(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0083067
(43) 공개일자 2025년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 39/215* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/215 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0106833
(22) 출원일자 2024년08월09일
심사청구일자 2024년08월09일
(30) 우선권주장
1020230167537 2023년11월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
대한민국(질병관리청 국립보건연구원장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
(72) 발명자
박만성
서울특별시 강남구 영동대로 22, 812동 802호 (일원동, 디에이치 자이 개포)
김기순
서울특별시 양천구 목동중앙북로 38, 105동 302호 (목동, 롯데캐슬위너아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 11 항

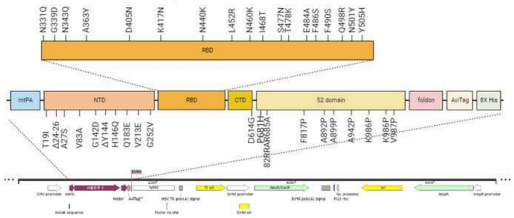
(54) 발명의 명칭 **계통수 분석 기반 교차 면역원성을 갖는 SARS-CoV-2 스파이크 모자이크 항원 및 이를 포함하는 백신**

(57) 요 약

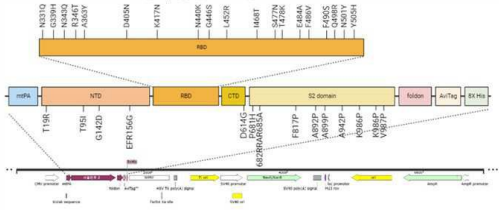
본 발명은 계통수 분석 기반 교차 면역원성을 갖는 SARS-CoV-2 스파이크 모자이크 항원 및 이를 포함하는 백신에 관한 것으로서, 본 발명의 SARS-CoV-2 바이러스 모자이크 항원은 SARS-CoV-2 바이러스 변이주의 스파이크 단백질 서열을 모자이크 기법을 통해 조합하고 추가적인 아미노산 잔기를 치환하여, 초기 prototype, 알파 변이주, 베타 변이주, 감마 변이주, 델타 변이주 및 오미크론 변이주 등과 같은 다양한 SARS-CoV-2 변이주에 대한 범용성을 가지는 백신의 용도로서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3

【서열번호 1】



【서열번호 2】



(52) CPC특허분류
A61P 31/14 (2018.01)
C12N 2770/20022 (2013.01)
C12N 2770/20034 (2013.01)
(72) 발명자
석종현
서울특별시 성북구 보문로30나길 8-12, 201호 (동선동2가)
김도근
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 212
김현국
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 212
김유진
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 212
박우정
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 212

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1776000224
과제번호	2022-ER2403-00
부처명	질병관리청
과제관리(전문)기관명	질병관리청
연구사업명	신기술기반백신플랫폼개발지원사업
연구과제명	코로나19 변이주에 광범위한 면역원성을 갖는 범용 항원 개발
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2022.05.04 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345374127
과제번호	2021R1A6C101C570
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국기초과학지원연구원
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	핵심연구지원센터조성지원과제(백신혁신센터)
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원은 계통수 분석을 통한 최적화된 모자이크 항원(phylogenetically optimized mosaic antigen; POMA)인 것을 특징으로 하는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원.

청구항 3

제1항에 따른 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 코딩하는 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 5

제3항 또는 제4항의 재조합 벡터로 형질도입되어 분리된 세포주.

청구항 6

제1항 또는 제2항의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스 백신.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 백신은 합성 백신 또는 유전자 백신인 것을 특징으로 하는 SARS-CoV-2 바이러스 백신.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 백신은 SARS-CoV-2 변이주 바이러스에 교차 면역원성을 갖는 것을 특징으로 하는 SARS-CoV-2 바이러스 백신.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 SARS-CoV-2 변이주는 델타 변이주, 오미크론 BA.5 변이주 또는 오미크론 XBB.1.5 변이주인 것을 특징으로 하는 SARS-CoV-2 바이러스 백신.

청구항 10

제1항 또는 제2항의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제6항의 SARS-CoV-2 바이러스 백신을 인간을 제외한 동물에 투여하여, SARS-CoV-2 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 계통수 분석 기반 교차 면역원성을 갖는 SARS-CoV-2 스파이크 모자이크 항원 및 이를 포함하는 백신에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 계통수 분석을 통해 최적화된 모자이크 항원(phylogenetically optimized

mosaic antigen; POMA)으로서, 교차 면역원성을 갖는 SARS-CoV-2 스파이크 결합 도메인 모자이크 항원 및 이를 포함하는 백신에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 제2형 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 (SARS-CoV-2)는 코로나바이러스과에 속하는 단일 가닥 RNA 코로나바이러스로, 2019년 11월 17일 중국 우한시에서 최초 보고 이후, 전 세계적인 대유행이 발생하면서 2020년 3월 WHO에서 범유행전염병으로 선포되었다. 이후 대유행 선포는 해제되었지만 2023년 11월 기준 WHO 추산 확진자 수는 772,166,517명에 이르며, 사망자는 6,981,263명에 이른다.

[0003] SARS-CoV-2 대유행 이후 백신 접종 인구가 늘어났음에도 불구하고 초기 prototype 이후 계속되는 변이주의 발생과 변이서열에 따른 면역기능 회피 및 백신효능 저하로 인한 백신접종 후 돌파감염 사례가 계속되고 있으며 이러한 상황에 대한 보건학적, 경제적 중요성이 강조되고 있다.

[0004] SARS-CoV-2 바이러스의 외피에 존재하는 표면 단백질인 스파이크 단백질(Spike)은 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 면역원성을 유도할 수 있는 것으로 알려져있으며, 백신의 주요 항원으로 사용된다. 특히 스파이크 단백질 중 수용체 결합 도메인 (receptor binding domain, RBD)는 SARS-CoV-2에 대한 중화항체를 형성하는 중요한 부위로 알려져 있다.

[0005] 이와 같이 SARS-CoV-2 바이러스의 대유행에 대비하기 위한 백신주의 개발이 요구되며, 특히 다양한 SARS-CoV-2 변이주 (초기 prototype, 알파 변이주, 베타 변이주, 감마 변이주, 델타 변이주 및 오미크론 변이주 등)에 대한 범용성을 가지는 백신의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 미국공개특허 US 2023-0256087 A1 (2023.08.17 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 계통수 분석 기반 교차 면역원성을 갖는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 제공하는데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터 또는 상기 재조합 벡터로 형질도입되어 분리된 세포주를 제공하는데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스 백신 또는 SARS-CoV-2 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 SARS-CoV-2 바이러스 백신을 인간을 제외한 동물에 투여하여, SARS-CoV-2 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질도입되어 분리된 세포주를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스 백신을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스 감염 질

환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 SARS-CoV-2 바이러스 백신을 인간을 제외한 동물에 투여하여, SARS-CoV-2 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 계통수 분석 기반 교차 면역원성을 갖는 SARS-CoV-2 스파이크 모자이크 항원 및 이를 포함하는 백신에 관한 것으로서, 본 발명의 SARS-CoV-2 바이러스 모자이크 항원은 SARS-CoV-2 바이러스 변이주의 스파이크 단백질 서열을 모자이크 기법을 통해 조합하고 추가적인 아미노산 잔기를 치환하여, 초기 prototype, 알파 변이주, 베타 변이주, 감마 변이주, 델타 변이주 및 오미크론 변이주 등과 같은 다양한 SARS-CoV-2 변이주에 대한 범용성을 가지는 백신의 용도로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 유전자 계통수 제작에 사용한 data set 구성을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 SARS-CoV-2 바이러스 스파이크 단백질의 유전자 계통수를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 SARS-CoV-2 POMA 스파이크 항원 단백질 2종의 플라스미드 벡터 지도를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 SARS-CoV-2 POMA 스파이크 항원 단백질 2종의 세포에서의 발현 후 정제 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 SARS-CoV-2 POMA 스파이크 항원 단백질의 ELISA 시험법을 통한 시험관 내(*in vitro*) 반응성 평가 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 SARS-CoV-2 스파이크 항원 단백질의 ELISA 시험법을 통한 변이주 항혈청 4종에 대한 반응성 평가 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 SARS-CoV-2 스파이크 항원 단백질의 햄스터 접종을 통해 획득한 항혈청의 항체역가를 ELISA 시험법을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 마우스 항혈청의 protoype 변이주 바이러스, 오미크론 BA.5 변이주 바이러스, 오미크론 XBB.1.5 변이주 바이러스에 대한 중화능 평가 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 제공한다.

[0020] 바람직하게는, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원은 계통수 분석을 통한 최적화된 모자이크 항원(phylogenetically optimized mosaic antigen; POMA)일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1로 표시되는 항원성을 나타낼 수 있는 T19I, △24-26, A27S, V83A, G142D, △Y144, H146Q, Q183E, V213E, G252V G339D, A363Y, D405N, K417N, N440K, L452R, N460K, I486T, S477N, T478K, E484A, F486S, F490S, Q498R, N501Y, Y505H, D614G 및 P681H 변이를 가지고 있으며, 여기에 더하여 N331Q 및 N342Q 변이로 331번 또는 342번 위치의 N-결합 당쇄화(NLG, N-linked Glycosylation)가 제거되었다. 또한 682번, 683번, 685번 위치의 아르기닌(Arginine)이 제거되고, 817번, 892번, 899번, 942번, 986번, 987번 위치의 아미노산이 각각 프롤린(Proline)으로 치환되어 항원의 구조적 안정성이 증가된 모자이크 스파이크 항원 또는 해당 아미노산 서열을 이용한 백신이 제공된다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 2로 표시되는 T19R, T95I, G142D, EFR156G, G339H, R346T, A363Y, D405N, K417N, N440K, G446S, L452R, I468T, S477N, T478K, E484A, F486V, F490S, Q498R, N501Y, Y505H, D614G 및 P681H 변이를 가지고 있으며, 여기에 더하여 N331Q 및 N343Q 변이로 331번 또는 342번 위치의 N-결합 당쇄화(NLG, N-linked Glycosylation)가 제거되었다. 또한 682번, 683번, 685번 위치의 아르기닌(Arginine)이 제거되고, 817번, 892번, 899번, 942번, 986번, 987번 위치의 아미노산이 각각 프롤린(Proline)으로 치환되어 항원의 구조적 안정성이 증가된 모자이크 스파이크 항원 또는 해당 아미노산 서열을 이용한 백신이 제공된다.

[0023] 본 명세서에서 사용되는 용어 “POMA”(Phylogenetically Optimized Mosaic Antigen)는 유전자 분자계통수를 기반으로 모자이크 항원 최적화 기술을 적용하여 주요 항원 단백질의 변이 경향성 및 다양성을 반영한 아미노산 서열을 도출하는 과정 및 이를 통해 획득한 항원을 의미한다.

[0024] 본 발명자들은 2022년 10월까지의 SARS-CoV-2 바이러스의 유전자 정보를 GISAID로부터 획득하였으며, 이를 이용해 구성한 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 서열을 data set을 통해 BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) 프로그램을 이용하여 유전자 분자계통수를 제작하였다. 제작한 분자계통수의 그룹을 기반으로 11개의 보존서열 (Consensus sequence)를 획득하였고, 11개의 보존서열로부터 2차 보존서열 5개를 획득하였다.

[0025] 이에 대해, 본 발명자들은 획득한 보존서열을 스파이크 단백질의 N terminal domain (NTD), 수용체 결합 도메인 (RBD), C terminal 도메인 (CTD) 및 S2 도메인을 서로 다른 보존서열을 조합하여 POMA 항원을 디자인하고 항원을 제작하여 백신 효능을 검증하고자 하였다.

[0026] 이 때, 특히 수용체 결합 도메인은 중화항체를 형성하는 것으로 알려진 바 있는 epitope을 기준으로 CR3022 site (CR3022 antibody bingding site), S309 site (S309 antibody binding site), RBS (Receptor binding site) 3 site로 구별하여 보존서열을 조합하여 POMA 항원을 제작하였다.

[0027] 이와 같은 방법으로 제작한 POMA 서열에 이후 발생한 오미크론 변이주에 대한 교차 면역원성 획득을 위해 N460K, F486S, F490S 또는 G339H, R346T, G446S 변이를 가지고 있으며, 더하여 N331Q 및 N342Q 변이로 331번 또는 342번 위치의 N-결합 당쇄화(NLG, N-linked Glycosylation)가 제거되었으며, 항원의 안정성을 높이기 위하여 A363T 및 P468T 변이를 포함한다.

[0028] 22년 10월 이후에 등장한 XBB.1, XBB.1.5, BQ.1, BN.1 등의 변이주의 서열은 POMA 항원 서열 디자인에 포함되지 않았으나 넓은 범위에서의 교차면역원성을 위해 추가적인 변이를 도입하였다. 서열번호 1로 나타나는 POMA의 경우 해당 변이주들에서 공통으로 나타나는 아미노산 변이인 460번 위치의 아미노산이 아스파라긴 (Asparagine)에서 라이신 (Lysine)으로, 486번 및 490번 위치의 아미노산이 페닐알라닌 (Phenylalanine)에서 세린 (Serine)으로의 치환을 RBS에 적용하였으며, 같은 방법으로 서열번호 2로 나타나는 POMA 항원은 339번 및 446번 위치의 글라이신 (Glycine)을 세린 (Serine)으로 치환되고 346번 위치의 아르기닌 (Arginine)을 트레오닌 (Threonine)으로 치환하였다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 "당쇄화 (Glycosylation)"는 당분자에서 헤미아세탈 수산기가 제거된 글리코실기를 단백질에 전위하는 반응을 의미한다. 상기 당쇄화는 각 반응에 특이적인 글리코실전달효소가 촉매로 관여하며, 당뉴클레오티드를 공급체 기질로 하는 경우가 주를 이룬다. 수용체로는 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 히드록실리신 등의 아미노산 잔기를 들 수 있다. 이러한 잔기에 전이된 올리고당에 점차로 단당을 전이하는 연속반응에 의해 복합당질을 합성할 수 있다. 상기 복합당질은 생체조직의 구성물질, 특히 세포외 기질의 주성분이 될 수 있고, 그 외 세포 표면에서 세포 인식에도 중요한 역할을 담당한다.

[0030] 본 명세서에서 사용된 용어 "N-결합 당쇄화 (NLG, N-Linked Glycosylation)"는 번역 (translation) 후의 단백질 변형 중 하나로, 다당류와 부착할 수 있는 단백질 내 3개의 연속된 아미노산 서열인 시퀀 (sequon)이 "N-X-S/T (X는 프롤린을 제외한 모든 아미노산)"으로 이루어진 경우, 아스파라긴 (Asn, N) 잔기 상에 글리칸 (glycan)이 접합되는 것을 의미한다. 이하, "NLG 첨가"는 비-당쇄화 아미노산의 당쇄화를 의미하고, "NLG 제거"는 당쇄화 아미노산의 비-당쇄화를 의미한다.

[0031] SARS-CoV-2 바이러스의 스파이크 단백질 수용체 결합 도메인 주변의 NLG 상태 변화는 종종 특정 항원 부위 (antigenic site)의 차폐 (masking) 및 숙주 면역기구의 인식으로부터 바이러스 자신을 숨기는 면역 회피를 야기할 수 있다.

[0032] 363번 위치의 아미노산이 알라닌 (Alanine)에서 타이로신 (Tyrosine)으로 468번 위치의 아미노산이 프롤린 (Proline)에서 트레오닌 (Threonine)으로의 치환의 경우 수용체 결합 도메인의 구조적 안정성을 증가시키고, 세포에서의 단백질 발현시 발현량을 증가시키는 효과가 있다.

[0033] 서열번호 1과 서열번호 2로 표시되는 스파이크 단백질 POMA 항원은 수용체 결합 도메인에 더하여 N-terminal 도메인, C-terminal 도메인, S2 도메인을 조합하여 전체 서열을 결정하였다. C-terminal 도메인의 경우 획득한 모든 보존서열에서 614번 위치의 아미노산이 아스파트산 (Aspartic acid)에서 글라이신 (Glycine)으로 치환되었고, 681번 위치의 아미노산이 프롤린 (Proline)에서 히스티딘 (Histidine)으로 치환되어 해당 아미노산 서열을 사용하였다.

[0034] N-Terminal 도메인 아미노산 서열은 POMA 서열번호 1과 서열번호 2 각각에 사용된 수용체 결합 도메인의 서열을 고려하여 서열번호 1번의 경우 XBB.1의 N-Terminal 도메인 아미노산 서열을 활용하였으며, 서열번호 2번의 경우 Delta 변이주의 N-Terminal 도메인 아미노산 서열을 활용하였다.

[0035] S2 도메인 아미노산 서열의 경우 여타 스파이크 단백질 구성 부위보다 변이주 간 아미노산 서열 차이가 크지 않은 부분으로, 초기 변이주의 아미노산 서열을 사용하였으나, 스파이크 단백질의 안정성을 위하여 682번, 683번, 685번 위치의 아르기닌(Arginine)이 제거되었고, 817번, 892번, 899번, 942번, 986번, 987번 위치의 아미노산이 각각 프롤린(Proline)으로 치환이 적용되었다.

[0036] 상기 SARS-CoV-2 범용 스파이크 단백질 POMA 항원 제조를 위해, 본 발명자들은 획득한 4종의 아미노산 서열로부터 코돈 최적화(codon optimization)를 통해 최종 POMA 항원의 염기서열을 획득하였다.

[0037] 또한, 본 발명은 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0038] 바람직하게는, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 코딩하는 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 명세서에서 사용된 용어 “벡터”는 연결되어 있는 핵산 단편을 운반하는데 이용되는 핵산 분자를 의미한다. 상기 벡터는 박테리아, 플라스미드, 파지, 코스미드, 에피솜, 바이러스 및 삽입가능한 DNA 단편(즉, 상동재조합에 의해 숙주 세포 게놈 안으로 삽입 가능한 단편)이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 플라스미드는 벡터의 일종으로서 내부에 추가적으로 DNA 단편을 연결시킬 수 있는 고리형의 이중 가닥 DNA 루프를 의미한다. 또한, 바이러스 벡터는 추가적인 DNA를 바이러스 게놈 안에 연결시킬 수 있다.

[0040] 한편, 상기 POMA 서열로부터 범용 항원 단백질을 발현하기 위하여 플라스미드 벡터 내에 해당 서열을 막 단백질 혹은 분비되는 단백질 형태로 제작하고, 세포에 형질도입하는 것으로 POMA 항원을 획득할 수 있다.

[0041] 이 때, 상기 POMA 항원의 발현을 위하여 사용된 플라스미드 벡터는 구체적으로 pcDNA3.4 벡터일 수 있다. 또한, 항원을 가용성 단백질 형태로 삽입하기 위한 형태는 구체적으로 modified tPA 시그널 펩타이드 (mtPA), POMA 항원 ectodomain, 5GS linker, Foldon, Avi Tag, His Tag 이 연결된 형태일 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질도입되어 분리된 세포주를 제공한다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스 백신을 제공한다.

[0044] 바람직하게는, 본 발명의 백신은 서브유닛 백신, 합성 백신, 유전자 백신 또는 유전공학 백신일수 있다.

[0045] 본 명세서에서 사용된 용어 "서브유닛 백신"은 바이러스의 구성성분 중 면역기능을 일으킬 수 있는 항원 성분만을 추출하여 제조한 백신으로, 바이러스 방어에 필요한 항원 부위에 대해서만 면역형성을 유도함으로써 부작용을 최소화할 수 있다. 예를 들면, SARS-CoV-2 바이러스의 스파이크 단백질 또는 수용체 결합 도메인을 추출하여 사용할 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 사용된 용어 "합성 백신"은 바이러스의 항원 또는 항원결정기만을 화학적으로 합성하거나 또는 재조합 DNA 기술로 생산한 펩타이드를 포함한 백신으로, 예를 들면, SARS-CoV-2 바이러스의 스파이크 단백질 또는 수용체 결합 도메인을 합성하여 사용할 수 있다.

[0047] 본 명세서에서 사용된 용어 “유전자 백신”은 바이러스의 항원 또는 항원결정기의 염기서열을 mRNA, DNA 혹은 유전자가 도입된 바이러스 벡터의 형태로 포함하는 백신으로, 예를 들면 SARS-CoV-2 바이러스 스파이크 단백질 또는 수용체 결합 도메인의 염기서열을 가진 유전물질을 사용할 수 있다.

[0048] 본 명세서에서 사용된 용어 "유전공학 백신"은 바이러스의 병원성을 일으키는 특이 유전자를 변형하거나 제거한 것일 수 있다.

[0049] 바람직하게는, 본 발명의 POMA SARS-CoV-2 항원을 이용한 백신의 경우 SARS-CoV-2 변이주에 대한 교차 면역원성을 부여할 수 있으며 구체적으로 prototype, 알파 변이주, 베타 변이주, 감마 변이주, 델타 변이주, 오미크론 변이주 등으로부터 선택되는 1종 이상의 SARS-CoV-2 변이주에 교차 면역원성을 낼 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명의 백신은 면역원성을 강화시키기 위해 면역증강제(adjuvant)를 더 포함할 수 있다. 면역증강제로는 수산화알루미늄(Aluminium hydroxide), 인산알루미늄(Aluminium phosphate) 등의 알루미늄, MF 59, AS03 등

에멀전(emulsion), AS04, CpG ODNs 등 TLR agonist 물질 기반, AS01 등 Particulate, Poly ICLC 등 합성 dsRNA, GSA-SE, GSL-AF 등 GLA 및 유도체, imiquimod, 3M-052 등 Imidazoquinolines, CpG ODN 1018, CpG ODN 7909, IC31 등 CpG ODNs, c-di-AMP 등 CDNs으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 나아가, 본 발명의 백신은 상기 면역증강제 뿐만 아니라, 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

[0052] 상기 담체는 본 발명의 백신을 제형화하기 위해 사용하는 것으로 통상 희석제, 부형제, 안정화제, 보존제 등을 포함할 수 있다.

[0053] 상기 희석제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 땅콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나 염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 상기 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 상기 안정화제로는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 덱스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인, 젤라틴 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있으나, 이에 한정 되는 것은 아니다.

[0056] 상기 보존제로는 티메로살, 페놀, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 상기 백신은 경구, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비강내, 흡입, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0058] 비경구 투여는 정맥내, 근육내, 복강내, 흉골내, 경피 및 동맥내 주사 및 주입을 포함하는 투여 방식을 의미한다. 상기 백신의 비경구 투여는 바람직한 순도 하에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 즉 사용되는 농도와 투여량에서 수용체에 비독성이고 다른 제제 성분과 혼화될 수 있는 것을 혼합하여 단위 투여량의 제형으로 조제하는 것이 바람직할 수 있다.

[0059] 상기 백신의 제형은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 제조한 제형은 경구용, 주사용, 도포용으로 사용할 수 있다. 상기 백신의 제형은 정제, 캅셀제, 연질캅셀제, 수액제, 과립제, 환제 또는 주사용 형태(용액, 현탁액 또는 유탁액)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 또한, 본 발명은 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항원을 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0061] 상기 SARS-CoV-2 바이러스 감염 질환은 SARS-CoV-2 바이러스 감염에 의해 유발되는 질환으로 부비강염, 발열, 호흡곤란, 저산소증, 호흡기 부전 및 쇼크로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 본 명세서에서 사용된 용어 "예방"은 조성물의 투여에 의해 SARS-CoV-2 바이러스 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "치료"는 조성물의 투여에 의해 SARS-CoV-2 바이러스 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0063] 상기 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0064] 상기 약학 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차로 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0065] 또한, 본 발명은 상기 SARS-CoV-2 바이러스 백신을 인간을 제외한 동물에 투여하여, SARS-CoV-2 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0066] 본 발명의 SARS-CoV-2 바이러스 백신이 면역 반응을 일으킬 수 있는 숙주 동물은 인간, 개, 고양이, 돼지, 말, 닭, 오리, 칠면조, 페럿 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 인간이다.

[0067] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0068] **<실시예 1> SARS-CoV-2 POMA 스파이크 항원의 서열 결정**

[0069] **1. SARS-CoV-2 스파이크 서열의 계통수 분석**

[0070] SARS-CoV-2 바이러스 변이주의 스파이크 단백질의 아미노산 서열 정보를 GISAID로부터 확보하였다. 이때, 확보한 데이터는 WHO Coronavirus (COVID19) Dashboard를 참고하여 주간 확진자 수와 지역별 감염 사례의 비율을 고려하여 random sampling을 통하여 704개의 데이터를 확보하였으며, 이를 도 1에 나타내었다. 해당 서열정보를 이용하여 BEAST 프로그램을 이용하여 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 계통수를 제작하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0071] **2. SARS-CoV-2 스파이크 단백질 계통수로부터 보존서열 도출**

[0072] 상기에서 제작한 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 계통수를 기반으로 유사한 서열을 16개의 group으로 clustering 하여 1차 보존서열 11개를 확보하였다. 추가적으로, 확보한 보존서열로부터 2차 보존서열 5개와 최종 보존서열을 확보하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0073] **3. 보존서열 조합 및 추가 아미노산 치환을 통한 POMA 서열 도출**

[0074] 상기에서 확보된 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 보존서열로부터 N-terminal 도메인, 수용체 결합 도메인, C-terminal 도메인, S2 도메인을 조합하고, 추가적인 아미노산 치환을 더하여 POMA 스파이크 단백질 항원 아미노산 서열 (서열번호 1 및 서열번호 2)을 제작하였다.

[0075] **<실시예 2> SARS-CoV-2 POMA 스파이크 항원 발현 및 정제**

[0076] 상기에서 확보한 POMA 스파이크 단백질 항원 아미노산 서열로부터 코돈 최적화(codon optimization)를 통하여 POMA 스파이크 항원의 염기서열을 도출하였고, 이를 유전자 재조합 기술을 이용하여 pcDNA.3.4 vector에 삽입하였다 (이때 플라스미드 벡터에 삽입된 서열번호 1에 해당하는 항원의 코돈 최적화된 서열은 서열번호 3, 서열번호 2에 해당하는 항원의 코돈 최적화된 서열은 서열번호 4로 표시하였다). 해당 플라스미드 벡터의 유전자 지도를 도 3에 나타내었다.

[0077] 각각의 플라스미드 벡터를 HD293-F 세포주에 형질도입하여 SARS-CoV-2 POMA 스파이크 항원 단백질을 발현하였으며, C-말단의 his tag를 이용한 affinity chromatography를 통해 항원을 정제하였다. 정제된 각각의 SARS-CoV-2 POMA 스파이크 항원 단백질은 size exclusion chromoatography (SEC)를 통한 분석으로 항원 단백질의 삼량체 특성과 순도를 확인하여 도 4에 나타내었다. 도 4를 참고하면 서열번호 1로 나타나는 SARS-CoV-2 POMA 스파이크 항원은 약 95%의 순도를 가지며, 삼량체와 유사한 크기의 표준단백질과 같은 elution volume을 가져 단량체로 존재하지 않으며, prototype 스파이크 항원과 동일하게 삼량체를 이루고 있음을 확인할 수 있다. 마찬가지로 서열번호 2로 나타나는 스파이크 항원의 경우 약 95% 이상의 순도를 가지며 삼량체를 이루고 있음을 확인할 수 있다.

[0078] **<실시예 3> SARS-CoV-2 POMA 스파이크 항원의 시험관 내(*in vitro*) 교차면역원성 분석**

[0079] 상기에서 획득한 SARS-CoV-2 POMA 스파이크 단백질 항원의 SARS-CoV-2 변이주 혈청과의 반응성을 확인하기 위해, 각 SARS-CoV-2 변이주 (prototype, 델타 변이주, 오미크론 BA.5 변이주 및 오미크론 XBB.1.5 변이주)를 햄스터에 21일 간격으로 2회 감염시킨 뒤 채혈하여 SARS-CoV-2 변이주 항혈청을 획득하였다. 이후 prototype 스파이크 단백질, 오미크론 BA.5 변이주 스파이크 단백질, SARS-CoV-2 POMA 스파이크 항원 단백질 2종의 항혈청에 대한 반응성을 ELISA 시험법을 통하여 확인한 결과, SARS-CoV-2 POMA 스파이크 항원 단백질은 prototype 스파이크 혹은 오미크론 BA.5 변이주 스파이크에 비하여 prototype 변이주, delta 변이주, 오미크론 변이주 BA.5, XBB.1.5에 대해서 전반적으로 높은 반응성을 보여주었으며, 해당 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다. 교차항원

성이 확인된 SARS-CoV-2 POMA 항원 2종을 햄스터 모델에 2주 간격으로 근육접종하여 범용항원에 대한 항혈청을 확보하였으며, 1차 면역 이후 항혈청을 이용하여 prototype, 오미크론 변이주 BA.5, S POMA 2종 등 스파이크 단백질 4종에 대한 broad reactive antibody titer가 유도된 것을 ELISA 시험법을 통하여 확인하였으며 해당 결과를 도 7에 나타내었다.

[0080] **<실시예 4> SARS-CoV-2 POMA 스파이크 항원의 생체 내(*in vivo*) 교차면역원성 분석**

[0081] 상기에서 범용성을 확인한 SARS-CoV-2 POMA 스파이크 단백질 항원의 *in vivo* 교차면역원성 분석을 위하여 재조합 단백질 제형으로 Al(OH)3를 adjuvent 로 하여 BALB/c 마우스 모델에 효능 평가를 진행하였다. 각 항원은 2주 간격으로 접종하였으며, 2차 접종 2주 후 항혈청을 확보하여 prototype 변이주, 오미크론 BA.5 변이주, 오미크론 XBB.1.5 변이주 바이러스에 대한 중화항체역가를 측정한 결과 SARS-CoV-2 POMA 항원은 prototype 바이러스에 대해 현재 유행주 항원보다 상대적으로 높은 교차 면역 활성을 가지며 현재 유행주 바이러스에 대해서도 prototype 항원보다 높은 교차면역활성을 가지는 것을 확인하였다. 추가적으로 이후 확산된 오미크론 변이주 XBB.1.5에 대해서도 상대적으로 높은 교차면역 활성을 가지는 것을 확인하였으며, 해당 결과는 도 8에 나타내었다.

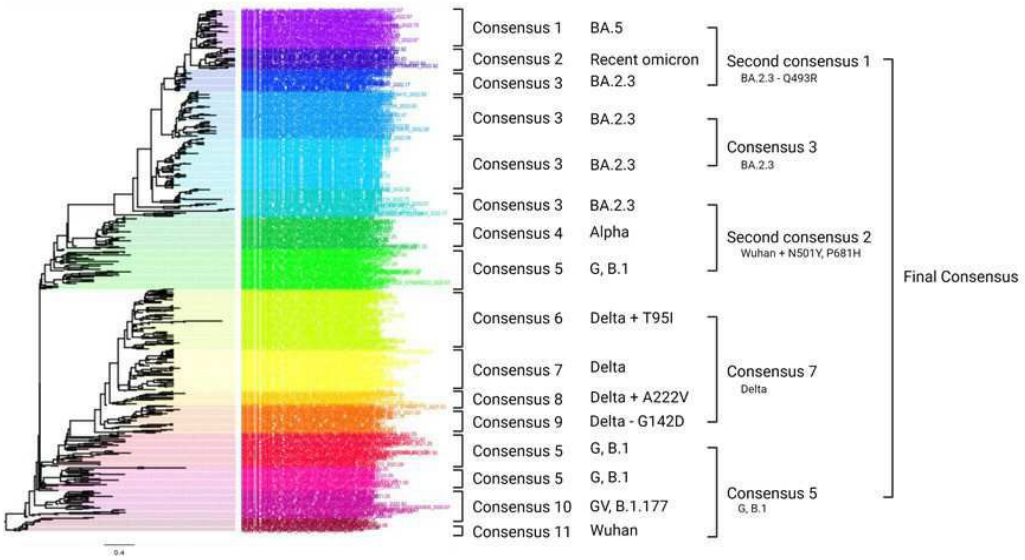
[0082] 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다. 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

도면

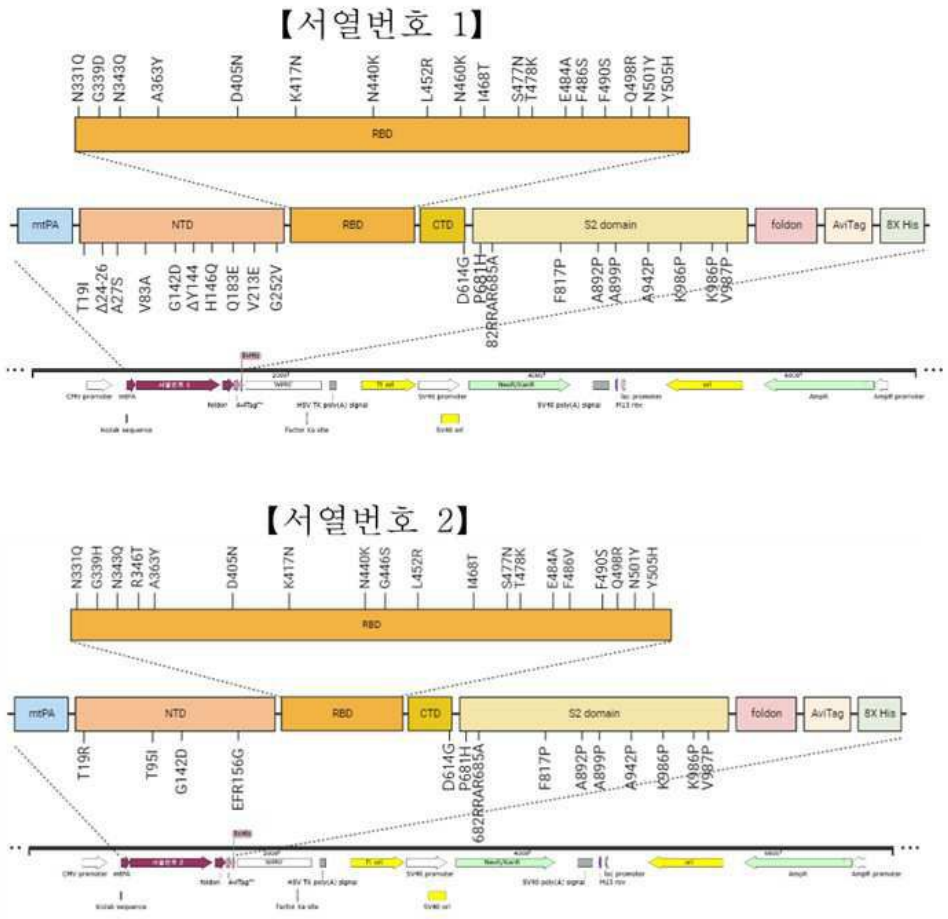
도면1

No. of Sequeces after random sampling						
yymm	Europe	Americas	Western Pacific	South-East Asia	Eastern Mediterranean	Africa
2019						
12월	0		1			0
2020년						
1월	1	1	1	1	1	
2월	1	1	1	1	1	
3월	1	1	1	1	1	1
4월	1	1	1	1	1	1
5월	1	1	1	1	1	1
6월	1	3	1	1	1	1
7월	1	4	1	1	1	1
8월	1	5	1	3	1	1
9월	2	3	1	3	1	1
10월	5	4	1	2	1	1
11월	9	8	1	2	1	1
12월	7	8	1	1	1	1
2021년						
1월	6	9	1	1	1	1
2월	4	5	1	1	1	1
3월	7	6	1	2	1	1
4월	6	6	1	7	1	1
5월	3	6	1	10	1	1
6월	2	4	1	3	1	1
7월	4	4	1	3	1	1
8월	6	8	2	3	2	1
9월	5	5	2	1	1	1
10월	6	3	1	1	1	1
11월	12	4	1	1	1	1
12월	15	7	1	1	1	1
2022년						
1월	51	35	6	8	2	1
2월	28	8	10	3	2	1
3월	21	3	20	1	1	1
4월	11	2	8	1	1	1
5월	6	5	6	1	1	1
6월	8	6	3	1	1	1
7월	12	7	7	1	1	1
8월	8	5	13	1	1	1
9월	6	2	5	1	1	0
10월	8	2	4	1	0	0
11월	3	2	4	1	0	0
총합계	269	184	113	72	36	30

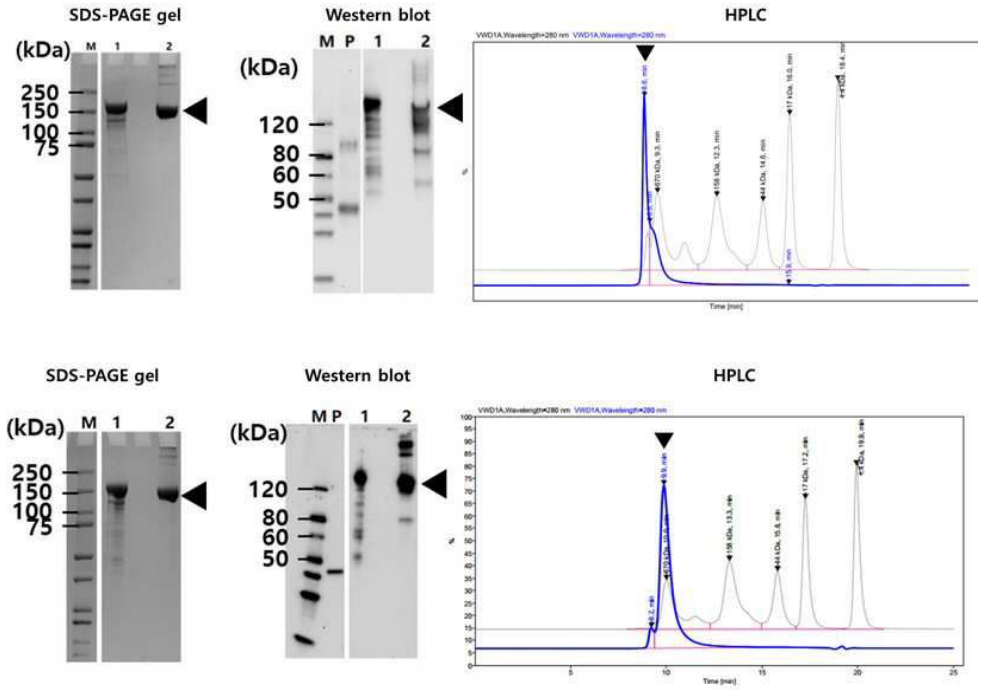
도면2



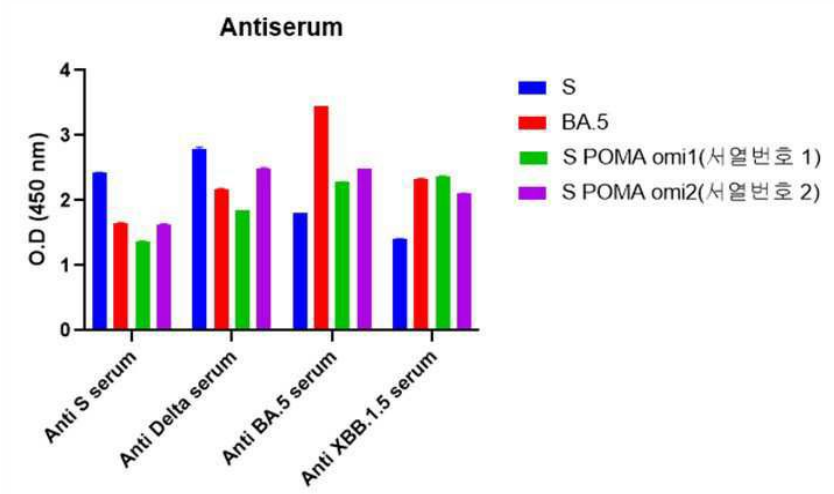
도면3


【서열번호 1】
N331Q
G339D
N343Q
A363Y
D405N
K417N
N440K
L452R
N460K
I468T
S477N
T478K
E484A
F486S
F490S
Q498R
N501Y
Y505H
RBD
mtPA
NTD
RBD
CTD
S2 domain
foldon
AviTag
8X His
T19I
Δ24-26
A27S
V83A
G142D
ΔY144
H146Q
Q183E
V213E
G252V
D614G
P681H
682RRAR685A
F817P
A892P
A899P
A942P
K986P
V987P
【서열번호 2】
N331Q
G339H
N343Q
R346T
A363Y
D405N
K417N
N440K
G446S
L452R
I468T
S477N
T478K
E484A
F486V
F490S
Q498R
N501Y
Y505H
RBD
mtPA
NTD
RBD
CTD
S2 domain
foldon
AviTag
8X His
T19R
T95I
G142D
EFR156G
D614G
P681H
682RRAR685A
F817P
A892P
A899P
A942P
K986P
V987P

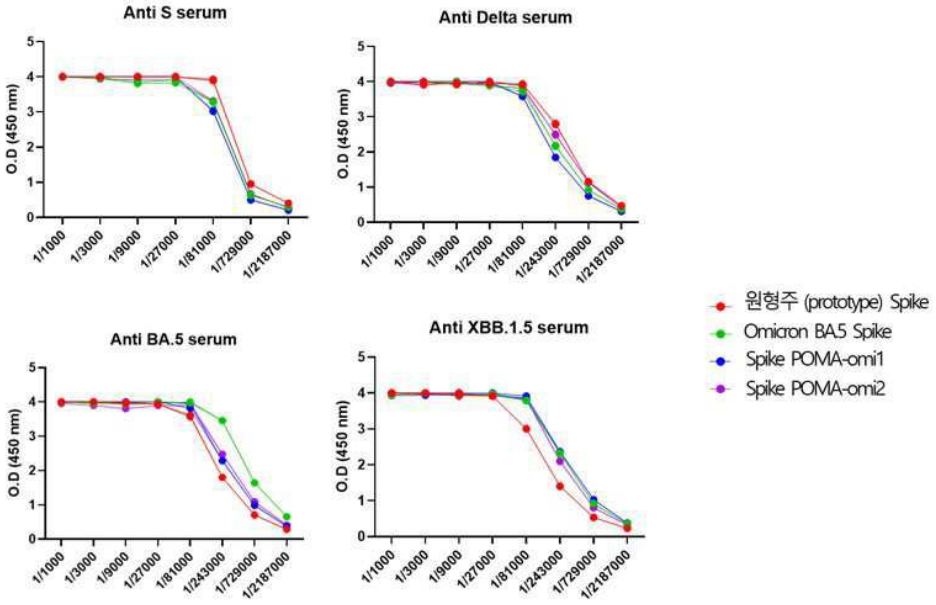
도면4


SDS-PAGE gel
Western blot
HPLC
(kDa)
M
1
2
250
150
100
75
P
120
80
60
50

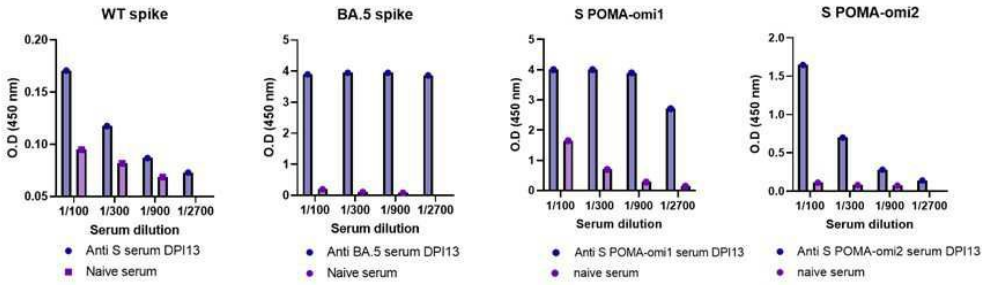
도면5


Antiserum
O.D (450 nm)
0
1
2
3
4
S
BA.5
S POMA omi1(서열번호 1)
S POMA omi2(서열번호 2)
Anti S serum
Anti Delta serum
Anti BA.5 serum
Anti XBB.1.5 serum

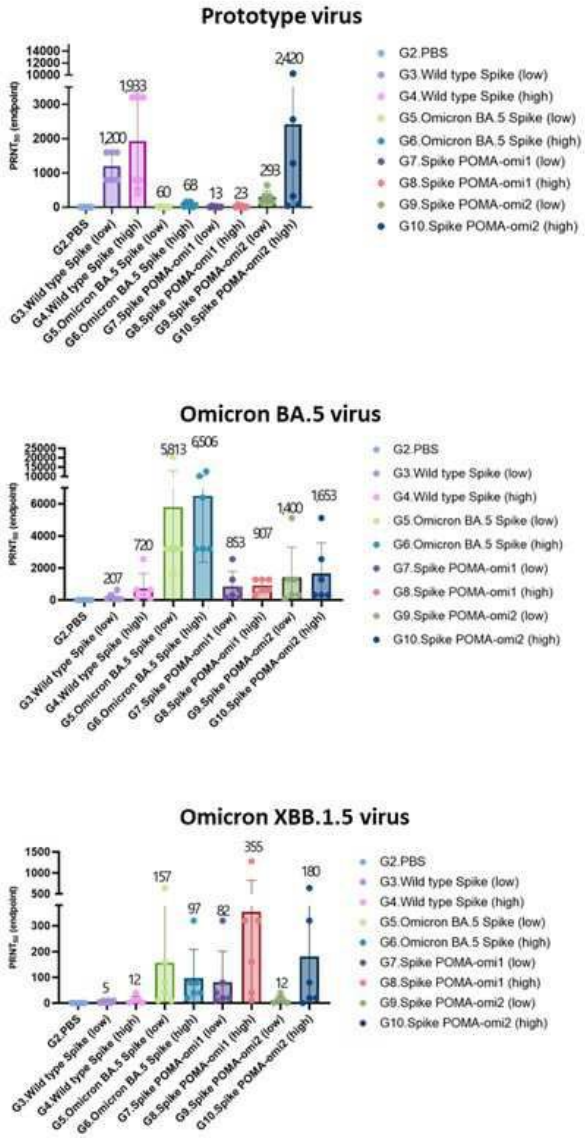
도면6


Anti S serum
Anti Delta serum
Anti BA.5 serum
Anti XBB.1.5 serum
O.D (450 nm)
1/1000
1/3000
1/9000
1/27000
1/81000
1/243000
1/729000
1/2187000
원형주 (prototype) Spike
Omicron BA.5 Spike
Spike POMA-omi1
Spike POMA-omi2

도면7


WT spike
BA.5 spike
S POMA-omi1
S POMA-omi2
O.D (450 nm)
1/100
1/300
1/900
1/2700
Serum dilution
Anti S serum DPI13
Naive serum
Anti BA.5 serum DPI13
Naive serum
Anti S POMA-omi1 serum DPI13
naive serum
Anti S POMA-omi2 serum DPI13
naive serum

도면8


Prototype virus
PRNT50 (endpoint)
14000
12000
10000
3000
2000
1000
0
1933
2420
1200
60
68
13
23
293
G2.PBS
G3.Wild type Spike (low)
G4.Wild type Spike (high)
G5.Omicron BA.5 Spike (low)
G6.Omicron BA.5 Spike (high)
G7.Spike POMA-omi1 (low)
G8.Spike POMA-omi1 (high)
G9.Spike POMA-omi2 (low)
G10.Spike POMA-omi2 (high)
Omicron BA.5 virus
PRNT50 (endpoint)
25000
20000
15000
10000
6000
4000
2000
0
5813
6506
1400
1653
720
853
907
207
G2.PBS
G3.Wild type Spike (low)
G4.Wild type Spike (high)
G5.Omicron BA.5 Spike (low)
G6.Omicron BA.5 Spike (high)
G7.Spike POMA-omi1 (low)
G8.Spike POMA-omi1 (high)
G9.Spike POMA-omi2 (low)
G10.Spike POMA-omi2 (high)
Omicron XBB.1.5 virus
PRNT50 (endpoint)
1500
1000
500
300
200
100
0
355
180
157
97
82
5
12
12
G2.PBS
G3.Wild type Spike (low)
G4.Wild type Spike (high)
G5.Omicron BA.5 Spike (low)
G6.Omicron BA.5 Spike (high)
G7.Spike POMA-omi1 (low)
G8.Spike POMA-omi1 (high)
G9.Spike POMA-omi2 (low)
G10.Spike POMA-omi2 (high)

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.