미노산의 M으로의 치환; 52번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환; 73번 위치에 상응하는 아미노산의 S로의 치환; 78번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환; 132번 위치에 상응하는 아미노산의 Y로의 치환; 161번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환; 173번 위치에 상응하는 아미노산의 S 또는 K로의 치환; 213번 위치에 상응하는 아미노산의 T로의 치환; 256번 위치에 상응하는 아미노산의 Q 또는 N으로의 치환; 260번 위치에 상응하는 아미노산의 V로의 치환; 및 324번 위치에 상응하는 아미노산의 D로의 치환으로 확인되었다(도 2).

[0173] 도 2a는 서열번호 1을 참조 서열로 하여 서열번호 2 및 서열번호 3과 서열 정렬을 수행한 결과의 일부분을 나타낸 것으로, 박스로 표시된 부분이 각 아미노산 치환 위치이다. 박스 표시 중, 빨간색 박스(서열번호 1의 넘버링을 기준으로, 173번 및 256번에 상응하는 위치)는 서열번호 2 및 서열번호 3에서 공통적으로 치환이 이루어진 아미노산의 위치를 표시한 것이다. 도 2b는 상기 도2a에 표시된 아미노산 치환 위치에 대하여 정리한 표이다.

[0175] [제조예 4 및 5] SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 포함하는 전장 S 항원 단백질 서열의 도출

[0176] 상기 제조예 3에서 구조 안정성 향상을 위해 설계한 최적화 디자인 서열(서열번호 2 및 서열번호 3) 각각에 대하여, 이를 포함하는 전장 S 항원 단백질 서열을 도출하였다.

[0178] [제조예 4] 서열번호 2의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 포함하는 전장 S 항원 단백질 서열의 도출

[0179] 상기 제조예 3에서 설계한 서열번호 2의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 S1 도메인으로 하여, 이에 구조 안정성 변이 6P를 추가한 S2 도메인을 포함하는 전장 S 항원 단백질 서열을 도출하였다. 구체적으로 S2 서브유닛은 야생형 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 614번 위치의 아스파르트산을 글라이신으로 치환한 변이(D614G)를 포함하고 있다. 선정된 범용 스파이크 단백질의 S2 서브유닛은 추가적으로 단백질 구조 안정화를 위한 HexaPro(F817P, A892P, A899P, A942P, K986P, V987P) 변이(Hsieh 등, Science 369: 1501-05 (2020)) 및 S1/2 cleavage site 변이(682RRAR685 to A)를 도입하여 이용하였다.

[0180] 상기 과정을 거쳐 제조된, 서열번호 2의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 포함하는 전장 S 항원 단백질의

아미노산 서열은 하기 서열번호 10과 같다.

표 11

[0181]	[서열번호 10] 서열번호 2 (Consensus_dsg; Cds_dsg)의 폴리펩타이드를 포함하는 전장 S 항원 단백질 서열(N → C)
	MFVFLVLLPLVSSQCVNLITRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTTDLFLPFFSNVTWFHAIISGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFAST EKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIIVNNATNVVIVKCEFFQFCNDPFLGVYHKNKNSWMESEFRVYDSANNCTFEYVSSPFLMDLEGKQGNFKNL REFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPOGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSQGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNE GTITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTDSIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASF TFKCYGVSPKTLNLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYRYRLFRKSNLKPFRDI STEIYQAGSKPCNGVEGFNCFYPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLP FQQFGRDIADTTDAVRDPQTLIELDITPCSFGGVSIVTPGNTNSQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAE HVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPASVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTEC NLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSPIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGD IAARDLICAQKFNGLTVPPLLTDEMI AQYTSALLAGTITSGWTFGAGPALQIPFPMQAMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQD SLSTPSALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAIISSVLNDILSRDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKM SECVLGQSKRVDFCGKGYHLSMFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAI CHDGAHFPREGVFSNGTHWVFTQRNFYEPQIITDNTFV SGNCDVVGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWY IWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCSLKGCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

[0183] [제조예 5] 서열번호 3의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 포함하는 전장 S 항원 단백질 서열의 도출

[0184] 상기 제조예 3에서 설계한 서열번호 3의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 S1 도메인으로 하여, 이에 구조 안정성 변이 6P를 추가한 S2 도메인을 포함하는 전장 S 항원 단백질 서열을 도출하였다. 구체적으로 S2 서브유닛은 야생형 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 614번 위치의 아스파르트산을 글라이신으로 치환한 변이(D614G)을 포함하고 있다. 선정된 범용 스파이크 단백질의 S2 서브유닛은 추가적으로 단백질 구조 안정화를 위한 HexaPro (F817P, A892P, A899P, A942P, K986P, V987P) 변이(Hsieh 등, Science 369: 1501-05 (2020)) 및 S1/2 cleavage site 변이(682RRAR685 to A)를 도입하여 이용하였다.

[0185] 상기 과정을 거쳐 제조된, 서열번호 3의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 포함하는 전장 S 항원 단백질의 아미노산 서열은 하기 서열번호 11과 같다.

표 12

[0186]	[서열번호 11] 서열번호 3 (Chimeric_dsg; Chi_dsg)의 폴리펩타이드를 포함하는 전장 S 항원 단백질 서열(N → C)
	MFVFLVLLPLVSSQCVNLITRTQEYTNSTFTRGVYYPDKVFRSSVLHMTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSNGSNGTKYFDNPVLPFNDGVYFASTE KSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIIVNNATNVVIVKCYFQFCNDPFLDVYYHKNKNSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSKPFLMDLEGKQGNFKNL REFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPOGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSNGWTVGAAAYVGYLQPRTFLLKYNE GTITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFHEVFNATTFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNFAPFF AFKCYGVSPKTLNLCFTNVYADSFVIRGNEVSQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNKLDSKVSGNYNYLYRLFRKSKLKPFRDI STEIYQAGNKPNGVAGFNCFYPLQSYGFRPTYGVGHPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLP FQQFGRDIADTTDAVRDPQTLIELDITPCSFGGVSIVTPGNTNSQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAE HVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSHASVASQSI IAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTEC NLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSPIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGD IAARDLICAQKFNGLTVPPLLTDEMI AQYTSALLAGTITSGWTFGAGPALQIPFPMQAMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQD SLSTPSALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAIISSVLNDILSRDPPEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKM SECVLGQSKRVDFCGKGYHLSMFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAI CHDGAHFPREGVFSNGTHWVFTQRNFYEPQIITDNTFV SGNCDVVGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWY IWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCSLKGCSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT

[0188] [실시예 1] SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드의 범용성 확인

[0189] 상기 제조예 1에서 설계한 서열번호 4의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드의 SARS-CoV-2에 대한 범용성을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0190] 상기 제조예 1에서 설계한 서열번호 4의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 이용하여 HEK293T 세포주에 transfection 하여 범용 항원 서열을 가지는 단백질을 발현하였다. 그 다음, 국가병원체자원은행(NCCP)에서 분

양받은 SARS-CoV-2 S형(우한주, NCCP No. 43326), 알파(Alpha, NCCP No. 43381) 변이주, 베타(Beta, NCCP No. 43382) 변이주, 및 델타(Delta, NCCP No. 43390) 변이주를 햄스터 비강을 통해 감염시켰고 2주 후 채혈하여 각 변이주에 대한 항혈청을 확보하였다. 각 변이주 항혈청을 이용하여 Western blot 분석 실험을 수행한 결과, SARS-CoV-2 S형(우한주), 알파(Alpha) 변이주, 베타(Beta) 변이주, 및 델타(Delta) 변이주의 모든 항혈청은 범용 항원에 결합함을 확인하여 범용 항원의 범용성을 확인하였다(도 3).

[제조예 6] SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신의 제조

<제조예 6-1> SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신 제작

상기 제조예 3에서 설계한 서열번호 2의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 이용하여 상기 제조예 4에서 제조한 전장 S 항원 단백질 서열(서열번호 10)을 이용해 mRNA 백신 생산용 IVT 벡터에 클로닝하여 mRNA 백신을 제작하였다.

구체적으로, 서열번호 2의 SARS-CoV-2 범용 항원 서열을 코돈 최적화하여, 유전자(DNA)를 제작하였다. 상기 합성된 유전자를 overlapping cloning 방법으로 mRNA 백신 생산용 IVT 벡터에 삽입하였다. PCR 증폭으로 IVT 벡터 내 항원의 linearization 및 Poly(A) tailing을 진행하였다. 이후 linear한 DNA를 T7 RNA polymerase 관련 in vitro transcription kit를 사용하여, 하기 서열번호 12의 mRNA를 합성하였다. 만들어진 mRNA는 RNeasy Mini kit (74104, Qiagen)로 정제하여 유전자 크기 및 RNA 품질 확인 후 -20℃에 보관하였다.

표 13

[서열번호 12] 서열번호 10 (Consensus_dsg; Cds_dsg)에 대응하는 mRNA (5' → 3')
AUGUUCGUGUUUCUGGUCCUGCUGCCUCUGGUGUCUAGCCAGUGCGUGAACCCUGACCACCCGACCCAACUGCCUCCUGCCUACACCAUAGC UUUACAAGAGGCGUGUUAUACCCCGAUAAAGGUGUUCAGAGCAGCGUGCUGCAGCACAACCGACCUGUCCUGCCUUUCUACGCAACGUG ACCUUGGUUCCAGCCAUACAGCGAACUACCGGACCAAGAGAUUCGACAACCCCGUGCUGCCAUUCACGACGCGGUUUUUUCGCCUUCUACC GAGAAGAGCAACAUCAUCAGAGGCGUGAUUCUUGGCACCCUGGACAGCAAAACCCAGAGUCUGCUGAUCGUGAAUACGCCACCAACGUC GUCAUCAAGGUGUGGAGUUCAGUUCUGCAACGACCCUUCUUGGGCGUGUACCAACAAGAACAGUCCUGGAGUAGAAAGCGAAUUUAGA GUGUACGACUCUGCCAAACACUGCACCUCAGUACGUGUCCAGGCCUUUCUGAUGGACCUUGAAGGAAACAGGGCAACUUAAGAUCUG AGGGAUUUCGUGUAAAAACAUCGACGGCUACUUAAGAUCUACAGCAAGCACACCCUUAUACACCUUGUGCGGGACUUGCCGCAAGGCUUC AGCGCCUGGAACCUUGUGGACCUCCCAUCGGCAUUAACAUCACCCGGUUCAGACCCUGCUGGCCUCCACAGAUCCUACCGACCCCU GGCGAUGCUCUCAGGCGUGACCGCCGCGCGCUGCUUACUACGUGGGAUACCUAGCCUAGAACAUCUCCUGCUGAAGUACAACGAGAAC GGCACAUCACCGACCGCGUGGACUUGCGCCUGGACCCCGUGUCUGAGACAAAGUGCACACUAGAAAGCUUACCGUGGAAAAAGGCAUCUAC CAAACAGCAAUUCAGAGUGCAGCCUACAGAUUCCAUUGUGCGGUUCCAAUUAUCACAAACCUUGUGUCCUUUUGGCGAGGUGUUAACGCC ACCAGAUUCCGCUCCGUGUAGCCUGGAACAGAAAGAGAAUCAGCAACUGCGUGGCGGACUACAGCGUGCUGUACAACAGCGCCUCCUUAGC ACAUUAGUGUACAGCGGUGACCCUACAAAGCUGAACGACCGUGUCUACCAACAGUUAACGCGGACAGCUUUGUGAUCGCGGGCGACGAG GUGCGGCGAGUACGCCCGGCGAGACUGGCAAGAUUCGUGACUACAAUUAAGCUGCCAGAUAGACUACCGGAUGUGUGAUCGCGUGGAAC UCCAACAACCGGAUAGCAAGGUGGGCGGAAUUAACAUCAGAUACCGGCGUUCGGAAGUUAACCGAAGCCUUUGAAGAGAUUU AGCACUGAGAUUACAGGCGCGGAGCAAGCCUGUAAUGGAGUGGAAGGCUUACACUGCUACUUCUCCUGCAAGCUACGGGUUACGCCU ACAAUAGCGUGGGUACAGCGCCUACAGAGUGGUGUGUGAGCUUCGAGCUGCUGAUGUCCUGCUACAGUGUGCGCCCUAAGAGUCC ACAAUUCUGGUGAAGAAAUUGUGUAAUUAACCGGCGUACAGGACCGGCGUUCUGACAGAGAGCAACAAGAAUUCUGCCC UUCGAGCAGUUCGCGGAGAGACUACGAGUACAACCGAUGCCGUGAGAGAUCCCGAGACCCUGGAGAUCCUGGACAUACCCCGUGAGCUUC GGCGGCAAGUGUGUGUACCGGACCAUACCCUUAACCGGUGUGUGUACCGGAGGUGAAGCUACCGGAGGUGAAGCGGCGGCGGCU AUCCACGCGGAGUACGUGACCCCAUUGGCGGUGUACUACAGGAAGCAUUGUGUUCAGACCCGCGCGGUGUGUGAUCGCGCGCGGAG CAGGUAACAUAUACGAGUGCGACAUCCUACUGGAGCUGGCAUCUGCGCCUCCUACAGACCCAGACCAACAGCCCGCCUUGUAGCC UCUCAAAGCAUUAUGCCUACACAAGAGCCUGGGCGCGGAGAACUCCGUGUUAUAGUAUUAUAGCAUUGCAUCCUACCAACUACCC AUCAGCGUGACACAGAGAUUCGCGUGAGCAUAGCAAGACCUCCUGGAGUACUACCAUGUACAUUGUGGCGACUGAGUAGAUUGCAGC AACCGUGCUCUAAUACGGCAGCUUCUGCACACAGCUGAACCGGCGUUGACCGGCAUCGCGGUGGAACAGGACAAGAACACCCAAGAGGUG UUUGCCCAGGUGAAGCAGAUUUACAAGACCCUCCCAUACAGGACUUCGCGGUGUUAACUUAAGCCAGAUCCUGCCUGAUCCUUAACCC AGCAAGCGGAGGCGCCUACGAGGACCUUGUUAACAAGGUGACCCUGGUGACGCGCGGAUUAUACAGCAUAGGCGACUUGCGGCGAU AUCGCGCCAGAGAUCAUUCUGUGCCAGAGUUAACGGACUGACUGUACCAACCUUACUGACCGAUGAGAUAGCUGCUGACUACACA UCUGCCUGCUGGUGGACCAUACAGCGGUGGACAUUCGCGCGCGGCGCCCGCCUGCAAUCCCGUUAUUGCAGAUUGGCCUUAUGA UUAACGGAUUCGGGUGACCCAGAACGUGUUAUGAGAACAGAGCUGAUGCUAAUACAGUUAACAGCGCAUUGCGGCAAAUCCAAGAC UCUCUGAGCAGCACACCCUCCGUCUGGCAAGCUGAGGAGUUGUGAAGCAAAACGCGCAAGCCUUAACACCCUGUGAAACAGCUGAGC AGCAACUUGGUGGCAUACGACGCGUGCUUAACGACAUUCUGUUAAGGUGGACCCCGUAGGCGGAAGUGCAGAUUGACAGACUACACC GGAAGACUGCAGAGCCUGCAAACCUACGUGACCCACAGUUAUGAUCAGAGCGGUGAGAUCCGGGCGAGCGCAACCUUGCGCGCCACAAGAG UGCGAAGUGUGUGGCGGAGCAAAAAGAGUGGACUUCGCGGCAAGCUGAUCACCUUGAUGAGCUUUCUACAGAGCGCCCGCCACGCGGUG GUGUUCUGCAGGUGACAUACGUGCCUGCUACAGGAGAAGAUUACCAACCGCCCGGCAUUGCCACGACGCGCAAGGCUACAUUCCAAGA GAAGGCGUGUUCGACGAAUUGGACCCACUGGUUCGUGACCCAAAGAAACUUCUACGAGCCUAGAUCAUACAACCGACAACAUUCGUG AGCGGGAACUGCGACGUGGUAUUGGCAUUGUGAACAAUACCGUGUACGACCCUUGCAGCCAGAACUGGAUCCUUAAGGAAGAGCUGGAC AAGUACUUAAGAACCACACAAGCCUGACGUGGACCUUGGCGGACUUAAGCGGUAUACAGCCUACAGUGGUAACUACAGAAAGAGUUCGAC AGGUUAAACGAAGUGGCAAGAACCUGAAUGAGUCCUGAUCGAUCUGCAGGAGCUGGGAAGUACGAACAGUACAUAAGUGGCCUUGGUAC AUCUGGCGUGGGAUUAUUGCCGAUUGAUCGCAUUGGUGACCAUAGCUGUGCUGCAUGACGAGCUGCUGCUUCCUGCUAAGGGC UGCUGAUGCUGGCUCCUGUUGUAAUUCGACGAAGAUACAGCGAGCCGUGCUGAAGGGAGUGAAGCUGCAUUAACCC

[0198] 또한, 상기 제조예 3에서 설계한 서열번호 3의 SARS-CoV-2 범용 항원 폴리펩타이드를 이용하여 상기 제조예 5에서 제조한 전장 S 항원 단백질 서열(서열번호 11)을 이용해 상기와 동일한 방법을 수행하여, 하기와 같은 서열번호 13의 mRNA를 합성하였다.

표 14

[0199]	[서열번호 13] 서열번호 11 (Chimeric_dsg; Chi_dsg)에 대응하는 mRNA (5' → 3')
	AUGUUCGUGUCCUGGUGUGCUGGCCUCUGGUGAGCAGCCAGUGCGUGAAUCUGAUUACAAGAACUCAGGAGUACACUAAUCUUUACCCAGA GGAGUGUACUACCCCGAUAAAGGUGUUUAGGUCUAGCGUGCUGCACAUGACUCAGGACCUUUCUUCUUUUCUAAUGUGACCUUGGUUC CACGCAUCCACGUGAGCGGCAGCAACGGCAGCAAAUUAUUCGAUAAUCCUGUGCUGCCCUUACAACGACGGCGUGUACUUCGCCUCCACAGAG AAGUCAAACAUUAUUCGGGGGUGGAUUCUGGCACACACUGGACAGUAAAACCCAGUCCCUUGCUGAUCGUGAACAAUGUACCAACGUGGUG AUUAAGGUGUGCUACUUCAGUUCUGCAAUGAUCCAUUCCUGGAUGUGUACUACCACAAGAACAUAAGUCCUGGAUGGAAAGCGAAUUCAGA GUGUAAUCCUCUGCAAAUACUGUACAUUCGAGUACGUGUCCAAGCAUCCUUGGACCUUGAAGGCAAGCAGGGGAAUUUAAAAACCGUG CGGGAGUUUGUUUUAAGAAUACGAUGGCUACUUAAGAUUUUAUCCAAACACACUCCCAUACACCUUGACCCAGGAGGACCUGCCCGAGGCUUU UCCGCCUUGGAGCCCUUGGUGGACCUGCCAUUGGCAUUAACAUAUACAAGAUUCAGACCCUUGCUGGCUUGCAGACAGGUCCUUAUCGACACCU GGCGAUAGCAGCAUUGGUGGACCGUGCGGGCAGCCGCCUUAUACGUGGGAUACCUUGCAGCCCGGACCUUUCUGUGAAGUACAAUGAGAAC GGCACAUCACAGACGUGGACUUGCGCCUGGACCCACUGAGCGAGACUAGUGCACUUGAUAUACUACUGUGGAGAAGGGGAUUUAU CAGCAUUAACUUCAGAGUCCGCCUACCGAGAGUACUGUGGUUCCCAACAUACCAACCUUGGCCUUUUCACGAGGUGUUUAACGCC ACCACCUUCGCCUUCAGUGUAGCCUGGAACAGGAAGAGAUAUCAGCAAUUGCGUGGCAGACUACUCCGUGCUGUACAACUUCGCACCCUUCUUC GCCUUUAAGUGUACGGGUGAGCCCCACCAACUGAACGAUCUGUGCUUACAAAUGUGUACGCCGAUAGUUUUGUGAUCGGGGGAAUGAG GUGUCUAAAUCGCCCGGCCAGACCGGAAACAUUCGUGAUUAUAACUACAAGCUGCCGAUGAUUUUACCGGGUGCGUGAUCGCCUGGAU AGUAAUAGCUGGAUAGCAAAGUGUCUGGCAACUUAACUACUUGUACCGGCGUUCAGGAAAUCCAGCUGAAGCCUUCGAGCGCGACAUC UCUACCGAAUUUACCGGCGGUAACAAGCCAUUAACGGCGUGGCGUGCUUUAUUGCUACUUCACUUGCAGAGCUACGGGUUCGGGCC ACCUAUGGGGUGGGCAUCAGCCUACCGCGUGGUGGUGCUUUCGAGCUGCUGCAGCCCGAGCUACCGUGUGCGGGCCCAAGAGUCA ACUAAUCUGGUAAGAACAAGUGUGUACAACUACAACUUAUGGCCUGACUGGGACAGGCGUGCUCACCGAGAGCAACAAGAAAUUCUGCCU UUUCAGCAGUUCGGCAGGGAUACGCCGACACACAGAUCCGUUCGGGACCCACAGACCCUGGAAAUCCUGGAUUAUACUCCAUAGCAGCUUC GGCGCGUGUCCGUGAUUACACUGGAACCAACACAGCAACCCAGGUGGCGUGCUGUACAGGGCGUGAACUGCACCGAGGUGCCUGUGGCA AUACACGCCGACACGUGACUCCCAUUGGCGAGUGUAUUAACCGGCUCCAUGUGUUUACAGACUAGAGCGGCGGCCUGAUCGGAGCUGAG CAGGUGAAUACUCUUAUGAGUGCGAUUCCCCAUUCGAGCGCGCAUCUCGCGAUCCUACAGACAGACAAACAGCCAGCCAGCGUGGCC UCUCAAAGCAUUAUCCUACACAAGAGCCUGGGCGCGGAGAACUCCGUUGCUUAUAGUAAUUAAGCAUUGCAAUCCUACCAACUUCACC AUCAGCGUGACACAGAGAUUCUGCCUGUGAGCAUACCAAGACCUCCUGGACUGUACCAUGUACAUUCUGUGCGGACUCGAGUAAUGCAGC AACUGCUGUCUCAAUACGGCAGCUUCUGCACACAGCUGAACCGGGCUGACCGGCGUGAACAGGACAAGAACACCCAAAGAGGUG UUUGCCAGGUGAAGCAGAUUUAAGACCCUCCCAUACAGGACUUCGCGGCUUUAACUUAAGCCAGAUCCUGCCUGAUCCUUAUAAACCC AGCAAGCGGAGCCCAUCGAGGACCUUGCUUAACAAGGUGACCUUGGUGACGCCGGAUUAUCAAGCAGUUAUGGCGACUGUCUGGGCGAU AUCGCGCCAGAGACCUACUUGUGCCAGAGUUAACGGACUGACUGUGUACACCCUUAUCUGACCGAUGAGAUAGCUCAGUACACA UCUGCCUGUGGUGGUGGACCAUACACAGCGGUGGACAUUCGGCGCCGCCCGCCUUGCAAAUCCGUUUCUUAUGCAGAUAGGCCUUAUGA UUAACCGGAUUCGGGUGACCCAGAACGUCCUGUAUGAGAACCAAGCUGAUCGCUAAUACAGUUAACAGCGCAAUUCGGCAAAAUCCAAGAC UCUCUGAGCAGCACACCCUCCGUCUGGGCAAGCUGCAGGAUGUGGUGAACCAAAACGCCCAAGCCUUAACACCCUUGUGAAACAGCUGAGC AGCAACUUGUGGCCAUACGACGCGUGCUUAACGACAUUCUGUCUACGAGGACCCCGUGAGGCGGAAGUGCAGAUCCGACAGACUACAC GGAAGACUGCAGAGCCUGCAAAACUACGUGACCAACAGUUAUACAGAGCGCUGAGAUCCGGGCGAGCGCAACCUUGCGCGCCACAAGAUG AGCGAAUGUGUGCGGGCAGAGCAAAAGAGUGGACUUCUGCGCAAGGCUAUAACCUAGUAGGCUUUCUACAGAGCGCCCCACCGCGUG GUGUCCUGCAGGACAUACGUGCCUGCUCAGGAGAAGAUUACACCGCCCGCCUUCUGCCAGCAGCGCAAGGCUACUUCUCCAAAG GAAGGCGUGUUCGUCAGCAUUGGACCCACUGGUUCUGAGCCAAAGAAACUUAACGAGCCUAGAUCAUACAACCGACAACACAUUCGUG AGCGGGAACUGCGACGUGGUAUUCGGCAUUGUGAACAAUACCGUGUACGACCCUUGCAGCCAGAACUGGAUUCUUAAGGAAGAGCUGGAC AAGUACUUUAAGAACACACAAGCCUGACGUGGACCUUGGGGACAUAAAGCGUAUAACGCCUACAGUGGUAACAUCAGAAAGAGAUUCGAC AGGUAAACGAAGUGGCCAAGAACCUGAAUGAGUCCUGAUCGAGCAGGAGCUGGCAAGUACGAGACAGUACAUAAAGUGGCCUUGGUAC AUCUGGCGGGGAUUAUUGCCGAUUGAUCGCAUUGGUGACCAUAGCUGUGCUGACGAGCUGGCUAGACGAGCUGCUUUGCCUGAAGGGC UGCUGUAGCUGUGGCUCCUGUUGUAAAUUCGACGAAGAUACAGCGAGCCCGUGCUGAAGGGAGUGAAGCUGCAUUAACCC

[0201] <제조예 6-2> SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신의 LNP 봉입

[0202] LNP 봉입은 NanoAssemblr Benchtop Instrument (Precision Nanosystems Inc) 장비를 사용하였다. 각 이온화지 질은 에탄올, mRNA는 10 mM citrate 용액에 희석하여 준비하였다. SM-102 : DSPC : cholesterol : DMG-PEG2000 를 50 : 10 : 38.5 : 1.5로 섞은 혼합액을 mRNA와 부피 비율이 1 : 3이 되도록 혼합하여 봉입하였다. 만들어진 mRNA-LNP는 1X PBS로 희석하여 Amicon Ultra-15 filter로 원심분리하여 농축하였다. LNP의 품질 확인을 위해서 Nano-ZS zetasizer로 LNP 입자의 크기 분포를 측정하였고, Ribogreen assay (R11490, Invitrogen) 방법을 이용하여 RNA의 농도와 LNP 봉입율을 측정하였다.

[0204] [실시예 2] 서열번호 12의 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신의 면역원성 평가

[0205] <실시예 2-1> SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신의 접종

[0206] 마우스 모델을 이용하여 상기 제조예 6에서 제조한 서열번호 12의 SARS-CoV-2 범용 mRNA를 이용한 백신의 면역원성을 평가하였다. 구체적으로, Balb/c 마우스(4주, 암컷)에 5 ug 농도의 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신을 3주간 격으로 2회 근육접종(I.M)한 후, 마지막 접종 2주 뒤에 혈청 및 비장세포를 얻어 체액성 및 세포성 면역을 측정하였다(도 4). 대조군으로는 기존 모더나사의 Wild type SARS-CoV-2 S형(우한주) 백신 서열을 사용하여 동일한 방식으로 수행하였다.

[0208] <실시예 2-2> 체액성 면역(중화항체가) 확인

[0209] 상기 제조예 6에서 제조한 서열번호 12의 SARS-CoV-2 범용 mRNA를 이용한 백신이 체액성 면역 반응을 유도하는지 평가하기 위하여 중화항체가를 측정하였다. 구체적으로, 56℃에서 비동화(inactivation)시킨 면역 마우스의 혈청을 2% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-Streptomycin)이 함유된 DMEM 배지로 96-well plate에 2배씩 단계 희석하였다. 400 PFU/ml로 희석된 각각 다양한 바이러스 Wild type SARS-CoV-2 S형(우한주), 델타(Delta) 변이주(인도주), 오미크론 변이주(Omicron BA.5)를 희석된 혈청과 1:1로 접종하여 5% CO₂, 37℃에서 1시간 동안 배양하는 중화 단계를 수행하였다. 실험 하루 전 Vero-E6 세포를 1.8×10^5 cells/well로 분주(seeding)한 12-well plate에 중화된 혈청-바이러스 혼합액을 접종하여 5% CO₂, 37℃에서 1시간 배양하였다. 혈청-바이러스 혼합액을 제거한 후, overlay media (2% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin과 0.6% Agarose가 포함된 MEM 배지)를 넣고 2일 간 배양하였다. 이후, overlay media를 제거한 뒤 크리스탈 바이올렛(crystal violet) 염색약을 넣고 2시간 방치하였다. 그 다음, 염색약을 제거한 후 충분히 말려 플라그(plaque)를 계수하여 중화항체가를 계산하였다.

[0210] 상기 실험 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 본 발명의 SARS-CoV-2 초기주 범용 mRNA 백신의 경우(도 5에서 "Consensus_dsg S" 또는 "Css_dsg S"로 표기), Wild type SARS-CoV-2 S형(우한주)뿐만 아니라, 델타(Delta) 변이주(인도주) 및 오미크론 변이주(Omicron)에 대하여도 기존 Wild type SARS-CoV-2 S형(우한주) 백신(도 5에서 "Control S"로 표기)과 비교하여 더욱 높은 중화항체가를 나타내는 것으로 확인되었다(도 5).

[0212] <실시예 2-3> 세포성 면역(IFN-gamma 유도능) 확인

[0213] 상기 제조예 6에서 제조한 서열번호 12의 SARS-CoV-2 범용 mRNA를 이용한 백신이 세포성 면역 반응을 유도하는지 평가하기 위하여 면역된 마우스의 비장세포에서 바이러스 특이적인 IFN- γ 를 분비하는 T세포를 측정하는 ELISpot을 수행하였다. 구체적으로, 10% FBS와 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-Streptomycin)을 함유하는 RPMI 배지에 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신 면역된 마우스의 비장을 분리한 뒤 gentleMACS 장비를 이용하여 비장을 단일 세포로 분쇄하였다. 70 μ m 트레이너(strainer)로 비장세포를 여과시켜 원심분리(2,000 rpm, 5분, 4℃)를 수행하였다. 상층액을 제거하고 남은 펠렛(pellet)에 ACK 용해 버퍼(Lysing buffer) 5 ml를 넣고 볼텍싱(vortexing)한 뒤 5분간 37℃에서 방치하였다. 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-Streptomycin)을 함유하는 RPMI 배지를 10 ml 더 추가한 뒤 같은 조건으로 원심분리하였다. 상층액을 버리고 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-Streptomycin)이 함유된 RPMI 배지를 1 ~ 3 ml 넣어 펠렛을 잘 풀어준 후, LUNA cell counter 기기로 비장 세포를 계수하였다. Mouse IFN- γ ELISpot plus kit (R&D system) 내 96-well plate에 비장 세포를 2.5×10^5 cells/well로 분주하였다. 자극제로는 SARS-CoV-2 펩타이드(peptide)를 최종 1 μ g/well이 되도록 희석하여 well에 분주하였다. 세포-자극제 혼합물을 5% CO₂, 37℃에서 12 ~ 48시간 배양하였다. 세포-자극제 혼합물을 제거하고 PBS로 세척한 후 1차 항체를 PBS-0.5% FBS 용액에 희석 및 분주하여 상온에서 2시간 배양하였다. 위와 같이 세척한 후 ALP 표지된 2차 항체를 PBS-0.5% FBS 용액에 희석 및 분주하여 상온에서 1시간 배양하였다. 다시 세척한 후 여과필균시킨 기질 용액(BCIP/NBT-plus)을 넣어 10-30분간 스팟(spot)이 나타날 때까지 반응시켰다. 반응을 멈추기 위해 증류수로 세척한 후 잘 건조시켰다. 생성된 스팟(spot)은 CTL 자동화 장비를 사용하여 계수하였다.

- [0214] 상기 실험 결과, 도 6에 나타낸 바와 SARS-CoV-2 초기주 범용 mRNA 백신의 경우(도 6에서 "Consensus_dsg S" 또는 "Css_dsg S"로 표기), 기존 Wild type SARS-CoV-2 S형(우한주) 백신(도 6에서 "Control S"로 표기)과 비슷한 정도의 우수한 세포성 면역반응을 나타내는 것으로 확인되었다(도 6).
- [0216] **[실시예 3] 서열번호 12의 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신의 감염 방어능 평가**
- [0217] 상기 제조예 6에서 제조한 서열번호 12의 SARS-CoV-2 범용 mRNA를 이용한 백신에 의한 감염방어능 평가를 위하여 SARS-CoV-2 바이러스에 감수성이 있는 5주령의 암컷 human ACE2 형질전환 마우스[B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Pr1mn/J]에 0.5 µg dose의 백신 후보물질을 3주 간격으로 2회 근육접종(I.M)한 후, 2주 뒤에 각각 100 LD50 (Lethal dose 50) 용량의 Wild type SARS-CoV-2 S형(우한주)와 인 델타(Delta) 변이주(인도주)로 공격접종 후, 2주 동안 매일 체중 변화와 생존율을 측정하였다.
- [0218] 상기 실험 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 백신을 접종하지 않은 PBS 그룹에서는 바이러스 공격 접종 후 3 ~ 4일부터 급격하게 몸무게가 감소하다가 9일 이내에 모두 폐사한 반면, 본 발명의 SARS-CoV-2 초기주 범용 mRNA 백신을 접종한 그룹의 경우(도 7에서 "Consensus_dsg S" 또는 "Css_dsg S"로 표기)에는 Wild type SARS-CoV-2 S형(우한주)뿐만 아니라 델타(Delta) 변이주(인도주)의 공격접종에서도 체중이 감소한 개체없이 100% 생존율을 보였다(도 7).
- [0219] 또한 도 8에 나타낸 바와 같이, 오미크론(Omicron) 변이주를 3.6×10^4 PFU 용량으로 공격접종 후 3일 뒤에 마우스의 폐 조직에 존재하는 바이러스의 역가를 측정한 결과, 백신을 접종하지 않은 PBS 그룹에서는 높은 바이러스 역가가 측정된 반면, 기존 Wild type SARS-CoV-2 S형(우한주) 백신(도 5에서 "Control S"로 표기)은 폐 조직 내 바이러스 역가가 측정된 반면, 본 발명의 SARS-CoV-2 초기주 범용 mRNA 백신을 접종한 그룹의 경우(도 8에서 "Consensus_dsg S" 또는 "Css_dsg S"로 표기)에는 바이러스가 100 % 사멸되었음을 확인하였다. 또한 RT-qPCR 방법을 이용하여 폐 조직의 잔존 바이러스 양을 측정한 결과, 기존 Wild type SARS-CoV-2 S형(우한주) 백신(도 5에서 "Control S"로 표기) 대비 본 발명의 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신에서 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(도 8).
- [0220] 또한 도 9에 나타낸 바와 같이, 백신 후보물질을 2회 근육접종(I.M) 후 공격접종 전에 채혈한 혈청에서의 중화항체가를 측정한 결과, 본 발명의 SARS-CoV-2 초기주 범용 mRNA 백신의 경우(도 9에서 "Consensus_dsg S" 또는 "Css_dsg S"로 표기), S형(우한주)뿐만 아니라, 델타(Delta) 변이주(인도주) 및 오미크론 변이주(BA.5)에 대하여도 기존 Wild type SARS-CoV-2 S형(우한주) 백신(도 9에서 "Control S"로 표기)과 비교하여 유의적으로 더욱 높은 중화항체가를 나타내는 것으로 확인되었다(도 9).
- [0222] **[실시예 4] 서열번호 13의 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신의 면역원성 평가**
- [0223] 상기 제조예 6에서 제조한 서열번호 13의 SARS-CoV-2 범용 mRNA를 이용한 백신이 체액성 면역 반응을 유도하는지 평가하기 위하여 중화항체가를 측정하였다. 구체적으로, 56℃에서 비동화(inactivation)시킨 면역 마우스의 혈청을 2% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-Streptomycin)이 함유된 DMEM 배지로 96-well plate에 2배씩 단계 희석하였다. 400 PFU/ml로 희석된 각각 다양한 바이러스 SARS-CoV-2 S형(우한주), 델타(Delta) 변이주(인도주), 오미크론 변이주(Omicron BN.1)를 희석된 혈청과 1:1로 접종하여 5% CO₂, 37℃에서 1시간 동안 배양하는 중화 단계를 수행하였다. 실험 하루 전 Vero-E6 세포를 1.8×10^5 cells/well로 분주(seeding)한 12-well plate에 중화된 혈청-바이러스 혼합액을 접종하여 5% CO₂, 37℃에서 1시간 배양하였다. 혈청-바이러스 혼합액을 제거한 후, overlay media (2% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin과 0.6% Agarose가 포함된 MEM 배지)를 넣고 2일 간 배양하였다. 이후, overlay media를 제거한 뒤 크리스탈 바이올렛(crystal violet) 염색약을 넣고 2시간 방치하였다. 그 다음, 염색약을 제거한 후 충분히 말려 플라그(plaque)를 계수하여 중화항체가를 계산하였다.
- [0224] 상기 실험 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이 본 발명의 SARS-CoV-2 오미크론 범용 mRNA 백신의 경우(도 10에서 "Chimeric_dsg S" 또는 "Chi_dsg S"로 표기), S형(우한주)뿐만 아니라, 델타(Delta) 변이주(인도주) 및 오미크론 변이주(BN.1)에 대하여도 오미크론 Chimeric Spike 백신(도 10에서 "Chimeric S" 또는 "Chi S"로 표기)과 비교하여 더욱 높은 중화항체가를 나타내는 것으로 확인되었다(도 10).

[0226] [실시예 5] 서열번호 13의 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신의 감염 방어능 평가

[0227] 상기 제조예 6에서 제조한 서열번호 13의 SARS-CoV-2 오미크론 범용 mRNA를 이용한 백신이 세포성 면역 반응을 유도하는지 평가하기 위하여 면역된 마우스의 비장세포에서 바이러스 특이적인 IFN- γ 를 분비하는 T세포를 측정하는 ELISpot을 수행하였다. 구체적으로, 10% FBS와 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-Streptomycin)을 함유하는 RPMI 배지에 SARS-CoV-2 범용 mRNA 백신 면역된 마우스의 비장을 분리한 뒤 gentleMACS 장비를 이용하여 비장을 단일 세포로 분쇄하였다. 70 μ m 트레이너(strainer)로 비장세포를 여과시켜 원심분리(2,000 rpm, 5분, 4℃)를 수행하였다. 상층액을 제거하고 남은 펠렛(pellet)에 ACK 용해 버퍼(Lysing buffer) 5 ml를 넣고 볼텍싱(vortexing)한 뒤 5분간 37℃에서 방치하였다. 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-Streptomycin)을 함유하는 RPMI 배지를 10 ml 더 추가한 뒤 같은 조건으로 원심분리하였다. 상층액을 버리고 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-Streptomycin)이 함유된 RPMI 배지를 1 ~ 3 ml 넣어 펠렛을 잘 풀어준 후, LUNA cell counter 기기로 비장 세포를 계수하였다. Mouse IFN- γ ELISpot plus kit (R&D system) 내 96-well plate에 비장 세포를 2.5×10^5 cells/well로 분주하였다. 자극제로는 SARS-CoV-2 펩타이드(peptide)를 최종 1 μ g/well이 되도록 희석하여 well에 분주하였다. 세포-자극제 혼합물을 5% CO₂, 37℃에서 12 ~ 48시간 배양하였다. 세포-자극제 혼합물을 제거하고 PBS로 세척한 후 1차 항체를 PBS-0.5% FBS 용액에 희석 및 분주하여 상온에서 2시간 배양하였다. 위와 같이 세척한 후 ALP 표지된 2차 항체를 PBS-0.5% FBS 용액에 희석 및 분주하여 상온에서 1시간 배양하였다. 다시 세척한 후 여과멸균시킨 기질 용액(BCIP/NBT-plus)을 넣어 10-30분간 스팟(spot)이 나타날 때까지 반응시켰다. 반응을 멈추기 위해 증류수로 세척한 후 잘 건조시켰다. 생성된 스팟(spot)은 CTL 자동화 장비를 사용하여 계수하였다.

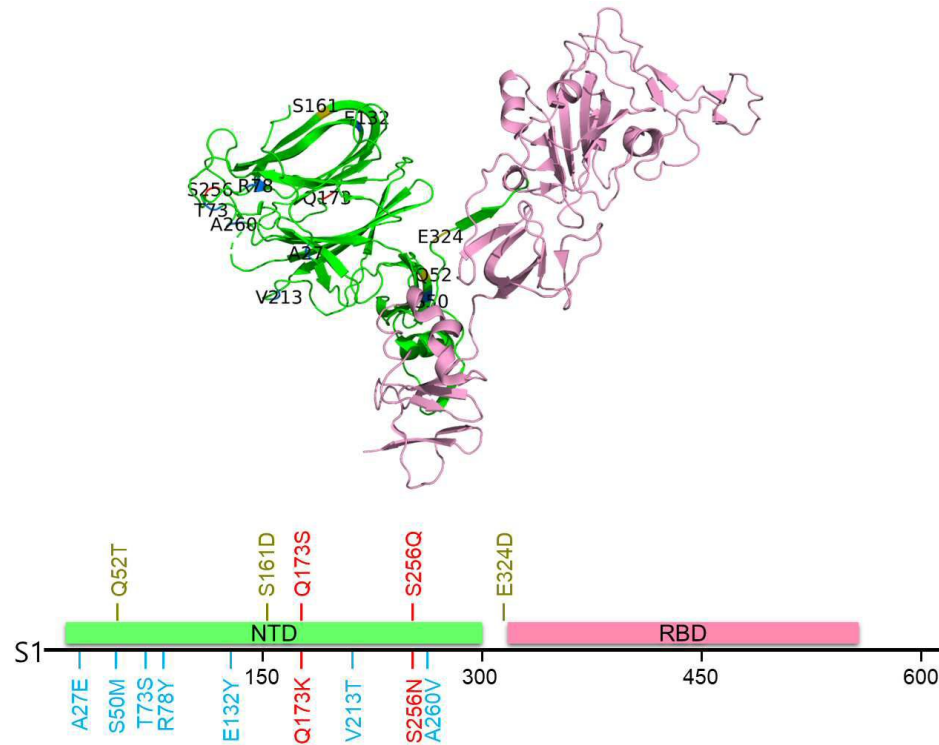
[0228] 상기 실험 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이 본 발명의 SARS-CoV-2 오미크론 범용 mRNA 백신의 경우(도 11에서 "Chimeric_dsg S" 또는 "Chi_dsg S"로 표기) 오미크론 Chimeric Spike 백신(도 11에서 "Chimeric S" 또는 "Chi S"로 표기)보다 유의적으로 높은 우수한 세포성 면역반응을 나타내는 것으로 확인되었다(도 11).

[0230] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로도 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

[0231] 한편, 본 명세서에 별도로 첨부되는 서열목록 전자파일에 있어서, RNA 서열의 경우, WIPO ST.26의 규정에 따라 서열 내의 U를 모두 T로 변경하여 작성하였으며, 명세서 본문 내의 기재에 있어서는 본래 RNA 서열에 따라 U를 그대로 사용하여 기재하였다.

도면

도면1



도면2

(a)

서열번호 1	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS	60
서열번호 2	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS	60
서열번호 3	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS	57

	NVTWFHAIHVSQNGTKRFONPVLFPNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLDSTQSLIIV	120
	NVTWFHAIHVSQNGTKRFONPVLFPNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLDSTQSLIIV	118
	NVTWFHAIHVSQNGTKRFONPVLFPNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLDSTQSLIIV	117

	NNATNVVIVKVFQFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSPFLMDLE	180
	NNATNVVIVKVFQFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSPFLMDLE	177
	NNATNVVIVKVFQFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSPFLMDLE	177

	GKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT	240
	GKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT	237
	GKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT	

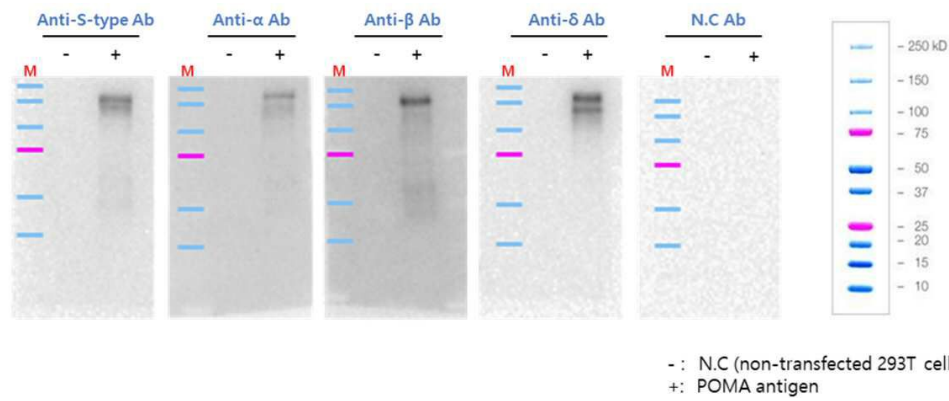
	LLALHRSYLTSGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETK	300
	LLALHRSYLTSGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETK	297
	LLALHRSYLTSGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETK	

	CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISN	360
	CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISN	357
	CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISN	

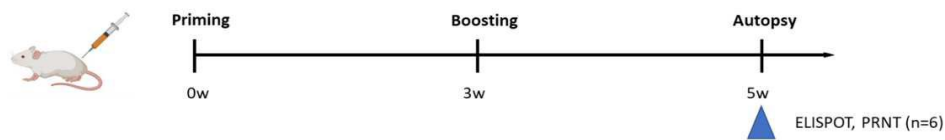
(b)

서열번호 1	27	50	52	73	78	132	161	173	213	256	260	324
서열번호 2			52				158	170		253		321
서열번호 3	24	47		70	75	129		170	210	253	257	

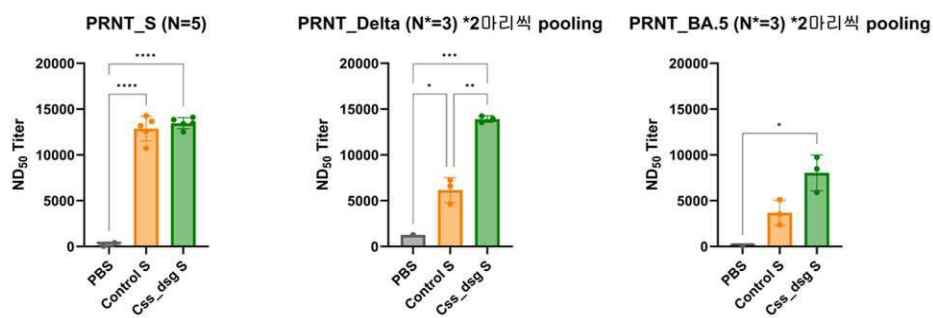
도면3



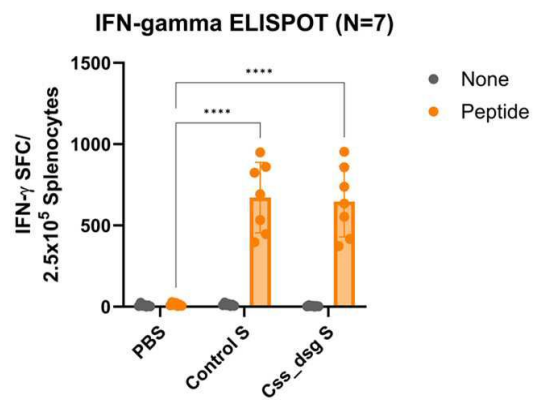
도면4



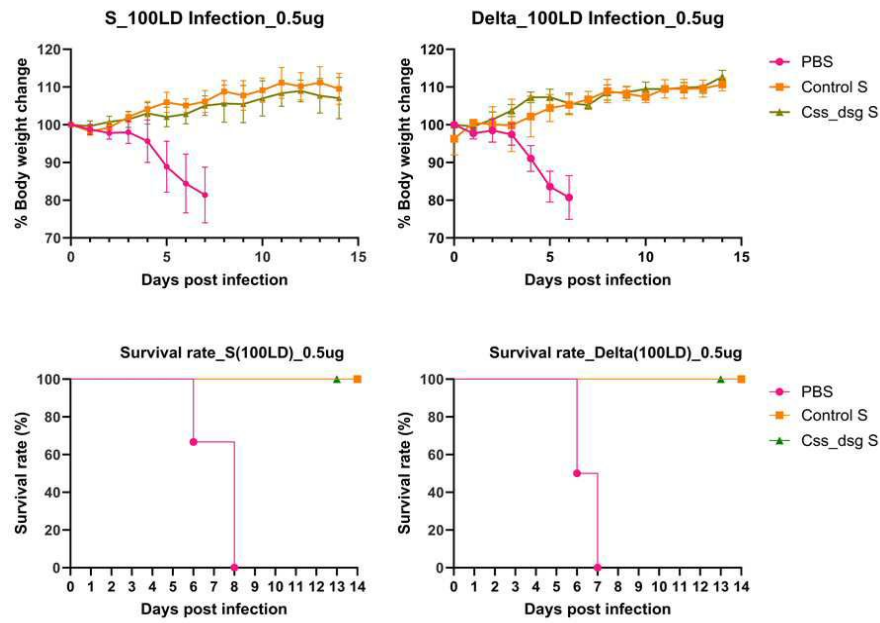
도면5



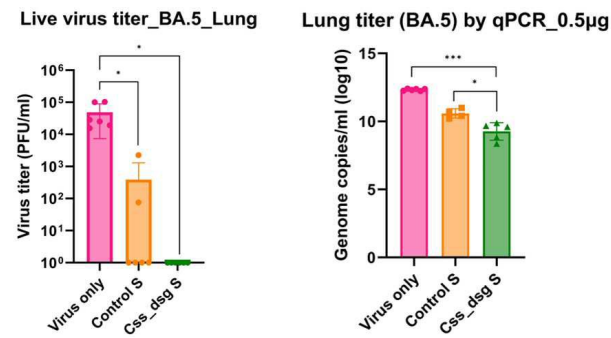
도면6



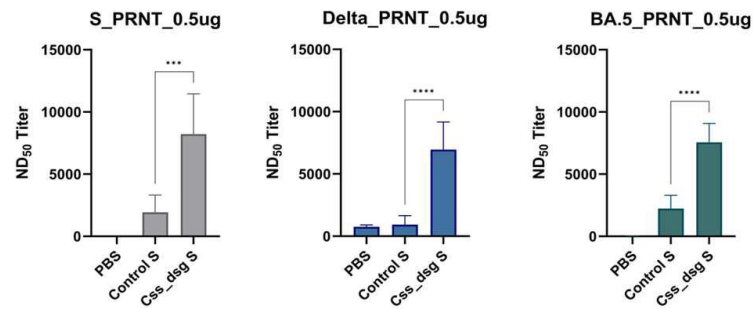
도면7



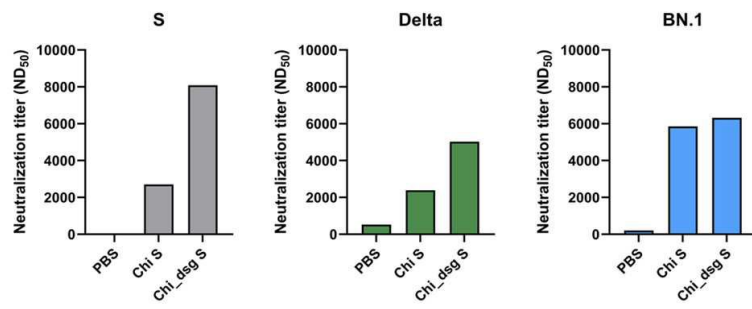
도면8



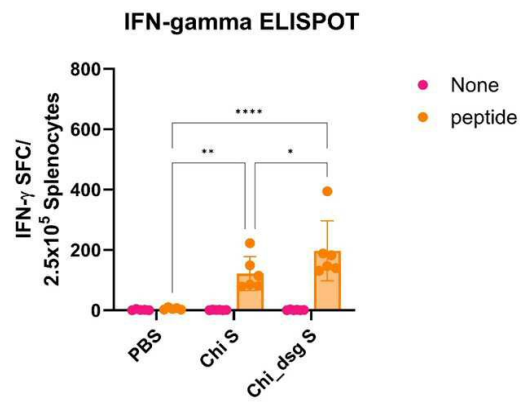
도면9



도면10



도면11



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.