(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0088402
(43) 공개일자 2025년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 39/12* (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 39/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0180605
(22) 출원일자 2024년12월06일
심사청구일자 2024년12월06일
(30) 우선권주장
1020230177089 2023년12월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인
기초과학연구원
대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)
(72) 발명자
최영기
세종특별자치시 보듬4로 9 도램마을11단지 1101동 1503호
김철중
대전광역시 유성구 엑스포로339번길 320 싸이언스빌 6동 102호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인더웨이브

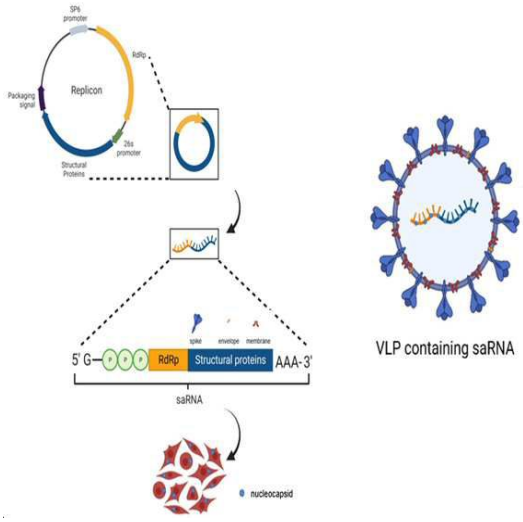
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **자가 증폭 RNA를 포함하는 바이러스 유사 입자 제조를 위한 알파 바이러스 기반 벡터 시스템**

(57) 요 약

일 양상은 알파 바이러스(alphavirus)의 비구조 단백질을 코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터, 상기 벡터로 감염된 세포, 상기 세포에서 수득한 바이러스 유사 입자(virus like particle; VLP) 및 이를 포함하는 백신 조성물을 제공한다. 상기 벡터는 단일 벡터 시스템으로 헬퍼 벡터 없이 saRNA를 포함하는 VLP를 쉽고, 간편하게 제조 가능하며, 상기 벡터를 통하여 제조된 상기 VLP 및 백신 조성물은 단회 투여만으로도 충분한 양의 항체를 생성하며, 추가 증식이 이루어지지 않아 안전성이 우수하며, 점막 투여 가능한 형태로서, 점막 면역을 유도하여 근육 내 투여용 치료제 대비 현저히 우수한 호흡기 질환 예방 또는 치료 효과를 나타낸다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 39/215 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)
C12N 9/127 (2013.01)
C12N 2770/20022 (2013.01)
C12N 2770/20023 (2013.01)
C12N 2770/20034 (2013.01)
C12N 2770/36122 (2013.01)
C12N 2770/36134 (2013.01)
C12N 2770/36143 (2013.01)
(72) 발명자
강영임
대전광역시 서구 월평북로 13 204동 1505호

유민아
대전광역시 서구 만년로 45 초원아파트 106동 1502호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2710019481
과제번호	IBS-R801-D1
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	과학기술정보통신부
연구사업명	기초과학연구원연구운영비지원(주요사업비)
연구과제명	신변종 바이러스 연구
과제수행기관명	기초과학연구원
연구기간	2024.01.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

알파 바이러스(alphavirus)의 비구조 단백질을 코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 알파 바이러스는 아우라(Aura) 바이러스, 바반키(Babanki) 바이러스, 바마 삼림(Barmah Forest) 바이러스, 베바루(Bebaru) 바이러스, 사바쑤(Cabassou) 바이러스, 치쿤구니아(Chikungunya) 바이러스, 동부형 이콰인 뇌염(Eastern equine encephalitis) 바이러스, 에버글레이드(Everglades) 바이러스, 포트 모건(Fort Morgan) 바이러스, 게타(Getah) 바이러스, 하이랜드(Highlands) J 바이러스, 키질라가시(Kyzylagach) 바이러스, 마야로(Mayaro) 바이러스, 메 트리(Me Tri) 바이러스, 미델부르크(Middelburg) 바이러스, 모쏘 다스 페드라스(Mosso das Pedras) 바이러스, 무캄보(Mucambo) 바이러스, 엔두무(Ndumu) 바이러스, 오니옹-니옹(O'nyong-nyong) 바이러스, 피슈나(Pixuna) 바이러스, 리오 네그로(Rio Negro) 바이러스, 로스 강(Ross River) 바이러스, 연어 췌장 질병(Salmon pancreas disease) 바이러스, 셈리키 삼림(Semliki Forest) 바이러스(SFV), 남방 코끼리 물범(Southern elephant seal) 바이러스, 토나테(Tonate) 바이러스, 트로카라(Trocara) 바이러스, 우나(Una) 바이러스, 서부형 이콰인 뇌염(Western equine encephalitis) 바이러스 및 와타로아(Whataroa) 바이러스로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 벡터.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 알파 바이러스의 비구조 단백질을 코딩하는 유전자는 NSP1 단백질을 코딩하는 유전자, NSP2 단백질을 코딩하는 유전자, NSP3 단백질을 코딩하는 유전자 및 NSP4 단백질을 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 벡터.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 알파 바이러스의 비구조 단백질을 코딩하는 유전자는 RNA 의존적 RNA 중합효소(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)를 코딩하는 유전자를 포함하는, 벡터.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 목적 단백질은 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편인, 벡터.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자는 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 목적 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자 및 목적 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 벡터.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 목적 바이러스는 호흡기 질환 유발 바이러스인, 벡터.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스는 코로나 바이러스(Coronavirus), 인간호흡기세포융합바이러스(Respiratory Syncytial Virus), 아데노 바이러스(Adenovirus), 인플루엔자 바이러스(Influenza Virus), 리노 바이러스(Rhinovirus), 엔테로 바이러스(Enterovirus), 보카 바이러스(Bocavirus), 파라인플루엔자 바이러스(Parainfluenza Virus), 메타뉴모 바이러스(Metapneumovirus), 엡스타인바 바이러스(Epstein-Barr Virus), 거대세포 바이러스(Cytomegalovirus), 단순포진 바이러스(Herpes Simplex Virus), 홍역 바이러스(Measles Virus) 및 수두대상포진 바이러스(varicella-zoster virus)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 벡터.

청구항 9

청구항 1의 벡터가 발현하는 RNA를 세포에 도입하는 단계를 포함하는 바이러스 유사 입자(virus like particle, VLP) 제조용 세포의 제조방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 RNA를 세포에 도입하는 단계는 목적 바이러스 유래 패키징 신호 관련 단백질을 코딩하는 유전자; 상기 알파 바이러스 유래 폴리뉴클레오티드; 및 제2 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 발현하는 RNA를 동시에 도입하는 것인, 세포의 제조방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 RNA는 알파 바이러스의 RNA 의존적 RNA 중합효소를 코딩하는 RNA 및 목적 단백질을 코딩하는 RNA를 포함하는 것인, 세포의 제조방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 목적 단백질을 코딩하는 RNA는 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA, 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA 및 목적 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이며,

상기 세포는 목적 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질 또는 이의 단편을 발현하도록 유전적으로 조작된 것인, 세포의 제조방법.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 RNA를 세포에 도입하는 단계 이전에 상기 벡터를 선형화(linearization)하는 단계를 더 포함하는 세포의 제조방법.

청구항 14

청구항 9에 있어서, 상기 세포는 미생물, 동물세포 또는 식물세포인, 세포의 제조방법.

청구항 15

청구항 9의 방법으로 제조된 바이러스 유사 입자 제조용 세포.

청구항 16

청구항 15의 세포를 배양하는 단계를 포함하는 바이러스 유사 입자의 제조 방법.

청구항 17

청구항 16의 방법으로 제조된 바이러스 유사 입자.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 목적 단백질은 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편 및 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편인, 바이러스 유사 입자.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 RNA는 상기 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편, 상기 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편 및 상기 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편으로 패키징(packaging)된 것인, 바이러스 유사 입자.

청구항 20

청구항 17에 있어서, 목적 바이러스 유래 패키징 신호 관련 단백질을 코딩하는 유전자; 상기 알파 바이러스 유래 폴리뉴클레오티드; 및 제2 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 발현하는 RNA를 더 포함하는 바이러스 유사 입자.

청구항 21

청구항 17의 바이러스 유사 입자를 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 백신 조성물은 점막 면역 반응을 유도하는 것인, 백신 조성물.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 점막 면역 반응은 점막에서 항원 특이적 IgA를 발현하는 것인, 백신 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 알파 바이러스(alphavirus)의 비구조 단백질을 코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 백신(vaccine)이란 기능을 약화시킨 병원체 또는 인체가 정보를 인식할 수 있도록 처리한 단백질 또는 핵산 등의 의약품을 의미한다. 제조 방법에 따라 크게 약독화 생백신, 불활성화 백신, 톡소이드 백신, mRNA 백신, 추출 백신, 바이러스 벡터 백신, 바이러스 유사 입자(VLP) 백신 등이 있다.

[0004] 사람들은 호흡기를 통해 외부로부터 병원체의 위협을 받고 있는데, 이러한 병원체의 대부분은 점막을 통해 침입이 이루어진다. 상기 병원체에 대한 첫번째 방어 역할을 수행하는 점막면역(mucosal immunity)은 병원체의 침입을 막는 가장 효과적인 방법이라고 할 수 있다.

[0005] 점막백신(mucosal vaccine)은 점막에서 점막면역반응(mucosal immune response)을 유도할 뿐만 아니라 전신면역반응(systemic immune response) 도 동시에 유도할 수 있으며, 점막면역의 중요한 특징 중 하나인 점막 표면에 항원 특이적 IgA(IgA)를 생산할 수 있다. 또한, 백신투여를 위해 주사바늘을 사용하지 않아 통증이나 거부감이 없으며, 안전하고 쉽게 투여할 수 있다는 장점이 있다. 현재 약독화 생백신 또는 사백신으로 구성된 점막백신이 상용화되고 있지만, 생백신의 경우 안전성 문제가 제기되었으며, 사백신은 생백신에 비해 안전하지만 낮은 면역원성으로 효과적인 면역반응을 유도하기 어렵다는 단점이 있다. 따라서, 이러한 점막백신의 효율성, 안전성 등의 문제 해결이 필요한 실정이다.

[0006] mRNA 백신은 바이러스의 유전 정보를 포함하는 mRNA를 투여하여 체내에서 직접 항원을 생산하게 함으로써 면역반응을 유도한다. 다만, mRNA 백신의 경우, 항원 단백질을 코딩하는 서열만이 포함되어 있기 때문에 면역을 일으키기 위한 충분한 항원이 발생하지 않아 투여량이 많아진다는 단점이 존재하며, mRNA를 체내로 전달할 수 있는 안정적인 전달체가 존재하여야 한다.

[0007] VLP(Virus-Like Particle) 백신은 바이러스의 구조 단백질을 야생형 바이러스와 겉모습이 유사한 구조를 나타내도록 특이적으로 발현시킨 입자로서 VLP 백신은 입자 내부에 병원체에 대한 유전 정보가 포함되어 있지 않아, 전달체로 사용할 수 있으며, 바이러스의 겉모습과 유사한 구조를 나타내므로, 기존 바이러스의 감염 경로로 투여되어 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 자가 복제가 가능한 saRNA(self-amplifying RNA)를 포함하는 VLP 백신을 제조하기 위한 벡터 시스템을 개발하였으며, 상기 벡터 시스템을 통하여 제조된 VLP 백신은 점막 투여가 가능하여, 점막면역 및 이를 통한 전신 면역이 가능하므로, 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 점막 면역 백신으로서의 현저히 우수한 효능을 밝히게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2024-0113430호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 일 양상은 알파 바이러스(alphavirus)의 비구조 단백질을 코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 다른 양상은 상기 벡터가 발현하는 RNA를 세포에 도입하는 단계를 포함하는 바이러스 유사 입자(virus like particle, VLP) 제조용 세포의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0013] 또 다른 양상은 상기 바이러스 유사 입자(virus like particle, VLP) 제조용 세포의 제조방법으로 제조된 바이러스 유사 입자 제조용 세포를 제공하는 것이다.

[0014] 또 다른 양상은 상기 바이러스 유사 입자 제조용 세포를 배양하는 단계를 포함하는 바이러스 유사 입자의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 또 다른 양상은 상기 바이러스 유사 입자의 제조 방법으로 제조된 바이러스 유사 입자를 제공하는 것이다.

[0016] 또 다른 양상은 상기 바이러스 유사 입자를 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 또 다른 양상은 상기 바이러스 유사 입자를 포함하는 백신 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 또 다른 양상은 상기 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 바이러스 유사 입자의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 일 양상은 알파 바이러스(alphavirus)의 비구조 단백질을 코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0021] 용어 "알파 바이러스(alphavirus)"는 토가비리데(*Togaviridae*) 과에 속하는 바이러스로서, 단일 양성 센스 가닥 RNA 게놈을 가진 작고 구형의 외피 바이러스이다. 광범위한 세포(곤충, 조류, 포유류 등)에 감염될 수 있으며, 바이러스의 RNA 게놈이 스스로 RNA 리플리카제(replicase)를 암호하기 때문에 RNA 복제와 전사가 효율적으로 이루어진다. 알파 바이러스 게놈에는 비구조 및 구조의 두 가지 오픈 리딩 프레임(ORF: open reading frame)이 존재한다. 첫 번째 ORF는 NSP 유전자를 포함하며 바이러스 RNA의 전사 및 번역에 필수적인 단백질(NSP1 내지 NSP4)을 코딩하며, 단일 다단백질 전구체를 생산하고, 상기 다단백질 전구체는 단백질분해 과정을 통해 성숙한 단백질로 절단된다. 두 번째 ORF는 3가지 구조 단백질인 코어 뉴클레오캡시드 단백질 C, 외피 단백질 P62 및 E1을 코딩한다.

[0022] 용어 "단백질"은 아미노산들이 펩티드 결합을 통하여 연결된 분자로, 폴리펩티드와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 상기 단백질은 재조합 단백질, 단백질의 일부 또는 이의 단편 등을 포함한다. 예를 들어, 키메릭 단백질, 에피토프(epitope)로 작용할 수 있는 크기의 펩티드 또는 폴리 펩티드 등을 포함할 수 있다.

[0023] 용어 "유전자"는 최광의의 의미로 간주되어야 하며, DNA 또는 RNA(구체적으로는 mRNA)일 수 있고, 예를 들어, 상기 유전자가 DNA인 경우, 작동 가능하도록 벡터에 포함된 형태일 수 있다.

[0024] 용어 "코딩하는 유전자"는 폴리펩티드 또는 단백질의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 가진 유전자를 의미한다. 상기 "코딩하는 유전자"는 상기 폴리펩티드의 일부 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자 또는 단백질의 일부 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자를 포함한다.

[0025] 용어 "벡터"는 유전적 물질을 그것이 복제 및/또는 발현될 수 있는 다른 세포로 수송하기 위해 사용되는 핵산 분자이다. 예를 들어, 플라스미드, 바이러스 벡터(박테리오파지, 동물 바이러스 및 식물 바이러스), 코스미드 및 인공 염색체(예컨대, YAC)를 포함한다. 구체적으로, 상기 벡터는 플라스미드일 수 있고, 보다 구체적으로는 알파 바이러스 유래 플라스미드일 수 있고, 예를 들어, 셈리키 삼림 바이러스(semliki-forest virus) 유래 플라스미드일 수 있다.

[0026] 일 구체예에 있어서, 상기 알파 바이러스는 아우라(Aura) 바이러스, 바반키(Babanki) 바이러스, 바마 삼림(Barmah Forest) 바이러스, 베바루(Bebaru) 바이러스, 사바쑤(Cabassou) 바이러스, 치쿤구니아(Chikungunya) 바이러스, 동부형 이콰인 뇌염(Eastern equine encephalitis) 바이러스, 에버글레이드(Everglades) 바이러스, 포트 모건(Fort Morgan) 바이러스, 게타(Getah) 바이러스, 하이랜드(Highlands) J 바이러스, 키질라가시(Kyzylagach) 바이러스, 마야로(Mayaro) 바이러스, 메 트리(Me Tri) 바이러스, 미델부르크(Middelburg) 바이러스, 모쏘 다스 페드라스(Mosso das Pedras) 바이러스, 무캄보(Mucambo) 바이러스, 엔두무(Ndumu) 바이러스, 오니옹-니옹(O'nyong-nyong) 바이러스, 피슈나(Pixuna) 바이러스, 리오 네그로(Rio Negro) 바이러스, 로스 강(Ross River) 바이러스, 연어 췌장 질병(Salmon pancreas disease) 바이러스, 셈리키 삼림(Semliki Forest) 바

이러스(SFV), 남방 코끼리 물범(Southern elephant seal) 바이러스, 토나테(Tonate) 바이러스, 트로카라(Trocara) 바이러스, 우나(Una) 바이러스, 서부형 이콰인 뇌염(Western equine encephalitis) 바이러스 및 와타로아(Whataroa) 바이러스로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 구체적으로는 셈리키 삼림(Semliki Forest) 바이러스(SFV)일 수 있다.

[0027] 예를 들어, 상기 알파 바이러스의 비구조 단백질은 하나 이상의 알파 바이러스 유래의 비구조 단백질일 수 있다. 예를 들어, 상기 알파 바이러스의 비구조 단백질은 2개의 상이한 알파 바이러스 유래의 비구조 단백질의 조합(아우라(Aura) 바이러스 유래 비구조 단백질 및 셈리키 삼림 바이러스 유래 비구조 단백질)일 수 있다. 또한, 상기 알파 바이러스의 비구조 단백질은 동일한 알파 바이러스 유래의 비구조 단백질일 수 있다. 예를 들어, 상기 알파 바이러스의 비구조 단백질은 셈리키 삼림(Semliki Forest) 바이러스 유래 비구조 단백질일 수 있다.

[0028] 일 구체예에 있어서, 상기 알파 바이러스의 비구조 단백질은 NSP1 단백질, NSP2 단백질, NSP3 단백질 및 NSP4 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 구체적으로는 알파바이러스의 NSP1 단백질, NSP2 단백질, NSP3 단백질 및 NSP4 단백질을 모두 포함할 수 있다. 보다 구체적으로는 셈리키 삼림 바이러스의 NSP1 단백질, NSP2 단백질, NSP3 단백질 및 NSP4 단백질을 모두 포함할 수 있다.

[0029] 상기 NSP1 단백질은 메틸트랜스퍼라아제 활성을 가지며, 바이러스 캡핑 반응에 관여할 수 있다. NSP2 단백질은 헬리카아제 및 프로테아제 활성을 가질 수 있다. NSP3 단백질은 3개의 도메인(매크로도메인, 중앙(또는 알파바이러스 고유) 도메인 및 초가변 도메인(HVD))을 포함한다. NSP4 단백질은 RNA 의존적 RNA 중합효소 활성을 가진다. 즉, RNA 의존적 RNA 중합효소의 일부 또는 전부를 포함할 수 있고, RNA 의존적 RNA 중합효소를 활성화할 수 있는 요소(예컨대, 단백질, 효소 등)를 포함할 수 있다.

[0030] 일 구체예에 있어서, 상기 알파 바이러스의 비구조 단백질은 RNA 의존적 RNA 중합효소(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)을 포함할 수 있다. 구체적으로는 셈리키 삼림 바이러스의 RNA 의존적 RNA 중합효소(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)을 포함할 수 있다.

[0031] 상기 RNA-의존성 RNA 중합효소는 RNA를 주형으로 RNA를 복제하는 효소로서, 고세균과 일부 바이러스에서 발견된다.

[0032] 일 구체예에 있어서, 알파 바이러스의 비구조 단백질을 코딩하는 유전자는 상기 알파 바이러스의 NSP1 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 알파 바이러스의 NSP2 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 알파바이러스의 NSP3 단백질을 코딩하는 유전자 및 상기 알파 바이러스의 NSP4 단백질을 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자를 포함할 수 있으며, 구체적으로는 상기 알파 바이러스의 NSP1 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 알파 바이러스의 NSP2 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 알파 바이러스의 NSP3 단백질을 코딩하는 유전자 및 상기 알파 바이러스의 NSP4 단백질을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로 셈리키 삼림 바이러스의 NSP1 단백질을 코딩하는 유전자, 셈리키 삼림 바이러스의 NSP2 단백질을 코딩하는 유전자, 셈리키 삼림 바이러스의 NSP3 단백질을 코딩하는 유전자 및 셈리키 삼림 바이러스의 NSP4 단백질을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다.

[0033] 일 구체예에 있어서, 상기 알파 바이러스의 비구조 단백질을 코딩하는 유전자는 RNA 의존적 RNA 중합효소(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있고, 구체적으로는 상기 알파 바이러스의 NSP1 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 알파 바이러스의 NSP2 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 알파 바이러스의 NSP3 단백질을 코딩하는 유전자 및 상기 알파 바이러스의 NSP4 단백질을 코딩하는 유전자는 RNA 의존적 RNA 중합효소(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있고, 보다 구체적으로 셈리키 삼림 바이러스의 NSP1 단백질을 코딩하는 유전자, 셈리키 삼림 바이러스의 NSP2 단백질을 코딩하는 유전자, 셈리키 삼림 바이러스의 NSP3 단백질을 코딩하는 유전자 및 셈리키 삼림 바이러스의 NSP4 단백질을 코딩하는 유전자는 RNA 의존적 RNA 중합효소(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다.

[0034] 또한, 일 구체예에 있어서, 상기 벡터는 상기 알파바이러스의 RNA 의존적 RNA 중합효소를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있으며, 구체적으로는 상기 알파바이러스의 RNA 의존적 RNA 중합효소를 코딩하는 유전자 및 상기 알파바이러스의 NSP1 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 알파 바이러스의 NSP2 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 알파바이러스의 NSP3 단백질을 코딩하는 유전자 및 상기 알파 바이러스의 NSP4 단백질을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로 셈리키 삼림 바이러스의 RNA 의존적 RNA 중합효소를 코딩하는 유전자 및 셈리키 삼림 바이러스의 NSP1 단백질을 코딩하는 유전자, 셈리키 삼림 바이러스의 NSP2 단백질을 코딩하는 유전자, 셈리키 삼림 바이러스의 NSP3 단백질을 코딩하는 유전자 및 셈리키 삼림 바이러스의 NSP4 단백질을 코딩하는 유전자를

포함할 수 있다.

[0035] 구체적으로, 상기 벡터가 상기 알파 바이러스의 비구조 단백질 중 NSP1 내지 NSP4 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 경우, 상기 벡터가 발현됨으로써, 상기 RNA 의존적 RNA 중합효소의 전부 또는 일부 또는 상기 RNA 의존적 RNA 중합효소를 활성화할 수 있는 요소도 발현되어, 상기 RNA 의존적 RNA 중합효소가 정상적으로 기능할 수 있다.

[0036] 일 구체예에 있어서, 상기 알파 바이러스의 NSP1 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 70% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 구체적으로 상기 알파 바이러스의 NSP1 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 또는 100%의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0037] 일 구체예에 있어서, 상기 알파 바이러스의 NSP2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 3의 염기 서열과 70% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 구체적으로 상기 알파 바이러스의 NSP2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 3의 염기 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 또는 100%의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0038] 일 구체예에 있어서, 상기 알파 바이러스의 NSP3 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 5의 염기 서열과 70% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 구체적으로 상기 알파 바이러스의 NSP3 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 5의 염기 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 또는 100%의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0039] 일 구체예에 있어서, 상기 알파 바이러스의 NSP4 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 7의 염기 서열과 70% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 구체적으로 상기 알파 바이러스의 NSP4 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 7의 염기 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 또는 100%의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0040] 일 구체예에 있어서, 상기 알파 바이러스의 RNA-의존성 RNA 중합효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 9의 염기 서열과 70% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 구체적으로 상기 알파 바이러스의 RNA-의존성 RNA 중합효소를 코딩하는 유전자는 서열번호 9의 염기 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 또는 100%의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0041] 일 구체예에 있어서, 상기 벡터는 조절 서열을 더 포함할 수 있다.

[0042] 상기 "조절 서열"은 발현대상 서열 또는 유전자에 기능적으로 연결된 후에 상기 핵산 또는 상기 유전자의 발현, 즉 전사 및 번역을 조절하는 발현 활성을 갖는 핵산을 의미하며, 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 조절 요소(예컨대, 폴리아데닐화 신호 및 발현된 RNA의 안정성에 영향을 미치는 요소)를 포괄하는 것일 수 있다.

[0043] 일 구체예에 있어서, 상기 조절 서열은 3'-비번역 부위(Untranslated region, UTR) 서열, 5'-UTR 서열 및 폴리(A) 테일 서열(poly(A) tail sequence)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으며, 구체적으로는 3'-UTR 서열, 5'-UTR 서열 및 폴리(A) 테일 서열(poly(A) tail sequence)을 모두 포함할 수 있다.

[0044] 상기 용어 "3' 비번역 부위(3'-UTR)"는 오픈 리딩 프레임의 3' 말단에 위치하는 영역으로 유전자의 발현을 통제하는 역할을 한다.

[0045] 상기 용어 "5' 비번역 부위(5'-UTR)"는 오픈 리딩 프레임의 5' 말단에 위치하는 영역으로 단백질 합성의 시작에 관여한다.

[0046] 상기 용어 "폴리(A) 테일"은 엑소리보뉴클리아제(Exoribonuclease)의 분해 과정을 지연시키고, 발현된 RNA의 안정성과 생체 내 반감기를 연장시켜 발현 효율에 영향을 미치는 3' 말단 영역에 위치하는 구조물을 의미하고, 일반적으로 복수 개의 아데닌 뉴클레오티드 서열에 의해 형성될 수 있다.

[0047] 일 구체예에 있어서, 상기 조절서열은 작동 가능하게 연결된 것일 수 있다.

[0048] 용어 "작동 가능하게 연결(operably linked)"은 도입 유전자가 숙주 세포에서 발현이 이루어질 수 있도록 하는 방식으로 조절서열에 연결되어 있는 것을 의미한다.

[0049] 용어 "호흡기 질환 유발 바이러스"는 비말 전파 또는 직접 접촉 전파를 통하여 점막 감염, 예를 들어, 상부 호흡기(상기도), 하부 호흡기(하기도), 눈 점막, 코 점막, 입 점막 등을 감염시켜, 호흡기 질환을 일으키는 바이러스를 의미한다.

[0050] 일 구체예에 있어서, 상기 목적 단백질은 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 구체적으로, 상기 목적 단백질은 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편일 수 있고, 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편은 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편, 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편, 목적 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편 및 목적 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질 또는 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편은 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편은 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편, 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편, 목적 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편 및 목적 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질 또는 이의 단편일 수 있거나; 또는 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편은 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편, 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편 및 목적 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편일 수 있다.

[0051] 용어 "스파이크(Spike, S) 단백질"은 바이러스 표면에 존재하며, 곤봉 모양의 돌기 형태로 이루어진 구조 단백질이다. 상기 스파이크 단백질은 숙주 세포의 당 단백질 수용체와 결합하는 것으로 알려져 있으며, 이는 세포막과 바이러스의 외막의 융합, 그리고, 중화 항체의 생성을 야기할 수 있다.

[0052] 용어 "외피(Envelope, E) 단백질"은 바이러스의 가장 바깥층을 구성하며, 바이러스 유전체를 보호하는 역할을 한다.

[0053] 용어 "막(Membrane, M) 단백질"은 막관통 단백질이며, 바이러스 입자의 조립에 중심적인 역할을 한다.

[0054] 용어 "뉴클레오캡시드(Necleocapsid, N) 단백질"은 바이러스의 RNA에 결합하여 바이러스 입자의 조립, 외피 형성 및 RNA 합성 과정에서 유전체를 안정화하고 포장하는데 중요한 역할을 수행한다.

[0055] 용어 "패키징 신호"는 양성 단일 가닥 RNA 게놈에서 발견되며, 상기 패키징 신호는 바이러스의 구조 단백질이 바이러스 입자 형태로 조립될 수 있도록 한다. 용어 "패키징 신호 관련 단백질"은 입자의 조립을 유도하는 역할을 하는 단백질, 예를 들어, 비구조 단백질, 효소, 저분자 단백질 등을 의미한다.

[0056] 일 구체예에 있어서, 상기 목적 단백질을 코딩하는 유전자는 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자일 수 있다. 구체적으로, 상기 목적 단백질을 코딩하는 유전자는 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자일 수 있고, 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자는 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 목적 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자 및 목적 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 보다 구체적으로, 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 목적 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자 및 목적 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자일 수 있거나; 또는 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자는 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자 및 목적 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백

질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자일 수 있다.

[0057] 일 구체예에 있어서, 상기 목적 바이러스는 호흡기 질환 유발 바이러스일 수 있다. 구체적으로, 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편은 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 보다 구체적으로, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편 및 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질 또는 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 보다 더 구체적으로, 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편은 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편 및 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질 또는 이의 단편일 수 있거나; 또는 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편은 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편 및 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편일 수 있다.

[0058] 예를 들어, 목적 바이러스가 코로나 바이러스이며, 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편이 코로나 바이러스의 스파이크 단백질 또는 이의 단편인 경우, 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편은 코로나 바이러스의 스파이크 단백질의 전체, 이의 일부 또는 이의 단편을 의미하며, 구체적으로, 코로나 바이러스의 스파이크 단백질의 전체 또는 이의 일부 또는 코로나 바이러스의 스파이크 단백질의 단편 또는 이의 일부를 의미한다.

[0059] 또한, 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편은 같은 계통의 서로 다른 변이 바이러스 또는 서로 다른 계통의 바이러스 유래의 단백질 또는 이의 단편을 재조합하여 제조한 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편이 SARS-CoV-2 바이러스의 스파이크 단백질 또는 이의 단편인 경우, SARS-CoV-2 바이러스의 스파이크 단백질 또는 이의 단편 중, 수용체 결합 도메인(RBD) 부분을 MERS CoV 바이러스의 수용체 결합 도메인으로 재조합한 키메릭 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 의미하는 것일 수 있다.

[0060] 일 구체예에 있어서, 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자는 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자일 수 있다. 구체적으로, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자 및 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 보다 더 구체적으로, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자 및 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자일 수 있거나; 또는 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자는 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자 및 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자일 수 있다.

[0061] 예를 들어, 목적 바이러스가 코로나 바이러스이며, 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편이 코로나 바이러스의 스파이크 단백질 또는 이의 단편인 경우, 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자는 코로나 바이러스의 스파이크 단백질의 전체, 이의 일부 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자를 의미하며, 구체적으로, 코로나 바이러스의 스파이크 단백질의 전체 또는 이의 일부를 코딩하는 유전자 또는 코로나 바이러스의 스파이크 단백질의 단편 또는 이의 일부를 코딩하는 유전자를 의미한다.

[0062] 또한, 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자는 같은 계통의 서로 다른 변이 바이러스 또는 서로 다른 계통의 바이러스 유래의 단백질 또는 이의 단편을 재조합하여 제조한 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있다. 예를 들어, 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자가 SARS-CoV-2 바이러스의 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자인 경우, SARS-CoV-2 바이러스의 스파이크 단

백질 또는 이의 단편 중, 수용체 결합 도메인(RBD) 부분을 MERS CoV 바이러스의 수용체 결합 도메인으로 재조합한 키메릭 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자를 의미하는 것일 수 있다.

[0063] 일 구체예에 있어서, 상기 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 11, 서열번호 23 또는 서열번호 25의 염기 서열과 70% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 구체적으로 상기 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 11, 서열번호 23 또는 서열번호 25의 염기 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 또는 100%의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0064] 일 구체예에 있어서, 상기 외피 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 13의 염기 서열과 70% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 구체적으로 상기 외피 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 13의 염기 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 또는 100%의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0065] 일 구체예에 있어서, 상기 막 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 15의 염기 서열과 70% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 구체적으로 상기 막 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 15의 염기 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 또는 100%의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0066] 일 구체예에 있어서, 상기 뉴클레오캡시드 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 17의 염기 서열과 70% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 구체적으로 상기 뉴클레오캡시드 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 17의 염기 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 또는 100%의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0067] 일 구체예에 있어서, 상기 패키징 신호 관련 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 19의 염기 서열과 70% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 구체적으로 상기 패키징 신호 관련 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 19의 염기 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 또는 100%의 상동성을 갖는 염기 서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0068] 일 구체예에 있어서, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스는 코로나 바이러스(Coronavirus), 인간호흡기세포융합바이러스(Respiratory Syncytial Virus), 아데노 바이러스(Adenovirus), 인플루엔자 바이러스(Influenza Virus), 리노 바이러스(Rhinovirus), 엔테로 바이러스(Enterovirus), 보카 바이러스(Bocavirus), 파라인플루엔자 바이러스(Parainfluenza Virus), 메타뉴모 바이러스(Metapneumovirus), 엡스타인바 바이러스(Epstein-Barr Virus), 거대세포 바이러스(Cytomegalovirus), 단순포진 바이러스(Herpes Simplex Virus), 홍역 바이러스(Measles Virus) 및 수두대상포진 바이러스(varicella-zoster virus)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 구체적으로, 코로나 바이러스, 인간호흡기세포융합바이러스, 아데노 바이러스 및 인플루엔자 바이러스로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 보다 구체적으로는 코로나 바이러스일 수 있다.

[0069] 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편은 하나 이상의 목적 바이러스 유래의 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 구체적으로, 하나 이상의 호흡기 질환 유발 바이러스에서 유래된 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 예를 들어, 상기 목적 단백질은 2개의 서로 다른 바이러스 유래의 단백질(RSV의 융합 당단백질 및 SARS-CoV-2의 막 및 외피 단백질), 2개의 서로 다른 바이러스 변이체 유래의 단백질(MERS-CoV의 스파이크 단백질 및 SARS-CoV-2의 막 및 외피 단백질; MERS-CoV 및 SARS-CoV-2의 키메릭 스파이크 단백질 및 SARS-CoV-2의 막 및 외피 단백질) 등일 수 있다.

[0070] 일 실시예에서는 셈리키 삼림 바이러스(semliki-forest virus; SFV)의 구조 단백질을 코딩하는 서열 대신 SARS-CoV-2의 패키징 신호 및 구조 단백질인 스파이크(Spike, S), 외피(Envelope, E) 및 막(Membrane, M) 단백질을 코딩하는 서열이 삽입된 벡터와 뉴클레오캡시드를 코딩하는 서열이 삽입된 벡터 각각이 모두 안정적으로 선형화되고, 세포를 형질감염하여 우수한 VLP 생성능을 나타내었음을 통하여 상기 벡터의 안정적인 VLP 생성능을 확인

하였다(실시예 1 참조).

[0071] 또한, 상기 SARS-CoV-2의 패키징 신호 및 구조 단백질인 스파이크(Spike, S), 외피(Envelope, E) 및 막(Membrane, M) 단백질을 코딩하는 서열이 삽입된 벡터를 SARS-CoV-2의 뉴클레오캡시드를 발현하는 세포주에 형질감염하였을 때 또한, 안정적으로 VLP가 생성됨을 확인하여 상기 VLP를 대량 생산하기 위한 세포주 또한 안정적으로 제조되었음을 확인하였다(실시예 1 참조).

[0072] 일 양상에 따르면, 알파바이러스의 비구조 단백질들(NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, RdRp 포함)을 코딩하는 유전자, 목적 단백질(스파이크 단백질, 외피 단백질, 막 단백질 및 패키징 신호 관련 단백질)을 코딩하는 유전자를 포함하는 상기 벡터는 상기 유전자들이 안정적으로 발현될 수 있게 제조되어 현저히 우수한 VLP 생산율을 나타낸다. 또한, 상기 벡터는 헬퍼 벡터(helper vector) 없이 VLP를 생성할 수 있는 단일 벡터 시스템으로 제조가 편리하며, 상기 벡터에 의하여 발현된 VLP는 점막 투여가 가능하여, 점막 면역 및 전신 면역을 유도하여 현저하게 우수한 면역 반응을 일으키고, 한 번의 투여 후 재조립되지 않아 안전성이 우수하다는 장점이 존재한다.

[0074] 다른 양상은 상기 벡터가 발현하는 RNA를 세포에 도입하는 단계를 포함하는 바이러스 유사 입자(virus like particle, VLP) 제조용 세포의 제조방법을 제공한다.

[0075] 상기 "벡터", "유전자", "비구조 단백질", "단백질", "호흡기 질환 유발 바이러스", "구조 단백질" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0076] 용어 "RNA"는 "mRNA"및 "saRNA"와 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 "RNA"는 복수의 리보뉴클레오티드 단위체를 포함하는 고분자 물질로서, 구체적으로, 복수의 리보뉴클레오티드 단위체가 당/포스페이트 기본 골격의 포스포디에스테르 결합에 의해 서로 연결되어 있는 폴리머를 의미하고, 상기 "mRNA"는 유전 정보를 세포질 안의 리보솜으로 전달하는 RNA를 의미한다. 예를 들어, 선형화(linearization)된 상기 벡터가 발현하는 mRNA를 의미한다. 또한, 상기 "saRNA(self-amplifying RNA)"는 숙주 세포 내에서 스스로 복제 가능하도록 RNA-의존성 RNA 중합효소를 코딩하는 서열이 포함된 RNA를 의미한다(도 1). 예를 들어, 상기 saRNA는 상기 알파 바이러스의 RNA-의존성 RNA 중합효소를 코딩하는 서열이 포함된 선형화된 벡터가 발현하는 mRNA를 의미한다.

[0077] 용어 "도입"은 세포에 유전물질을 전달하는 것을 의미하며, 형질 전환, 형질 도입, 형질 감염을 포함한다. 예를 들어, 상기 도입은 미세사출법(microprojectile bombardment), 전기천공법(electroporation), 인산 칼슘($CaPO_4$) 침전, 염화칼슘($CaCl_2$) 침전, PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포좀 매개법(liposome-mediated method) 등으로 수행될 수 있다.

[0078] 용어 "바이러스 유사 입자(virus like particle, VLP)"는 자연적으로 자가-조립(self-assembly)되는 특성을 가진 바이러스 구조 단백질로서, 실제 병원체 바이러스의 형태를 모방하며 생화학적 특성 또한 매우 유사하게 나타난다고 일반적으로 알려져 있다. 구체적으로, 바이러스-유사 입자는 원래 병원체와 유사하거나 동일한 구조로 제조되고, 고도의 반복성을 가진 형태의 항원성을 나타내는 에피토프를 제시할 수 있다.

[0079] 일 구체예에 있어서, 상기 RNA를 세포에 도입하는 단계는 목적 바이러스 유래 패키징 신호 관련 단백질을 코딩하는 유전자; 상기 알파 바이러스 유래 폴리뉴클레오티드; 및 제2 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 발현하는 RNA를 동시에 도입하는 것일 수 있다.

[0080] 상기 "알파 바이러스 유래 폴리뉴클레오티드"는 RNA 서열로 전사되지 않거나, 전사된다 하더라도 단백질로 번역되지 않는 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 예를 들어, 비전사영역, 비번역부위, 유전자 간 영역(intergenic region), 조절 서열 등을 포함하며, 구체적으로, 3'-UTR 서열, 5'-UTR 서열, 폴리(A) 테일 서열, 인트론, 센트로미어, 텔로미어, 복제 개시점(Ori), 프로모터, 인핸서, 사일런서 등을 포함한다.

[0081] 상기 "제2 목적 단백질"은 제2 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 상기 제2 목적 바이러스는 상기 목적 바이러스와 동일하거나 상이할 수 있고, 상기 제2 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편은 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편과 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 상기 목적 바이러스가 코로나 바이러스인 경우, 상기 제2 목적 바이러스는 상기 목적 바이러스와 동일한 코로나 바이러스일 수도 있고, 상기 목적 바이러스와 상이한 RSV일 수 있으며, 상기 목적 단백질이 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질 또는 이의 단편인 경우, 제2 목적 단백질은 상기 목적 단백질과 동일한 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질 또는 이의 단편일 수 있으며, 상기 목적 단백질과 상이한 RSV의 융합 당단백질, MERS-CoV의 스파이크 단백질 등일 수 있다.

[0082] 일 구체예에 있어서, 상기 RNA는 알파 바이러스의 비구조 단백질을 코딩하는 RNA 및 목적 단백질을 코딩하는 RNA를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 RNA는 알파 바이러스의 RNA 의존적 RNA 중합효소를 코딩하는 RNA 및 목적 단백질을 코딩하는 RNA를 포함할 수 있다.

[0083] 일 구체예에 있어서, 상기 목적 단백질을 코딩하는 RNA는 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA, 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA 및 목적 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이며, 상기 세포는 목적 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질 또는 이의 단편을 발현하도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다. 구체적으로 상기 RNA는 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 스파이크 단백질을 코딩하는 RNA, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 외피 단백질을 코딩하는 RNA, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 막 단백질을 코딩하는 RNA 및 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 패키징 신호 관련 단백질을 코딩하는 RNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이며, 상기 세포는 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질을 발현하도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 RNA는 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 스파이크 단백질을 코딩하는 RNA, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 외피 단백질을 코딩하는 RNA, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 막 단백질을 코딩하는 RNA 및 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 패키징 신호 관련 단백질을 코딩하는 RNA일 수 있다.

[0084] 상기 용어 "유전적으로 조작"은 세포에 대하여 하나 이상의 유전적 변형(genetic modification)을 도입하는 행위 또는 그에 의하여 만들어진 세포를 나타낸다. 예를 들어, 상기 유전적으로 조작된 세포는 상기 호흡기 질환 유발 바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 도입되어, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질을 생성 또는 발현할 수 있다.

[0085] 일 양상의 방법에 따르면, 알파바이러스의 RNA 의존적 RNA 중합효소(RdRp)를 코딩하는 유전자, 목적 단백질(스파이크 단백질, 외피 단백질, 막 단백질 및 패키징 신호 관련 단백질)을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 발현하는 RNA, 즉, saRNA가 세포에 도입된다. 상기 saRNA는 상기 세포 내에서 RdRp를 통하여 자가 증폭하고, 바이러스의 구조 단백질인 스파이크, 외피 및 막 단백질을 발현한 후, 패키징 신호에 의하여 바이러스 입자의 형태로 조립되어 내부에 saRNA를 포함하는 VLP가 형성된다. 따라서, 상기 세포에서 제조된 saRNA를 포함하는 VLP는 상기 saRNA 내에 바이러스의 뉴클레오캡시드를 코딩하는 서열이 포함되지 않는 바, 단회 감염 후, 재감염이 일어나지 않아 안전성이 현저히 높다.

[0086] 일 구체예에 있어서, 상기 바이러스 유사 입자 제조용 세포의 제조방법은 상기 RNA를 세포에 도입하는 단계 이전에 상기 벡터를 선형화(linearization)하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0087] 일 구체예에 있어서, 상기 바이러스 유사 입자 제조용 세포의 제조방법은 상기 선형화하는 단계 이후 및 RNA를 세포에 도입하는 단계 이전에 선형화된 벡터를 RNA로 전사하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0088] 상기 선형화(linearization)는 상기 환형(circular), 닉형(nick form) 벡터를 물리적, 화학적 또는 생물학적 방법을 통하여 절단하여 양 끝이 존재하는 형태로 변화시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 화학 물질 또는 제한 효소를 처리하는 방법, 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 통하여 선형화 하는 방법이 포함될 수 있다. 상기 제한 효소를 처리하는 방법의 경우, 상기 제한 효소는 SpeI, NheI, BamHI, EcoRI, HindIII, kpnI, NotI, PstI, SmaI, XhoI, FokI, Alw26I, BbvI, BsrI, EarI, HphI, MboI, SfaNI, Tth111I, NeaI, NgoMIV, Eco57I, BcgI, BpI, Bsp24I, BaeI, CjeI, EcoPI, StyLTI, Bal31, T4, T7, RecBCD, P25736I, P09030II, P1, DnaseI, Endo R, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, Cas3, Cas3-HD, Cas5, Cas7, Cas8, Cas10 등 일 수 있으며, 구체적으로 상기 제한 효소는 SpeI일 수 있다.

[0089] 일 구체예에 있어서, 상기 세포는 미생물, 동물세포 또는 식물세포일 수 있다. 구체적으로, 효모, 곰팡이, 원생동물(protozoa)과 같은 미생물의 세포, 식물의 세포, 곤충 또는 양서류의 세포 또는 BHK21, Vero, CHO, HeLa, HEK293 및 COS-1과 같은 포유 동물의 세포일 수 있다.

[0090] 일 실시예에서는 상기 벡터를 통하여 제조된 saRNA를 포함하는 VLP는 비정형의 구조를 가지며, 상기 뉴클레오캡시드를 발현하는 세포주를 사용하여 제조되었을 때, 백신 접종을 위한 충분한 양의 VLP가 생성됨을 확인하였으며, 상기 VLP를 2D 및 3D 세포주에 접종하였을 때, 세포 내에 VLP를 구성하는 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질이 발현됨을 확인하여 VLP의 감염능을 확인하였다. 또한, 상기 VLP의 경우, 접종 48시간 경과 후에는 VLP의 형태가 현미경 사진 상 확인되지 않아, 재감염되지 않는 안전성이 우수한 형태임을 확인하였다(실시예 2 및 3 참조).

[0091] 또한, 다른 실시예에서는 saRNA를 포함하는 VLP 제조용 벡터를 추가 항원(루시퍼라제)를 발현하는 벡터와 함께

세포에 도입하였을 때, 제조된 VLP 내에 saRNA 뿐만 아니라 상기 추가 항원을 코딩하는 RNA가 함께 패키징되어 추가 항원도 함께 전달할 수 있는 VLP가 제조 가능함을 확인하였고, 이를 통해 추가 항원을 상기 VLP를 통하여 함께 전달하는 경우, VLP 내부에 포집된 saRNA의 발현에 간섭 없이 상기 추가 항원의 발현 또한 증진 가능함을 확인하였다(실시예 5 참조).

[0092] 일 양상에 따르면, 상기 VLP 제조용 세포의 제조방법에 따라 제조된 세포는 안정적으로 VLP를 대량 생산할 수 있으며, 세포 자체에서 호흡기 질환 유발 바이러스의 뉴클레오캡시드를 발현하므로, 상기 세포에서 생산된 saRNA를 포함하는 VLP는 다른 세포를 감염시킨 후에는 추가 증식하지 않아 안전성이 현저하게 우수한 VLP를 제조할 수 있다.

[0094] 또 다른 양상은 상기 바이러스 유사 입자 제조용 세포의 제조방법으로 제조된 바이러스 유사 입자 제조용 세포를 제공한다. 구체적으로 상기 벡터가 발현하는 RNA를 세포에 도입하는 단계를 포함하는 바이러스 유사 입자(virus like particle, VLP) 제조용 세포의 제조방법으로 제조된 바이러스 유사 입자 제조용 세포를 제공한다.

[0095] 상기 "벡터", "유전자", "비구조 단백질", "단백질", "호흡기 질환 유발 바이러스", "구조 단백질", "RNA", "도입" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0096] 일 구체예에 있어서, 상기 목적 단백질을 코딩하는 RNA는 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA, 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA 및 목적 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이며, 상기 세포는 목적 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질 또는 이의 단편을 발현하도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다. 구체적으로 상기 RNA는 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 스파이크 단백질을 코딩하는 RNA, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 외피 단백질을 코딩하는 RNA, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 막 단백질을 코딩하는 RNA 및 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 패키징 신호 관련 단백질을 코딩하는 RNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이며, 상기 세포는 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 뉴클레오캡시드 단백질을 발현하도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 RNA는 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 스파이크 단백질을 코딩하는 RNA, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 외피 단백질을 코딩하는 RNA, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 막 단백질을 코딩하는 RNA 및 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 패키징 신호 관련 단백질을 코딩하는 RNA일 수 있다.

[0097] 일 구체예에 있어서, 상기 세포는 미생물, 동물세포 또는 식물세포일 수 있다. 구체적으로, 효모, 곰팡이, 원생동물(protozoa)과 같은 미생물의 세포, 식물의 세포, 곤충 또는 양서류의 세포 또는 BHK21, Vero, CHO, HeLa, HEK293 및 COS-1과 같은 포유 동물의 세포일 수 있다.

[0098] 일 양상에 따르면, 상기 VLP 제조용 세포의 제조방법에 따라 제조된 세포는 안정적으로 VLP를 대량 생산, 즉, 백신으로 접종 가능한 양의 VLP를 효율적으로 생산할 수 있으며, 세포 자체에서 바이러스의 뉴클레오캡시드를 발현하므로, 상기 벡터가 발현하는 saRNA는 바이러스의 뉴클레오캡시드를 코딩하는 서열을 포함하지 않아, 상기 세포에서 생산된 saRNA를 포함하는 VLP는 다른 세포를 감염시킨 후에는 추가 증식하지 않으므로, 현저하게 우수한 안전성을 나타내는 VLP를 제조할 수 있다.

[0100] 또 다른 양상은 상기 바이러스 유사 입자 제조용 세포를 배양하는 단계를 포함하는 바이러스 유사 입자의 제조방법을 제공한다. 구체적으로, 상기 벡터가 발현하는 RNA를 세포에 도입하는 단계를 포함하는 바이러스 유사 입자(virus like particle, VLP) 제조용 세포의 제조방법으로 제조된 상기 바이러스 유사 입자 제조용 세포를 배양하는 단계를 포함하는 바이러스 유사 입자의 제조방법을 제공한다.

[0101] 상기 "벡터", "유전자", "비구조 단백질", "단백질", "호흡기 질환 유발 바이러스", "구조 단백질", "RNA", "도입" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0102] 일 양상의 제조방법에 따르면, 상기 바이러스 유사 입자 제조용 세포를 배양하는 경우, 상기 벡터가 발현하는 상기 RNA가 RNA 의존적 RNA 중합효소에 의하여 복제되고, 상기 RNA가 코딩하는 단백질이 발현되어 상기 RNA가 내부에 패키징되어 있는 형태의 VLP가 다량 생산된다.

[0103] 일 구체예에 있어서, 상기 바이러스 유사 입자의 제조방법은 상기 세포의 세포막을 파괴하는 단계를 더 포함할

수 있다.

[0104] 구체적으로, 상기 바이러스 유사 입자의 제조방법에서 상기 세포막을 파괴하는 단계는 세포 내에 생산된 바이러스 유사 입자를 회수하기 위하여 상기 세포의 세포막을 용해(lysate)하는 것을 포함한다. 구체적으로 물리적, 화학적 또는 생물학적 방법, 예를 들어, 초음파 파쇄, 교반 파쇄, 균질기 파쇄, 냉동-해동 반복, 삼투압 쇼크, 용해 효소 사용, 유기 용매 사용, 계면 활성제 사용 또는 이들의 조합 등의 방법으로 수행될 수 있다.

[0105] 상기 바이러스 유사 입자의 제조방법이 상기 세포막을 파괴하는 단계를 더 포함하는 경우, 상기 VLP의 제조방법에 따르면, 현저하게 높은 수율로 VLP를 제조할 수 있다.

[0106] 일 구체예에 있어서, 상기 바이러스 유사 입자의 제조방법은 상기 세포의 세포막을 파괴하는 단계 이후에 정제하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0107] 구체적으로, 상기 "정제"는 상기 제조된 바이러스 유사 입자와 함께 존재하는 불순물들을 제거하고, 바이러스 유사 입자만 존재할 수 있도록 순도를 높이는 방법을 의미한다. 예를 들어, 상기 정제는 필터, 한외여과, 원심분리, 크로마토그래피 또는 이들의 조합 등의 방법으로 수행될 수 있다.

[0108] 구체적으로, 상기 바이러스 유사 입자의 제조방법이 상기 정제하는 단계를 더 포함하는 경우, 상기 VLP의 제조방법에 따르면, 현저하게 높은 순도로 VLP를 생산할 수 있다.

[0109] 일 양상에 따라 제조된 바이러스 유사 입자(VLP)는 내부에 saRNA를 포함하며, 외부 형태는 호흡기 질환 유발 바이러스의 구조를 나타내므로, 호흡기 질환 유발 바이러스의 감염 경로인 점막을 통하여 상기 VLP를 투여 가능하고, 내부의 saRNA가 자가 증폭하여 단회 투여로 면역을 일으킬 수 있는 충분한 양의 항원을 생산할 수 있다. 상기 VLP는 점막 투여를 통하여 점막 면역 및 전신 면역을 유도하여 근육 내 투여 경로 대비 현저히 우수한 면역반응을 일으킨다. 또한, saRNA는 뉴클레오캡시드를 코딩하는 서열을 포함하지 않으므로, 추가적인 증식이 일어나지 않아 안전성 또한 현저히 우수하다.

[0110] 따라서, 상기 제조된 바이러스 유사 입자(VLP)는 점막 투여가 가능하며, 투여 이후, 추가 증식 없이 단회 투여만으로 면역(점막 면역 및 전신 면역) 반응을 유도하여 빠른 시간 내에 항체를 생산할 수 있으므로, 상기 VLP를 백신에 적용할 경우, 근육 내 투여 백신 대비 면역원성 및 안전성이 현저하게 우수한 백신을 제조할 수 있다.

[0112] 또 다른 양상은 상기 바이러스 유사 입자의 제조방법으로 제조된 바이러스 유사 입자를 제공한다. 구체적으로, 상기 바이러스 유사 입자의 제조방법은 상기 벡터가 발현하는 RNA를 세포에 도입하는 단계를 포함하는 바이러스 유사 입자 제조용 세포의 제조방법으로 제조된 상기 바이러스 유사 입자 제조용 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 상기 벡터는 알파 바이러스(alphavirus)의 비구조 단백질을 코딩하는 유전자 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다.

[0113] 상기 "벡터", "유전자", "비구조 단백질", "단백질", "호흡기 질환 유발 바이러스", "구조 단백질", "RNA", "도입", "바이러스 유사 입자" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0114] 일 구체예에 있어서, 상기 목적 단백질은 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편일 수 있으며, 구체적으로 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편 및 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로, 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편 및 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편일 수 있으며, 보다 더 구체적으로 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편, 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편 및 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편일 수 있다.

[0115] 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편은 하나 이상의 목적 바이러스 유래의 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 구체적으로, 하나 이상의 호흡기 질환 유발 바이러스에서 유래된 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 예를 들어, 상기 목적 단백질은 2개의 서로 다른 바이러스 유래의 단백질(RSV의 융합 당단백질 및 SARS-CoV-2의 막 및 외피 단백질), 2개의 서로 다른 바이러스 변이체 유래의 단백질(MERS-CoV의 스파이크 단백질 및 SARS-CoV-2의 막 및 외피 단백질; MERS-CoV 및 SARS-CoV-2의 키메릭 스파이크 단백질 및 SARS-CoV-2의 막 및 외피 단백질) 등일 수 있다.

[0116] 일 구체예에 있어서, 상기 RNA는 상기 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편, 상기 목적 바이러

스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편 및 상기 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편으로 패키징(packaging)된 것일 수 있다.

[0117] 일 구체예에 있어서, 상기 RNA는 알파 바이러스의 비구조 단백질을 코딩하는 RNA 및 목적 단백질을 코딩하는 RNA를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 RNA는 알파 바이러스의 RNA 의존적 RNA 중합효소를 코딩하는 RNA 및 목적 단백질을 코딩하는 RNA를 포함할 수 있다.

[0118] 일 구체예에 있어서, 상기 목적 단백질을 코딩하는 RNA는 목적 바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA, 목적 바이러스 유래 외피 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA, 목적 바이러스 유래 막 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA 및 목적 바이러스 유래 패키징 신호(packaging signal) 관련 단백질 또는 이의 단편을 코딩하는 RNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 구체적으로 상기 RNA는 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 스파이크 단백질을 코딩하는 RNA, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 외피 단백질을 코딩하는 RNA, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 막 단백질을 코딩하는 RNA 및 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 패키징 신호 관련 단백질을 코딩하는 RNA로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 RNA는 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 스파이크 단백질을 코딩하는 RNA, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 외피 단백질을 코딩하는 RNA, 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 막 단백질을 코딩하는 RNA 및 상기 호흡기 질환 유발 바이러스 유래 패키징 신호 관련 단백질을 코딩하는 RNA일 수 있다.

[0119] 일 구체예에 있어서, 상기 바이러스 유사 입자는 목적 바이러스 유래 패키징 신호 관련 단백질을 코딩하는 유전자; 상기 알파 바이러스 유래 폴리뉴클레오티드; 및 제2 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터가 발현하는 RNA를 더 포함할 수 있다.

[0120] 상기 "알파 바이러스 유래 폴리뉴클레오티드"는 RNA 서열로 전사되지 않거나, 전사된다 하더라도 단백질로 번역되지 않는 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 예를 들어, 비전사영역, 비번역부위, 유전자 간 영역(intergenic region), 조절 서열 등을 포함하며, 구체적으로, 3'-UTR 서열, 5'-UTR 서열, 폴리(A) 테일 서열, 인트론, 센트로미어, 텔로미어, 복제 개시점(Ori), 프로모터, 인핸서, 사일런서 등을 포함한다.

[0121] 상기 "제2 목적 단백질"은 제2 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 상기 제2 목적 바이러스는 상기 목적 바이러스와 동일하거나 상이할 수 있고, 상기 제2 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편은 상기 목적 바이러스 유래 단백질 또는 이의 단편과 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 상기 목적 바이러스가 코로나 바이러스인 경우, 상기 제2 목적 바이러스는 상기 목적 바이러스와 동일한 코로나 바이러스일 수도 있고, 상기 목적 바이러스와 상이한 RSV일 수 있으며, 상기 목적 단백질이 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질 또는 이의 단편인 경우, 제2 목적 단백질은 상기 목적 단백질과 동일한 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질 또는 이의 단편일 수 있으며, 상기 목적 단백질과 상이한 RSV의 융합 당단백질, MERS-CoV의 스파이크 단백질 등일 수 있다.

[0122] 상기 바이러스 유사 입자는 복강 내, 점막 내, 근육 내, 진피 내, 피하, 정맥 내, 직장 내, 폐 내, 경막 내, 경구, 경피 또는 비강 내로 투여하기 위한 것일 수 있으며, 구체적으로는 점막 내 또는 비강 내 투여하기 위한 것일 수 있다.

[0123] 일 구체예에 있어서, 상기 바이러스 유사 입자는 점막 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0124] 용어 "점막"은 피부 중 점액선을 가진 체내 상피 세포들로, 신체의 여러 관강의 내부 벽을 이루는 조직이다. 예를 들어, 점막은 코 점막, 비강 점막, 구강 내 점막, 눈 점막, 귀 점막, 생식기 점막, 인후 점막, 인두 점막, 기도 점막, 기관지 점막, 폐 점막, 위 점막, 장관 점막, 직장 점막 등일 수 있다.

[0125] 용어 "점막 면역 반응"은 점막에서 유도되는 면역 반응을 나타낸다. 예를 들어, 점막 면역 반응은 항원-특이적 면역글로불린 G(IgG) 및 그의 서브클래스, 면역글로불린 A(IgA) 및 그의 서브클래스, 면역글로불린 M(IgM) 및 그의 서브클래스 및 면역화된 항원에 대한 세포 매개 면역을 포함한다.

[0126] 일 구체예에 있어서, 상기 바이러스 유사 입자는 점막 표면에서 세포성(cellular) 면역 반응 및 체액성(humoral) 면역 반응으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 유도할 수 있으며, 구체적으로는 세포성 면역 반응 및 체액성 면역 반응을 모두 유도할 수 있다.

[0127] 일 구체예에 있어서, 상기 바이러스 유사 입자는 국소(local) 면역 반응 및 전신(systemic) 면역 반응으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 유도할 수 있으며, 구체적으로는 국소 면역 반응 및 전신 면역 반응 모두를 유도할 수 있다.

[0128] 일 양상에 따른 바이러스 유사 입자는 상기 점막 내 또는 비강 내 투여 가능한 제형의 백신으로 점막 표면에 항

원 특이적 IgA를 생산하는 점막면역반응을 유도할 뿐만 아니라 전신면역반응도 동시에 유도하여 기존의 근육 내 투여 백신 대비 현저하게 우수한 면역 반응을 일으키며, 빠른 면역 반응을 유도할 수 있다. 또한, 주사 바늘을 통하여 백신 접종이 이루어지지 않으므로, 통증이나 거부감이 없으며, 안전하고 쉽게 투여 가능하다. 구체적으로, 상기 바이러스 유사 입자를 비강 내 투여하는 경우, 감염이 숙주의 상기도 및/또는 하기도 점막 표면을 통하여 이루어지는 바이러스에 대하여 신속하고, 증강된 면역 반응을 일으킬 수 있다.

[0129] 일 구체예에 있어서, 상기 점막 면역 반응은 점막에서 항원 특이적 IgA 및 IgG로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 발현하는 것일 수 있으며, 구체적으로, 점막에서 항원 특이적 IgA 및 IgG를 발현하는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 점막에서 항원 특이적 IgA를 발현하는 것일 수 있다.

[0130] 상기 바이러스 유사 입자를 상기 호흡기 질환 유발 바이러스의 1차 감염 경로인 점막을 통하여 투여하는 경우, 점막 면역 반응을 통해 항원 특이적 IgA가 발현되며, 빠르게 전신 면역이 이루어져 근육 내 주사 등을 통하여 투여가 이루어지는 경우 대비 현저하게 우수한 면역 반응을 나타내므로, 상기 바이러스 유사 입자가 포함된 백신의 접종 효율을 증가시킨다.

[0131] 일 양상에 따라 제조된 바이러스 유사 입자는 내부에 saRNA를 포함하며, 외부 형태는 호흡기 질환 유발 바이러스의 구조를 나타내므로, 호흡기 질환 유발 바이러스의 감염 경로인 점막을 통하여 개체를 감염시킬 수 있고, 내부의 saRNA가 자가 증폭하여 단회 투여로 면역을 일으킬 수 있는 충분한 양의 항원을 생산할 수 있다. 또한, saRNA는 뉴클레오캡시드를 포함하지 않으므로, 추가적인 증식은 일어나지 않아 안전성 또한 현저히 우수하다.

[0132] 따라서, 상기 제조된 바이러스 유사 입자(VLP)는 점막 투여가 가능하며, 투여 이후, 추가 증식 없이 단회 투여만으로 면역(점막 면역 및 전신 면역) 반응을 유도하여 빠른 시간 내에 항체를 생산할 수 있으므로, 상기 VLP를 백신에 적용할 경우, 근육 내 투여 백신 대비 면역원성 및 안전성이 현저하게 우수한 백신을 제조할 수 있다.

[0134] 또 다른 양상은 상기 바이러스 유사 입자를 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공한다.

[0135] 상기 "벡터", "유전자", "비구조 단백질", "단백질", "호흡기 질환 유발 바이러스", "구조 단백질", "RNA", "도입". "바이러스 유사 입자", "점막", 점막 면역 반응" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0136] 용어 "백신"은 생체 내에 면역을 유도하는 항원을 포함한 생물학적 제제로서, 감염증의 예방 또는 치료를 위하여 개체에 투여함으로써 생체에 면역이 생기게 하는 면역원 또는 항원성 물질을 의미한다.

[0137] 용어 "예방"은 일 양상에 따른 백신 조성물의 투여에 의해 개체의 호흡기 질환을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0138] 용어 "치료"는 일 양상에 따른 백신 조성물의 투여에 의해 개체의 호흡기 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0139] 상기 백신 조성물은 하나 이상의 면역학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하여 제공될 수 있다.

[0140] 구체적으로, 상기 담체, 부형제 또는 희석제는 예를 들어, 글루코스, 락토즈, 덱스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등일 수 있다.

[0141] 일 구체예에 있어서, 상기 백신 조성물은 면역증강제(adjuvant)를 더 포함할 수 있다. 상기 면역증강제는 알루미늄 하이드록사이드(Aluminum Hydroxide, $Al(OH)_3$), 알루미늄 포스페이트(Aluminium phosphate, $AlPO_4$), 알룸(포타슘알루미늄 설페이트), MF59, virosome, AS04[알루미늄 하이드록사이드 및 모노포스포릴 리피드 A(MPL)의 혼합물], AS03(DL-α-tocopherol, squalene 및 유화제인 polysorbate 80의 혼합물), CpG, Flagellin, Poly I:C, AS01, AS02, ISCOMs 또는 ISCOMMATRIX 등이 사용될 수 있다.

[0142] 일 구체예에 있어서, 상기 면역증강제는 백신 조성물 내에 10 내지 70 v/v%로 포함될 수 있고, 구체적으로는 30 내지 70 v/v% 보다 구체적으로는 50 내지 70 v/v%로 포함될 수 있다. 예를 들어, 50 내지 70 v/v%, 50 내지 65 v/v%, 50 내지 60 v/v%, 50 내지 55 v/v%, 55 내지 70 v/v%, 55 내지 65 v/v%, 55 내지 60 v/v%, 60 내지 70 v/v%, 60 내지 65 v/v% 또는 65 내지 70 v/v%으로 포함될 수 있다.

[0143] 상기 백신 조성물은 복강 내, 점막 내, 근육 내, 진피 내, 피하, 정맥 내, 직장 내, 폐 내, 경막 내, 경구, 경피 또는 비강 내로 투여하기 위한 것일 수 있으며, 구체적으로는 점막 내 또는 비강 내 투여하기 위한 것일 수 있다.

[0144] 일 양상에 따른 백신 조성물은 상기 점막 내 또는 비강 내 투여 가능한 제형의 백신으로 점막 표면에 항원 특이적 IgA를 생산하는 점막면역반응을 유도할 뿐만 아니라 전신면역반응도 동시에 유도하여 기존의 근육 내 투여 백신 대비 현저하게 우수한 면역 반응을 일으키며, 빠른 면역 반응을 유도할 수 있다. 또한, 주사 바늘을 통하여 백신 접종이 이루어지지 않으므로, 통증이나 거부감이 없으며, 안전하고 쉽게 투여 가능하다. 구체적으로, 상기 백신 조성물을 비강 내 투여하는 경우, 감염이 숙주의 상기도 및/또는 하기도 점막 표면을 통하여 이루어지는 바이러스에 대하여 신속하고, 증강된 면역 반응을 일으킬 수 있다.

[0145] 상기 백신 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 드립(drip) 또는 스프레이 등의 비강용 제형 그리고 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 통상적으로 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다.

[0146] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 글루코스, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 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, 동결건조제제가 포함된다. 비수용성제제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 비강 내 투여를 위한 제제에 적합한 침투제는 일반적으로 당업자에게 공지되어 있으며, 적합한 제형은 안정성과 순응도를 위해 무균, 등장 및 완충되도록 제형화될 수 있다. 비강내 투여를 위한 제제는 또한 정상적인 섬모 작용을 유지시키기 위해 점액 분비를 여러 측면에서 자극하도록 제조되며, pH 5.5 내지 6.5를 유지하며, 항미생물 방부제 및 적합한 안정화제를 포함할 수 있다.

[0147] 일 구체예에 있어서, 상기 호흡기 질환은 코로나 바이러스 감염증, 인간호흡기세포융합바이러스 감염증, 아데노바이러스 감염증, 인플루엔자 바이러스 감염증, 리노 바이러스 감염증, 엔테로 바이러스 감염증, 보카 바이러스 감염증, 파라인플루엔자 바이러스 감염증, 메타뉴모 바이러스 감염증, 엡스타인바 바이러스 감염증, 거대세포 바이러스 감염증, 단순포진 바이러스 감염증, 홍역 바이러스 감염증 및 수두대상포진 바이러스 감염증으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 바이러스 감염증일 수 있다.

[0148] 상기 백신 조성물은 면역학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어, "면역학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 투여는 하루에 한 번 투여되는 것일 수도 있고, 수 회 나누어 투여되는 것일 수도 있다. 예를 들어, 상기 백신 조성물을 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회 또는 그 이상 투여할 수 있으며, 투여는 약 1주 내지 16주 간격, 약 1주 내지 12주 간격, 약 1주 내지 8주 간격 또는 약 1주 내지 4주 간격일 수 있다. 상기 백신 조성물이 표적으로 하는 바이러스에 의해 2차 또는 그 이상 감염되는 경우, 정기적으로 재투여할 수 있다.

[0149] 상기 용어 "투여"란 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, "개체"란 호흡기 질환을 보유할 수 있는 인간을 포함하는 쥐, 생쥐, 돼지, 말, 소, 가축 등의 모든 생물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함하는 포유동물일 수 있다.

[0150] 상기 백신 조성물의 1회 투여량은 0.1 μL 내지 0.6 mL일 수 있고, 구체적으로는 10 μL 내지 0.6 mL, 보다 구체적으로는 30 μL 내지 0.6 mL 일 수 있다.

[0151] 상기 백신 조성물은 상기 백신 조성물의 1회 투여량 내 상기 바이러스 유사 입자를 5 ㎍ 내지 5000 ㎍, 5 ㎍ 내지 2500 ㎍, 5 ㎍ 내지 1000 ㎍, 5 ㎍ 내지 500 ㎍, 5 ㎍ 내지 250 ㎍, 5 ㎍ 내지 100 ㎍, 5 ㎍ 내지 50 ㎍, 50 ㎍ 내지 5000 ㎍, 50 ㎍ 내지 2500 ㎍, 50 ㎍ 내지 1000 ㎍, 50 ㎍ 내지 500 ㎍, 50 ㎍ 내지 250 ㎍, 50 ㎍ 내지 100 ㎍, 100 ㎍ 내지 5000 ㎍, 100 ㎍ 내지 2500 ㎍, 100 ㎍ 내지 1000 ㎍, 100 ㎍ 내지 500 ㎍, 100 ㎍

내지 250 ㎍, 250 ㎍ 내지 5000 ㎍, 250 ㎍ 내지 2500 ㎍, 250 ㎍ 내지 1000 ㎍, 250 ㎍ 내지 500 ㎍, 500 ㎍ 내지 5000 ㎍, 500 ㎍ 내지 2500 ㎍, 500 ㎍ 내지 1000 ㎍, 1000 ㎍ 내지 5000 ㎍, 1000 ㎍ 내지 2500 ㎍ 또는 2500 ㎍ 내지 5000 ㎍으로 포함할 수 있다.

[0152] 상기 백신 조성물은 부스터(booster) 백신으로 투여될 수 있다. "부스터"는 백신에 의한 예방접종 시 첫번째 항원 자극 이후에 접종되는 두번째 항원 자극을 나타내며, 항체가 생성될 때, 첫번째 항원 자극 후에 나타나는 반응에 비해서 두번째 항원 자극에 의해 보다 빠르고, 높은 항체 생성율을 달성하게 된다. 상기 "부스터 백신"은 상기 백신 조성물의 1차 또는 2차 접종 후 접종되며, 예를 들어 3차 접종에 해당할 수 있으며 1차 접종 이후 회차인, 면역 증강 효과를 나타낼 수 있는 접종을 넓게 의미한다.

[0153] 일 구체예에 있어서, 상기 호흡기 질환은 호흡기 염증성 폐 질환, 만성 폐쇄성 폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD), 부비강염, 알레르기성 비염, 하기도 감염증, 기관염, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 폐기종, 폐렴, 천식, 기관지 확장증, 폐기종, 폐결핵, 급성 호흡곤란 증후군, 미만성 간질성 폐질환, 낭포성 섬유증, 중이염, 모세기관지염 및 폐섬유증으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0154] 일 구체예에 있어서, 상기 백신 조성물은 점막 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0155] 일 구체예에 있어서, 상기 백신 조성물은 점막 표면에서 세포성(cellular) 면역 반응 및 체액성(humoral) 면역 반응으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 유도할 수 있으며, 구체적으로는 세포성 면역 반응 및 체액성 면역 반응을 모두 유도할 수 있다.

[0156] 일 구체예에 있어서, 상기 백신 조성물은 국소(local) 면역 반응 및 전신(systemic) 면역 반응으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 유도할 수 있으며, 구체적으로는 국소 면역 반응 및 전신 면역 반응 모두를 유도할 수 있다.

[0157] 일 구체예에 있어서, 상기 점막 면역 반응은 점막에서 항원 특이적 IgA 및 IgG로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 발현하는 것일 수 있으며, 구체적으로, 점막에서 항원 특이적 IgA 및 IgG를 발현하는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 점막에서 항원 특이적 IgA를 발현하는 것일 수 있다.

[0158] 상기 백신 조성물을 상기 호흡기 질환 유발 바이러스의 1차 감염 경로인 점막을 통하여 투여하는 경우, 점막 면역 반응을 통해 항원 특이적 IgA가 발현되며, 빠르게 전신 면역이 이루어져 근육 내 주사 등을 통하여 투여가 이루어지는 경우 대비 현저하게 우수한 면역 반응을 나타내므로, 백신의 접종 효율을 증가시킨다.

[0159] 일 실시예에서는 saRNA를 포함하는 VLP를 마우스에 비강 투여한 경우, IgG 및 점막 면역 항체인 IgA 역가가 현저히 높게 나타났으며, 중화항체 역가, INF-γ의 분비, INF-α 및 INF-β 유전자의 발현 및 T세포 수 또한 대조군, 근육 내 투여군 및 LNP 비강 투여군 대비 현저히 우수하게 나타났다.

[0160] 또한, 백신 접종 후, 바이러스 재감염이 진행되었을 때, 상기 saRNA를 포함하는 VLP를 마우스에 비강 투여한 경우, 마우스의 체중, 생존율, 폐 및 점막 내 존재하는 바이러스의 역가 및 폐 기능이 정상 범위로 회복되었으며, 이는, 근육 내 투여군 및 LNP 비강 투여군 대비 현저히 우수한 수준임을 확인하여, 상기 VLP의 비강 투여가 우수한 면역원성 및 재감염에 대한 방어능을 나타냄을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0161] 일 실시예에서는 상기 벡터 시스템의 경우, SARS-CoV-2의 구조 단백질을 코딩하는 서열 부분을 다른 외래 유전자를 삽입하였을 경우에도 안정적으로 제조가 가능하였으며, 상기 벡터와 함께 추가 항원을 발현하는 벡터를 동시에 세포에 형질감염시켜 saRNA와 함께 추가 항원 RNA를 포함하는 VLP 또한 제조 가능함을 확인하였다. VLP의 수용체 결합 부위를 변경시킨 키메릭 VLP 또한 안정적으로 제조되며, 상기 키메릭 VLP들 또한 현저하게 우수한 면역원성 및 방어능을 나타냄을 확인하여, 상기 벡터 시스템을 다양한 바이러스들에 대한 백신 주형으로 사용하기에 유용함을 확인하였다(실시예 5 참조).

[0162] 일 양상에 따른 상기 백신 조성물은 바이러스의 1차 감염 경로인 점막을 통한 투여가 가능하며, 상기 백신 조성물 내 포함된 VLP 내의 saRNA가 자가 증폭하므로, 단회 투여만으로도 충분한 양의 항체를 생성할 수 있다. 또한, 상기 VLP는 추가적인 증식을 하지 않으므로 안전성이 우수하며, 점막 면역을 유도하므로, 점막 특이적 항체가 생산되어 근육 내 주사 대비 현저히 우수한 면역 반응을 유도한다.

[0164] 또 다른 양상은 상기 바이러스 유사 입자를 포함하는 백신 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 호흡기 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0165] 상기 "벡터", "비구조 단백질", "호흡기 질환 유발 바이러스", "구조 단백질", "RNA", "도입", "바이러스 유사 입자", "투여" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0166] 일 구체예에 있어서, 상기 호흡기 질환은 코로나 바이러스, 인간호흡기세포융합바이러스, 아데노 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 리노 바이러스, 엔테로 바이러스, 보카 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 메타뉴모 바이러스, 엡스타인바 바이러스, 거대세포 바이러스, 단순포진 바이러스, 홍역 바이러스 및 수두대상포진 바이러스로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 바이러스 감염증일 수 있다.

[0167] 상기 투여 단계에서 상기 백신 조성물은 1회에 0.1 μL 내지 0.6 mL로 투여될 수 있고, 구체적으로는 10 μL 내지 0.6 mL, 보다 구체적으로는 30 μL 내지 0.6 mL로 투여될 수 있다.

[0168] 상기 백신 조성물은 상기 백신 조성물의 1회 투여량 내 상기 바이러스 유사 입자를 5 ㎍ 내지 5000 ㎍, 5 ㎍ 내지 2500 ㎍, 5 ㎍ 내지 1000 ㎍, 5 ㎍ 내지 500 ㎍, 5 ㎍ 내지 250 ㎍, 5 ㎍ 내지 100 ㎍, 5 ㎍ 내지 50 ㎍, 50 ㎍ 내지 5000 ㎍, 50 ㎍ 내지 2500 ㎍, 50 ㎍ 내지 1000 ㎍, 50 ㎍ 내지 500 ㎍, 50 ㎍ 내지 250 ㎍, 50 ㎍ 내지 100 ㎍, 100 ㎍ 내지 5000 ㎍, 100 ㎍ 내지 2500 ㎍, 100 ㎍ 내지 1000 ㎍, 100 ㎍ 내지 500 ㎍, 100 ㎍ 내지 250 ㎍, 250 ㎍ 내지 5000 ㎍, 250 ㎍ 내지 2500 ㎍, 250 ㎍ 내지 1000 ㎍, 250 ㎍ 내지 500 ㎍, 500 ㎍ 내지 5000 ㎍, 500 ㎍ 내지 2500 ㎍, 500 ㎍ 내지 1000 ㎍, 1000 ㎍ 내지 5000 ㎍, 1000 ㎍ 내지 2500 ㎍ 또는 2500 ㎍ 내지 5000 ㎍으로 포함할 수 있다.

[0169] 일 양상에 따른 호흡기 질환 예방 또는 치료 방법에 사용되는 상기 백신 조성물은 바이러스의 1차 감염 경로인 점막을 통한 투여가 가능하며, 상기 백신 조성물 내 포함된 VLP 내의 saRNA가 자가 증폭하므로, 단회 투여만으로도 충분한 양의 항체를 생성할 수 있다. 또한, 상기 VLP는 추가적인 증식을 하지 않으므로 안전성이 우수하며, 점막 면역을 유도하므로, 점막 특이적 항체가 생산되어 근육 내 주사 대비 현저히 우수한 면역 반응을 유도한다.

[0171] 또 다른 양상은 상기 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 바이러스 유사 입자의 용도를 제공한다.

[0172] 상기 "벡터", "비구조 단백질", "호흡기 질환 유발 바이러스", "구조 단백질", "RNA", "도입", "바이러스 유사 입자" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0173] 일 구체예에 있어서, 상기 호흡기 질환은 코로나 바이러스, 인간호흡기세포융합바이러스, 아데노 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 리노 바이러스, 엔테로 바이러스, 보카 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 메타뉴모 바이러스, 엡스타인바 바이러스, 거대세포 바이러스, 단순포진 바이러스, 홍역 바이러스 및 수두대상포진 바이러스로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 바이러스 감염증일 수 있다.

[0174] 상기 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약제의 1회 투여량은 0.1 μL 내지 0.6 mL로 투여될 수 있고, 구체적으로는 10 μL 내지 0.6 mL, 보다 구체적으로는 30 μL 내지 0.6 mL로 투여될 수 있다.

[0175] 상기 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약제의 1회 투여량 내 상기 바이러스 유사 입자를 5 ㎍ 내지 5000 ㎍, 5 ㎍ 내지 2500 ㎍, 5 ㎍ 내지 1000 ㎍, 5 ㎍ 내지 500 ㎍, 5 ㎍ 내지 250 ㎍, 5 ㎍ 내지 100 ㎍, 5 ㎍ 내지 50 ㎍, 50 ㎍ 내지 5000 ㎍, 50 ㎍ 내지 2500 ㎍, 50 ㎍ 내지 1000 ㎍, 50 ㎍ 내지 500 ㎍, 50 ㎍ 내지 250 ㎍, 50 ㎍ 내지 100 ㎍, 100 ㎍ 내지 5000 ㎍, 100 ㎍ 내지 2500 ㎍, 100 ㎍ 내지 1000 ㎍, 100 ㎍ 내지 500 ㎍, 100 ㎍ 내지 250 ㎍, 250 ㎍ 내지 5000 ㎍, 250 ㎍ 내지 2500 ㎍, 250 ㎍ 내지 1000 ㎍, 250 ㎍ 내지 500 ㎍, 500 ㎍ 내지 5000 ㎍, 500 ㎍ 내지 2500 ㎍, 500 ㎍ 내지 1000 ㎍, 1000 ㎍ 내지 5000 ㎍, 1000 ㎍ 내지 2500 ㎍ 또는 2500 ㎍ 내지 5000 ㎍으로 포함할 수 있다.

[0176] 일 양상에 따른 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 바이러스 유사 입자는 바이러스의 1차 감염 경로인 점막을 통한 투여가 가능하며, 상기 VLP 내의 saRNA가 자가 증폭하므로, 단회 투여만으로도 충분한 양의 항체를 생성할 수 있다. 또한, 상기 VLP는 추가적인 증식을 하지 않으므로 안전성이 우수하며, 점막 면역을 유도하므로, 점막 특이적 항체가 생산되어 상기 VLP를 근육 내 주사한 경우 대비 현저히 우수한 면역 반응을 유도한다.

발명의 효과

[0178] 바이러스 유사 입자(virus like particle; VLP)를 제조하는 벡터, 상기 벡터로 제조된 VLP 및 이를 포함하는 백신 조성물에 관한 것으로, 상기 벡터는 단일 벡터 시스템으로 헬퍼 벡터 없이 saRNA를 포함하는 VLP를 쉽고, 간편하게 제조 가능하며, 상기 벡터를 통하여 제조된 상기 VLP 및 이를 포함하는 백신 조성물은 바이러스의 1차 감염 경로인 점막을 통한 투여가 가능하며, 상기 VLP 내의 saRNA가 자가 증폭하므로, 단회 투여만으로도 충분한 양의 항체를 생성할 수 있다. 또한, 상기 VLP는 추가적인 증식을 하지 않으므로 안전성이 우수하며, 점막 투여 가능한 형태로서, 점막 면역을 유도하여 근육 내 투여용 치료제 대비 현저히 우수한 호흡기 질환 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0180] 도 1은 기존 mRNA와 자가 증폭 RNA(self-amplifying RNA)가 체내에 접종되었을 때 발현을 나타내는 도이다.

도 2는 saRNA를 포함하는 VLP 제조를 위한 벡터, 벡터가 발현하는 RNA 및 제조된 VLP의 구조를 나타내는 도이다.

도 3은 saRNA를 포함하는 VLP 제조를 위한 벡터의 구성을 나타내는 도이다.

도 4는 SARS-CoV-2의 스파이크, 외피, 막, 뉴클레오캡시드를 코딩하는 각 유전자가 삽입된 각각의 벡터가 전사된 RNA들의 웨스턴 블롯 및 SARS-CoV-2의 스파이크, 외피 및 막을 코딩하는 유전자가 삽입된 벡터 및 뉴클레오캡시드를 코딩하는 유전자가 삽입된 벡터가 발현하는 RNA들의 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 벡터를 선형화하여 제조된 RNA를 세포에 형질감염한 후, 생성된 단백질을 면역 형광 어세이를 통하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 형질감염된 세포의 용해물 및 상층액에 대하여 웨스턴 블롯을 수행하여 VLP의 생성 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 HEK 293-N 세포주에서 VLP 생성 여부를 확인한 도이다.

도 8은 SARS-CoV-2의 스파이크, 외피 및 막을 코딩하는 유전자가 삽입된 벡터가 전사된 RNA의 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 saRNA를 HEK 293-N 세포주에 형질감염시킨 후 생성된 단백질은 면역 형광 어세이를 통하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 형질감염된 세포의 용해물 및 상층액에 대하여 웨스턴 블롯을 수행하여 VLP의 생성 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 뉴클레오캡시드를 발현하는 VLP 대량 생산 세포주의 현미경 사진이다.

도 12는 VLP의 구조를 나타내는 TEM 사진이다.

도 13은 VLP의 입자 크기 분포를 나타내는 도이다.

도 14는 BHK-21, HACE2-293T 및 A549-HACE2-TMPRSS2 세포주에서의 VLP 감염능을 확인한 도이다.

도 15는 HACE2-293T 및 A549-HACE2-TMPRSS2 세포주에서의 VLP 감염능을 현미경 사진을 통하여 확인한 도이다.

도 16은 면역 형광 어세이를 통하여 인간 기관지 상피세포에 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질의 발현을 확인한 도이다.

도 17은 ISH를 통하여 인간 기관지 상피세포에 SARS-CoV-2의 스파이크 유전자가 발현되었음을 확인한 도이다.

도 18은 VLP로 감염시킨 세포의 용해물에 대하여 웨스턴 블롯을 수행한 결과를 나타낸 도이다.

도 19는 VERO E6 세포주에 VLP를 감염시킨 후, 30분 및 48시간 경과 후의 세포의 TEM 사진을 나타낸 도이다.

도 20은 VLP를 비강 접종한 후, 마우스의 폐에서의 SARS-CoV-2의 스파이크 유전자 발현을 확인한 도이다.

도 21은 VLP를 비강 접종한 후, 마우스의 폐에서의 SARS-CoV-2의 막 단백질 발현을 확인한 도이다.

도 22는 BALB/c 마우스에서의 VLP 백신 투여 실험 방법을 도식화한 도이다.

도 23은 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 α-스파이크 RBD IgG 및 α-스파이크 트리머 IgG 역가를 나타낸 도이다.

도 24는 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 α-스파이크 RBD IgA 및 α-스파이크 트리머 IgA 역가를 나타낸 도이다.

도 25는 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 중화항체 역가를 나타낸 도이다.

도 26은 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 INF-γ의 분비량을 나타낸 도이다.

도 27은 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 INF-α 및 INF-β 유전자의 발현량을 나타낸 도이다.

도 28은 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 T세포 수를 나타낸 도이다.

도 29는 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 체중 변화를 나타낸 도이다.

도 30은 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 생존율을 나타낸 도이다.

도 31은 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 폐 내에 존재하는 바이러스의 역가 변화를 나타낸 도이다.

도 32는 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 폐 기능 변화를 나타낸 도이다.

도 33은 hACE2-Tg 마우스에서의 VLP 백신 투여 실험 방법을 도식화한 도이다.

도 34는 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 α-스파이크 RBD IgG 및 α-스파이크 트리머 IgG 역가를 나타낸 도이다.

도 35는 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 α-스파이크 RBD IgA 및 α-스파이크 트리머 IgA 역가를 나타낸 도이다.

도 36은 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 중화항체 역가를 나타낸 도이다.

도 37은 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 INF-γ의 분비량을 나타낸 도이다.

도 38은 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 INF-α 및 INF-β 유전자의 발현량을 나타낸 도이다.

도 39는 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 체중 변화를 나타낸 도이다.

도 40은 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 체중 변화를 나타낸 도이다.

도 41은 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 생존율을 나타낸 도이다.

도 42는 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 폐 및 비강 내에 존재하는 바이러스를 qPCR을 사용하여 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 43는 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 폐 기능 변화를 나타낸 도이다.

도 44는 외래 유전자인 LacZ가 삽입된 벡터의 세포에서의 외래 유전자 단백질 발현을 확인한 도이다.

도 45는 VLP 제조용 벡터 시스템과 함께 추가 항원(luciferase)을 발현하는 벡터를 함께 세포에 도입하는 경우에서의 각 벡터의 구성 및 제조된 VLP 구조를 나타내는 모식도이다.

도 46은 VLP 제조용 벡터 시스템과 함께 추가 항원(luciferase)을 발현하는 벡터를 함께 세포에 도입하였을 때, NSP1, 스파이크 및 루시퍼라제 유전자의 발현량을 나타낸 도이다.

도 47은 VLP 제조용 벡터 시스템과 함께 추가 항원(luciferase)을 발현하는 벡터를 함께 세포에 도입하였을 때, SARS2 JN.1 바이러스에 감염된 마우스 및 감염되지 않은 마우스에서의 추가 항원 발현을 확인한 사진이다.

도 48은 VLP 제조용 벡터 시스템과 함께 추가 항원(luciferase)을 발현하는 벡터를 함께 세포에 도입하였을 때, SARS2 JN.1 바이러스에 감염된 마우스 및 감염되지 않은 마우스에서의 추가 항원 발현을 확인한 그래프이다.

도 49는 SARS-CoV-2 오미크론 BA.1의 스파이크 단백질 중 RBD를 SARS-CoV-2 오미크론 XBB의 RBD로 변경하여 생성된 VLP를 나타낸 도이다.

도 50은 SARS-CoV-2 오미크론 BA.1의 스파이크 단백질 중 RBD를 MERS-CoV의 RBD로 변경하여 생성된 VLP를 나타

낸 도이다.

도 51은 MERS-CoV 키메릭 VLP의 대량 생산용 세포주에서의 제조를 확인한 도이다.

도 52는 VLP 대량 생산용 세포주에서 발현된 MERS-CoV 키메릭 VLP의 외피 및 막 단백질을 발현하는 유전자의 양을 확인한 도이다.

도 53은 BALB/c 마우스에서의 오미크론 XBB.1 키메릭 VLP 백신 투여 실험 방법을 도식화한 도이다.

도 54는 오미크론 XBB.1 키메릭 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 중화항체 역가를 나타낸 도이다.

도 55는 오미크론 XBB.1 키메릭 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 INF-α 및 INF-β 유전자의 발현량을 나타낸 도이다.

도 56은 오미크론 XBB.1 키메릭 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 폐 내에 존재하는 바이러스의 역가 변화를 나타낸 도이다.

도 57은 hACE2-Tg 마우스에서의 오미크론 XBB.1 키메릭 VLP 백신 투여 실험 방법을 도식화한 도이다.

도 58은 오미크론 XBB.1 키메릭 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 중화항체 역가를 나타낸 도이다.

도 59는 오미크론 XBB.1 키메릭 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 INF-α 및 INF-β 유전자의 발현량을 나타낸 도이다.

도 60은 오미크론 XBB.1 키메릭 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 체중 변화를 나타낸 도이다.

도 61은 오미크론 XBB.1 키메릭 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 생존율 변화를 나타낸 도이다.

도 62는 오미크론 XBB.1 키메릭 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 폐 내에 존재하는 바이러스의 역가 변화를 나타낸 도이다.

도 63은 VERO E6 세포주에 대하여 MERS-CoV 키메릭 VLP를 접종하였을 때, 발현된 MERS-CoV의 RBD 단백질을 확인한 도이다.

도 64은 hDPP4 마우스에서의 MERS-CoV 키메릭 VLP 백신 투여 실험 방법을 도식화한 도이다.

도 65는 MERS-CoV 키메릭 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 IgG 역가를 나타낸 도이다.

도 66은 MERS-CoV 키메릭 VLP 백신 접종 후, 마우스에서의 중화항체 역가를 나타낸 도이다.

도 67은 MERS-CoV 키메릭 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 체중 변화를 나타낸 도이다.

도 68은 MERS-CoV 키메릭 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 생존율을 나타낸 도이다.

도 69는 MERS-CoV 키메릭 VLP 백신 접종 후, 바이러스로 재감염시킨 이후의 마우스의 폐 내에 존재하는 바이러스의 역가 변화를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0181] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0183] **참조예**

[0184] **<참조예 1> SARS-CoV-2 VLP 감염**

[0185] VERO E6, HEK-293T, A549-HACE2-TMPRSS2 및 BHK-21 세포에 20배 희석한 VLP(SARS-CoV-2 또는 MERS)를 감염시키고, 1시간 후 2% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교체한 뒤 48시간 동안 유지하였다. 감염 후 48시간(hours post infection, hpi) 경과 시점에 세포를 따뜻한 PBS로 3번 세척하고, 세포 용해물 및 상층액에서 바이러스 및 숙주 RNA를 Maxwell RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit(Promega, WI)를 사용하여 추출하였다.

[0187] **<참조예 2> 정량적 RT-PCR(Quantitative RT-PCR)**

[0188] RNA 수율은 RT-qPCR 분석을 통하여 평가하였다. 구체적으로, cDNA는 StepOnePlus Real-Time PCR 시스템(QuantStudio 5; Thermo Fisher Scientific)에서 1× One Step TB Green PrimeScript RT-PCR 키트(Takara)를 포함하는 반응 혼합물에서 모든 바이러스 전사체(N 앰플리콘)에 공통적인 내부 바이러스 서열 또는 하위 게놈 N mRNA를 특이적으로 표적하는 프라이머의 존재 하에 증폭되었다. 반응은 42 ℃에서 5분, 95 ℃에서 10초, 그 다음 95 ℃에서 5초, 60 ℃에서 30초를 40 사이클 반복하여 수행하였다.

[0190] **<참조예 3> ELISA 및 중화 항체 검사**

[0191] 96웰 NUNC-MaxiSorp 플레이트를 SARS-CoV-2 오미크론 BA.1 RBD(Sinobiological, #40592-V08H121) 또는 전장 스파이크 트리머(Sinobiological, #40589-V08H26)로 4 ℃에서 하룻밤 동안 코팅하고, PBS(pH 7.4)에서 1 μg/mL로 희석하였다. 플레이트를 차단 완충액(5% BSA, 0.05% tween-20이 포함된 PBS)으로 37 ℃에서 1시간 동안 차단하였다. 샘플은 시약 희석제(1% BSA, 0.05% tween-20이 포함된 PBS)로 1:10 희석을 시작으로 하여 연속 희석하였다. 37 ℃에서 2시간 동안 배양한 후 플레이트를 세척 완충액(0.05% tween-20이 포함된 PBS)으로 4번 세척하고, 그 다음 1:20,000 희석된 염소 항-마우스 IgG-HRP(abcam, #ab97023)를 첨가하고 37 ℃에서 1시간 동안 배양하였다.

[0192] 혈청 중화 검사는 DMEM(10% FBS, 1% L-글루타민, 100 U/ml 페니실린-스트렙토마이신 보충)에 용해된 Vero E6 세포를 96웰 플레이트에 웰당 3×10^4 세포의 밀도로 분주하였다. 24시간 후, 혈청을 56 ℃에서 30분 동안 배양하여 불활성화한 다음, DMEM(FBS 불포함, 1% L-글루타민 및 100 U/ml 페니실린-스트렙토마이신 포함)에 1:10으로 희석하고, 96웰 플레이트에서 1:2 희석을 연속하여 수행하였다. 그런 다음 웰당 100 $TCID_{50}$으로 구성된 동량의 SARS-CoV-2를 희석된 혈청에 첨가하였다. 혈청-바이러스 혼합물을 37 ℃에서 1시간 동안 배양한 다음 Vero E6 세포에 첨가하였다. 그 다음 Vero E6 배양 배지를 150 μL의 낮은 혈청 DMEM(2% FBS, 1% L-글루타민, 100 U/ml 페니실린-스트렙토마이신 포함)로 교체하고 37 ℃에서 72시간 동안 배양하여 세포 병변 효과(cytopathic effects)를 관찰하였다.

[0194] **<참조예 4> 동물 실험**

[0195] 동물 실험은 기초과학연구원(IBS-2023-039)의 동물실험윤리위원회의 승인에 따라 수행되었다. SARS-CoV-2 VLP(XBB.1 키메릭 VLP 또는 BA.1 VLP)의 백신으로서의 효능을 조사하기 위해 8 내지 10주령 암컷 BALB/c 또는 hACE2-Tg 마우스를 그룹당 13마리씩 무작위로 나누었으며, MERS VLP의 백신으로서의 효능을 조사하기 위해 8 내지 10주령 암컷 Hddp4 마우스를 그룹당 10마리씩 무작위로 나누었다. 마우스를 마취 후 VLP 또는 PBS를 30 μL 비강 접종하였다.

[0196] SARS-CoV-2 VLP의 경우, 접종 4주 후 마우스에 1 LD_{50}의 Wuhan MA 또는 XBB.1로 30 μL를 비강 접종하고, 약 14일 간 체중 및 생존율을 관찰하였으며 3, 5 및 7 dpi (days post infection)에 그룹별로 2마리씩 안락사한 후 비갑개와 폐 조직을 조직병리학 검사와 qRT-PCR을 위해 수득하였다.

[0197] MERS VLP의 경우, 접종 5주 후 부스팅 MERS VLP를 접종하였으며, 부스팅 접종으로부터 2주 후, 마우스에 10 LD_{50}의 MERS-CoV로 30 μL를 비강 접종하고, 약 14일 간 체중 및 생존율을 관찰하였으며 3, 5 및 7 dpi에 그룹별로 2마리씩 안락사한 후 비갑개와 폐 조직을 조직병리학 검사와 qRT-PCR을 위해 수득하였다.

[0199] **<참조예 5> 폐 조직병리학(Lung histopathology)**

[0200] 면역조직화학(IHC)은 Bond RXm(Leica) 자동화 플랫폼을 사용하여 수행하였다. 구체적으로, 마우스 폐 슬라이드를 탈왁스하고 재수화한 다음, 에피토프 회수 ER2 고-pH 완충액(epitope retrieval ER2 high-pH buffer, Leica)으로 전처리하였다. 내인성 과산화효소는 H_2O_2로 불활성화하고, 비특이적 신호는 마우스 혈청(1/500 희석)으로 차단하였다. 토끼 항-SARS-CoV-2 뉴클레오캡시드(Abcam, #ab271180) 1차 항체는 1:200의 농도로 처리

하였고, 그 다음 과산화효소-접합 항-토끼 IgG(Jackson ImmunoResearch, #111-035-003)를 1:1000 희석하여 처리하였다.

[0201] 면역 반응성은 디아미노벤지딘 크로모겐 반응을 통하여 시각화하였다. 슬라이드는 헤마톡실린으로 대조 염색하고, 에탄올을 사용하여 연속하여 탈수하고 크실렌으로 투명화한 후 영구적으로 마운팅(mount)하였다. 음성 대조군은 1차 항체를 BOND 1차 항체 희석제(Leica, #AR9352)로 대체하여 제조하였다. 40배 확대된 현미경 사진은 Axio Scan Z1을 사용하여 촬영하였다.

[0202] 제자리 부합법(In situ hybridization, ISH)은 제조업체의 지침에 따라 RNAscope 2.5 HD 검출 시약-RED 키트(ACDBio, MN)를 사용하여 수행했습니다. 구체적으로, 폐 슬라이드의 파라핀을 제거하고 H_2O_2로 처리한 다음 항원 회수 용액으로 전처리하였다. nCoV2019-S(ACDBio, #848561) 프로브는 2시간 동안 혼성화하였다. 신호는 Amp 1-6 용액으로 증폭하고, RED 용액을 사용하여 검출하였다. 슬라이드는 헤마톡실린으로 대조 염색하고, 마운팅하였으며, 40배 확대된 슬라이드 이미지는 Axio Scan Z1을 사용하여 촬영하였다.

[0204] **제조예**

[0205] **<제조예 1> 벡터의 제조**

[0206] pSP6-26s 플라스미드는 pSFV3(Addgene, #92072) 골격(backbone)에서 셈리키 삼림 바이러스(semliki-forest virus; SFV)의 비구조 및 구조 단백질을 제거하여 구성하였다. SARS-CoV-2 오미크론 BA.1의 구조 단백질과 패키징 신호를 코딩하는 서열을 합성(Bionics, Korea)하여 pSP6-26s 및 pcDNA3.1(+)(Genscript, NJ) 플라스미드에 서브클로닝하였다. 레플리콘 플라스미드 pSFV3-SEM-PS9는 SARS-CoV-2 오미크론 BA.1의 구조 단백질(스파이크 단백질, 외피 단백질 및 막 단백질)과 패키징 신호의 서열을 pSFV3 골격(셈리키 삼림 바이러스의 비구조 단백질인 NSP1 내지 NSP4 포함)에 서브클로닝하여 구성하였다.

[0207] 키메릭 VLP를 제조하는 벡터의 경우, 상기 pSFV3-SEM-PS9에서 SARS-CoV-2 오미크론 BA.1의 스파이크 단백질 중 RBD(Receptor binding domain) 부분만을 각각 SARS-CoV-2 오미크론 XBB.1 또는 MERS-CoV의 RBD로 변경하여 구성하였다.

[0208] 상기 SARS-CoV-2의 패키징 신호 서열의 경우, 서열번호 20의 서열 또는 SARS-CoV-2 BA.1 strain의 NSP11 내지 NSP12의 일부를 코딩하는 유전자 서열을 사용하였다. 삽입된 서열들에 대한 내용은 하기 표 1과 같으며, 벡터의 구성은 도 3에 도시된 바와 같다.

표 1

[0209]

서열번호	서열이름
서열번호 1	셈림키 삼림 바이러스(SFV) NSP1(DNA)
서열번호 2	SFV NSP1(RNA)
서열번호 3	SFV NSP2(DNA)
서열번호 4	SFV NSP2(RNA)
서열번호 5	SFV NSP3(DNA)
서열번호 6	SFV NSP3(RNA)
서열번호 7	SFV NSP4(DNA)
서열번호 8	SFV NSP4(RNA)
서열번호 9	SFV RdRp(DNA)
서열번호 10	SFV RdRp(RNA)
서열번호 11	SARS-CoV-2(BA.1) 스파이크 유전자(DNA)
서열번호 12	SARS-CoV-2(BA.1) 스파이크 유전자(RNA)
서열번호 13	SARS-CoV-2(BA.1) 외피 유전자(DNA)
서열번호 14	SARS-CoV-2(BA.1) 외피 유전자(RNA)
서열번호 15	SARS-CoV-2(BA.1) 막 유전자(DNA)
서열번호 16	SARS-CoV-2(BA.1) 막 유전자(RNA)
서열번호 17	SARS-CoV-2(BA.1) 뉴클레오캡시드 유전자(DNA)
서열번호 18	SARS-CoV-2(BA.1) 뉴클레오캡시드 유전자(RNA)
서열번호 19	SARS-CoV-2(BA.1) 패키징 신호 1(DNA)
서열번호 20	SARS-CoV-2(BA.1) 패키징 신호 1(RNA)
서열번호 21	pSFV3-SEM-PS9가 발현하는 saRNA

서열번호 22	pSFV3-SEM-PS9
서열번호 23	SARS-CoV-2(XBB.1 RBD) 키메릭 스파이크 유전자(DNA)
서열번호 24	SARS-CoV-2(XBB.1 RBD) 키메릭 스파이크 유전자(RNA)
서열번호 25	MERS-CoV(MERS RBD) 키메릭 스파이크 유전자(DNA)
서열번호 26	MERS-CoV(MERS RBD) 키메릭 스파이크 유전자(RNA)

[0211] **<제조예 2> VLP 생산을 위한 세포 배양**

[0212] HEK 293 세포(인간 신장 상피세포(*Homo sapiens* kidney epithelial), ATCC: CRL-1573)를 10% 열 불활성화 태아 소 혈청(FBS; Thermo Fisher Scientific)과 항생제인 페니실린(100 U/mL)과 스트렙토마이신(100 μg/mL)이 보충된 DMEM(Thermo Fisher Scientific)에서 배양하였다. 세포는 5% CO_2 하에서 37 ℃로 유지하여 배양하였다.

[0213] 뉴클레오캡시드(N)를 발현하는 HEK 293(HEK 293-N) 세포는 리포펙타민(Lipofectamine) 3000(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 선형화된 pcDNA3.1(+)-N 플라스미드를 형질감염시켜 얻었다. 2일 후, 세포를 1 mg/ml의 G418(InvivoGen)로 클론 선별하고 뉴클레오캡시드의 발현을 면역 형광 분석으로 확인하였다.

[0215] **<제조예 3> saRNA를 포함하는 SARS-CoV-2 VLP의 제조**

[0216] MEGAscript SP6 키트(Invitrogen)을 사용하여 시험관 내(*in vitro*) 전사 방식을 통하여 RNA 전사체를 수득하였다. 그 다음 0.8 ml의 DMEM에 용해된 HEK 293-N 세포(8×10^6의 세포 포함) 용액을 포함하는 4 mm 큐벳에 400 μg의 레플리콘 RNA를 첨가하였다. 단일 전기 펄스는 GenePulser X(Bio-Rad)로 260 V, 550 μF로 설정하여 적용하였다. 세포를 100 mm 배양 접시에 옮긴 후, VLP를 제조하였다. 형질감염 후 48시간 경과 후에, VLP를 포함하는 배양 배지를 수득하여 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층액은 0.45 μm 주사기 필터로 여과하였다.

[0217] SARS-CoV-2 VLP를 농축하고, 정제하기 위하여 여과액을 20% 수크로오스 쿠션에 탑재하였고, SW32Ti 로터(Beckman Coulter)를 사용하여 4 ℃에서 4시간 동안 30,000 rpm으로 초원심분리(ultracentrifugation)하였다. 그 후, 수득된 펠릿을 PBS 용액에 현탁하고, 남은 수크로오스와 단백질은 Amicon Ultra-2mL-30K(Merck)를 사용하여 4 ℃에서 1시간 동안 4,000 rpm 원심분리하여 제거하였다. 정제된 VLP는 최종적으로 PBS로 현탁하고 사용할 때까지 -80 ℃에 보관하였다.

[0219] **실시예**

[0220] **<실시예 1> saRNA를 포함하는 VLP의 생성 확인**

[0221] SARS-CoV-2의 구조 단백질 및 패키징 서열이 삽입된 VLP 제조를 위한 벡터를 세포에 감염시켰을 때, 상기 벡터가 안정적으로 VLP를 생산할 수 있는 지 여부, 즉, 벡터 내 삽입된 서열에 따라 saRNA(self-amplifying RNA)가 전사되고, VLP가 생성되는 지 여부를 확인하기 위하여 제조예 1 내지 3에 따라, 레플리콘 플라스미드 벡터(pSFV3-SEM-PS9, 도 3)를 시험관 내 전사(*in vitro* transcription, IVT)하여 saRNA로 만든 후, 이를 세포주에 접종하여 VLP를 제조(도 2)하고, 제조된 VLP를 웨스턴 블롯 및 면역 형광 어세이를 통하여 확인하였다.

[0223] **(1) BHK-21 세포주에서의 벡터 시스템의 안정성 확인**

[0224] 도 4에 도시된 바와 같이, 셈리키 삼림 바이러스(semliki-forest virus; SFV)의 구조 단백질을 코딩하는 서열 대신 SARS-CoV-2 오미크론 BA.1의 패키징 신호 및 구조 단백질인 스파이크(Spike, S), 외피(Envelope, E), 막(Membrane, M), 뉴클레오캡시드(Nucleocapsid, N) 단백질 각각을 코딩하는 서열; 또는 스파이크, 외피 및 막 단백질을 코딩하는 서열이 pSFV3 골격에 삽입된 레플리콘 플라스미드 벡터를 시험관 내 전사(IVT)하였다. 그 결과, SARS-CoV-2의 각각의 구조 단백질(S, E, M 및 N)에 대한 mRNA 및 스파이크, 외피 및 막 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 mRNA에 해당하는 각각의 밴드가 확인되었다. 이를 통해, 레플리콘 플라스미드 벡터가 IVT를 통하여 mRNA 형태로 변화하였음을 확인하였다.

[0225] 도 5에 도시된 바와 같이, 상기 IVT를 통하여 제조된 mRNA를 BHK-21 세포주에 형질감염시킨 후, 세포 내에 생성

된 단백질을 면역 형광 어세이를 통하여 확인한 결과, 세포 내에 SARS-CoV-2의 구조 단백질인 스파이크, 막 단백질 및 뉴클레오캡시드 단백질이 발현되었음을 확인하였다.

[0226] 또한, 형질감염된 세포의 용해물(lysates) 및 상층액으로 분비된 VLP를 정제하여, 웨스턴 블롯을 수행한 결과, SARS-CoV-2의 각각의 구조 단백질(S, E, M 및 N)을 코딩하는 mRNA를 형질감염한 경우 및 스파이크, 외피 및 막 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 mRNA를 형질감염한 경우 모두에서 VLP가 형성되었으며, 특히 스파이크, 외피 및 막 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 mRNA를 형질감염시킨 경우, VLP가 보다 잘 생성되었음을 확인하였다(도 6).

[0227] 상기 결과들을 통하여, SARS-CoV-2 오미크론 BA.1의 구조 단백질인 스파이크, 외피 및 막 단백질 및 패키징 신호를 함께 포함하는 벡터 시스템을 형질감염시켰을 때, VLP가 안정적으로 생성됨을 확인하였다.

[0229] **(2) HEK 293-N 세포주에서의 벡터 시스템의 안정성 확인**

[0230] 도 7에 도시된 바와 같이, 뉴클레오캡시드를 안정적으로 항상 발현하는 세포주(HEK 293-N 세포주)를 제작하여, SFV의 구조 단백질을 코딩하는 서열 대신 SARS-CoV-2 오미크론 BA.1의 뉴클레오캡시드를 제외한 구조 단백질(S, E 및 M)과 패키징 신호의 서열이 pSFV3 골격에 삽입된 레플리콘 플라스미드 벡터(pSFV3-SEM-PS9)를 형질감염시킨 경우 또한, VLP가 생성되는 지 여부를 확인하였다.

[0231] 도 8에 도시된 바와 같이, 상기 레플리콘 플라스미드 벡터(pSFV3-SEM-PS9)를 IVT하였을 때, 표적하는 saRNA를 나타내는 밴드(약 13000 bp)가 형성되었음을 확인하였다.

[0232] 도 9에 도시된 바와 같이, 상기 IVT를 통하여 제조된 saRNA를 HEK 293-N 세포주에 형질감염시킨 후, 세포 내에 생성된 단백질을 면역 형광 어세이를 통하여 확인한 결과, 세포 내에 SARS-CoV-2의 구조 단백질(스파이크, 뉴클레오캡시드 및 막 단백질)이 발현되었음을 확인하였다.

[0233] 또한, 형질감염된 세포의 용해물(lysates) 및 상층액으로 분비된 VLP를 정제하여, 웨스턴 블롯을 수행한 결과, SARS-CoV-2의 구조 단백질인 스파이크, 외피 및 막 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 saRNA를 형질감염시킨 경우 SARS-CoV-2 VLP가 형성되었음을 확인하였다(도 10).

[0234] 상기 결과들을 통해, 안정적으로 레플리콘 플라스미드 벡터(pSFV3-SEM-PS9) 시스템을 형질감염 시켰을 때, 뉴클레오캡시드를 항상 발현하는 HEK 293-N 세포주 또한 안정적으로 상기 벡터 시스템을 통하여 VLP를 생산하였음을 확인하였다. 이에, Vero E6 세포주를 사용하여 VLP를 반복 생산 가능하도록 SARS-CoV-2의 뉴클레오캡시드를 발현하는 VLP 대량 생산 세포주(도 11)를 제작하였다.

[0236] **<실시예 2> saRNA를 포함하는 VLP의 특성 확인**

[0237] saRNA를 포함하는 VLP의 특성을 확인하기 위하여 제조예 1 내지 3에 따라 제조된 VLP의 구조 및 크기를 측정하였다.

[0238] 도 12에 도시된 바와 같이, SARS-CoV-2의 구조 단백질, RdRp 및 패키징 서열이 포함된 saRNA를 포함하는 VLP의 구조를 투과전자현미경(TEM)을 사용하여 확인한 결과, 비정형의 구조를 나타냄을 확인하였으며, 도 13에 도시된 바와 같이, DLS(Dynamic light scattering)를 사용하여 상기 VLP의 크기를 측정한 결과, VLP는 약 56 nm의 직경을 나타냄을 확인하였다.

[0239] 상기 VLP를 생성하는 세포주(HEK 293-N) 내에 생성된 VLP의 양을 확인한 결과, 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 모든 위치에서 10.6 Log_{10} copies/mL 이상의 VLP가 생산되었음을 나타내는 바, 접종을 위한 충분한 양의 VLP가 상기 벡터 시스템을 통하여 안정적으로 생산됨을 확인하였다.

표 2

[0240]

Log_{10} copies/mL	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4	Site 5	Site 6
	12.3	10.6	12.5	12.2	12.3	11.9

[0242] **<실시예 3> saRNA를 포함하는 VLP의 *in vitro* 세포 감염능 확인**

[0243] saRNA를 포함하는 VLP의 세포 감염능을 확인하기 위하여 제조예 1 내지 3에 따라 제조된 VLP의 hACE2 및 TMPRSS2 수용체가 있는 세포(2D 배양) 및 인간 기관지 상피세포(3D 배양)에서의 감염능을 웨스턴 블롯, 면역 형광 어세이 및 ISH를 통하여 평가하였다. 또한, VLP 감염된 세포의 TEM 사진 및 웨스턴 블롯을 통하여, VLP 감염 후 재감염이 발생하는지 여부를 함께 확인하였다.

[0245] **(1) saRNA를 포함하는 VLP의 *in vitro* 세포 감염능 확인**

[0246] 도 14에 도시된 바와 같이, SARS-CoV-2 바이러스가 숙주를 감염시키기 위하여 사용하는 숙주 세포의 수용체인 hACE2가 발현된 세포주(HACE2-293T) 및 hACE2와 함께 숙주 프로테아제 TMPRSS2가 발현된 세포주(A549-HACE2-TMPRSS2)에 대하여 saRNA를 포함하는 VLP가 감염능이 있는 것을 확인하였다.

[0247] 또한, 도 15에 도시된 바와 같이, hACE2 및 TMPRSS2가 발현된 세포주에서 VLP를 감염시켰을 때, SARS-CoV-2의 스파이크 단백질이 발현됨을 확인하여, 상기 saRNA를 포함하는 VLP가 세포에 대한 감염능이 있음을 확인하였다.

[0248] 도 16 및 도 17에 도시된 바와 같이, 3D 배양된 인간 기관지 상피세포에서의 VLP의 감염능을 확인한 결과, 면역 형광 어세이를 통하여 인간 기관지 상피세포에 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질(도 16)이 발현되었음을 확인하였다. 또한, ISH를 통하여 인간 기관지 상피세포에 SARS-CoV-2의 스파이크 유전자가 발현되었음을 확인하였으며, 상기 ISH 결과를 통하여 VLP 내에 saRNA가 분포하고 있음을 함께 확인하였다(도 17).

[0250] **(2) saRNA를 포함하는 VLP의 재조립 가능성 확인**

[0251] saRNA를 포함하는 VLP의 재조립 가능 여부를 확인하기 위하여, VLP로 감염시킨 세포의 용해물에 대하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 도 18에 도시된 바와 같이, A549-HACE2-TMPRSS2 세포에 saRNA를 포함하는 VLP를 감염시킨 후 2일 경과 후의 세포 상층액을 확인한 결과, 세포 상층액에서 상기 saRNA를 포함하는 VLP의 뉴클레오캡시드가 확인되지 않아, 상기 VLP는 세포 감염 후, 재조립되지 않음을 확인하였다.

[0252] 또한, 도 19에 도시된 바와 같이, VERO E6 세포주에 VLP를 감염시킨 후, 30분 및 48시간 경과 후의 세포를 TEM을 사용하여 확인한 결과, 30분이 경과하였을 때, 세포가 VLP에 의하여 감염되어 있음을 확인하였으며, 48시간이 경과한 후, 세포에 VLP는 확인되지 않아 한 번 감염된 이후, VLP가 재조립되지 않음을 확인하였다.

[0253] 즉, saRNA를 포함하는 VLP는 숙주 세포에 감염 후, VLP 내에 포함되어 있는 saRNA가 SARS-CoV-2의 구조단백질을 발현시켜, 내부에 saRNA가 없는 SARS-CoV-2 VLP를 형성함으로써, 단회 감염으로 높은 면역원성을 나타내고, 재조립되지 않아 추가 감염의 가능성이 현저하게 낮으므로 우수한 안전성을 나타낸다.

[0255] **<실시예 4> saRNA를 포함하는 VLP의 *in vivo* 마우스 감염능 확인**

[0256] saRNA를 포함하는 VLP의 마우스에서의 감염능을 확인하기 위하여 제조예 1 내지 3에 따라 제조된 VLP를 참조예 4에 따라 준비된 마우스(hACE2-Tg 마우스 및 BALB/c 마우스)에 투여하여, 마우스 폐 조직에서의 VLP 감염능 및 VLP 투여에 따른 마우스에서의 면역원성 및 방어능을 함께 측정하였다.

[0258] **(1) saRNA를 포함하는 VLP의 감염능 확인**

[0259] 참조예 5에 따라, saRNA를 포함하는 VLP를 비강 투여한 hACE2-Tg 마우스의 폐 조직에 대하여 면역조직화학(IHC) 및 제자리 부합법(In situ hybridization, ISH) 분석을 수행하여 VLP 감염 여부를 확인하였다.

[0260] 도 20에 도시된 바와 같이, saRNA를 포함하는 VLP 백신을 비강을 통하여 접종한 결과, 접종 후 1일 및 2일 차에 마우스의 폐에서 SARS-CoV-2의 스파이크 유전자가 발현되었음을 확인되었다. 또한, 도 21에 도시된 바와 같이, 상기 백신 접종 후, 1일 차에 마우스 폐 조직에서 SARS-CoV-2의 막 단백질이 발현되었음을 확인되었다.

[0261] 상기 결과에 따라, saRNA를 포함하는 VLP 백신이 마우스에 대하여 우수한 감염능을 나타냄을 확인하였다.

[0263] **(2) 면역원성 및 방어능 확인(BALB/c 마우스)**

[0264] saRNA(오미크론 BA.1의 구조 단백질을 코딩하는 서열)를 포함하는 VLP 백신을 10^{10} copies/mice로 1회 비강 투여(intranasal; I.N)한 후, 마우스의 혈액을 채취하고, $1LD_{50}$의 우한(Wuhan) MA 바이러스로 재접종하였고, 10일 동안 혈액을 채취하여 경과를 확인하였다(도 22).

[0265] 상기 saRNA를 포함하는 VLP 백신을 접종한 후 28일 후, α-스파이크 RBD IgG 및 α-스파이크 트리머 IgG가 모두 대조군(PBS) 대비 증가하였으며(도 23), 점막 면역을 나타내는 α-스파이크 RBD IgA 및 α-스파이크 트리머 IgA의 경우, 대조군 및 백신을 근육 내(intramuscular; I.M)로 투여한 군 대비 saRNA를 포함하는 VLP 백신을 비강 투여한 군에서 현저하게 증가하였음을 확인하였다. 즉, 점막 면역 항체인 IgA의 경우, 비강 투여한 경우에서만 항체의 역가가 현저하게 높게 나타나 백신을 비강 투여함으로써, 현저히 우수한 항체 형성을 유도할 수 있음을 확인하였다(도 24).

[0266] 또한, 상기 saRNA를 포함하는 VLP 백신을 비강 투여한 군에서 대조군 및 백신을 근육 내(I.M)로 투여한 군 대비 오미크론 BA.1 및 우한 MA에 대한 중화항체 역가가 현저하게 증가하였으며(도 25), 선천 면역을 담당하는 INF-γ의 분비가 증가하였고(도 26), INF-α 및 INF-β 유전자의 발현이 현저히 증가하였음을 확인하였다(도 27). 지라에 존재하는 T세포 수 또한 대조군 대비 증가하였음을 확인하였다(도 28).

[0267] 상기 saRNA를 포함하는 VLP 백신을 투여한 후, 28일 경과 후 우한(Wuhan) MA 바이러스로 재감염한 결과, saRNA를 포함하는 VLP 백신을 비강 투여한 군은 대조군 및 근육 내 투여군과 비교하여 마우스의 체중이 빠르게 정상 수준으로 회복되었으며(도 29), 생존율 또한 현저히 우수하며(도 30), 마우스의 폐 내에 존재하는 바이러스의 역가 또한 빠르게 감소하였음을 확인하였다(도 31). 이에 대응하여, 마우스의 폐 기능 개선 효과 또한 대조군 대비 현저히 우수하게 나타남을 확인하였다(도 32).

[0268] 상기 결과들을 종합하였을 때, saRNA(오미크론 BA.1의 구조 단백질을 코딩하는 서열)를 포함하는 VLP 백신을 비강 투여한 경우, 즉, 점막 면역을 유도한 경우 근육 내 투여한 경우 대비 점막면역, T 세포면역, 선천면역 및 항체 생성능이 현저히 우수하게 나타났으며, 4주 후 바이러스에 재감염되었을 경우에도 적응 면역을 통하여 빠르게 마우스의 체중, 폐기능, 폐내 바이러스 역가 및 생존율 등의 정상 수준으로 개선함을 확인하였다.

[0269] 이에, 상기 VLP 백신이 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 효과적인 백신으로서 작용할 수 있으며, 점막 투여를 통한 접종이 가능한 백신으로서 활용될 수 있음을 확인하였다.

[0271] **(3) 면역원성 및 방어능 확인(hACE2-Tg 마우스)**

[0272] 상기 (2)에서와 동일하게 saRNA(오미크론 BA.1의 구조 단백질을 코딩하는 서열)를 포함하는 VLP 백신을 10^{10} copies/mice로 SARS-CoV-2 VLP를 수용체를 가진 hACE2-Tg 마우스에 1회 비강 투여(intranasal; I.N)한 후, 마우스의 혈액을 채취하고, $1LD_{50}$의 우한(Wuhan) MA 바이러스로 재접종하였고, 10일 동안 혈액을 채취하여 경과를 확인하였 다(도 33).

[0273] 상기 saRNA를 포함하는 VLP 백신을 접종한 후 28일 후, α-스파이크 RBD IgG 및 α-스파이크 트리머 IgG가 모두 대조군(PBS), VLP 백신의 근육 내 투여군 및 LNP 백신의 비강 투여군 대비 현저하게 증가하였으며(도 34), 점막 면역을 나타내는 α-스파이크 RBD IgA 및 α-스파이크 트리머 IgA의 경우 또한, 대조군(PBS), VLP 백신의 근육 내 투여군 및 LNP 백신의 비강 투여군 대비 현저하게 증가하였다. 즉, 점막 면역 항체인 IgA의 경우, 비강 투여한 경우에서만 항체의 역가가 현저하게 높게 나타나 백신을 비강 투여함으로써, 현저히 우수한 항체 형성을 유도할 수 있음을 확인하였다(도 35).

[0274] 또한, 상기 saRNA를 포함하는 VLP 백신을 비강 투여한 군에서 대조군(PBS), VLP 백신의 근육 내 투여군 및 LNP 백신의 비강 투여군 대비 오미크론 BA.1, 우한 MA 및 오미크론 XBB.1.17에 대한 중화항체 역가가 현저하게 증가하였으며(도 36), 선천 면역을 담당하는 INF-γ의 분비가 증가하였고(도 37), INF-α 및 INF-β 유전자의 발현이 현저히 증가하였음을 확인하였다(도 38). 또한, VLP 백신을 비강 투여한 군의 체중은 백신 접종 후 10일까지 체중 감소 없이 정상 체중 범위를 유지하며, 상기 VLP 백신이 독성이 없이 안전하게 바이러스에 대한 빠른 면역

반응을 유도함을 확인하였다(도 39).

[0275] 상기 saRNA를 포함하는 VLP 백신을 투여한 후, 28일 경과 후 우한(Wuhan) MA 바이러스로 재감염한 결과, saRNA를 포함하는 VLP 백신을 비강 투여한 군은 대조군(PBS), VLP 백신의 근육 내 투여군 및 LNP 백신의 비강 투여군과 비교하여 마우스의 체중이 빠르게 정상 수준으로 회복되었으며(도 40), 생존율 또한 현저히 우수하며(도 41), 마우스의 폐 및 점막 내에 존재하는 바이러스의 역가 또한 빠르게 감소하였음을 확인하였다(도 42). 이에 대응하여, 마우스의 폐 기능 개선 효과 또한 대조군(PBS), VLP 백신의 근육 내 투여군 및 LNP 백신의 비강 투여군 대비 현저히 우수하게 나타남을 확인하였다(도 43).

[0276] 상기 결과들을 종합하였을 때, saRNA(오미크론 BA.1의 구조 단백질을 코딩하는 서열)를 포함하는 VLP 백신을 비강 투여한 경우, 즉, 점막 면역을 유도한 경우 근육 내 투여한 경우 및 LNP 백신으로 비강 투여한 경우 대비 점막면역, T 세포면역, 선천면역 및 항체 생성능이 현저히 우수하게 나타났으며, 4주 후 바이러스에 재감염되었을 경우에도 적응 면역을 통하여 빠르게 마우스의 체중, 폐기능, 폐내 바이러스 역가 및 생존율 등의 정상 수준으로 개선함을 확인하였다.

[0277] 이에, 상기 VLP 백신이 기존의 LNP 형태의 백신보다 SARS-CoV-2 바이러스에 대하여 효과적인 백신으로서 작용할 수 있으며, SARS-CoV-2의 감염 경로인 점막을 통한 투여가 가능한 백신으로서 점막 면역을 유도할 수 있는 백신으로 활용될 수 있음을 확인하였다.

[0279] **<실시예 5> saRNA를 포함하는 VLP 제조를 위한 벡터 시스템의 활용**

[0280] saRNA를 포함하는 VLP 제조를 위한 벡터 시스템을 구축하기 위하여 사용되는 벡터 내에 오미크론 BA.1의 구조 단백질을 코딩하는 서열이 아닌 다른 외래 유전자를 삽입하여 활용할 수 있는지, 추가적인 항원을 함께 발현할 수 있는지 및 키메릭 VLP의 적용이 가능한지 여부를 확인하였다.

[0282] **(1) VLP 제조용 벡터 시스템의 외래 유전자 발현 가능성 확인**

[0283] SARS-CoV-2 오미크론 BA.1의 구조 단백질이 아닌 외래 유전자 또한 발현 가능한지 여부를 확인하기 위하여, LacZ 단백질의 서열을 pSFV3 골격(셈리키 삼림 바이러스의 비구조 단백질인 NSP1 내지 NSP4 포함)에 서브클로닝하여 구성한 레플리콘 플라스미드 pSFV3-LacZ를 제조하고, 이를 선형화하여 제조된 RNA를 BHK-21 세포주 및 NP-293 세포주에 형질감염한 후, LacZ 발현을 1일 및 2일 차에 베타 갈락토시다아제 염색(beta Galactosidase staining)으로 확인하였다.

[0284] 도 44에 도시된 바와 같이, BHK-21 세포주 및 NP-293 세포주 모두에서 LacZ 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 즉, 상기 VLP 제조용 벡터 시스템은 VLP 제조용 벡터 내에 SARS-CoV-2 유래의 단백질을 발현하는 유전자 뿐만 아니라, 외래 유전자(예를 들어, 다른 바이러스 유래의 단백질을 발현하는 유전자 등)를 삽입하여 활용 가능함을 확인하였다.

[0286] **(2) saRNA 이외의 추가 항원 전달 가능 여부 확인**

[0287] 상기 벡터 시스템의 추가적인 항원 전달 시스템으로서의 가능성을 확인하기 위하여, 제조예 1에 따른 pSP6-26s 플라스미드에 추가 항원으로 작용하는 루시퍼라제(luciferase) 유전자 및 SARS-CoV-2 오미크론 BA.1의 패키징 신호를 코딩하는 서열을 서브클로닝하여 pSP6-luciferase 벡터를 구성하고, pSFV3-SEM-PS9(pSFV3-SARS2와 동일)와 함께 벡터의 선형화 후, NP-293 세포주에 형질감염하여 추가 항원인 루시퍼라제의 발현을 확인하였다(도 45).

[0288] 도 46에 도시된 바와 같이, NSP1 단백질을 발현하는 유전자, 스파이크 단백질을 발현하는 유전자 및 루시퍼라제를 발현하는 유전자의 발현을 확인한 결과, 상기 세 가지의 유전자 발현이 모두 높게 나타났으며, 이를 통해, 추가 항원으로서 동시에 형질감염된 루시퍼라제를 발현하는 유전자가 VLP 제조를 위한 RNA의 발현을 저해, 즉, VLP 제조를 위한 RNA와 경쟁하여 발현되지 않으며, 오히려 VLP 제조를 위한 RNA와 함께 발현시킨 경우, 루시퍼라제 RNA만을 감염시켜 발현시켰을 때보다 높은 발현량을 나타내는 것을 확인하였다.

[0289] 또한, SARS-CoV-2 JIN.1로 감염된 BALB/c 마우스 및 감염되지 않은 마우스 각각에 추가 항원(루시퍼라제) 및

saRNA(SARS-CoV-2 BA.1)를 포함하는 VLP를 접종하였다(도 47). 그 결과, SARS-CoV-2 JIN.1 감염된 마우스 및 감염되지 않은 마우스 모두에서 추가 항원인 루시퍼라제가 발현되었음을 확인하였고(도 47 및 48), 이를 통해 이미 바이러스에 감염된 경험이 있거나 백신 기접종자에 대하여도 추가 항원이 포함된 VLP를 백신으로 접종 가능하며, saRNA(SARS-CoV-2 BA.1)를 포함하는 VLP가 추가 항원 전달체로서 작용 가능하며, 항원 전달능 또한 현저히 우수함을 확인하였다.

[0290] 즉, VLP 제조를 위한 벡터와 함께 추가 항원을 코딩하는 서열을 포함하는 벡터를 함께 형질감염시키는 경우, VLP 제조를 위한 벡터가 발현하는 RNA 내 포함된 RdRp가 추가 항원을 코딩하는 서열을 포함하는 벡터가 발현된 RNA 서열 내의 26s를 인식하여 saRNA의 발현에 대한 간섭 없이 추가 항원의 발현을 유의적으로 증가시키므로, 상기 VLP 제조를 위한 벡터 시스템이 추가적인 항원을 전달하는 전달체로서도 활용 가능함을 확인하였다.

[0292] **(3) 키메릭 VLP의 제조 가능성 확인**

[0293] 도 49 및 도 50에 도시된 바와 같이, 상기 벡터 시스템을 다른 바이러스의 백신에도 적용 가능한 주형으로 사용하기 위하여, 상기 벡터 시스템을 통하여 제조된 VLP의 수용체 결합 부위(RBD, receptor binding domain)를 변경시킨 키메릭(Chimeric) VLP의 제조 가능성을 확인하였다.

[0294] 구체적으로, 기존 SARS-CoV-2 오미크론 BA.1의 스파이크 단백질, 즉, 수용체 결합 부위를 오미크론 XBB.1(이하, XBB.1 키메릭 VLP; 도 49) 또는 MERS-CoV(이하, MERS-CoV 키메릭 VLP; 도 50)로 변경한 결과, 각각의 변경된 스파이크 단백질을 포함하는 VLP가 안정적으로 형성되었음을 확인하였다.

[0295] 또한, 뉴클레오캡시드를 포함하는 VLP 대량생산용 세포주인 VERO E6 세포주에 MERS-CoV 키메릭 VLP 제조를 위한 벡터가 발현하는 RNA를 형질감염한 결과, MERS-CoV의 RBD가 발현된 것을 확인하였으며(도 51), MERS-CoV 키메릭 VLP의 외피 및 막 단백질을 발현하는 유전자가 발현된 것을 확인하여(도 52), 상기 VLP 대량생산 세포주를 통해 키메릭 VLP 또한 안정적으로 생산될 수 있음을 확인하였다.

[0296] 즉, 상기 벡터 시스템 내 바이러스의 구조 단백질을 코딩하는 서열 부분을 다른 변이체 또는 다른 바이러스의 구조 단백질을 코딩하는 서열로 변경하여도 VLP가 안정적으로 제조되며, 대량 생산 또한 가능하므로, 상기 벡터 시스템을 다양한 바이러스들에 대한 백신 주형으로 사용하기에 유용함을 확인하였다.

[0298] **(4) 키메릭 VLP의 면역원성 및 방어능 확인**

[0299] **(4)-1 면역원성 및 방어능 확인(XBB.1 키메릭 VLP, BALB/c 마우스)**

[0300] XBB.1 키메릭 VLP 투여에 따른 마우스에서의 면역원성 및 방어능을 확인하기 위하여 XBB.1 키메릭 VLP 백신을 비강 투여(intranasal; I.N)한 후, BALB/c 마우스의 혈액을 채취하고, 오미크론 XBB.1 바이러스로 재접종하였고, 10일 동안 혈액을 채취하여 경과를 확인하였다(도 53).

[0301] 상기 XBB.1 키메릭 VLP 백신을 접종한 후 28일 후, 상기 XBB.1 키메릭 VLP 백신을 비강 투여한 군에서 대조군 및 백신을 근육 내(I.M)로 투여한 군 대비 오미크론 BA.1 및 오미크론 XBB.1에 대한 중화항체 역가가 현저하게 증가하였으며(도 54), XBB.1 키메릭 VLP 백신을 비강 투여한 군에서 INF-α 및 INF-β 유전자의 발현이 대조군 대비 현저하게 증가하였음을 확인하였다(도 55).

[0302] 또한, 상기 XBB.1 키메릭 VLP 백신을 투여한 후, 28일 경과 후 오미크론 XBB.1 바이러스로 재감염한 결과, 상기 XBB.1 키메릭 VLP 백신을 비강 투여한 군은 대조군 및 근육 내 투여군과 비교하여 마우스의 폐 내에 존재하는 바이러스의 역가 또한 빠르게 감소하였음을 확인하였다(도 56).

[0303] 상기 결과들을 종합하였을 때, XBB.1 키메릭 VLP 백신을 비강 투여한 경우, 즉, 점막 면역을 유도한 경우 대조군(PBS) 및 근육 내 투여한 경우 대비 면역 반응이 현저히 우수하게 나타났으며, 4주 후 바이러스에 재감염되었을 경우에도 적응 면역을 통하여 빠르게 마우스의 폐내 바이러스 역가를 정상 수준으로 개선함을 확인하였다.

[0304] 이에, 상기 키메릭 VLP 백신이 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 효과적인 백신으로서 작용할 수 있으며, 점막 투여를 통한 접종이 가능한 백신으로서 활용될 수 있음을 확인하였다.

[0306] **(4)-2 면역원성 및 방어능 확인(XBB.1 키메릭 VLP, hACE2-Tg 마우스)**

[0307] XBB.1 키메릭 VLP 투여에 따른 마우스에서의 면역원성 및 방어능을 확인하기 위하여 XBB.1 키메릭 VLP 백신을 비강 투여(intranasal; I.N)한 후, hACE2-Tg 마우스의 혈액을 채취하고, 오미크론 XBB.1 바이러스로 재접종하였고, 10일 동안 혈액을 채취하여 경과를 확인하였다(도 57).

[0308] 상기 BALB/c 마우스에 대한 실험 결과와 동일하게, 상기 XBB.1 키메릭 VLP 백신을 접종한 후 28일 후, 상기 XBB.1 키메릭 VLP 백신을 비강 투여한 군에서 대조군 및 백신을 근육 내(I.M)로 투여한 군 대비 오미크론 BA.1 및 오미크론 XBB.1에 대한 중화항체 역가가 증가하였으며(도 58), XBB.1 키메릭 VLP 백신을 비강 투여한 군에서 INF-α 및 INF-β 유전자의 발현이 대조군 대비 현저히 증가하였음을 확인하였다(도 59).

[0309] 또한, 상기 XBB.1 키메릭 VLP 백신을 투여한 후, 28일 경과 후 오미크론 XBB.1 바이러스로 재감염한 결과, 상기 XBB.1 키메릭 VLP 백신을 비강 투여한 군은 대조군 및 근육 내 투여군과 비교하여 마우스 생존율이 유의적으로 높게 유지되었으며, 체중 또한 감소하지 않은 것을 확인하였다(도 60 및 61). 또한, 마우스의 폐 내에 존재하는 바이러스의 역가 또한 빠르게 감소하였음을 확인하였다(도 62).

[0310] 상기 결과들을 종합하였을 때, XBB.1 키메릭 VLP 백신을 비강 투여한 경우, 즉, 점막 면역을 유도한 경우 대조군(PBS) 및 근육 내 투여한 경우 대비 면역 반응이 현저히 우수하게 나타났으며, 4주 후 바이러스에 재감염되었을 경우에도 적응 면역을 통하여 빠르게 폐내 바이러스 역가를 정상 수준으로 개선하며, 우수한 면역 반응을 통하여 높은 생존율을 나타냄을 확인하였다.

[0311] 이에, 상기 키메릭 VLP 백신이 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 효과적인 백신으로서 작용할 수 있으며, 점막 투여를 통한 접종이 가능한 백신으로서 활용될 수 있음을 확인하였다.

[0313] **(4)-3 세포 감염능, 면역원성 및 방어능 확인(MERS-CoV 키메릭 VLP)**

[0314] 키메릭 VLP의 세포 감염능 존재 여부를 확인하기 위하여, VERO E6 세포주에 대하여 MERS-CoV 키메릭 VLP를 접종시킨 후, MERS-CoV RBD 단백질 발현 여부를 확인하였다.

[0315] 도 63에 도시된 바와 같이, VERO E6 세포주에 대하여 MERS-CoV 키메릭 VLP를 접종한 결과, MERS-CoV RBD 단백질이 발현되었음을 확인하였다. 이에, MERS-CoV 키메릭 VLP가 세포 감염능이 있는 것을 확인하였다.

[0316] 또한, MERS-CoV 키메릭 VLP 투여에 따른 마우스에서의 면역원성 및 방어능을 확인하기 위하여 MERS-CoV 키메릭 VLP 백신을 비강 투여(intranasal; I.N)한 후, Hdpp4 마우스의 혈액을 채취하고, 오미크론 MERS-CoV 바이러스로 재접종하였고, 10일 동안 혈액을 채취하여 경과를 확인하였다(도 64).

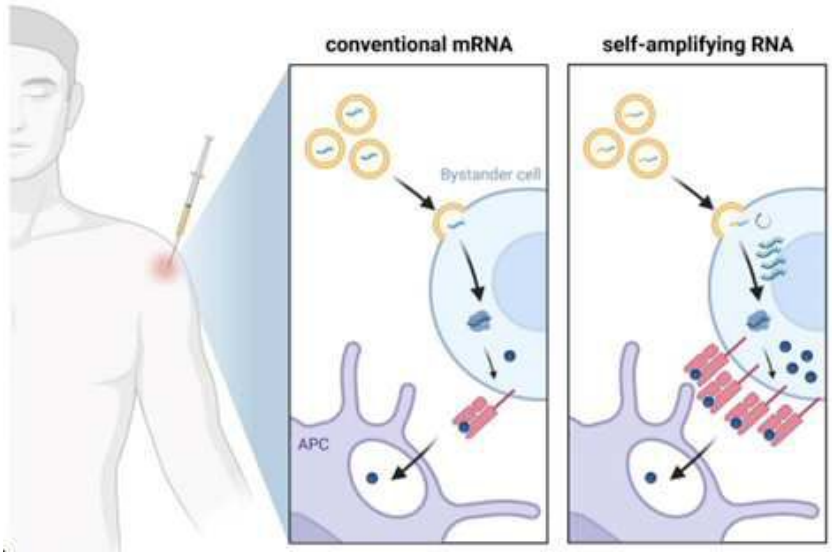
[0317] 상기 MERS-CoV 키메릭 VLP를 접종 후, α-BA.1 스파이크 RBD IgG, α-MERS 스파이크 RBD IgG, α- BA.1 스파이크 트리머 IgG 및 α- MERS 스파이크 트리머 IgG가 모두 대조군(PBS) 대비 현저하게 증가하였다(도 65). 또한, 상기 MERS-CoV 키메릭 VLP 백신을 비강 투여한 군에서 대조군 대비 오미크론 BA.1 및 MERS-CoV에 대한 중화항체 역가가 현저하게 증가하였으며(도 66), 상기 MERS-CoV 키메릭 VLP 백신을 투여한 후, MERS-CoV 바이러스로 재감염한 결과, 상기 MERS-CoV 키메릭 VLP 백신을 비강 투여한 군은 대조군과 비교하여 마우스 생존율이 유의적으로 높게 유지되었으며, 체중 또한 빠르게 정상 범위로 회복하는 것을 확인하였다(도 67 및 68). 또한, 마우스의 폐 내에 존재하는 바이러스의 역가도 빠르게 감소하였음을 확인하였다(도 69).

[0318] 상기 결과들을 종합하였을 때, MERS-CoV 키메릭 VLP 백신을 비강 투여한 경우, 즉, 점막 면역을 유도한 경우 면역 반응이 현저히 우수하게 나타났으며, 바이러스에 재감염되었을 경우에도 적응 면역을 통하여 빠르게 폐내 바이러스 역가를 정상 수준으로 개선하며, 우수한 면역 반응을 통하여 높은 생존율을 나타냄을 확인하였다.

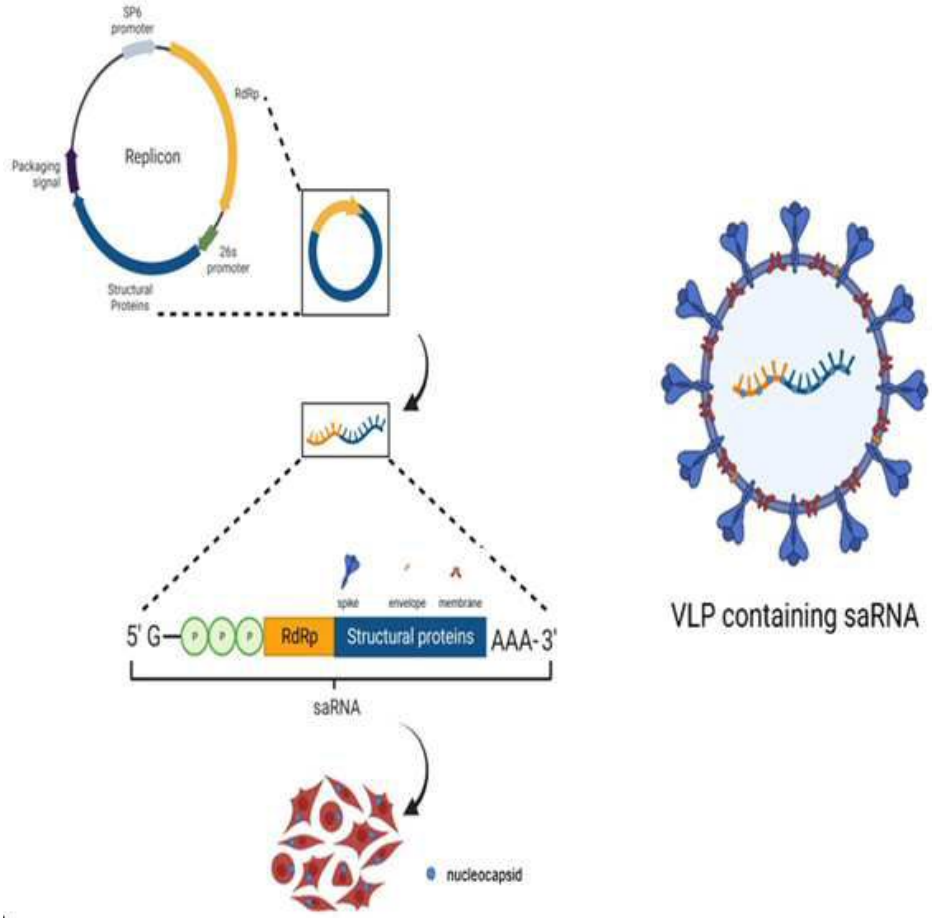
[0319] 이에, 상기 키메릭 VLP 백신이 코로나 바이러스에 대한 효과적인 백신으로서 작용할 수 있으며, 점막 투여를 통한 접종이 가능한 백신으로서 활용될 수 있음을 확인하였다.

도면

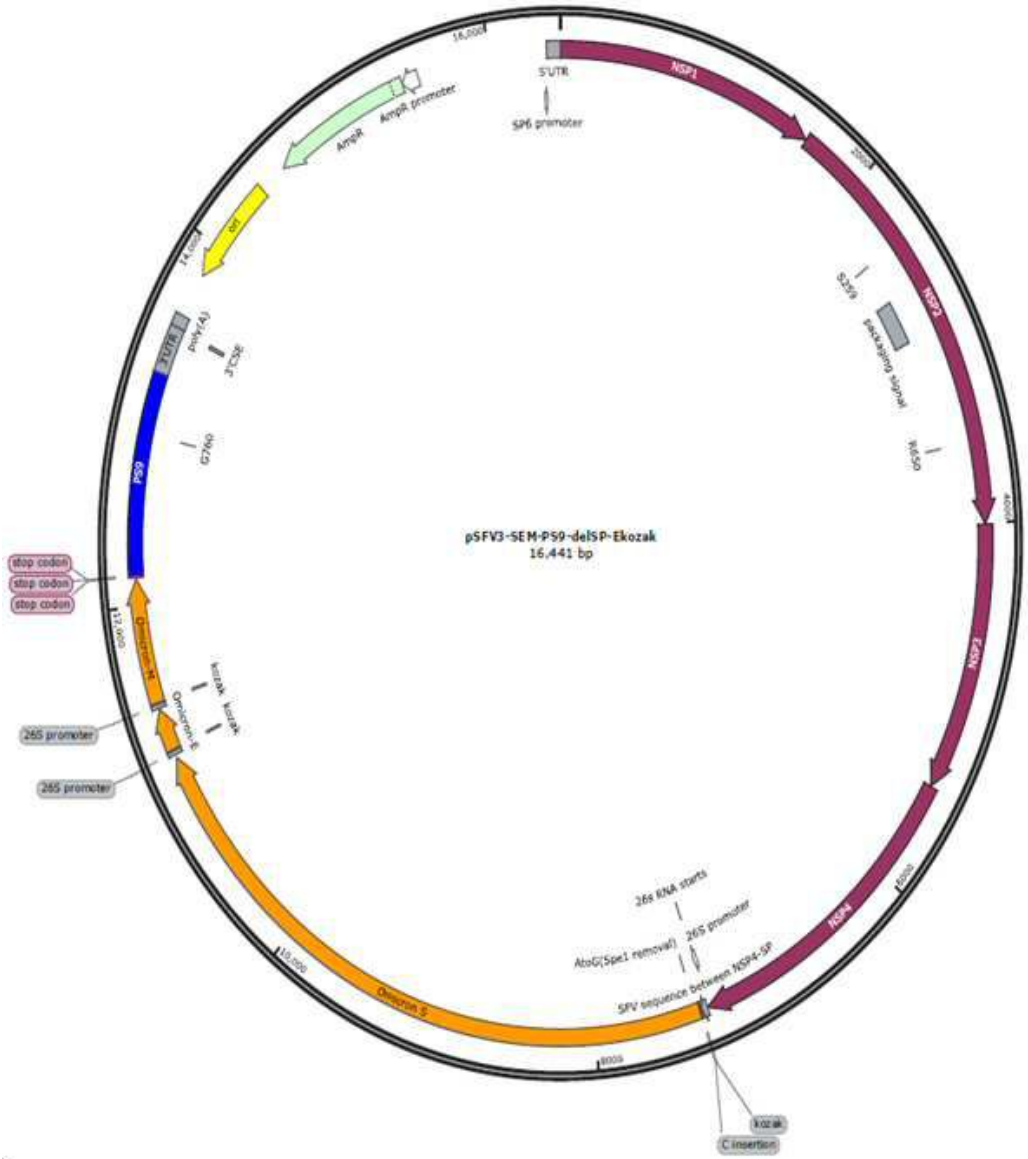
도면1


conventional mRNA
self-amplifying RNA
Bystander cell
APC

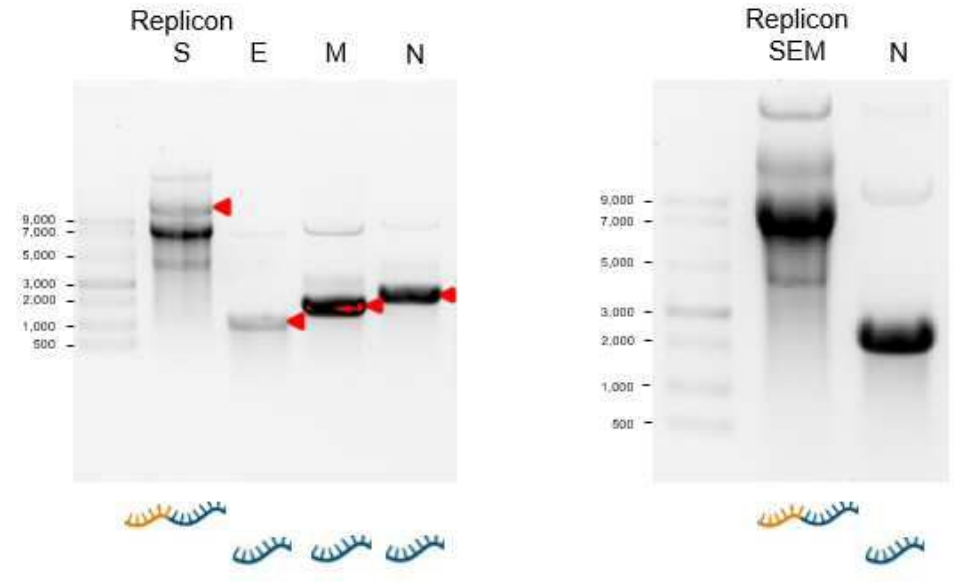
도면2


SP6 promoter
RdRp
Replicon
Packaging signal
26s promoter
Structural Proteins
spike
envelope
membrane
5' G
RdRp
Structural proteins
AAA-3'
saRNA
nucleocapsid
VLP containing saRNA

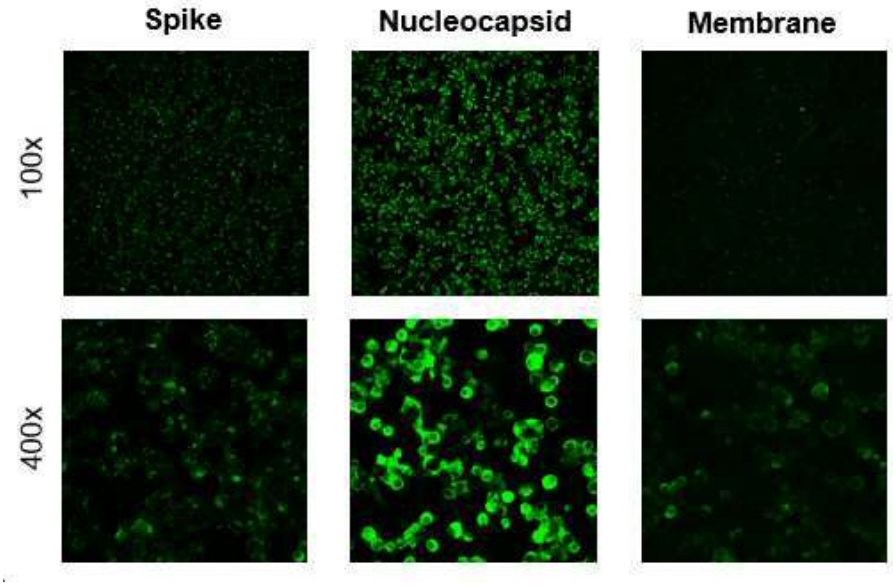
도면3


pSFV3-SEM-PS9-delSP-Ekozak
16,441 bp
5'UTR
SP6 promoter
NSP1
NSP2
S259
packaging signal
K650
NSP3
NSP4
26s RNA starts
AtoG(Spe1 removal)
26S promoter
SFV sequence between NSP4-SP
Omicron S
kozak
C insertion
Omicron N
kozak kozak
26S promoter
26S promoter
stop codon
stop codon
stop codon
PS9
3'UTR
poly(A)
ScaI
G760
AmpR
AmpR promoter
Ori

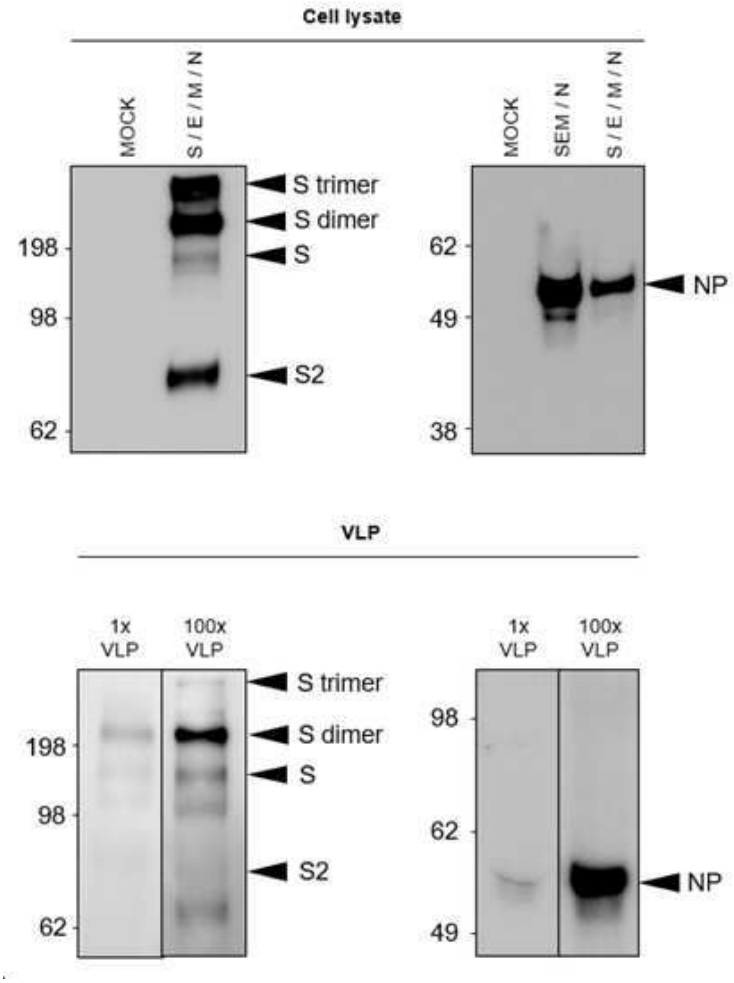
도면4


Replicon
S
E
M
N
9,000
7,000
5,000
3,000
2,000
1,000
500
Replicon
SEM
N
9,000
7,000
5,000
3,000
2,000
1,000
500

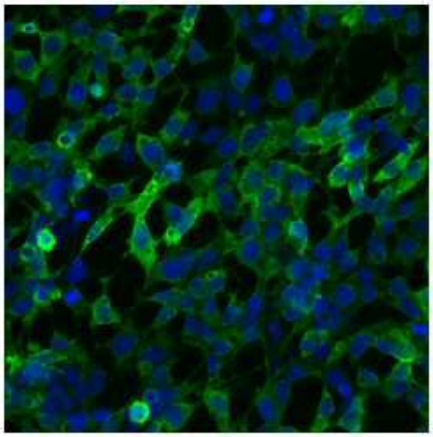
도면5


Spike
Nucleocapsid
Membrane
100x
400x

도면6

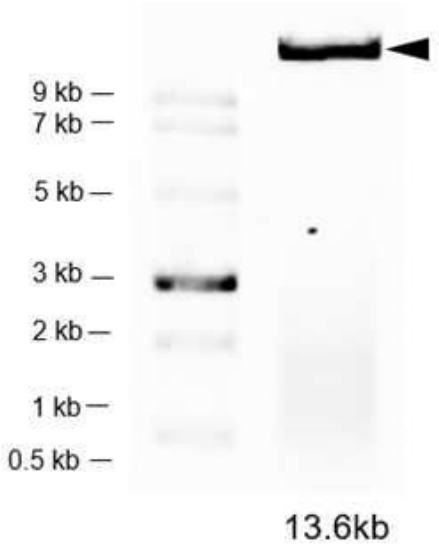


도면7

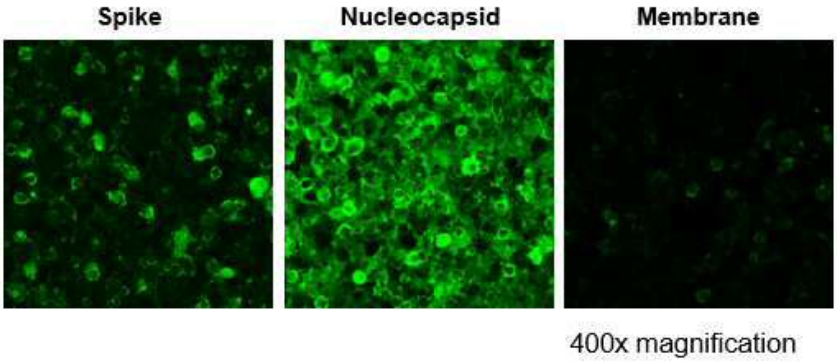


Anti-NP, 400x magnification

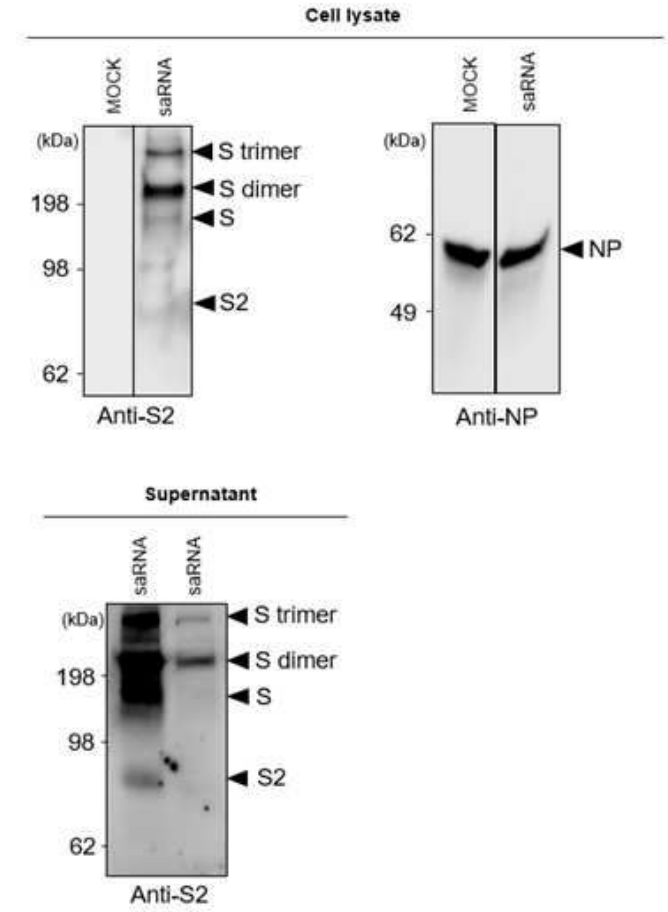
도면8


9 kb
7 kb
5 kb
3 kb
2 kb
1 kb
0.5 kb
13.6kb

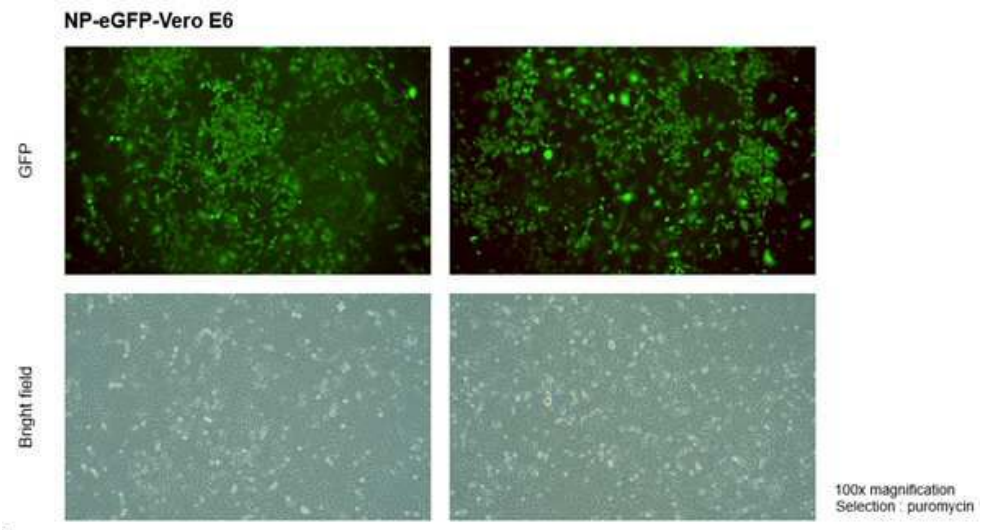
도면9


Spike
Nucleocapsid
Membrane
400x magnification

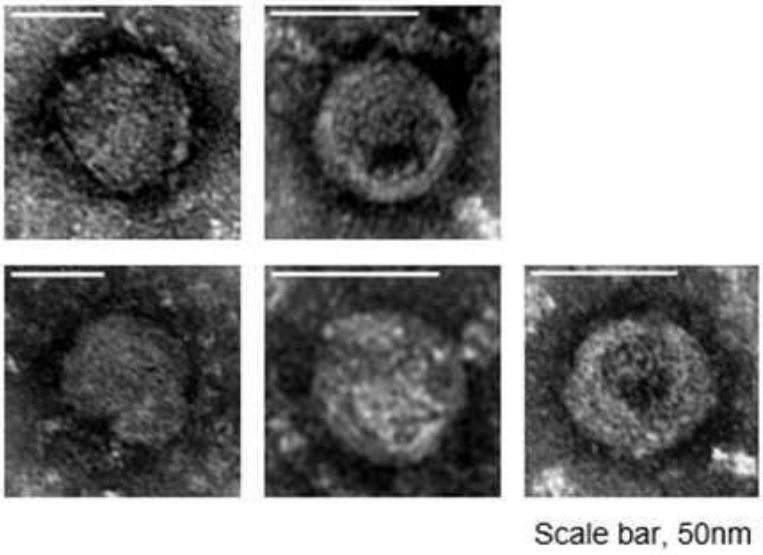
도면10


Cell lysate
MOCK
saRNA
(kDa)
198
98
62
S trimer
S dimer
S
S2
Anti-S2
MOCK
saRNA
(kDa)
62
49
NP
Anti-NP
Supernatant
saRNA
saRNA
(kDa)
198
98
62
S trimer
S dimer
S
S2
Anti-S2

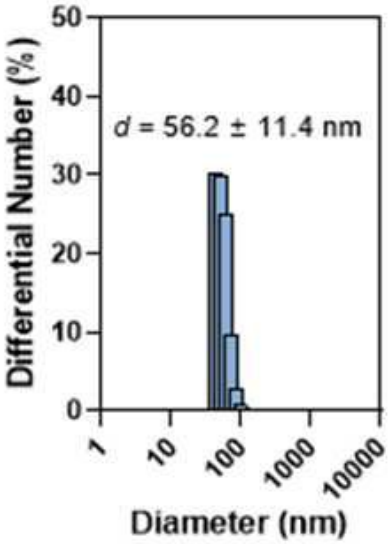
도면11


NP-eGFP-Vero E6
GFP
Bright field
100x magnification
Selection : puromycin

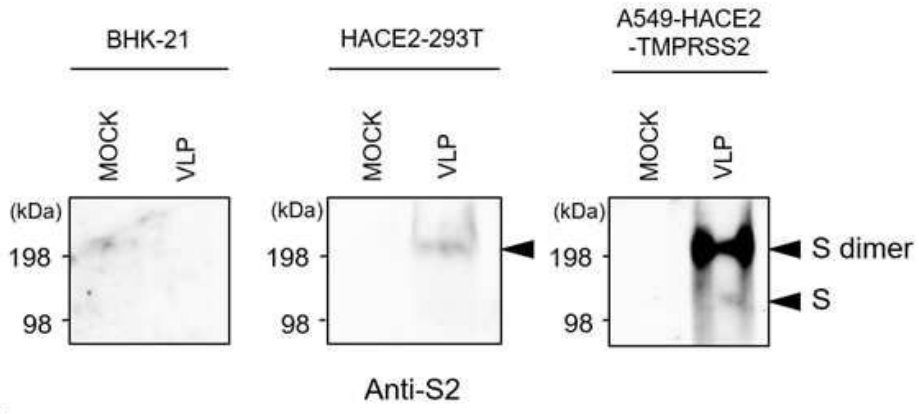
도면12



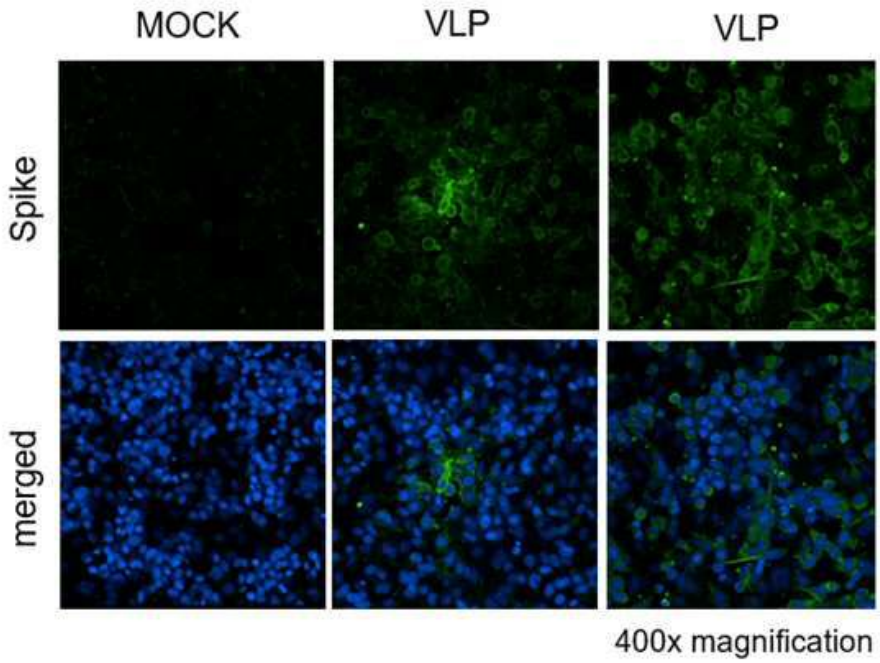
도면13



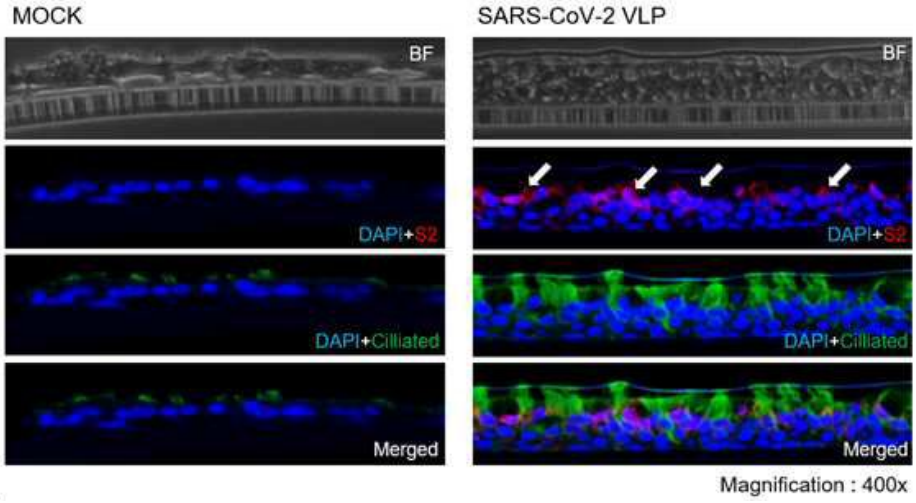
도면14



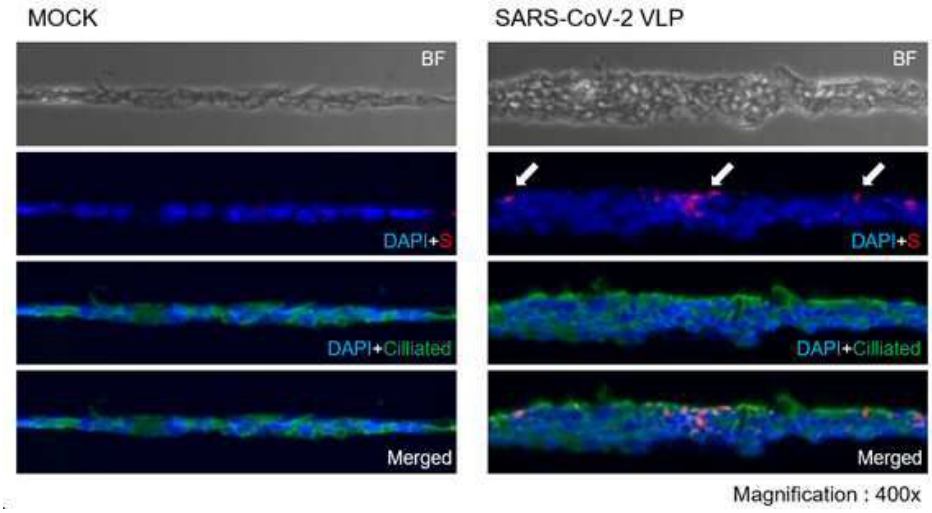
도면15


MOCK
VLP
VLP
Spike
merged
400x magnification

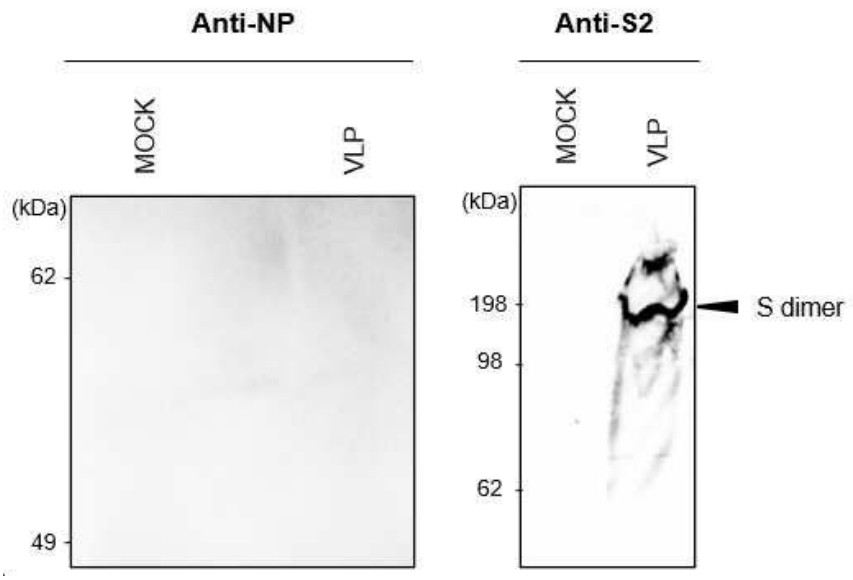
도면16


MOCK
SARS-CoV-2 VLP
BF
BF
DAPI+S2
DAPI+S2
DAPI+Cilliated
DAPI+Cilliated
Merged
Merged
Magnification : 400x

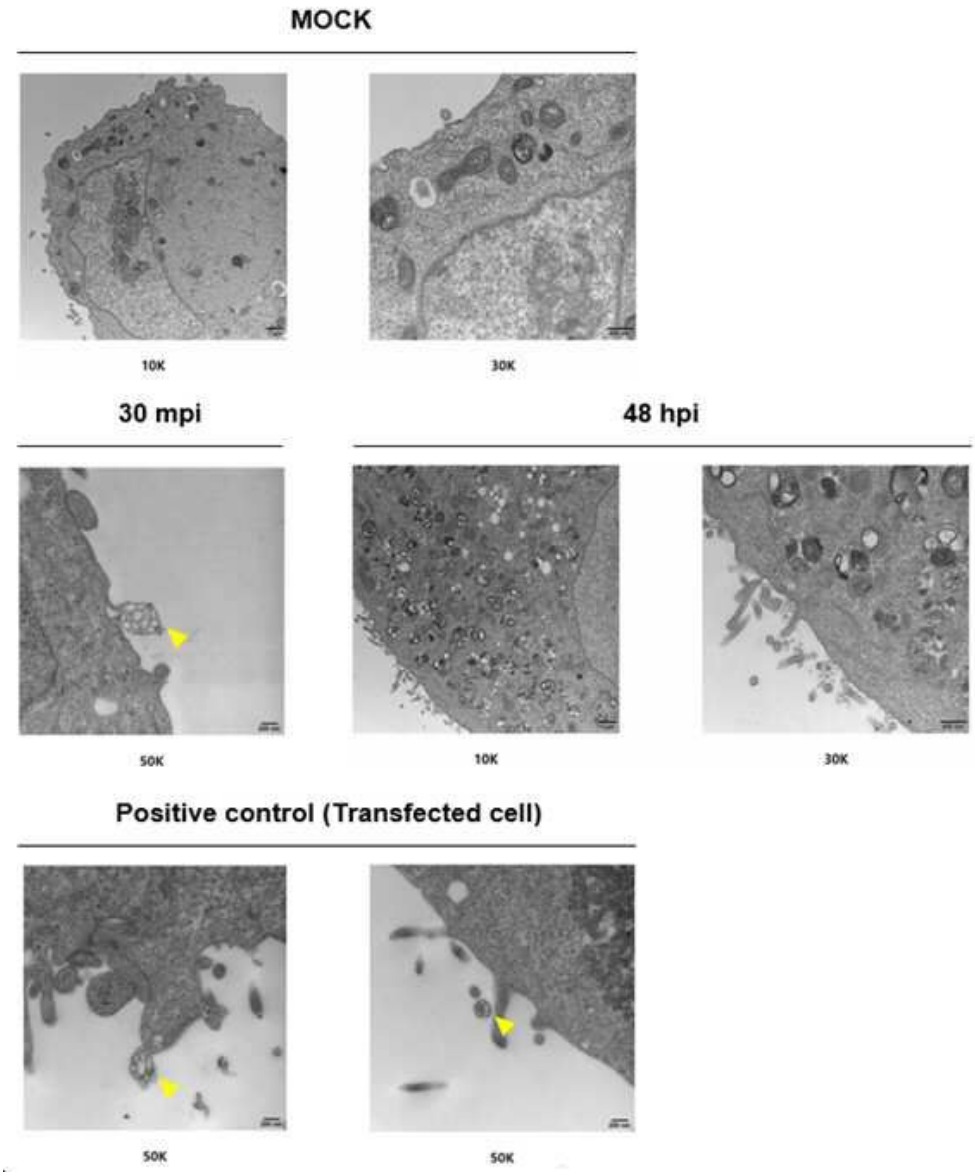
도면17


MOCK
SARS-CoV-2 VLP
BF
BF
DAPI+S
DAPI+S
DAPI+Ciliated
DAPI+Ciliated
Merged
Merged
Magnification : 400x

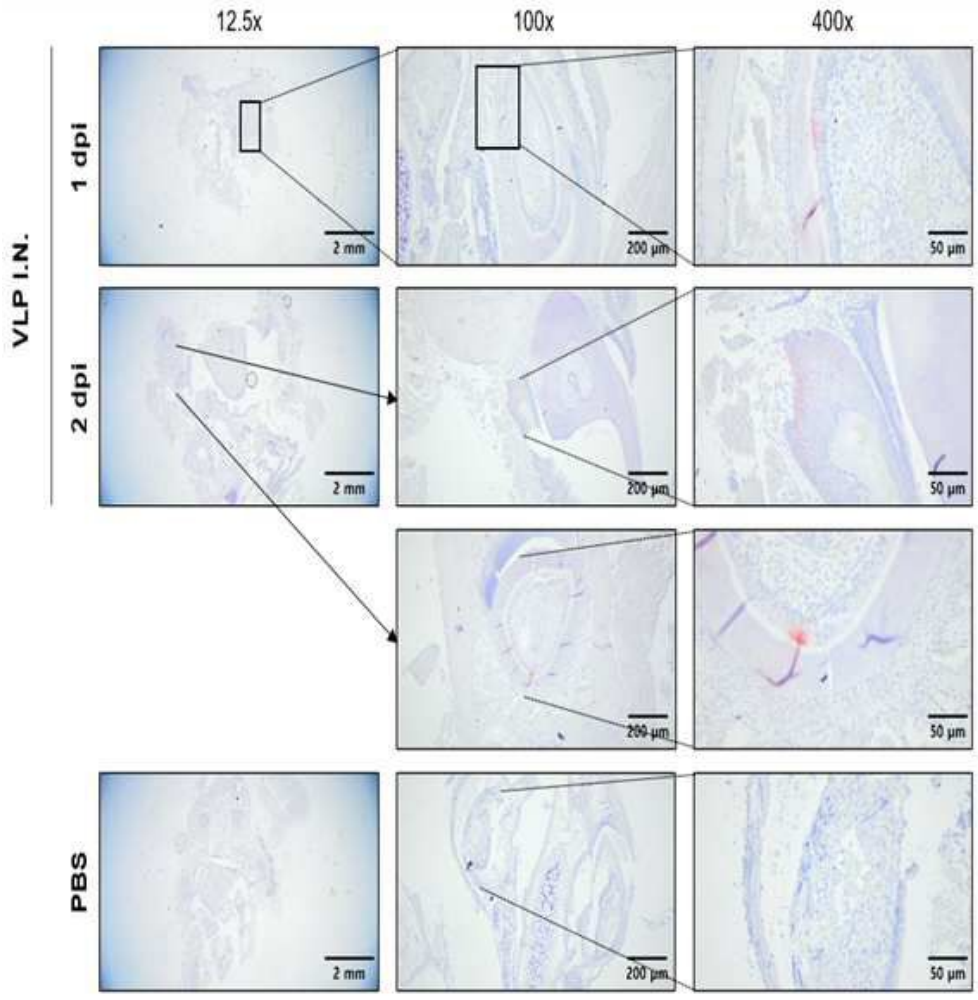
도면18


Anti-NP
Anti-S2
MOCK
VLP
MOCK
VLP
(kDa)
62
49
(kDa)
198
98
62
S dimer

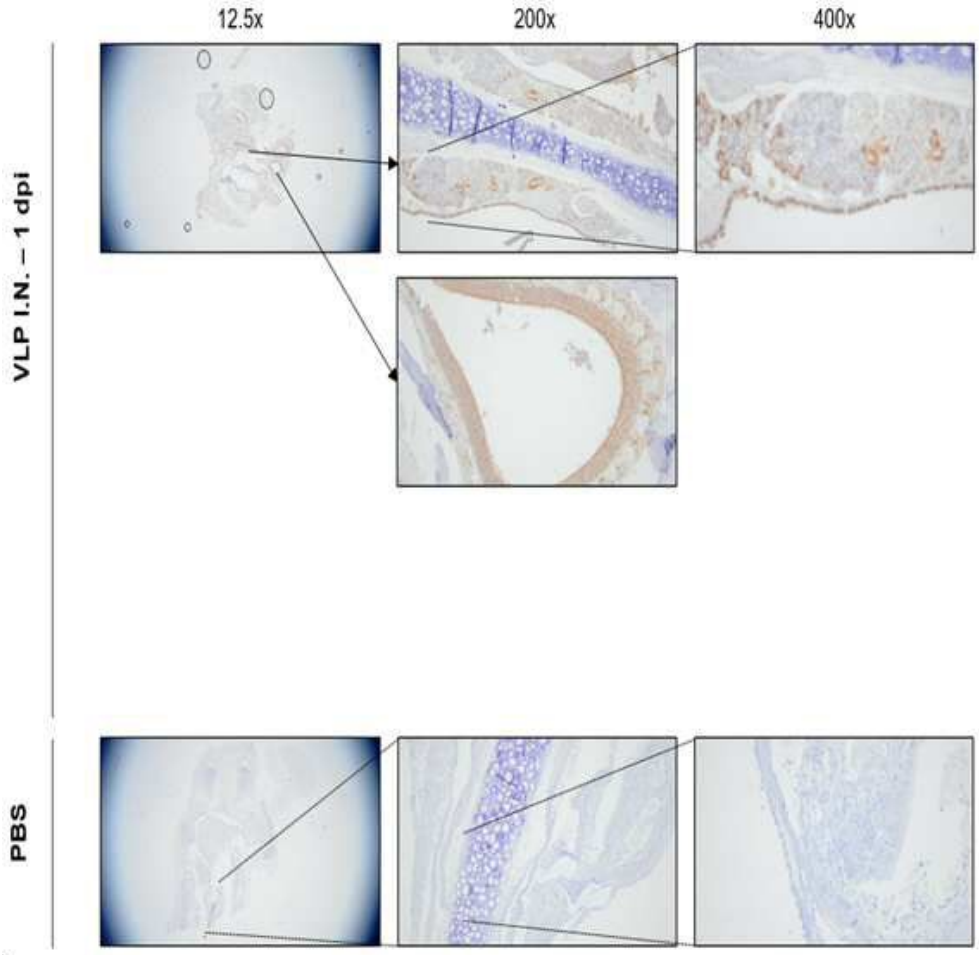
도면19


MOCK
10K
30K
30 mpi
48 hpi
50K
10K
30K
Positive control (Transfected cell)
50K
50K

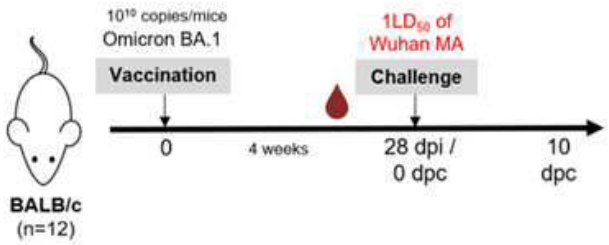
도면20



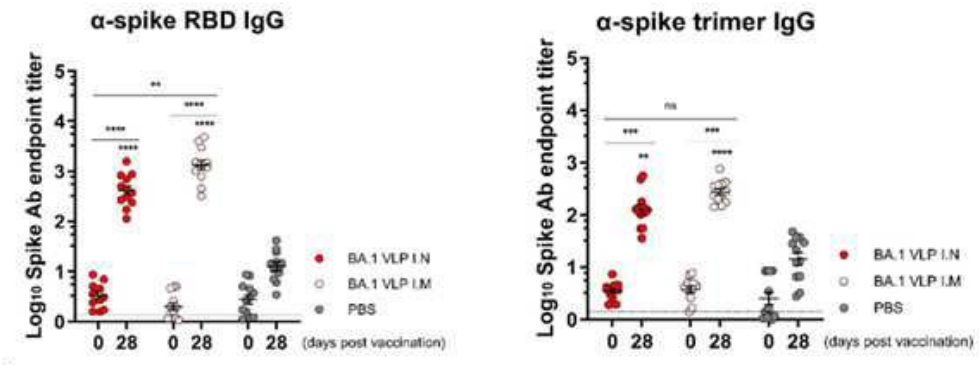
도면21



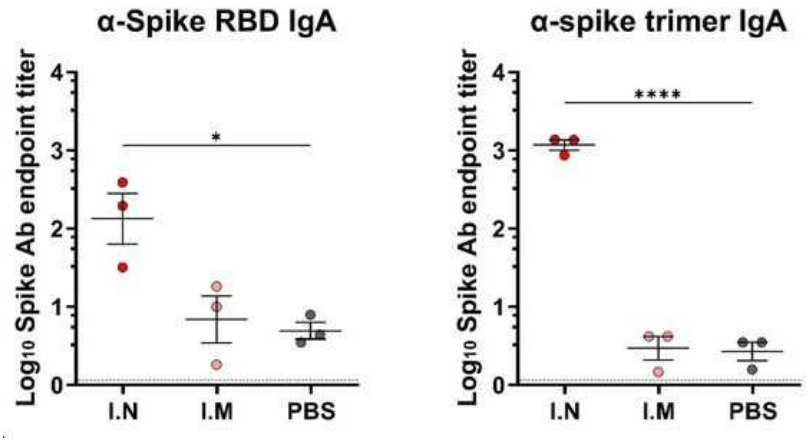
도면22



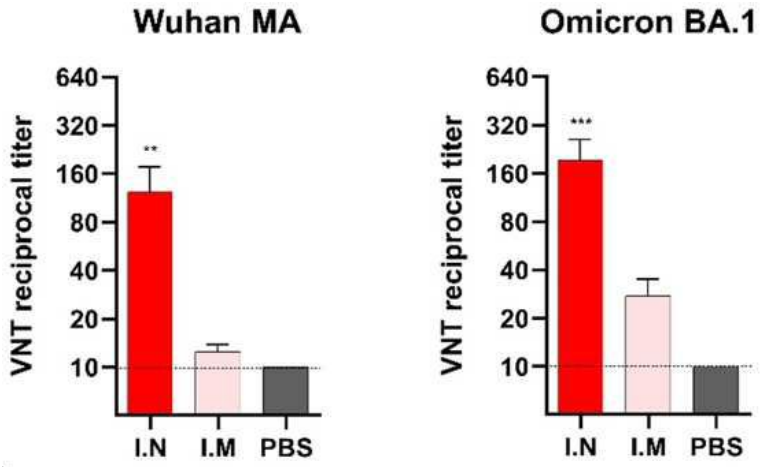
도면23



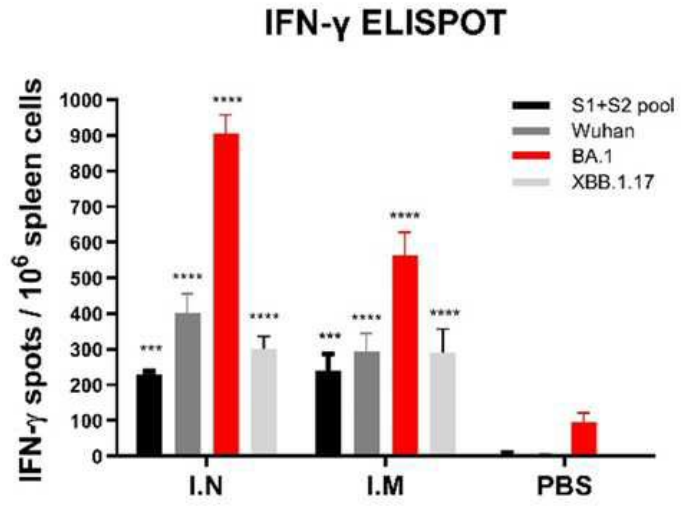
도면24



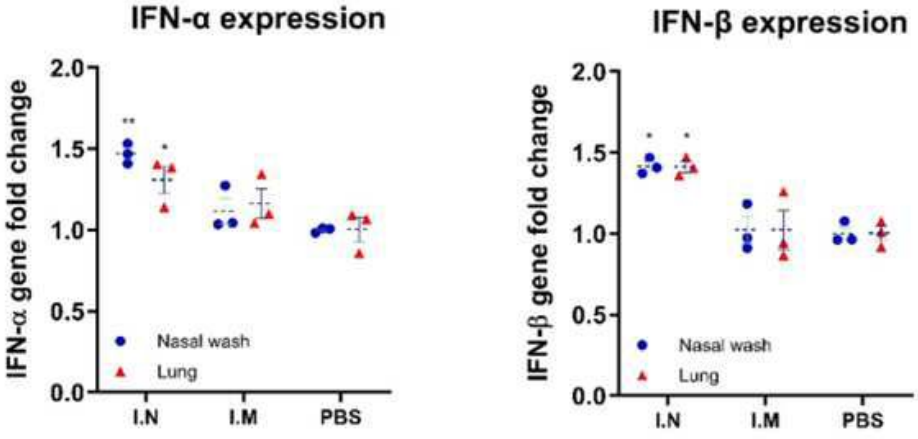
도면25



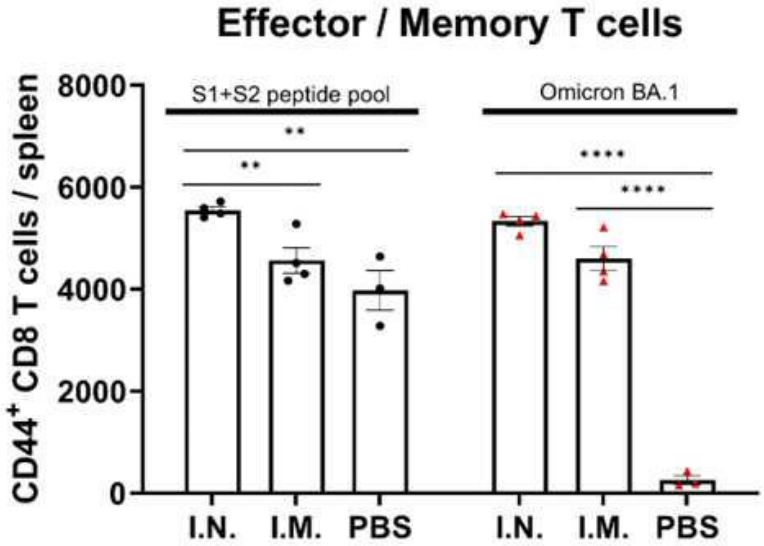
도면26



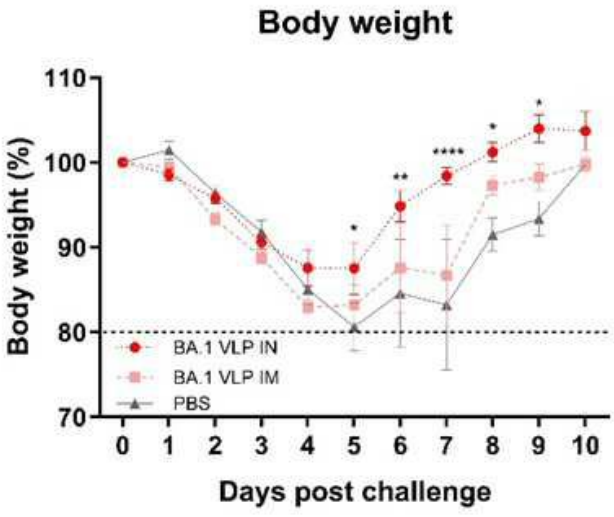
도면27



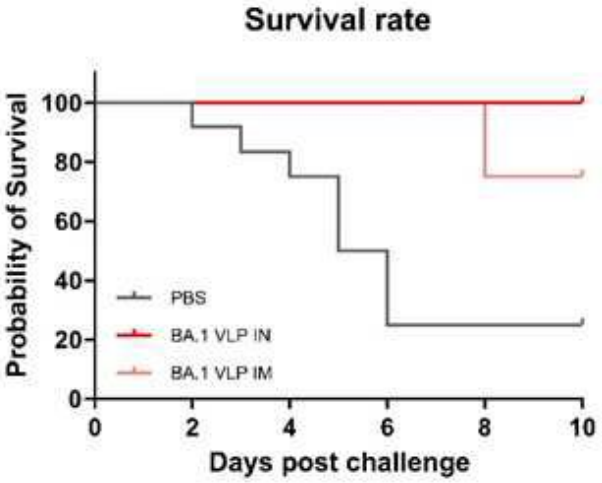
도면28



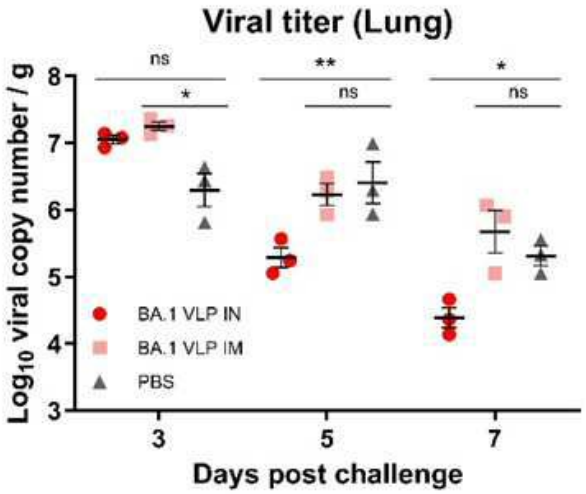
도면29



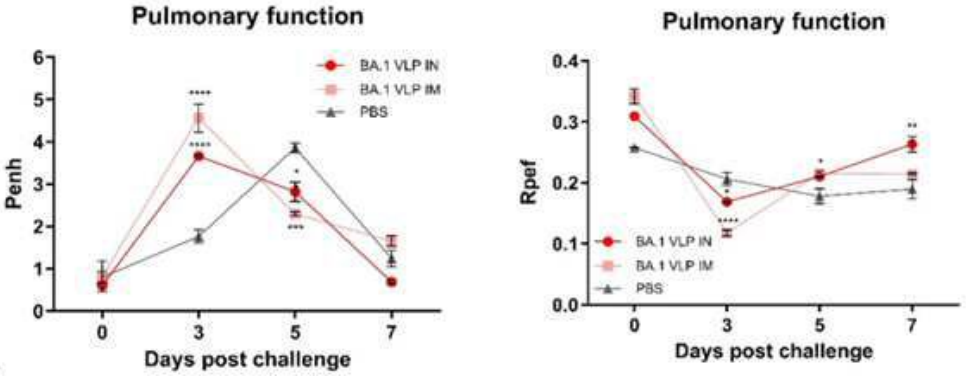
도면30



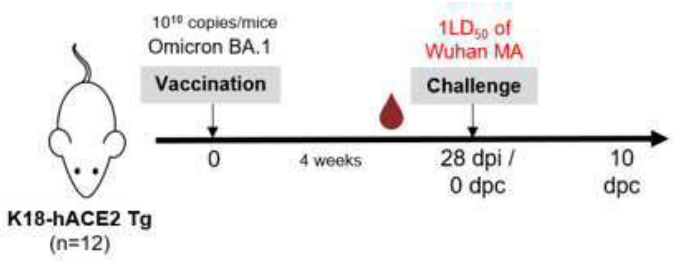
도면31



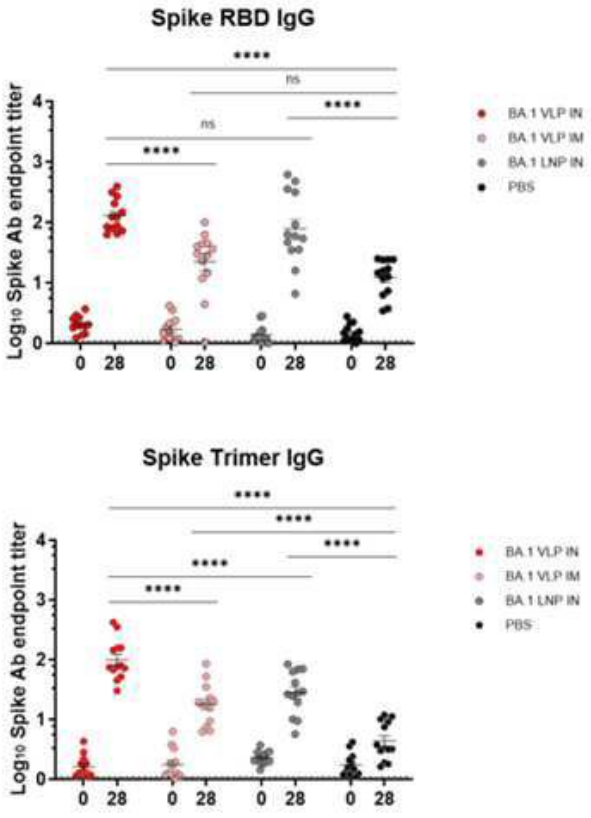
도면32



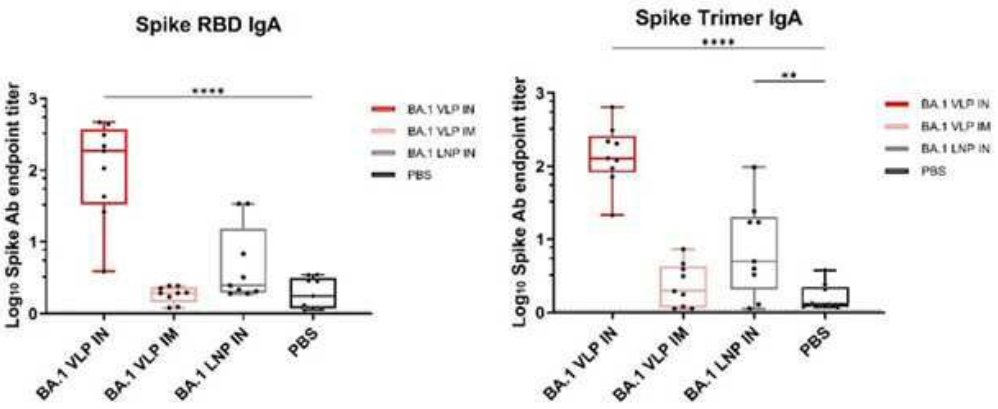
도면33



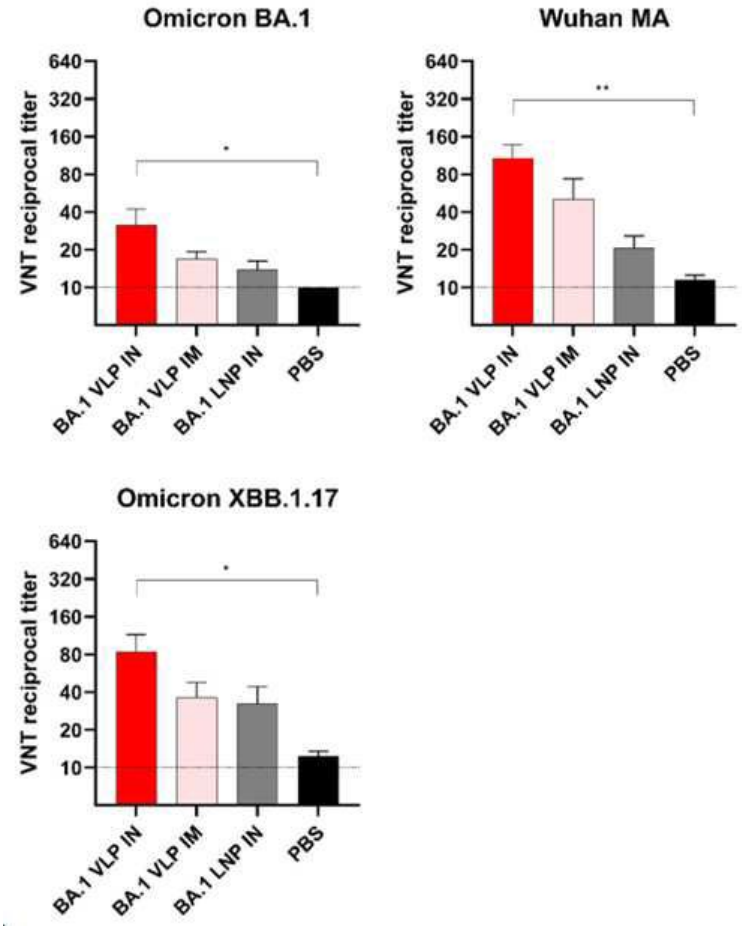
도면34



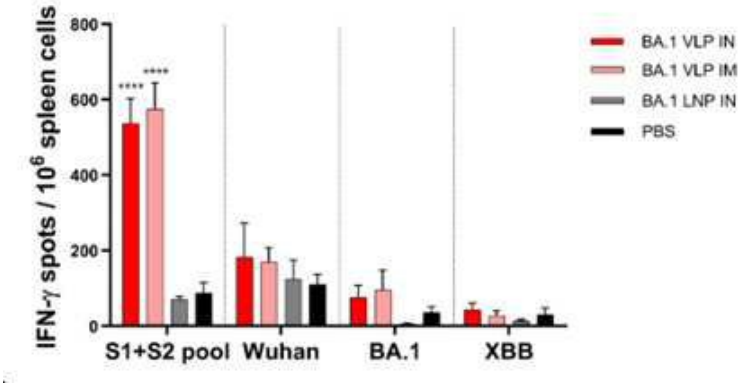
도면35



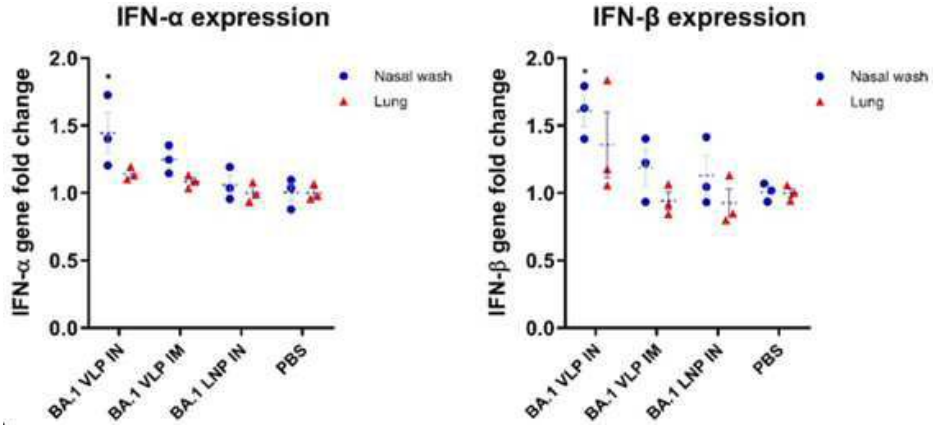
도면36


Omicron BA.1
Wuhan MA
Omicron XBB.1.17
VNT reciprocal titer
640
320
160
80
40
20
10
*
**
BA.1 VLP IN
BA.1 VLP IM
BA.1 LNP IN
PBS

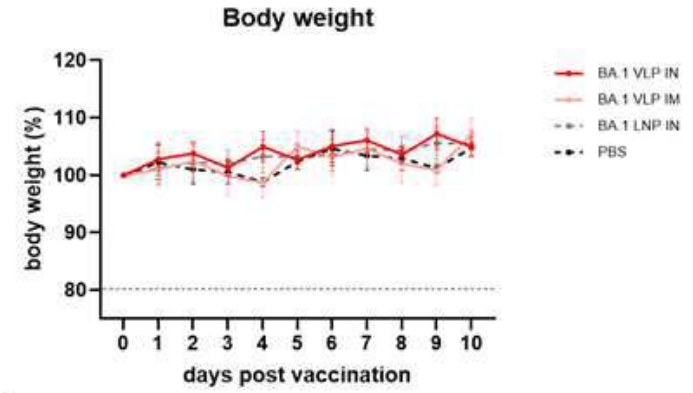
도면37


IFN-γ spots / 10^6 spleen cells
800
600
400
200
0
****
****
S1+S2 pool
Wuhan
BA.1
XBB
BA.1 VLP IN
BA.1 VLP IM
BA.1 LNP IN
PBS

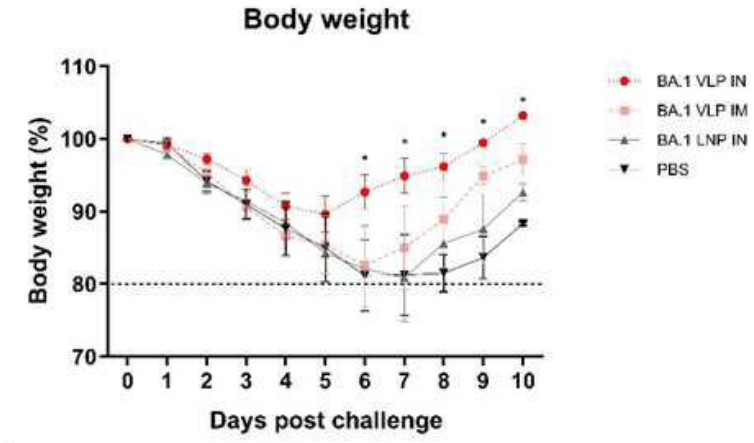
도면38



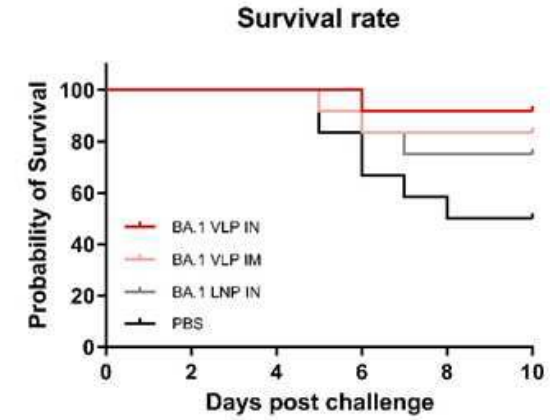
도면39



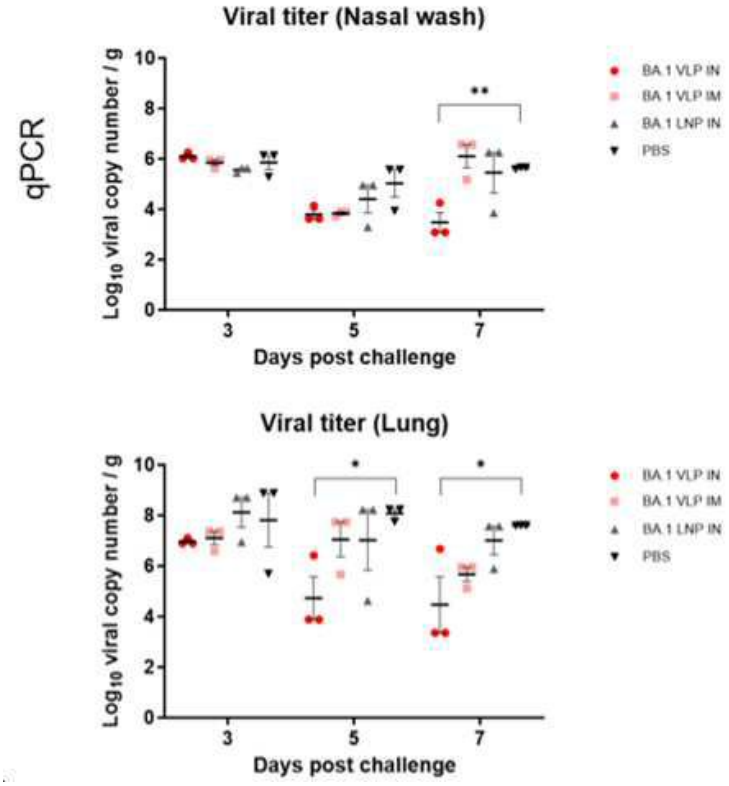
도면40



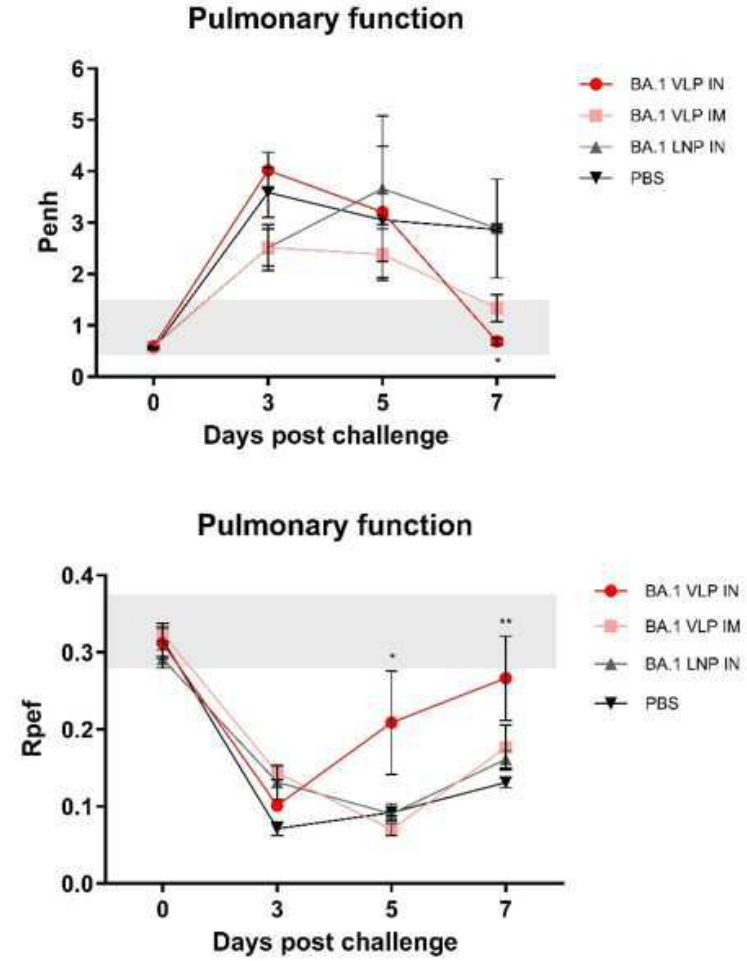
도면41


Survival rate
Probability of Survival
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
Days post challenge
BA.1 VLP IN
BA.1 VLP IM
BA.1 LNP IN
PBS

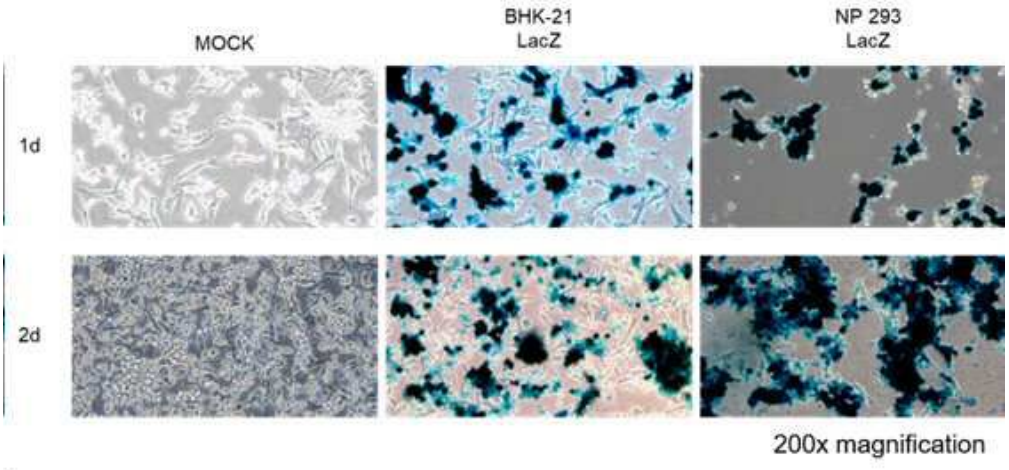
도면42


qPCR
Viral titer (Nasal wash)
Log10 viral copy number / g
Days post challenge
BA.1 VLP IN
BA.1 VLP IM
BA.1 LNP IN
PBS
Viral titer (Lung)
Log10 viral copy number / g
Days post challenge
BA.1 VLP IN
BA.1 VLP IM
BA.1 LNP IN
PBS

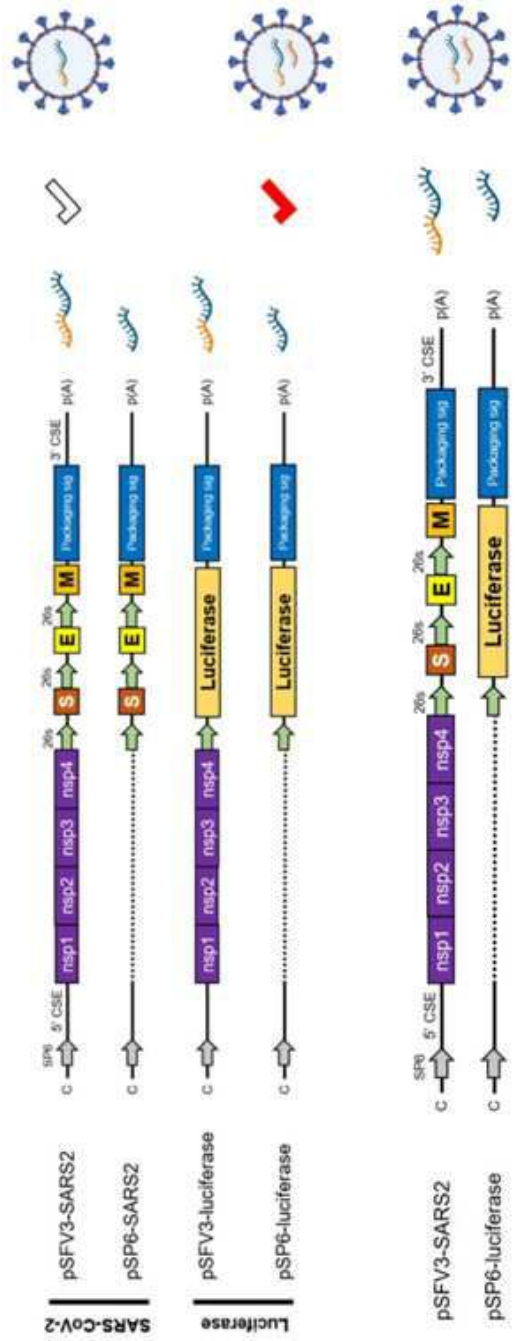
도면43


Pulmonary function
Penh
Days post challenge
BA.1 VLP IN
BA.1 VLP IM
BA.1 LNP IN
PBS
Pulmonary function
Rpef
Days post challenge
BA.1 VLP IN
BA.1 VLP IM
BA.1 LNP IN
PBS

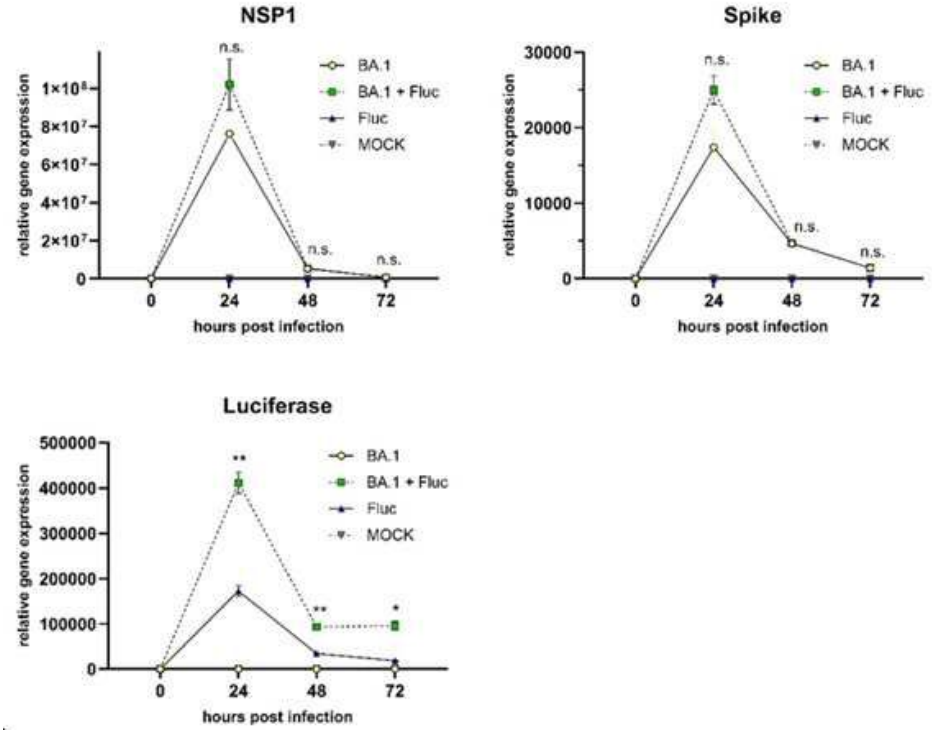
도면44


MOCK
BHK-21
LacZ
NP 293
LacZ
1d
2d
200x magnification

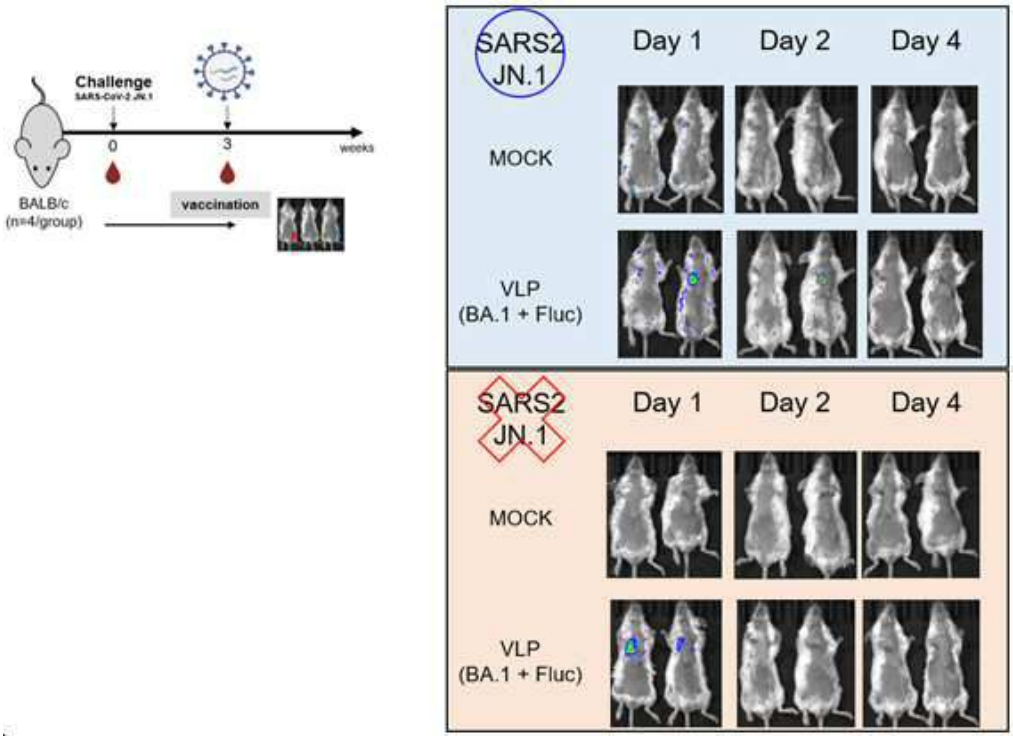
도면45


SARS-CoV-2
Luciferase
pSFV3-SARS2
pSP6-SARS2
pSFV3-luciferase
pSP6-luciferase
SP6
5' CSE
nsp1
nsp2
nsp3
nsp4
26s
S
E
M
Packaging sig
3' CSE
p(A)
Luciferase
C

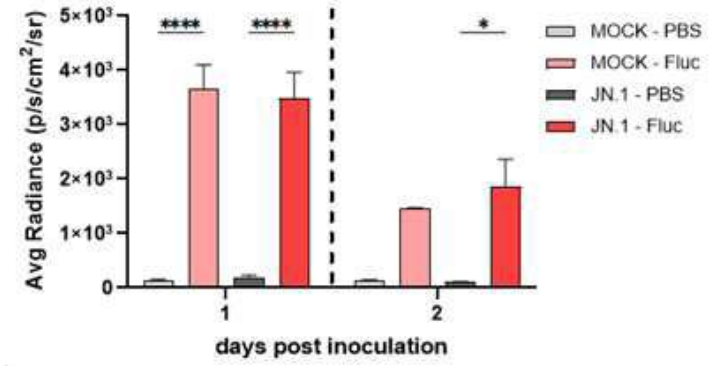
도면46


NSP1
relative gene expression
1×10⁸
8×10⁷
6×10⁷
4×10⁷
2×10⁷
0
n.s.
n.s.
n.s.
0
24
48
72
hours post infection
BA.1
BA.1 + Fluc
Fluc
MOCK
Spike
relative gene expression
30000
20000
10000
0
n.s.
n.s.
n.s.
0
24
48
72
hours post infection
BA.1
BA.1 + Fluc
Fluc
MOCK
Luciferase
relative gene expression
500000
400000
300000
200000
100000
0
**
**
*
0
24
48
72
hours post infection
BA.1
BA.1 + Fluc
Fluc
MOCK

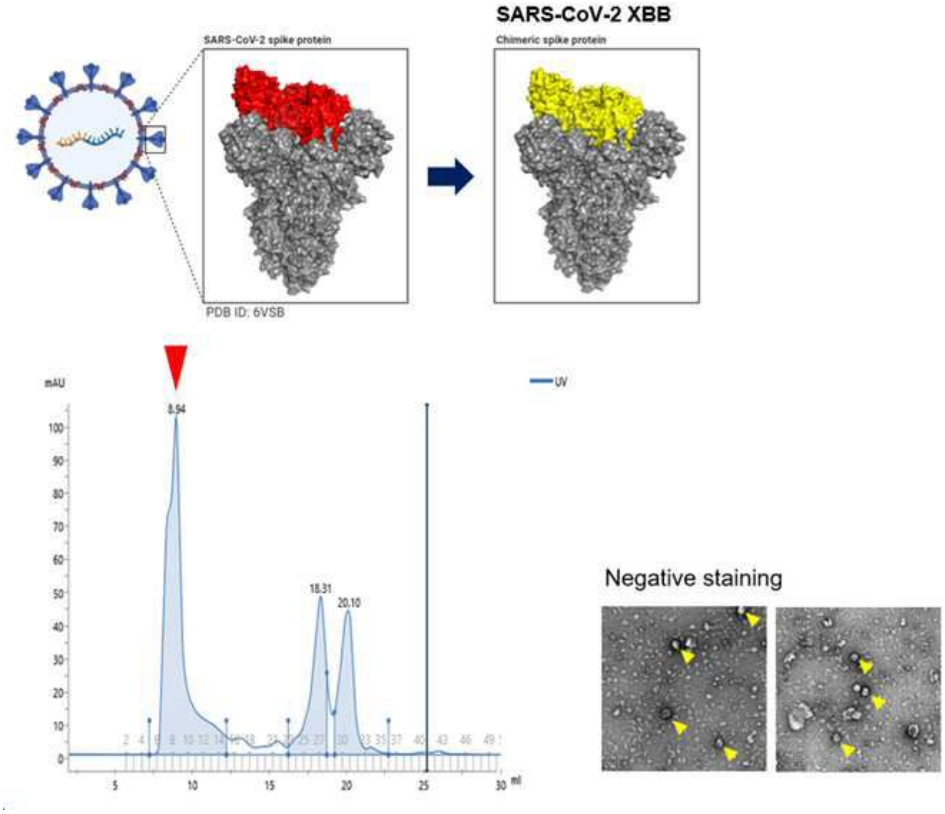
도면47


Challenge
SARS-CoV-2 JN.1
0
3
weeks
BALB/c
(n=4/group)
vaccination
SARS2
JN.1
Day 1
Day 2
Day 4
MOCK
VLP
(BA.1 + Fluc)
SARS2
JN.1
Day 1
Day 2
Day 4
MOCK
VLP
(BA.1 + Fluc)

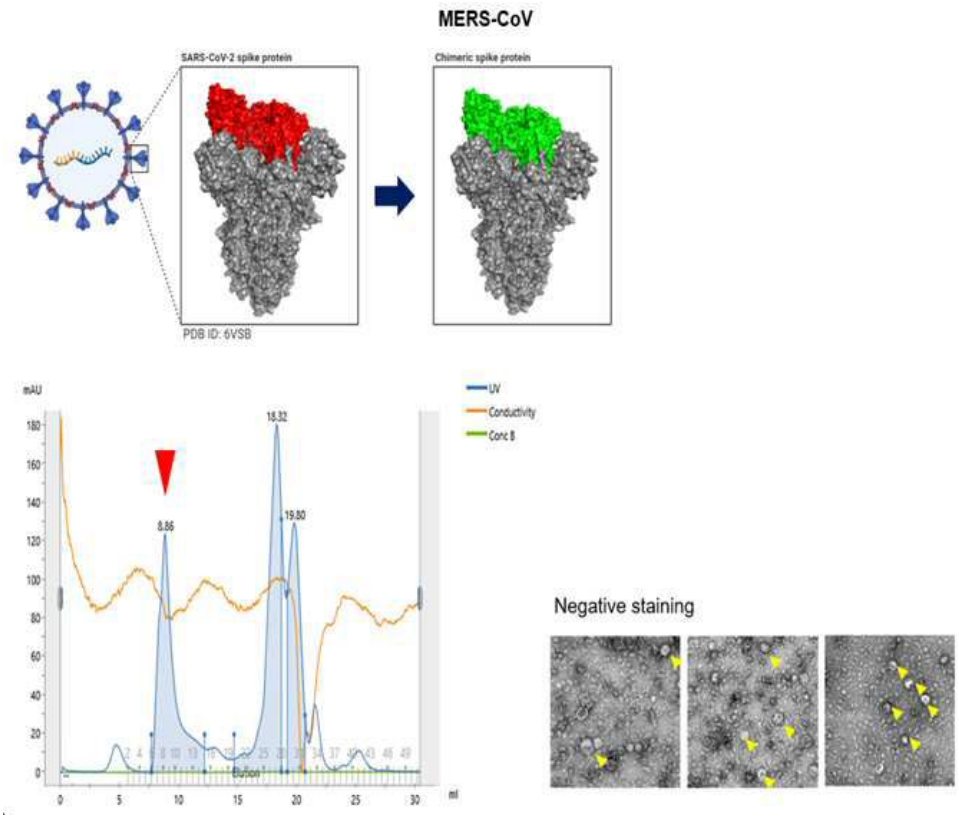
도면48


Avg Radiance (p/s/cm²/sr)
5×10³
4×10³
3×10³
2×10³
1×10³
0
****
****
*
MOCK - PBS
MOCK - Fluc
JN.1 - PBS
JN.1 - Fluc
1
2
days post inoculation

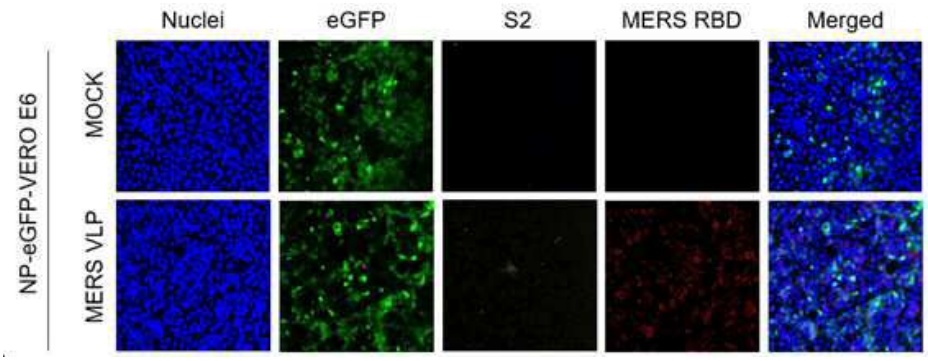
도면49


SARS-CoV-2 XBB
SARS-CoV-2 spike protein
Chimeric spike protein
PDB ID: 6VSB
mAU
UV
8.94
18.31
20.10
ml
Negative staining

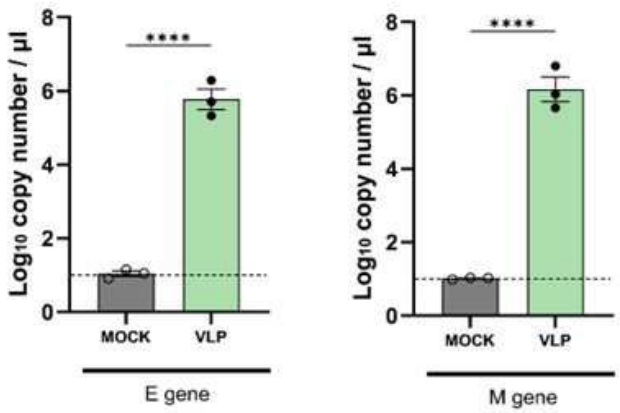
도면50


MERS-CoV
SARS-CoV-2 spike protein
Chimeric spike protein
PDB ID: 6VSB
mAU
UV
Conductivity
Conc B
8.86
18.32
19.80
Elution
ml
Negative staining

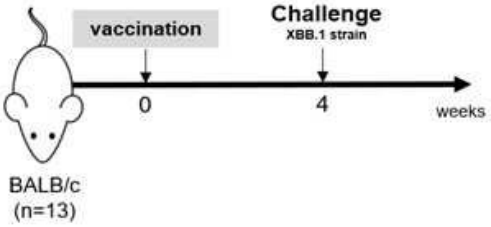
도면51


Nuclei
eGFP
S2
MERS RBD
Merged
NP-eGFP-VERO E6
MOCK
MERS VLP

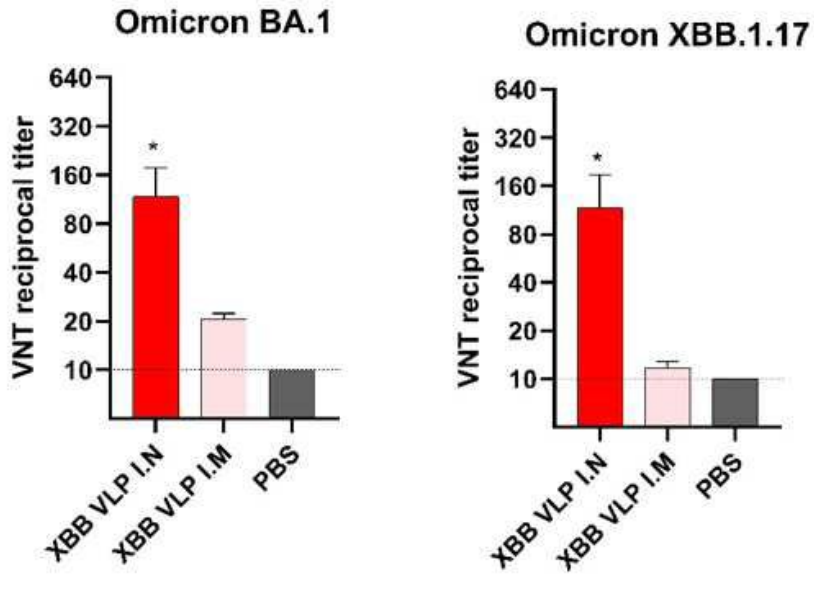
도면52



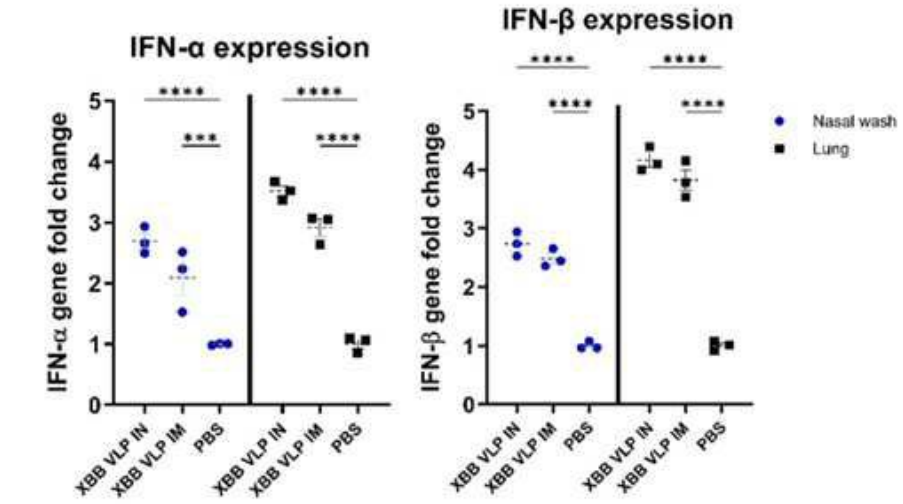
도면53



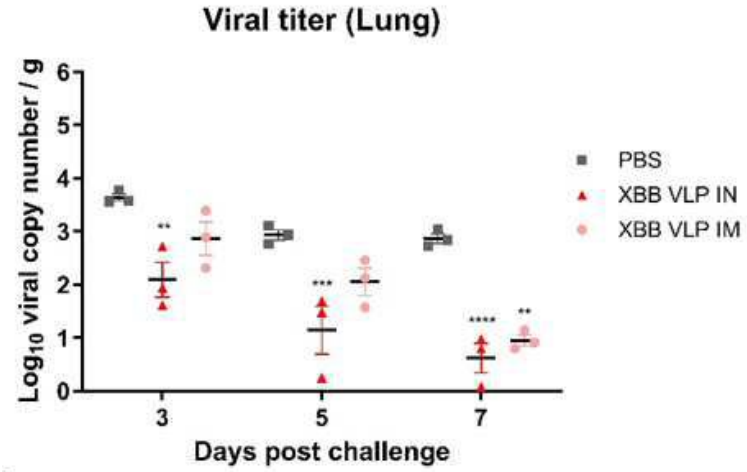
도면54



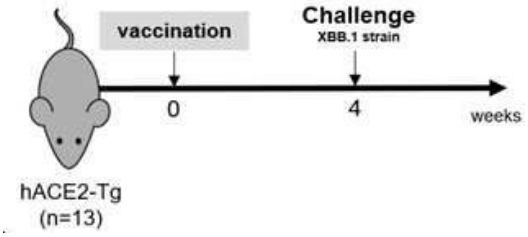
도면55



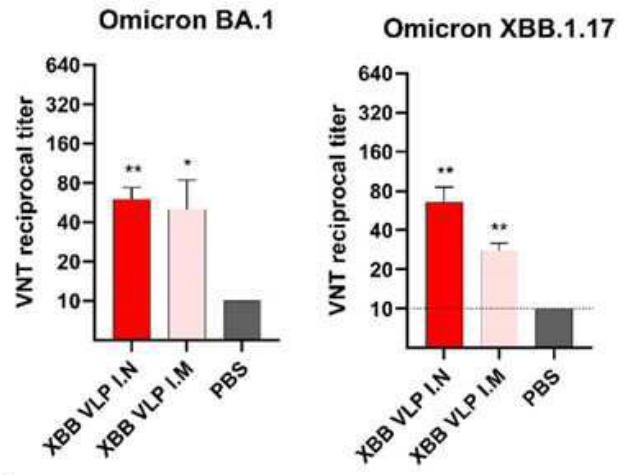
도면56



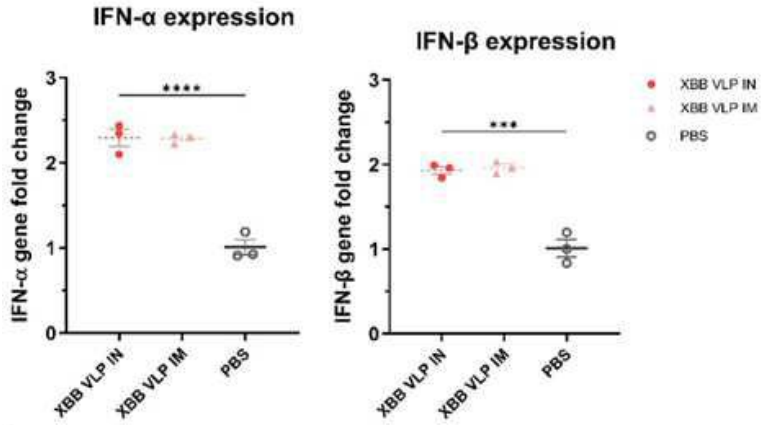
도면57



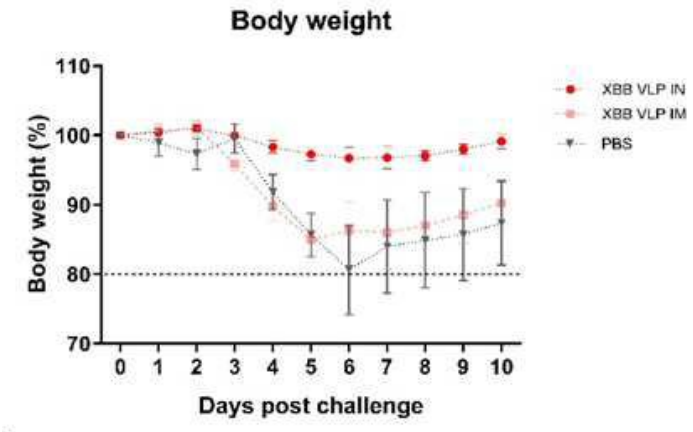
도면58



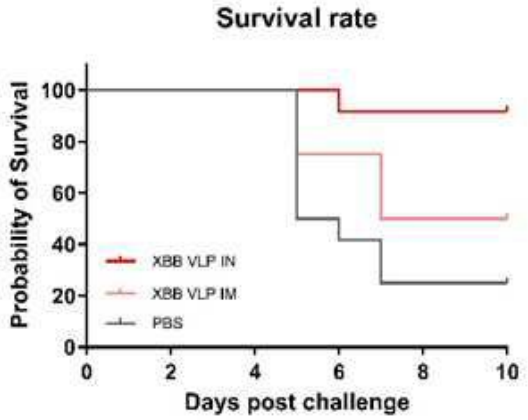
도면59



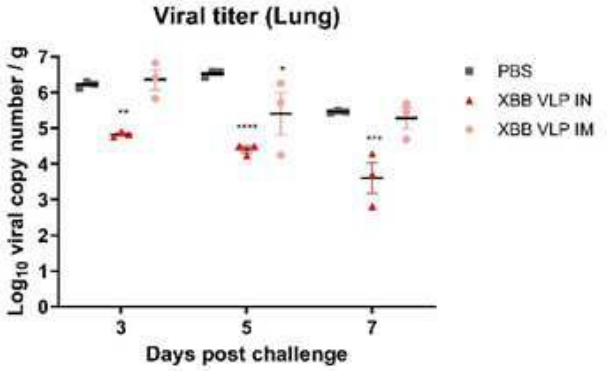
도면60



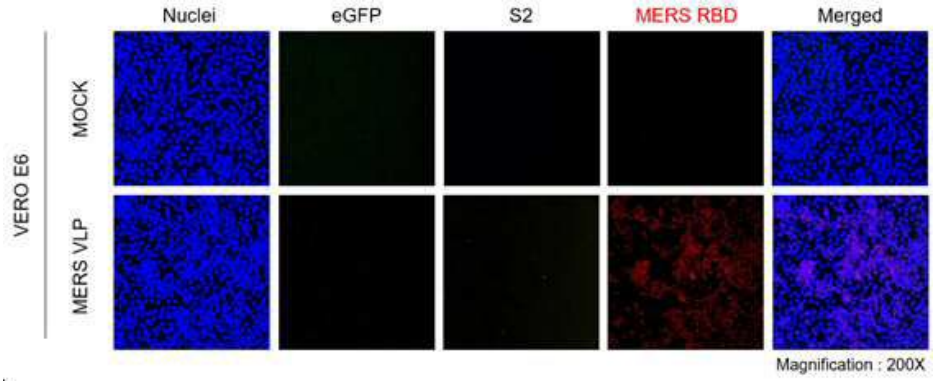
도면61



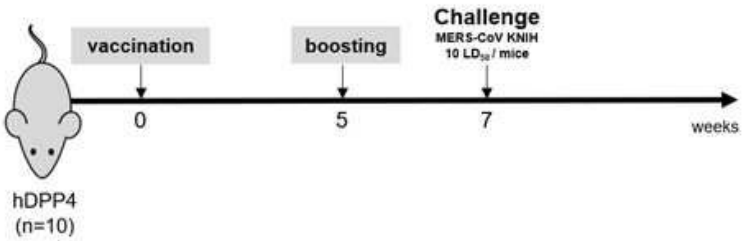
도면62



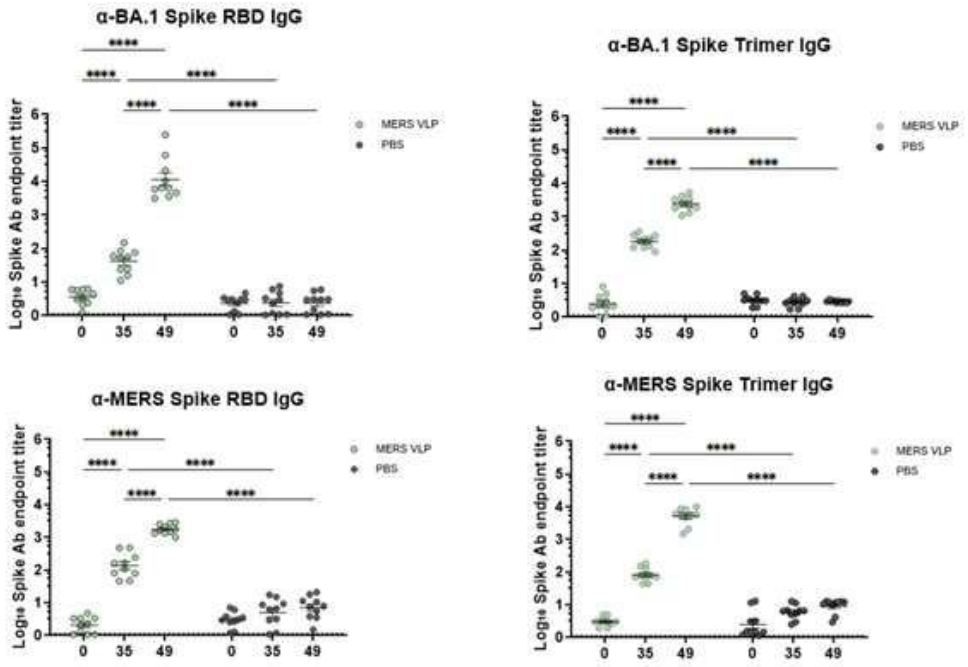
도면63



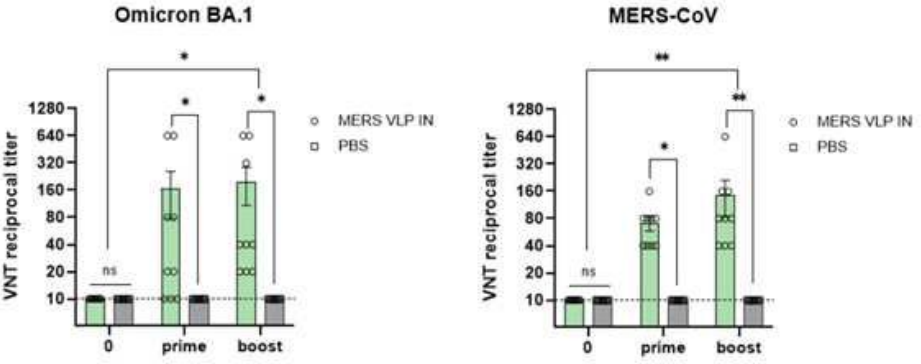
도면64



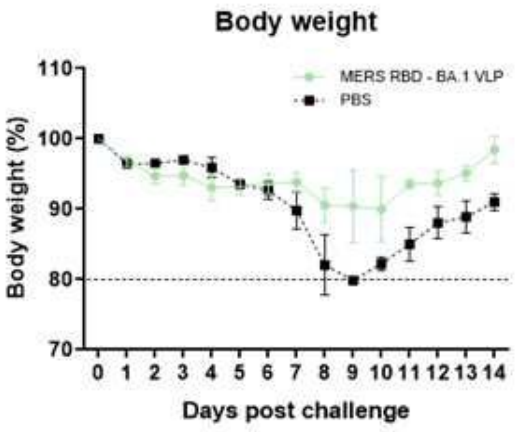
도면65



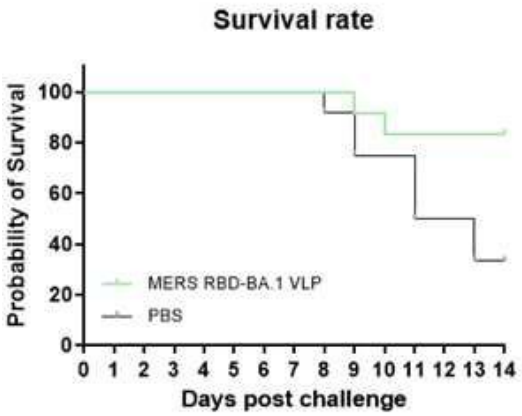
도면66



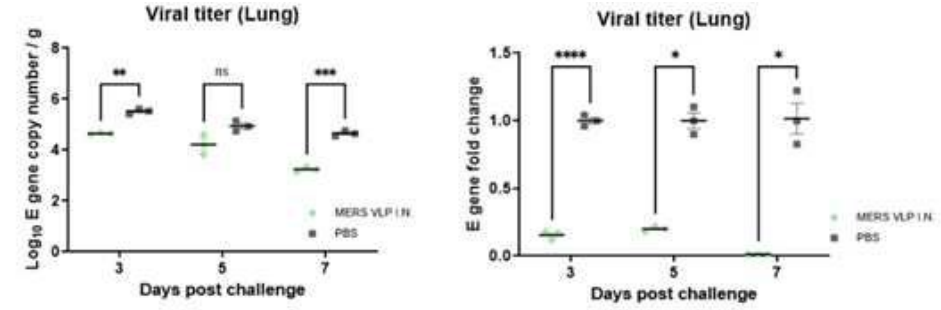
도면67



도면68


Survival rate
Probability of Survival
100
80
60
40
20
0
MERS RBD-BA.1 VLP
PBS
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Days post challenge

도면69


Viral titer (Lung)
Log10 E gene copy number / g
**
ns
***
MERS VLP I.N
PBS
3
5
7
Days post challenge
Viral titer (Lung)
E gene fold change
****
*
*
1.5
1.0
0.5
0.0
MERS VLP I.N
PBS
3
5
7
Days post challenge

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.