

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 4월 25일 (25.04.2024)



(10) 국제공개번호
WO 2024/085723 A1

- (51) 국제특허분류:
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 39/215* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/016390
- (22) 국제출원일: 2023년 10월 20일 (20.10.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2022-0136847 2022년 10월 21일 (21.10.2022) KR
- (71) 출원인: 충남대학교 산학협력단 (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) [KR/KR]: 34134 대전광역시 유성구 대학로 99, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 신현진 (SHIN, Hyun-Jin): 35274 대전광역시 서구 계룡로264번길 4, 105-610, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 리앤목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS): 06292 서울특별시 강남구 인주로 30길 13 대림아크로텔 12층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,

EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

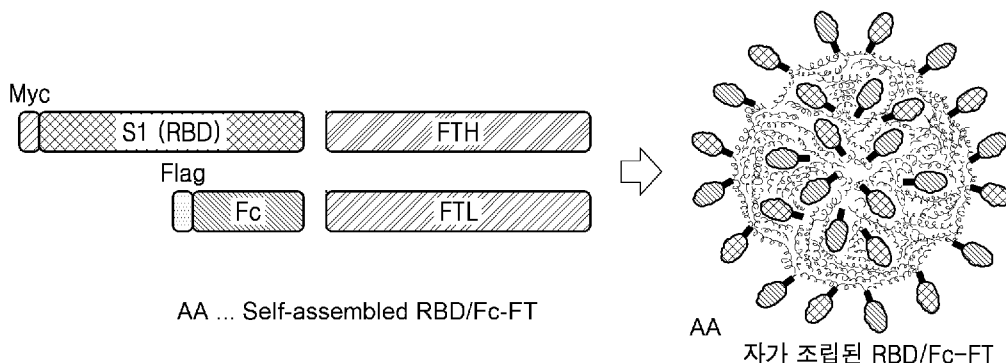
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: FERRITIN PROTEIN STRUCTURE DISPLAYING SARS-COV-2 S1-DERIVED PROTEIN AND ANTIBODY FC REGION PROTEIN SIMULTANEOUSLY ON SURFACE, AND USE THEREOF FOR VACCINE FOR CORONAVIRUS SARS-COV-2

(54) 발명의 명칭: SARS-CoV-2 S1 유래 단백질 및 항체 Fc 영역 단백질을 표면에 동시에 디스플레이하는 페리틴 단백질 구조체 및 이의 코로나바이러스 SARS-CoV-2에 대한 백신 용도



(57) Abstract: The present application relates to a protein structure and a use thereof for a vaccine for prevention or treatment of coronavirus SARS-CoV-2 infectious disease, the protein structure comprising: a first recombinant protein having a SARS-CoV-2 spike protein S1-derived protein and a ferritin heavy chain protein connected; and a second recombinant protein having an antibody Fc region protein and a ferritin light chain protein connected.

(57) 요약서: 본 출원은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질 및 페리틴 중쇄 단백질이 연결된 제 1 재조합 단백질; 및 항체 Fc 영역 단백질 및 페리틴 경쇄 단백질이 연결된 제 2 재조합 단백질을 포함하는 단백질 구조체 및 이의 코로나바이러스 SARS-CoV-2의 감염 질환을 예방 또는 치료하기 위한 백신 용도에 관한 것이다.



WO 2024/085723 A1

명세서

발명의 명칭: SARS-CoV-2 S1 유래 단백질 및 항체 Fc 영역 단백질 단백질을 표면에 동시에 디스플레이하는 페리틴 단백질 구조 체 및 이의 코로나바이러스 SARS-CoV-2에 대한 백신 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 SARS-CoV-2 S1 유래 단백질 및 항체 Fc 영역 단백질을 표면에 동시에 디스플레이하는 페리틴 단백질 구조체 및 이의 코로나바이러스 SARS-CoV-2에 대한 백신 용도에 관한 것으로, 본 특허출원은 2022년 10월 21일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2022-0136847호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

배경기술

- [2] 코로나바이러스-19 (Coronavirus-19: COVID-19, SARS-CoV2)는 중국 후베이성 우한시 우한 화난 수산물 도매시장(Wuhan Huanan seafood wholesale market)의 방문자를 중심으로 발발한 원인미상 폐렴의 병원체로 밝혀진 코로나바이러스이다. 상기 코로나바이러스-19에 감염된 환자들은 최소 2 일 내지 최대 14 일의 잠복기를 가지며, 이후, 발열, 호흡기 질환(기침, 호흡곤란), 폐렴, 근육통 등의 증상을 호소한다.
- [3] 코로나바이러스-19의 유전체는 4 가지의 구조적 단백질을 코딩하고 있다고 알려져 있다. 스파이크 (spike) 단백질은 숙주 세포의 수용체와 특이적인 결합을 하고, 핵 단백질 (nucleoprotein)은 RNA 게놈과 결합하여 뉴클레오캡시드를 만들고, 막 단백질 (Membrane protein)은 막과 캡시드 사이를 이어주며, 외피 (envelope) 단백질은 바이러스의 조립, 분출에 관여하며 외피를 구성한다.
- [4] 한편, 백신에는 제조방법에 따라 1세대 백신인 약독화 백신, 불활성화 백신, 2세대 백신인 아단위 백신, 독소이드 백신, 3세대 백신인 DNA, RNA, 재조합 바이러스 백신 등 다양한 형태가 존재한다. 이들 백신의 효능은 매우 다양하며, 각 형태별 면역활성 효능이 매우 다르게 나타난다. 예를 들어, 아단위 백신, 바이러스 백신은 안전성이 우수한 반면 면역원성을 향상시키기 위해서는 면역증강 물질 또는 어쥬번트(adjuvant)가 필요하다. 그러나, 특정 어쥬번트의 경우 백신의 면역 반응을 너무 심하게 일어나게 하여 알러지 반응과 같은 부작용을 유발하는 경우가 있다. 또한, 현재 상용화된 mRNA 백신은 인체에 주입하면 단백질로 번역된 뒤 사라지는 특징에 따라 과량으로 인체에 적용하여야 하고, 일정기간 후 추가 접종해야 면역의 효과가 유지되는 문제점이 있다. 더하여, 코로나바이러스-19의 변이주 발생에 따라 기존 개발된 백신의 경우 변이주에는 면역 효과를 나타내지 못하는 문제점 또한 발생되고 있다. 따라서, 어쥬번트 사용에 따른 부작용을 최소화 하고, 소량으로도 각종 변이주를 방어할 수 있을 정도로 우수한 백신 효능을 나

타내며, 나아가 방법론적으로 간단하여 백신 제조 공정을 단축시킬 수 있는 새로운 백신 제조 기술이 필요한 실정이다.

- [5] 한편, 페리틴은 철을 저장하는 단백질로써 원핵생물과 진핵생물에 널리 존재하고 있다. 페리틴의 분자량은 약 500,000 Da으로, 중쇄 (Heavy chain)와 경쇄 (Light chain)로 구성되어 있고, 자가 조립 능력이 있어 구형 입자를 형성하는 독특한 특성을 나타낸다. 이러한 특성을 이용하면 페리틴 내에 다양한 물질을 포집할 수 있다. 예를 들어, 은과 결합하는 펩타이드를 이용하여 은을 포집한 페리틴을 합성한 사례가 보고되어 있으며 (Kramer, R. M.; Li, C.; Carter, D. C.; Stone, M. O.; and Naik, R. R., (2004) J. Am. Chem. Soc., 126(41):13282-13286), MRI 조영제인 GdHPDO3A (gadolinium-[10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetato])를 포집시킨 페리틴도 보고된 바 있다 (Aime, S.; Frullano, L.; and Crich, S. G., (2002) Angew. Chem. Int. Ed., 41(6): 1017-1019). 다만, 자가 조립된 페리틴 구형 입자 표면에 항원 펩타이드를 디스플레이하여 백신 조성물로 이용하는 기술에 대한 연구는 부족한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 상기한 바와 같은 문제를 해결하기 위하여, 본 발명자들은 SARS-CoV-2 S1 유래 단백질 및 항체 Fc 영역 단백질을 표면에 동시에 디스플레이하는 페리틴 단백질 구조체를 개발하였고, 상기 단백질 구조체의 코로나바이러스 SARS-CoV-2에 대한 우수한 백신 효능을 확인함으로써, 상기 단백질 구조체는 코로나바이러스 SARS-CoV-2 백신을 개발하는데 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다.
- [7] 본 발명의 일 목적은 SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 스파이크 단백질 S1 유래 단백질 및 페리틴 (ferritin) 중쇄 (heavy chain) 단백질이 연결된 제 1 제조합 단백질; 및 항체 Fc 영역 단백질 및 페리틴 경쇄 (light chain) 단백질이 연결된 제 2 제조합 단백질을 포함하는 단백질 구조체를 제공하고자 한다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질 구조체를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환의 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공하고자 한다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 백신 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하고자 한다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질 구조체의 SARS-CoV-2 감염 질환을 예방 또는 치료하기 위한 용도 또는 상기 단백질 구조체의 SARS-CoV-2 감염 질환의 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제조하기 위한 용도를 제공하고자 한다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질 구조체를 제조하기 위한 방법을 제공하고자 한다.
- [12]

- [13] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [15]
- [16] 일 양상은 SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 스파이크 단백질 S1 유래 단백질 및 페리틴 (ferritin) 중쇄 (heavy chain) 단백질이 연결된 제 1 재조합 단백질; 및 항체 Fc 영역 단백질 및 페리틴 경쇄 (light chain) 단백질이 연결된 제 2 재조합 단백질을 포함하는 단백질 구조체를 제공한다. 상기 연결은 링커를 통해 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 상기 단백질간 연결을 가능하게 할 수 있는 당업계에 공지된 다양한 방법, 물질, 또는 구성 등이 사용될 수 있다.
- [17] 본 명세서에서의 용어, "SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)"은 사스코로나바이러스-2 또는 임시 명칭 2019년 신종 코로나바이러스 (2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)는 유전적 배열 (DNA sequencing)상 전도 기능 (Positive sense) 단일 가닥 RNA (single-stranded RNA) 코로나바이러스로서, 인간에게 전염성이 있고 코로나바이러스감염증-19의 원인으로 알려져 있다. SARS-CoV-2는 중국 우한시에서 일어나 국제적 공중보건 비상사태로 나아간 코로나바이러스감염증-19 유행의 원인이다.
- [18] 본 명세서에서의 용어, "스파이크 (spike) 단백질"은 바이러스의 표면에 배열되어 있는 돌기상 구조물로서, 길이는 10~15nm로 세포막에 있는 단백질 수용체와 결합해 우리 몸에 침투하는 일을 전담하고 있다. 따라서, 바이러스가 사람의 세포 속으로 들어갈 때 중요한 역할을 하고 있는 것이 상기 스파이크 단백질이다. 특히 바이러스는 스파이크단백질의 결합 능력에 따라 감염되는 숙주가 달라진다. 따라서, 스파이크 단백질을 이용해 바이러스 치료용 백신, 항체 및 진단 개발에 활용할 수 있다.
- [19] 상기 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질은 스파이크 1 (spike 1, S1) 도메인과 스파이크 2 (spike 2, S2) 도메인으로 구분되며, 이 중 S1이 세포 흡착에 관여하는 부위로서 수용체 결합부위가 포함되어 있고, 다양한 중화항체 생성 에피토프들이 존재하는 바, 본 발명에서는 이를 항원 펩타이드로 사용하였다.
- [20] 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질은, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1의 수용체-결합 도메인 (receptor binding domain, RBD) 단백질인 것일 수 있다. 상기 RBD 단백질은 구체적으로는, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단

백질 S1의 RBD 내 전부 또는 일부의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 단백질 구조체에 있어서, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질로서 상기 RBD 단백질이 아닌 다른 단백질을 사용하는 경우, 상기 단백질 구조체의 SARS-CoV-2에 대한 백신 효과가 감소할 수 있다.

- [21] 본 발명에서 사용된 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 1로 구성된 아미노산 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 98% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서 실질적으로 상기 단백질과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면 제한 없이 포함한다. 또한, 이러한 상동성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다. 일 구체예에 따르면, 상기 단백질 구조체에 있어서, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질이 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과는 상이한 다른 아미노산 서열, 예컨대, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 또는 상기 RBD 단백질 내 다른 부위의 아미노산 서열을 가지는 경우, 상기 단백질 구조체의 SARS-CoV-2에 대한 백신 효과가 감소할 수 있다.
- [22] 본 명세서에서의 용어, "항체 Fc 영역"은 항체 (antibody) 또는 면역글로불린 (immunoglobulin) 내 존재하는 단편 결정화 가능 영역 (Fragment crystallizable region)으로서, Fc 수용체라고 하는 세포 표면 수용체 및 보체 시스템의 일부 단백질과 상호작용하는 항체 또는 면역글로불린의 꼬리 영역을 의미한다. 본 발명에서는 상기 단백질 구조체의 백신 효율을 증대시키기 위해 항체 Fc 영역 내 아미노산 서열을 포함하는 단백질, 즉, 항체 Fc 영역 단백질을 이용하였다. 상기 항체 Fc 영역은 인간 면역글로불린 G (immunoglobulin G, IgG) Fc 영역을 의미할 수 있다. 상기 항체 Fc 영역 단백질은 항체 Fc 영역 내 전부 또는 일부의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [23] 본 발명에서 사용된 상기 항체 Fc 영역 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 4로 구성된 아미노산 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 98% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서 실질적으로 상기 단백질과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면 제한 없이 포함한다. 또한, 이러한 상동성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다. 일 구체예에 따르면, 상기 단백질 구조체에 있어서, 상기 항체 Fc 영역 단백질이 상기 서열번호 4의 아미노산 서열과는 상이한 다른 아미노산 서열, 예컨대, 상기 항체 Fc 영역 내 다른 부위의 아미노산 서열을 가지는 경우, 상기 단백질 구조체의 SARS-CoV-2에 대한 백신 효과가 감소할 수 있다.

- [24] 본 명세서에서의 용어, "페리틴 (ferritin)"은 철을 저장하는 단백질로써 원핵생물과 진핵생물에 널리 존재하고 있다. 페리틴의 분자량은 약 500,000 Da으로, 중쇄 (Heavy chain)와 경쇄 (Light chain)로 구성되어 있고, 자가 조립 능력이 있어 구형 입자를 형성하는 독특한 특성을 나타낸다. 페리틴은 24개의 단량체 (중쇄 혹은 경쇄 중 하나로 구성된 단일 단량체 혹은 이중 단량체)가 모여서 거대한 구 형태의 삼차구조를 형성한 단백질로써, 인간 페리틴의 경우 외경은 약 12 nm이고 내경은 약 8 nm이다. 페리틴은 pH 조건에 따라 단량체로 흩어지기도 하고 24개의 단량체가 조립되어 나노 입자를 형성하기도 하는데, 본 발명에서는 이러한 페리틴의 특성을 이용하여, 복수의 단백질 단량체가 집합 및/또는 조립 (즉, 자가 조립)되어 구 형태를 형성한 단백질 구조체를 제조하였다.
- [25] 상기 페리틴 중쇄 단백질 및 페리틴 경쇄 단백질은, 인간 또는 비인간의 페리틴 단백질에서 유래된 것일 수 있으며, 페리틴을 구성하는 중쇄 및 경쇄 내 전부 또는 일부의 아미노산 서열을 각각 포함할 수 있다.
- [26] 상기 페리틴 중쇄 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 상기 페리틴 경쇄 단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 2 또는 서열번호 5로 구성된 아미노산 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 98% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서 실질적으로 상기 단백질과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면 제한 없이 포함한다. 또한, 이러한 상동성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [27] 상기 재조합 단백질은 링커를 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 링커는 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질 또는 상기 항체 Fc 영역 단백질과 상기 페리틴 유래 단백질 (페리틴 중쇄 단백질 또는 페리틴 경쇄 단백질) 사이에 위치하는 것일 수 있다. 상기 링커는 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질 또는 상기 항체 Fc 영역 단백질과 상기 페리틴 유래 단백질 (페리틴 중쇄 단백질 또는 페리틴 경쇄 단백질)을 연결하여 재조합 단백질을 만드는 경우 이들 단백질의 구조적 유연성을 증가시키거나 각 단백질의 활성이 증진될 수 있도록, 단백질과 단백질 사이에 삽입하는 펩타이드일 수 있다. 링커는 융합되는 각 단백질의 활성을 저해하지 않으면서 불필요한 면역반응을 일으키지 않는 것이라면 제한이 없으나, 바람직하게는 아미노산 1개 내지 20개, 보다 바람직하게는 아미노산 1개 내지 5개로 구성된 펩타이드 링커일 수 있으며, 보다 구체적으로 SSG 펩타이드 링커일 수 있다.
- [28] 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질 또는 상기 항체 Fc 영역 단백질은 상기 페리틴 유래 단백질 (페리틴 중쇄 단백질 또는 페리틴 경쇄 단백질)의 C-말단 또는 N-말단에 연결된 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 페리틴 유래

단백질 (페리틴 중쇄 단백질 또는 페리틴 경쇄 단백질)의 C-말단에 연결된 것일 수 있다.

- [29] 일 구체예에 따르면, 상기 단백질 구조체에 있어서, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질과 상기 페리틴 중쇄 단백질이 아닌 상기 페리틴 경쇄 단백질이 연결되고, 상기 항체 Fc 영역 단백질과 상기 페리틴 경쇄 단백질이 아닌 상기 페리틴 중쇄 단백질이 연결되는 경우, 단백질 구조체의 구조적 안정성 또는 항원 표면 디스플레이 양상 등 다양한 요인이 영향을 받아 단백질 구조체의 SARS-CoV-2에 대한 백신 효과가 저하될 수 있다.
- [30] 상기 단백질 구조체에 있어서, 상기 제 1 재조합 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 제 2 재조합 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 서열번호 3 또는 서열번호 6으로 구성된 아미노산 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 98% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 아미노산 서열로서 실질적으로 상기 단백질과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면 제한 없이 포함한다. 또한, 이러한 상동성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [31] 본 명세서에서의 용어 "상동성"이란, 단백질을 암호화하는 염기서열이나 단백질을 구성하는 아미노산 서열의 유사한 정도를 의미하는데, 상동성이 충분히 높은 경우 해당 유전자의 발현 산물 및 단백질은 동일하거나 유사한 활성을 가질 수 있다. 또한, 상동성은 주어진 아미노산 서열 또는 염기서열과 일치하는 정도에 따라 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 염기서열과 동일하거나 유사한 활성을 가지는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 예를 들면, 점수 (score), 동일성 (identity) 및 유사도 (similarity) 등의 매개 변수 (parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0을 이용하거나, 정의된 엄격한 조건 (stringent condition)하에서 썼던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법 (예컨대, J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York)으로 결정될 수 있다.
- [32] 상기 단백질 구조체는 상기 제 1 재조합 단백질 및 상기 제 2 재조합 단백질을 각각 복수개로 포함하는 것일 수 있다. 즉, 상기 단백질 구조체는 복수의 단백질 단량체의 집합체를 의미할 수 있으며, 일 실시예에 따르면, 상기 단백질 구조체는, 상기 복수개의 제 1 재조합 단백질 단량체 및 상기 복수개의 제 2 재조합 단백질 단량체가, 그들 내에 포함된 페리틴 유래 단백질들의 고유의 특성에 의하여 자가 조립 (self assembly)되어 구 형태의 구조체 (또는 구조물 또는 집합체)를 형

성한 것일 수 있다. 즉, 상기 단백질 구조체는 복수의 단백질 단량체가 집합 및/또는 조립되어 형성된 나노 입자 또는 나노 구조체를 의미할 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 단백질 구조체는, 상기 복수개의 제 1 재조합 단백질 단량체 및 상기 복수개의 제 2 재조합 단백질 단량체를 합한 갯수로서, 예컨대 총 24개의 재조합 단백질 단량체가 집합 및/또는 조립되어 있는 다량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 원 페리틴 단백질은 24개의 조합체를 이루는 특성을 가진다. 따라서, 상기 페리틴 유래 단백질과 외부 단백질 (예컨대, 항원 단백질)이 조합체를 이루어 한 개의 재조합 단백질 (예컨대, 융합 단백질)을 만들게 인위적인 조작을 해주면 상술한 페리틴 단백질의 고유 특성상 원칙적으로 24개의 상기 재조합 단백질이 조합체를 이루어 24개의 항원이 동시에 발현되는 다량 항원발현체가 되는 것이다. 그러나 페리틴 단백질의 고유 원 특성과는 달리 융합되는 항원 단백질의 종류, 크기, 물성, 성분 등에 따라서 상기 재조합 단백질이 단량체로만 존재 할 수도 있고 이중체, 삼중체, 4중체 등과 같이 1 내지 24개의 단량체가 집합 및/또는 조립되어 있는 다량체로 존재할 수도 있다.

- [33] 상기 복수개의 제 1 및 2의 재조합 단백질 단량체들의 페리틴 유래 단백질들 (페리틴 중쇄 단백질들 및 페리틴 경쇄 단백질들)이 자가 조립되면서 상기 단백질 구조체를 형성하는 과정에서, 상기 페리틴 유래 단백질들과 연결된 복수의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질 및 복수의 항체 Fc 영역 단백질이 상기 단백질 구조체의 표면에 동시에 디스플레이 (제시)되고, 상기 단백질 구조체의 내부 코어에는 상기 복수의 페리틴 유래 단백질들 (페리틴 중쇄 단백질들 및 페리틴 경쇄 단백질들)이 조립되어 구형의 상태로 위치하는 것일 수 있다 (도 1 참고). 따라서, 일 구체예에 따르면, 상기 단백질 구조체는 상술한 바와 같은 구조적 특징에 의해 바이러스 또는 바이러스 유사 입자의 구조를 모사한 형태를 가지는 것일 수 있다.
- [34] 즉, 상기 단백질 구조체는 (외부) 표면에 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질 및 상기 항체 Fc 영역 단백질이 위치하는 것일 수 있고, 상기 단백질 구조체의 내부 코어에는 상기 페리틴 중쇄 단백질 및 상기 페리틴 경쇄 단백질이 위치하는 것일 수 있다.
- [35] 일 실시예에 따르면, 상기 단백질 구조체는 표면에 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질 및 항체 Fc 영역 단백질을 동시에 제시하는 바이러스 또는 바이러스 유사 입자의 구조를 모사한 형태를 가짐으로써, 현저히 우수한 항원성 및 항체 형성능을 나타낼 수 있다. 따라서, 상기 단백질 구조체는 SARS-CoV-2의 감염을 예방하거나, SARS-CoV-2 감염 질환을 예방 또는 치료하는 조성물 및 방법 등에 이용될 수 있다.
- [36]
- [37] 다른 양상은 상기 단백질 구조체를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환 (SARS-CoV-2 감염증)의 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공한다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 조성물에도 공히 적용된다.

- [38] 본 명세서에서의 용어 "백신"은 동물에서 면역학적 반응을 유도하는 적어도 하나의 면역학적으로 활성인 성분을 함유하는 약학적 조성물을 의미한다. 백신의 면역학적으로 활성인 성분은 살아있는 바이러스 또는 죽은 바이러스의 적절한 요소를 함유할 수 있고(서브유닛 백신), 이에 의해 이들 요소는 전체 바이러스 또는 이의 성장 배양물을 파괴하고, 이어서 원하는 구조물(들)을 수득하는 정제 단계에 의해, 또는 제한되는 것은 아니지만 박테리아, 곤충, 포유동물 또는 다른 종과 같은 적절한 시스템의 적절한 조작에 의해 유도된 합성과정 및 이어서 단리 및 정제과정에 의해, 또는 적절한 약학적 조성물을 사용하여 유전자 물질의 직접적인 혼입에 의한 백신을 필요로 하는 동물에서 상기 합성 과정의 유도에 의해 (폴리뉴클레오타이드 백신화) 제조된다. 백신은 상기 기술된 요소의 하나 또는 동시에 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [39] 본 명세서에서의 용어 "예방"은 SARS-CoV-2 백신 조성물의 투여로 인해 SARS-CoV-2의 감염 및 상기 감염에 의한 질환 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [40] 본 명세서에서의 용어 "치료"는 SARS-CoV-2 백신 조성물의 투여로 인해 SARS-CoV-2의 감염에 의해 이미 유발된 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [41] 상기 백신 조성물은 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 "약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제 또는 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 부형제, 희석제 또는 담체를 의미할 수 있다. 여기서 "약학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다.
- [42] 백신에 적합한 담체는 기술분야의 당업자에게 공지되어 있으며, 단백질, 당 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기의 담체는 수용액, 또는 비-수용액, 현탁액 또는 에멀전일 수 있다. 면역원성을 증가시키기 위한 면역보조제로서 정형 또는 비정형 유기 또는 무기 고분자등이 사용될 수 있다. 면역보조제는 일반적으로 항원에 대한 화학적 물리적 결합을 통해 면역반응을 촉진시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 면역보조제로서는 비정형 알루미늄 겔, 오일 에멀전, 또는 이중 오일 에멀전 그리고 이뮤노졸 등이 사용될 수 있다. 또한, 면역반응의 촉진을 위해 다양한 식물 유래 사포닌, 레바미솔, CpG 다이뉴클레오타이드, RNA, DNA, LPS, 다양한 종류의 사이토카인 등이 사용될 수 있다. 상기와 같은 면역 조성물은 다양한 보조제와 면역반응 촉진 첨가물의 조합에 의해 최적의 면역반응 유도를 위한 조성으로 사용될 수 있다. 또한 백신에 추가될 있는 조성물로는 안정제, 불활화제, 항생제, 보존제, 등이 사용될 수 있다. 백신의 투여 경로에 따라 백신 항원은 증류수, 완충용액 등과도 혼합하여 사용될 수 있다.
- [43] 상기 백신 조성물은 상기 단백질 구조체를 약 0.000001 내지 100000, 0.00001 내지 10000, 0.0001 내지 1000, 0.001 내지 100, 또는 0.01 내지 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포

함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이때, 상기 백신 조성물에 포함된 상기 단백질 구조체의 함량이 상기 범위를 벗어나는 경우, 상기 백신 조성물의 SARS-CoV-2에 대한 백신 효과가 감소되거나 충분히 발휘되지 않을 수 있다.

- [44] 본 명세서에서 용어, "유효성분으로 포함"은 상기 단백질 구조체의 SARS-CoV-2에 대한 백신 효과가 나타날 수 있는 정도의 유효량으로 상기 단백질 구조체가 포함되는 것을 의미하고, 약물전달 및 안정화 등을 위하여 다양한 성분을 부성분으로 첨가하여 다양한 형태로 제형화 (formulation)될 수 있음을 포함하는 의미이다.
- [45] 상기 백신 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태의 주사제의 형태로 제제화하여 사용될 수 있다. 상기 백신 조성물을 제제화할 경우, 일반적으로 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 또는 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 추가하여 조제될 수 있다.
- [46] 상기 백신 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당 업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 들 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 덱스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 경피 투여제로 제제화할 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태로 제제화될 수 있다. 비강 흡입제의 경우 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 등의 적합한 추진제를 사용하여 에어로졸 스프레이 형태로 제제화될 수 있으며, 좌제로 제제화할 경우 그 기제로는 위텡솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 폴리에틸렌글리콜류, 카카오지, 라우린지, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르류, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류, 소르비탄 지방산 에스테르류 등이 사용될 수 있다.
- [47] 상기 백신 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 구체적으로 상기 백신 조성물은 근육 투여용, 피하 투여용, 복강 투여용, 정맥 투여용, 경구 투여용, 진피 투여용, 안구 투여용, 및 뇌 내 투여용 조성물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [48] 상기 백신 조성물에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 단백질 구조체에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 앞에서 상기 단백질 구조체에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.
- [49]

- [50] 또 다른 양상은 상기 백신 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 방법에도 공히 적용된다.
- [51] 상기 개체는 SARS-CoV-2 감염 및 상기 감염에 의한 질환이 발병되거나 발병할 위험이 있는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이, 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물, 양식어류, 인간을 제외한 포유동물 등을 제한 없이 포함할 수 있다.
- [52] 본 명세서에서의 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 백신 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 그러나 경구 투여시, 단백질은 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다. 또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [53] 상기 백신 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 상기 용어 "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 백신 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 SARS-CoV-2 감염 또는 감염 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것으로 알려진 성분과 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.
- [54] 상기 백신 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 백신 조성물은 성인 1인당 약 0.1ng 내지 약 1,000 mg/kg, 바람직하게는 1 ng 내지 약 100 mg/kg로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량 또는 투여횟수는 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [55] 상기 백신 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 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, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [56] 상기 예방 또는 치료 방법에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 단백질 구조체 또는 상기 백신 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 앞에서 상기 단백질 구조체 또는 상기 백신 조성물에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.
- [57]
- [58] 또 다른 양상은 상기 단백질 구조체의 SARS-CoV-2 감염 질환을 예방 또는 치료하기 위한 용도를 제공한다.
- [59] 또 다른 양상은 상기 단백질 구조체의 SARS-CoV-2 감염 질환의 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제조하기 위한 용도를 제공한다.
- [60] 상기 용도에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 단백질 구조체, 상기 백신 조성물, 또는 상기 예방 또는 치료 방법에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 앞에서 상기 단백질 구조체, 상기 백신 조성물, 또는 상기 예방 또는 치료 방법에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.
- [61]
- [62] 또 다른 양상은 상기 단백질 구조체를 제조하기 위한 방법을 제공한다. 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 방법에도 공히 적용된다.
- [63] 구체적으로, 상기 방법은 (1) 상기 제 1 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제 2 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 1종 이상의 벡터를 세포에 도입시키는 단계; (2) 상기 벡터가 도입된 세포를 배양하는 단계; 및 (3) 상기 (2) 단계에서 얻어진 세포 배양물 (예컨대, 세포 자체 또는 세포를 제거한 배양물 (예컨대 상등액))로부터 상기 단백질 구조체를 분리하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [64] 본 명세서에서의 용어 "폴리뉴클레오타이드"란, 뉴클레오타이드가 결합한 고분자 물질로서, 유전 정보를 코딩하고 있는 핵산 (예컨대, DNA 또는 RNA 등)을 의미한다.
- [65] 상기 제 1 재조합 단백질에 포함된 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 7의 염기서열을 포함할 수 있고, 상기 제 1 재조합 단백질에 포함된 상기 페리틴 중쇄 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 8의 염기서열을 포함할 수 있으며, 상기 제 1 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 9의 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 제 2 재조합 단백질에 포함된 상기 항체 Fc 영역 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 10의 염기서열을 포함할 수 있고, 상기 제 2 재조합 단백질에 포함된 상기 페리틴 경쇄 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 11의 염기서열을 포함할 수 있으며, 상기 제 2 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 12의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [66] 상기 서열번호 7 내지 12의 염기서열 각각은, 각 서열번호로 기재한 염기서열뿐만 아니라, 상기 염기서열과 80% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로

는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 98% 이상, 가장 구체적으로는 99% 이상의 상동성을 나타내는 염기서열로서, 실질적으로 상기 각 단백질과 동일하거나 상응하는 효능을 나타내는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 구성하는 염기서열이라면 제한 없이 포함한다.

- [67] 본 명세서에서의 용어 "벡터"란, 적당한 숙주 세포에 도입되어 목적 단백질을 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 상기 용어 "작동가능하게 연결된 (operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용하여 용이하게 할 수 있다.
- [68] 상기 벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 면역원성 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임 (in frame)에 있어야 한다. 일반 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있고, 원핵 세포의 경우에는 lac, tac, T3 및 T7 프로모터, 진핵세포의 경우에는 원숭이 바이러스 40 (SV40), 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV) 프로모터, 사람 면역 결핍 바이러스 (HIV), 예를 들어 HIV의 긴 말단 반복부 (LTR) 프로모터, 모로니 바이러스, 시토메갈로바이러스 (CMV), 엡스타인 바 바이러스 (EBV), 로우스 사코마 바이러스 (RSV) 프로모터뿐만 아니라, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈, 사람 근육 크레아틴, 사람 메탈로티오네인 유래의 프로모터 등이 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [69] 또한, 상기 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함할 수 있다. 선택마커는 벡터로 트랜스펙션된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제 (selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 트랜스펙션된 세포가 선별 가능하다. 또한, 벡터가 복제가능한 발현벡터인 경우, 복제가 개시되는 특정 핵산 서열인 복제원점 (replication origin)을 포함할 수 있다.
- [70] 외래 유전자를 삽입하기 위한 재조합 벡터로는 플라스미드, 바이러스, 코즈미드 등 다양한 형태의 벡터를 사용할 수 있다. 재조합 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현하고 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 제한되지 않지만, 구체적으로 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 이용될 수 있다.

- [71] 상기 방법에 있어서, 상기 1종 이상의 벡터는, 상기 제 1 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제 2 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 모두 포함하는 1종의 벡터이거나, 상기 제 1 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제 2 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 각각 포함하는 2종의 벡터인 것일 수 있다.
- [72] 상기 방법에 있어서, 상기 세포는 진핵 세포 (eukaryotic cell)인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 세포는 포유류 유래 진핵 세포일 수 있고, 예컨대, 상기 세포는 HEK 293T 세포일 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 방법의 (1) 단계에서, 상기 제 1 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제 2 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 상기 1종 이상의 벡터를, 진핵 세포가 아닌 원핵 세포 (예컨대, 박테리아 등)에 도입하는 경우, 상기 원핵 세포 내에서 발현된 상기 제 1 재조합 단백질 및 상기 제 2 재조합 단백질은 자가 조립을 형성하기 어려울 수 있고, 이로 인해, 상기 원핵 세포 내에서 상기 단백질 구조체가 형성되기 어려울 수 있다.
- [73] 상기 방법의 상기 (1) 단계에서, 상기 제 1 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제 2 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 상기 1종 이상의 벡터를 세포에 도입하는 것은, 상기 세포에 외래 유전자인 상기 1종 이상의 벡터를 트랜스펙션 (transfection)시키는 것일 수 있다. 상기 트랜스펙션은 당업계에 알려진 일반적인 방법에 의해 수행될 수 있다. 예컨대, 상기 트랜스펙션을 위한 화학적 방법에는 양이온, 양이온 중합체, 양이온 리포솜 (liposome) 등이 사용될 수 있고, 물리적으로는 DNA를 핵 안으로 직접 주입하는 미세주입 (microinjection)이나, 강한 전기장에 노출시켜 일시적으로 세포 막의 투과성을 높이는 전기천공법 (electroporation) 등이 사용될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [74] 상기 방법의 상기 (2) 단계에서 상기 세포를 배양하는 동안 상기 세포 내에서 복수개의 상기 제 1 재조합 단백질 및 복수개의 상기 제 2 재조합 단백질이 발현되고 (즉, 발현된 후), 상기 발현된 복수개의 제 1 재조합 단백질 및 제 2 재조합 단백질은 상기 세포 내에서 자가 조립되어 단백질 구조체를 형성하는 것일 수 있다. 따라서, 상기 (2) 단계의 세포의 배양은, 상기 세포 내에서 상기 벡터로부터 상기 제 1 재조합 단백질 및 상기 제 2 재조합 단백질의 발현 및 발현된 상기 재조합 단백질들의 자가 조립을 유도할 수 있는 조건 (배지, 온도, 시간 등)에서 수행될 수 있다.
- [75] 상기 방법의 상기 (3) 단계는, 상기 (2) 단계에서 얻어진 세포 배양물로부터 상기 단백질 구조체를 추출, 분리, 및/또는 정제하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 세포 배양물로부터 상기 단백질 구조체를 추출, 분리, 및 정제하는 방법은 특별히 제한되지 않으며 당업계에 공지된 일반적인 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [76] 상기 제조 방법에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 단백질 구조체, 상기 백신 조성물, 상기 예방 또는 치료 방법, 또는 상기 용도에 대한 설명에서 언급된 것과

같은 것은, 앞에서 상기 단백질 구조체, 상기 백신 조성물, 상기 예방 또는 치료 방법, 또는 상기 용도에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.

발명의 효과

- [77] 일 양상에 따른 단백질 구조체에 따르면, SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질 및 항체 Fc 영역 단백질이 동시에 페리틴 단백질 구조체의 표면에 디스플레이됨으로써, 코로나바이러스 SARS-CoV-2에 대한 면역 효과가 현저히 우수하다. 따라서, 일 양상에 따른 단백질 구조체를 이용하여 코로나바이러스 SARS-CoV-2의 감염을 방어할 수 있는 우수한 면역 효과를 나타내는 백신을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [78] 도 1은 일 실시예에 따른 단백질 구조체 (RBD/Fc-FT)의 구조를 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- [79] 도 2는 일 실시예에 따른 단백질 구조체 (RBD/Fc-FT)에 대하여 면역침강반응 (Immunoprecipitation) 및 웨스턴 블랏 (Western blot)을 수행한 과정을 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- [80] 도 3은 일 실시예에 따른 단백질 구조체에 대하여 면역침강반응 후 웨스턴 블랏을 수행한 결과를 나타낸 도면이다 (1: RBD-FTH로 이루어진 단백질 구조체; 2: Fc-FTL로 이루어진 단백질 구조체; 3: RBD/Fc-FT 단백질 구조체).
- [81] 도 4는 일 실시예에 따른 단백질 구조체의 SARS-CoV-2에 대한 면역 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다 (PBS: PBS 접종 그룹; RBD-FTH: RBD-FTH로 이루어진 단백질 구조체 접종 그룹; RBD/Fc-FT: RBD/Fc-FT 단백질 구조체 접종 그룹).

[82]

발명의 실시를 위한 형태

- [83] 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.

[84]

[85] 실시예 1: 단백질 구조체 (RBD/Fc-FT)의 제조

- [86] 재조합 단백질 구조체 (RBD/Fc-FT)를 제조하기 위해, 하기와 같은 과정을 수행하였다.

- [87] 구체적으로, SARS-CoV-2에 대한 백신 반응을 유도할 수 있는 항원 펩타이드로서, SARS-CoV-2의 스파이크 단백질 S1의 수용체-결합 도메인 (receptor binding domain, RBD) 단백질 (RBD 단백질)을 이용하였으며, 상기 RBD 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 1로 기재하였다. 다음으로, 상기 항원 펩타이드의 항체 형성을 효과적으로 유도하기 위해, 페리틴 유래 단백질, 구체적으로는, 페리틴 heavy chain 단백질 (FTH)을 이용하였으며, 상기 페리틴 heavy chain 단백질의 아미노

산 서열을 서열번호 2로 기재하였다. 상기 RBD 단백질을 링커 (SSG 펩타이드)를 이용하여 상기 페리틴 heavy chain 단백질의 C-말단에 연결하여 재조합 단백질 (RBD-FTH)을 제조하였다. 상기 재조합 단백질 (RBD-FTH)의 아미노산 서열은 서열번호 3으로 기재하였다. 추가로, SARS-CoV-2에 대한 백신 효율을 증가시키기 위하여, 항체 Fc 영역 단백질 (인간 항체 Fc 영역 단백질: Fc)을 이용하였으며, 상기 Fc 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 4로 기재하였다. 구체적으로, 상기 Fc 단백질을 링커 (SSG 펩타이드)를 이용하여 페리틴 유래 단백질, 구체적으로는, 페리틴 light chain 단백질 (FTL)의 C-말단에 연결하여 재조합 단백질 (Fc-FTL)을 제조하였다. 상기 페리틴 light chain 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 5로 기재하였으며, 상기 재조합 단백질 (Fc-FTL)의 아미노산 서열은 서열번호 6으로 기재하였다. 서열번호 1 내지 6의 아미노산 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

- [88] 다음으로, 상기 RBD-FTH 및 Fc-FTL을 각각 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 (표 1 참고)를 각각 pCDNA 3.1 myc his 벡터에 삽입하여, 상기 RBD-FTH 및 Fc-FTL 각각을 발현하는 2종의 재조합 벡터를 제작하였고, 상기 2종의 재조합 벡터를 HEK 293T 세포에 도입 (트랜스펙션)한 후 상기 세포를 DMEM 배지 (10% FBS, 1% Anti/Anti, HEPES 포함)에서 약 37°C 조건으로 약 48 내지 72시간 동안 CO₂ 배양 및 계대배양하였다. 그 다음 배양된 세포로부터 단백질을 추출하기 위해, 상기 배양된 세포를 수집하여 단백질 용해 완충액 (M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent; Thermo Scientific™) (1ml/1 dish)으로 세포를 부유시킨 후 약 30분 내에 3회 반복적으로 vortexing하였고, 그 후 ICE에서 인큐베이션한 후 15000xg에서 약 25분간 원심분리하여 단백질 상층액을 회수하였다. 그 후 myc tag protein purification kit를 사용하여 상기 단백질 상층액으로부터, 상기 RBD-FTH 및 Fc-FTL이 집합 및/또는 조립되어 형성된 재조합 단백질 구조체 (RBD/Fc-FT)를 분리 및 정제하였다. 상기 RBD-FTH 및 Fc-FTL을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 벡터에 삽입하는 방법, 벡터를 세포에 도입 (트랜스펙션)하는 방법, 및 트랜스펙션된 세포의 배양 및 배양된 세포로부터 단백질을 추출, 분리, 및 정제하는 방법 등은 당업계에 공지된 일반적인 방법에 의해 수행될 수 있다.

- [89] 또한, 대조군으로서, 상기 제조된, RBD-FTH 및 Fc-FTL 각각을 발현하는 2종의 재조합 벡터를 각각 독립된 HEK 293T 세포에 트랜스펙션시킨 후 상기 세포 각각을 독립적으로 배양하고 배양된 세포로부터 단백질을 추출, 분리, 및 정제하여, RBD-FTH로 이루어진 단백질 구조체 및 Fc-FTL로 이루어진 단백질 구조체를 수득하였다. 각 과정을 수행하기 위한 구체적인 방법은 상술한 바와 같다.

- [90] 참고로 상기 각 재조합 벡터는, 상기 RBD의 염기서열의 말단에는 Myc 염기서열이 연결되고 상기 Fc의 염기서열의 말단에는 Flag 염기서열이 연결되도록 디자인되었으며, 이로 인해, 상기 각 재조합 벡터로부터 얻어진 상기 각 단백질 구조체에서 상기 RBD의 말단에는 RBD를 검출하기 위한 Myc가 태그되었고, 상기 Fc의 말단에는 Fc를 검출하기 위한 Flag가 태그되었다.

- [91] 상기 트랜스펙션된 세포로부터 얻어진 단백질이 RBD-FTH 및 Fc-FTL이 집합 및/또는 조립되어 형성된 재조합 단백질 구조체 (RBD/Fc-FT)인지 확인하기 위하여, 면역침강반응 (Immunoprecipitation) 및 웨스턴 블랏 (Western blot)을 수행하였다. 구체적으로, 상기 트랜스펙션된 세포로부터 얻어진 단백질 산물에, 상기 Fc 단백질에 태그된 Flag와 결합하는 Protein A/G bead를 첨가하여 면역침강반응을 수행한 후 상기 Protein A/G bead와 결합된 단백질을 분리하였고, 분리된 단백질에 대하여 상기 RBD 단백질에 태그된 Myc와 결합하는 Myc-Tag Ab를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다 (도 2 참고). 상기 면역침강반응 및 웨스턴 블랏은 당 업계에 공지된 일반적인 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [92] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 상기 RBD-FTH 및 Fc-FTL의 2종 단백질을 발현하는 재조합 벡터가 트랜스펙션된 세포로부터 얻어진 단백질 구조체는, 상기 Protein A/G bead 및 상기 Myc-Tag Ab 모두와 동시에 결합함을 확인한 반면, 상기 RBD-FTH 또는 Fc-FTL을 각각 발현하는 재조합 벡터가 각각 트랜스펙션된 세포로부터 얻어진 단백질 구조체 각각은, 상기 Protein A/G bead 및 상기 Myc-Tag Ab 와 동시에 결합하지 않음 (상기 Protein A/G bead 및 상기 Myc-Tag Ab 중 어느 하나와만 결합하는 것으로 예상됨)을 확인하였다. 이를 통해, 상기 RBD-FTH 및 Fc-FTL의 2종 단백질을 발현하는 재조합 벡터가 트랜스펙션된 세포로부터 얻어진 단백질 구조체는, 페리틴의 자가 조립 특성에 의해 상기 RBD-FTH 및 Fc-FTL의 2종 단백질이 집합 및/또는 조립되어 형성된 재조합 단백질 구조체 (RBD/Fc-FT)며 그 표면에 상기 Fc 단백질 및 상기 RBD 단백질이 동시에 디스플레이되고 내부 코어에는 페리틴 유래 단백질 (상기 Fc 단백질 및 RBD 단백질 각각과 연결된 페리틴 light chain 단백질 (FTL) 및 페리틴 heavy chain 단백질 (FTH))이 위치하는 것임을 알 수 있었다 (도 1 참고). 더하여, 위 실험을 통해, 상기 RBD-FTH 및 Fc-FTL의 2종 단백질을 발현하는 재조합 벡터가 트랜스펙션된 세포 내에서 상기 벡터에 의해 상기 RBD-FTH 및 Fc-FTL의 2종 단백질이 발현되고, 발현된 상기 2종의 단백질은 상기 세포 내에서 페리틴의 자가 조립 특성에 의해 자연적으로 집합 및/또는 조립 (즉, 자가 조립)되어 구형의 단백질 구조체 (또는 집합체)를 형성하는 것임을 알 수 있었다. 또한, 도 3에 나타낸 바와 같이, 밴드의 위치 (즉, 분자량)를 고려하면, 수득된 재조합 단백질 구조체 (RBD/Fc-FT)는 복수의 RBD-FTH 단량체 및 복수의 Fc-FTL 단량체를 포함하며 대략 총 10 내지 최대 24개 (구체적으로는, 대략 총 24개)의 재조합 단백질 단량체가 집합 및/또는 조립되어 있는 것임을 알 수 있었다.

[93] [표1]

단백질	아미노산 서열	코딩 핵산 서열
SARS-CoV-2 S1 의	서열번호 1: MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSF TRGVYYPPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTW	서열번호 7

RBD 단백질(RBD)	FHAIHVS GTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFAST EKSNIIRGWIFGTTLD SKTQSLLIVNNATNVVI KVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFR VYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKN LREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFS ALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDS SSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGT ITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTS NFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFAS VYAWNRRKRISNCVADYSVLVNSASFSTFKCY GVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAP GQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLD SKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQ AGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGY QPYRVVVL SFELLHAPATVCGPKKSTNLVKN KCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGR DIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVS VITP GTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLT PTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNN SYE	
페리틴 heavy chain 단백질 (FTH)	서열번호 2: MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYA SYVYLSMSYYFDRDDVALKNFAKYFLHQSH EEREHA EKLMKLQNQRGGRIFLQDIKKPDCD DWESGLNAMECALHLEKNVNQSLLELHKLA TDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKAIKELGDHV TNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGDS DNES	서열번호 8
RBD-FTH	서열번호 3: MFVFLVLLPLVSSQCVNL TTRTQLPPAYTNSF TRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTW FHAIHVS GTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFAST EKSNIIRGWIFGTTLD SKTQSLLIVNNATNVVI KVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFR VYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKN LREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFS ALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPGDS SSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGT ITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTS	서열번호 9

	<p>NFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFAS VYAWNRKRISNCVADYSVLNSASFSTFKCY GVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAP GQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDS KVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQYQ GSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQ PYRVVVLSEFLLHAPATVCGPKKSTNLVKNK CVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRD IADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPG TNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPT WRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYESS GMTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELY ASYVYLSMSYYFDRDDVALKNFAKYFLHQS HEEREHAEKLMKLQNQRGGRIFLQDIKKPDC DDWESGLNAMECALHLEKNVNQSLLELHKL ATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKAIKELGDH VTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGSDSNES</p>	
항체 Fc 영역 단백질 (Fc)	<p>서열번호 4:</p> <p>MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	서열번호 10
페리틴 lig ht chain 단 백질 (FTL)	<p>서열번호 5:</p> <p>MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASY TYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEK REGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAED EWGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHA LGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMG DHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD</p>	서열번호 11
Fc-FTL	<p>서열번호 6:</p> <p>MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL</p>	서열번호 12

	TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSSGMS SQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTY LSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKR EGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDE WGKTPDAMKAAMALEKKLNQALLDLHA LGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMG DHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD	
--	--	--

[94]

[95] 실시예 2: 단백질 구조체 (RBD/Fc-FT)의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 특이 항체 생성능 확인

[96] 상기 실시예 1에서 제조한 단백질 구조체 (RBD/Fc-FT)의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 특이 항체 생성능을 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[97] 구체적으로, Balb/c 마우스를 구입하여 다음과 같은 그룹으로 나누었다. 각각의 그룹은 5마리의 마우스를 사용하였다. 첫번째 그룹은 음성 대조군으로서 PBS 만을 접종한 그룹, 두번째 그룹은 RBD-FTH로 이루어진 단백질 구조체를 접종한 그룹, 세번째 그룹은 RBD/Fc-FT 단백질 구조체를 접종한 그룹으로 분류하였다.

[98] 각각의 실험군과 대조군에 맞추어서 접종을 실시하였고, 1차 접종 2주 후에, 추가 접종 (boosting)을 실시하였다. 2차 접종 2주 후, 모든 마우스로부터 혈청을 채취하여, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)를 이용하여 SARS-CoV-2 S1에 대한 특이 항체 생성 정도를 측정하였다. SARS-CoV-2 S1에 대한 특이 항체를 검출 및 측정하기 위한 ELISA 분석 방법은 당업계에 공지된 일반적인 방법에 의해 수행될 수 있다.

[99] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 단백질 구조체 (RBD/Fc-FT)를 접종한 그룹은 특이 항체 생성 정도가 가장 우수하며, RBD-FTH로 이루어진 단백질 구조체를 접종한 그룹 보다 약 2.5배 이상 높은 것을 확인하였는 바, 본 발명의 단백질 구조체 (RBD/Fc-FT)는 SARS-CoV-2에 대하여 현저히 우수한 면역원성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

[100]

[101] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

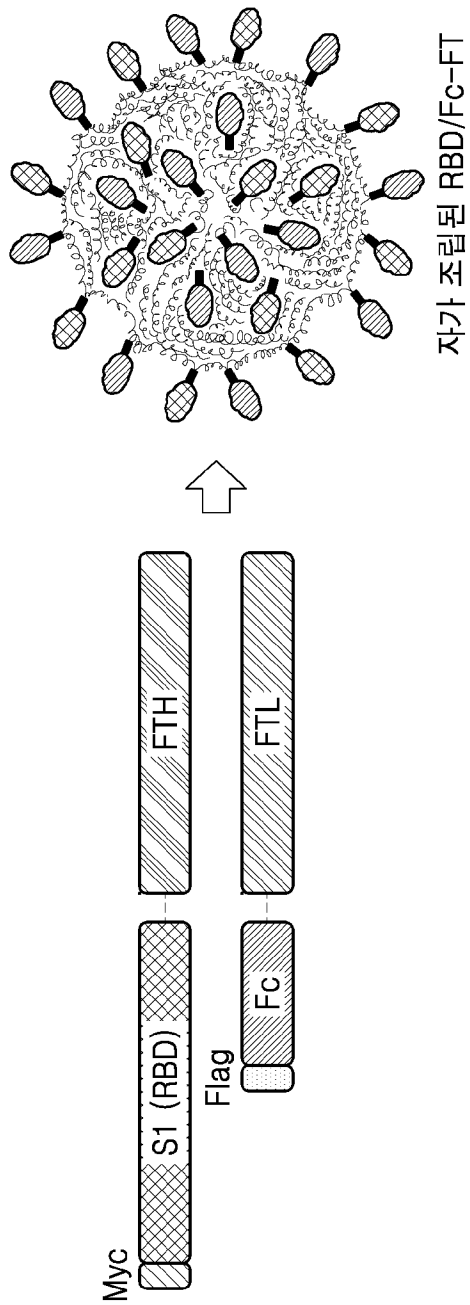
청구범위

- [청구항 1] SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 스파이크 단백질 S1 유래 단백질 및 페리틴 (ferritin) 중쇄 (heavy chain) 단백질이 연결된 제 1 재조합 단백질; 및
항체 Fc 영역 단백질 및 페리틴 경쇄 (light chain) 단백질이 연결된 제 2 재조합 단백질;을 포함하는 단백질 구조체.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질은, 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1의 수용체-결합 도메인 (receptor binding domain, RBD) 단백질인 것인, 단백질 구조체.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 제 1 재조합 단백질 및 상기 제 2 재조합 단백질은 각각 복수개로 포함된 것인, 단백질 구조체.
- [청구항 4] 청구항 3에 있어서,
상기 단백질 구조체는 상기 복수개의 제 1 재조합 단백질 및 상기 복수개의 제 2 재조합 단백질이 자가 조립되어 형성된 구형의 구조체인 것인, 단백질 구조체.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,
상기 단백질 구조체의 표면에 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질 및 상기 항체 Fc 영역 단백질이 위치하는 것인, 단백질 구조체.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서,
상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 S1 유래 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 항체 Fc 영역 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 단백질 구조체.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서,
상기 페리틴 중쇄 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 페리틴 경쇄 단백질은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 단백질 구조체.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서,
상기 제 1 재조합 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 제 2 재조합 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 단백질 구조체.
- [청구항 9] 청구항 1 내지 8 중 어느 한 항의 단백질 구조체를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환의 예방 또는 치료용 백신 조성물.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서,

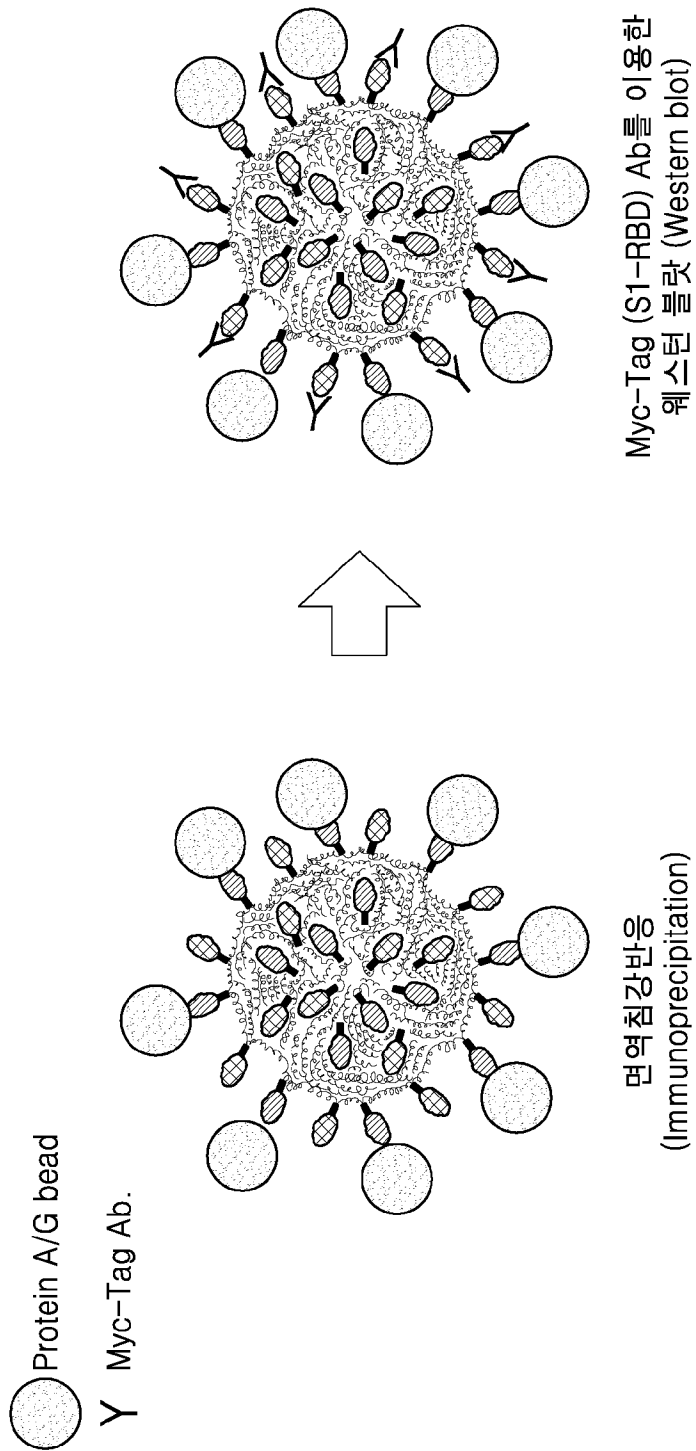
상기 백신 조성물은 근육 투여용, 피하 투여용, 복강 투여용, 정맥 투여용, 정맥 투여용, 진피 투여용, 안구 투여용, 및 뇌 투여용 조성물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 백신 조성물.

- [청구항 11] 청구항 9에 있어서,
상기 백신 조성물은 약학적으로 허용 가능한 부형제, 희석제, 또는 담체를 추가로 포함하는 것인, 백신 조성물.
- [청구항 12] 청구항 1의 단백질 구조체를 제조하기 위한 방법으로서,
(1) 청구항 1의 제 1 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 청구항 1의 제 2 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 1종 이상의 벡터를 세포에 도입시키는 단계;
(2) 상기 벡터가 도입된 세포를 배양하는 단계; 및
(3) 상기 (2) 단계에서 얻어진 세포 배양물로부터 청구항 1의 단백질 구조체를 분리하는 단계;를 포함하는, 방법.
- [청구항 13] 청구항 12에 있어서,
상기 세포는 진핵 세포 (eukaryotic cell)인 것인, 방법.
- [청구항 14] 청구항 12에 있어서,
상기 1종 이상의 벡터는, 상기 제 1 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제 2 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 모두 포함하는 1종의 벡터이거나, 상기 제 1 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제 2 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 각각 포함하는 2종의 벡터인 것인, 방법.
- [청구항 15] 청구항 12에 있어서,
상기 (2) 단계에서 상기 세포를 배양하는 동안 상기 세포 내에서 복수개의 상기 제 1 재조합 단백질 및 복수개의 상기 제 2 재조합 단백질이 발현되고, 상기 발현된 복수개의 제 1 재조합 단백질 및 제 2 재조합 단백질은 상기 세포 내에서 자가 조립되어 단백질 구조체를 형성하는 것인, 방법.

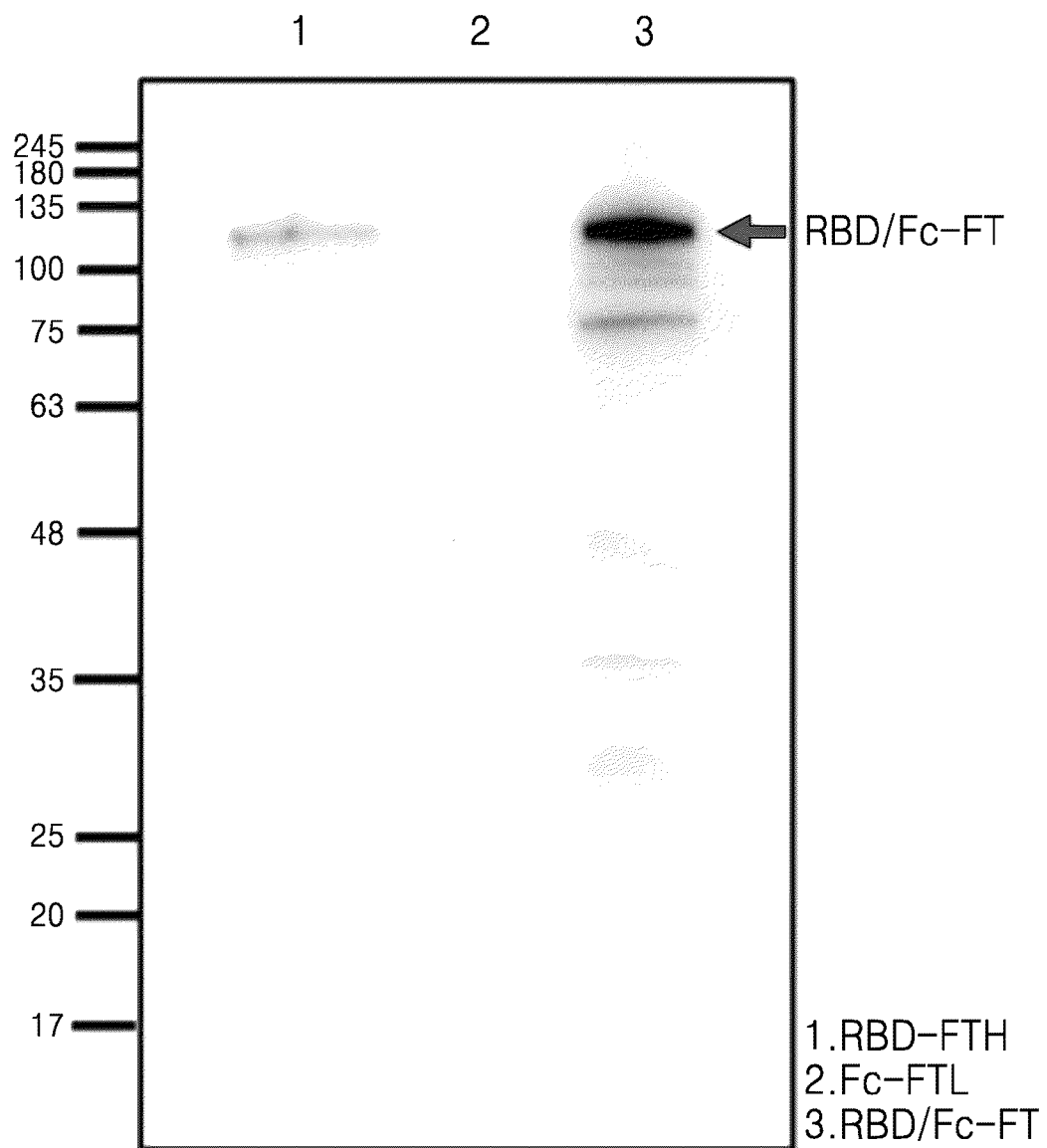
[도 1]

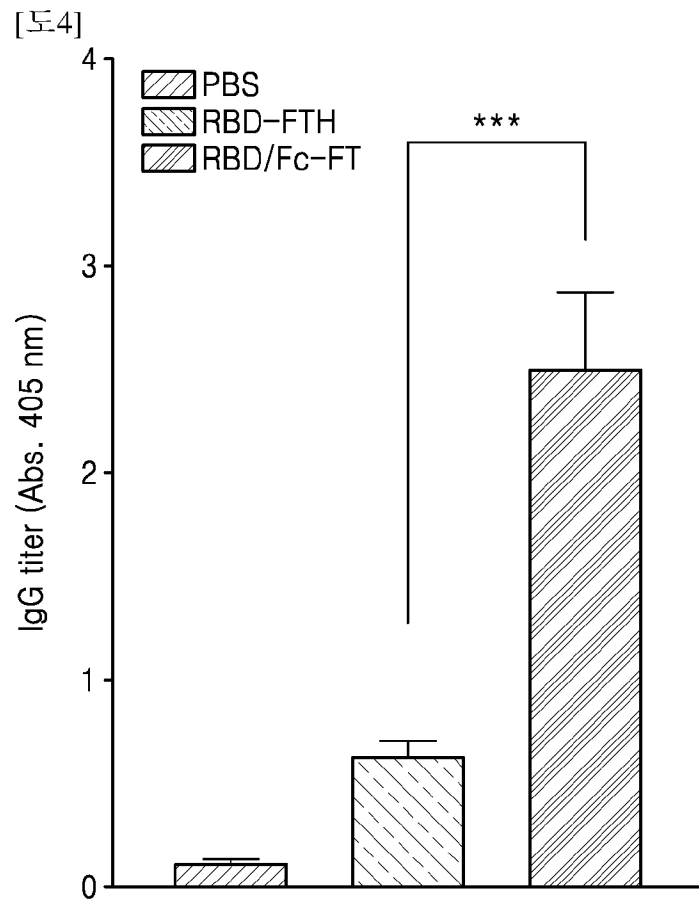


[도2]



[도3]





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/016390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 14/005(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; A61K 39/215(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 14/005(2006.01); A61K 39/12(2006.01); A61K 39/215(2006.01); C07K 16/10(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: SARS-CoV-2, 스파이크 단백질(spike protein), 페리틴(ferritin), Fc, 자가 조립(self-assembly)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2022-0133633 A (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) 05 October 2022 (2022-10-05) See abstract; paragraphs [0016], [0018], [0045] and [0070]-[0071]; example 1; figure 1; and claims 1-4 and 6-10.	1-15
Y	WO 2022-073138 A1 (THE HOSPITAL FOR SICK CHILDREN) 14 April 2022. See abstract; pages 73, 75 and 78; and claims 3 and 67-69.	1-15
A	KALATHIYA, U. et al. Multivalent display of SARS-CoV-2 spike (RBD domain) of COVID-19 to nanomaterial, protein ferritin nanocages. Biomolecules. 2021, vol. 11, thesis no.:297, pp. 1-12. See entire document.	1-15
A	KR 10-2022-0133631 A (CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY TECHNOLOGY HOLDINGS CO., LTD.) 05 October 2022 (2022-10-05) See entire document.	1-15
A	KR 10-2022-0107151 A (THE HOSPITAL FOR SICK CHILDREN et al.) 02 August 2022 (2022-08-02) See entire document.	1-15
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 February 2024		Date of mailing of the international search report 02 February 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/016390

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/016390

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
KR	10-2022-0133633	A	05 October 2022	None		
WO	2022-073138	A1	14 April 2022	AU	2023-356355	A1 25 May 2023
				BR	112023006497	A2 21 November 2023
				CA	3197642	A1 14 April 2022
				EP	4225804	A1 16 August 2023
				JP	2023-544211	A 20 October 2023
				KR	10-2023-0083316	A 09 June 2023
KR	10-2022-0133631	A	05 October 2022	None		
KR	10-2022-0107151	A	02 August 2022	AU	2020-320459	A1 03 March 2022
				BR	112022001800	A2 12 April 2022
				CA	3149320	A1 04 February 2021
				CN	114867754	A 05 August 2022
				EP	4007779	A1 08 June 2022
				JP	2022-543070	A 07 October 2022
				MX	2022001387	A 08 June 2022
				US	2023-0145060	A1 11 May 2023
				WO	2021-016724	A1 04 February 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/005(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; A61K 39/215(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/005(2006.01); A61K 39/12(2006.01); A61K 39/215(2006.01); C07K 16/10(2006.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: SARS-CoV-2, 스파이크 단백질(spike protein), 페리틴(ferritin), Fc, 자가 조립(self-assembly)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2022-0133633 A (충남대학교산학협력단) 2022.10.05 요약; 단락 [0016], [0018], [0045], [0070]-[0071]; 실시예 1; 도면 1; 청구항 1-4, 6-10	1-15
Y	WO 2022-073138 A1 (THE HOSPITAL FOR SICK CHILDREN) 2022.04.14 요약; 페이지 73, 75, 78; 청구항 3, 67-69	1-15
A	KALATHIYA, U. 등, 'Multivalent display of SARS-CoV-2 spike (RBD domain) of COVID-19 to nanomaterial, protein ferritin nanocages', Biomolecules, 2021, 11권, 논문번호:297, 페이지 1-12 전체 문헌	1-15
A	KR 10-2022-0133631 A (충남대학교 기술지주 주식회사) 2022.10.05 전체 문헌	1-15
A	KR 10-2022-0107151 A (더 호스피탈 포 식 찰드런 등) 2022.08.02 전체 문헌	1-15
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년02월01일(01.02.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년02월02일(02.02.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2022-0133633 A	2022/10/05	없음	
WO 2022-073138 A1	2022/04/14	AU 2023-356355 A1	2023/05/25
		BR 112023006497 A2	2023/11/21
		CA 3197642 A1	2022/04/14
		EP 4225804 A1	2023/08/16
		JP 2023-544211 A	2023/10/20
		KR 10-2023-0083316 A	2023/06/09
KR 10-2022-0133631 A	2022/10/05	없음	
KR 10-2022-0107151 A	2022/08/02	AU 2020-320459 A1	2022/03/03
		BR 112022001800 A2	2022/04/12
		CA 3149320 A1	2021/02/04
		CN 114867754 A	2022/08/05
		EP 4007779 A1	2022/06/08
		JP 2022-543070 A	2022/10/07
		MX 2022001387 A	2022/06/08
		US 2023-0145060 A1	2023/05/11
		WO 2021-016724 A1	2021/02/04