



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0171616
(43) 공개일자 2023년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G16B 5/00 (2019.01) G01N 33/558 (2006.01)
G16B 15/00 (2019.01) G16B 30/00 (2019.01)
G16C 20/30 (2019.01)

(52) CPC특허분류

G16B 5/00 (2019.02)
G01N 33/558 (2021.08)

(21) 출원번호 10-2022-0071992

(22) 출원일자 2022년06월14일

심사청구일자 2022년06월14일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

이상수

서울특별시 양천구 목동중앙로7길 32, 105동 901호(목동, 이편한세상)

키란지브 차크라바티

인도, 웨스트 벵갈주, 24피지एस노던시, 칼린디동, 칼린디 아파트 P-121동 6호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인본

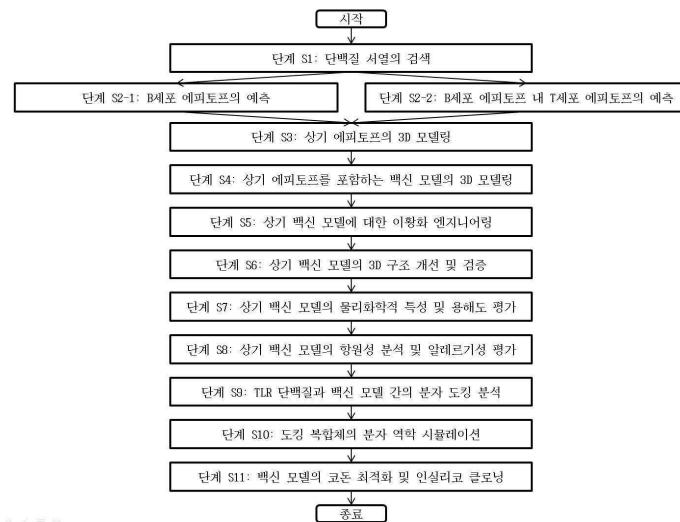
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법

(57) 요약

본 발명에 따르면 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법으로서, 단백질 서열을 검색하는 제1 단계; B세포 에피토프 및 B세포 에피토프 내 T세포 에피토프를 예측하는 제2 단계; 상기 예측된 에피토프를 3D 모델링하는 제3 단계; 상기 에피토프를 포함하는 백신 모델을 3D 모델링하는 제4 단계; 상기 백신 모델에 대한 이항화 엔지니어링을 수행하는 제5 단계; 상기 백신 모델의 3D 구조를 개선하고 검증하는 제6 단계; 상기 백신 모델의 물리화학적 특성 및 용해도를 평가하는 제7 단계; 상기 백신 모델의 항원성을 분석하고 알레르기성을 평가하는 제8 단계; TLR 단백질과 상기 백신 모델 간의 분자 도킹을 분석하는 제9 단계; 상기 도킹 복합체의 분자 역학을 시뮬레이션하는 제10 단계; 및 상기 백신 모델의 코돈 최적화 및 인실리코 클로닝을 수행하는 제 11단계를 포함하는, 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G16B 15/00 (2019.02)

G16B 30/00 (2019.02)

G16C 20/30 (2019.02)

(72) 발명자

아취시 란잔 샤르마

강원도 춘천시 성심로 67

마노짓 바타차리아

인도, 웨스트 벵갈주, 웨스트미드나포르시, 자그람
동, 아르빈다나가르 D-24

명세서

청구범위

청구항 1

다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법으로서,
단백질 서열을 검색하는 제1 단계;
B세포 에피토프 및 B세포 에피토프 내 T세포 에피토프를 예측하는 제2 단계;
상기 예측된 에피토프를 3D 모델링하는 제3 단계;
상기 에피토프를 포함하는 백신 모델을 3D 모델링하는 제4 단계;
상기 백신 모델에 대한 이황화 엔지니어링을 수행하는 제5 단계;
상기 백신 모델의 3D 구조를 개선하고 검증하는 제6 단계;
상기 백신 모델의 물리화학적 특정 및 용해도를 평가하는 제7 단계;
상기 백신 모델의 항원성을 분석하고 알레르기성을 평가하는 제8 단계;
TLR 단백질과 상기 백신 모델 간의 분자 도킹을 분석하는 제9 단계;
상기 도킹 복합체의 분자 역학을 시뮬레이션하는 제10 단계; 및
상기 백신 모델의 코돈 최적화 및 인실리코 클로닝을 수행하는 제 11단계
를 포함하는, 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 단계는 약물 데이터베이스 및 프로테옴 데이터를 마이닝하는 단계; 표적 단백질의 세포내 국소화를 수행하는 단계; 및 단백질의 약물-가능성을 분석하는 단계를 포함하는 것인, 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물은 마이코박테리움 레프라에(Mycobacterium leprae)에 대한 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물인, 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물은: 서열번호 1 및 2로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상으로 나타나는 제1 영역을 포함하는 제1 펩타이드; 서열번호 3 및 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상으로 나타나는 제2 영역을 포함하는 제2 펩타이드; 서열번호 5 및 6으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상으로 나타나는 제3 영역을 포함하는 제3 펩타이드; 및 서열번호 7 및 8로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상으로 나타나는 제4 영역을 포함하는 제4 펩타이드를 포함하는, 마이코박테리움 레프라에에 대한 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물인, 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물은 서열번호 9 및 10으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상으로 나타나는 펩타이드를 더 포함하는 것인, 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물은 서열번호 11 내지 15로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열로 나타나는 펩타이드를 더 포함하는 것인, 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법에 따라 개발된, 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 마이코박테리움 레프라에(Mycobacterium leprae)에 대한 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법에 관한 것이고, 더욱 상세하게는 면역정보학적 접근을 통한 마이코박테리움 레프라에의 TN 균주에 대한 4가지 유형의 공통 B세포 및 T세포 에피토프를 가진 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마이코박테리움 레프라에(Mycobacterium leprae, M.leprae)은 만성 피부과 및 신경학적 임상 징후를 나타내는 나병(한센병이라고도 함)의 원인 매개체이다. 나병은 주로 5가지 임상병리학적 형태, 즉 i) 결핵성 나병(tuberculoid leprosy, TT), ii) 나병성 나병(lepromatous leprosy, LL), iii) 경계성 결핵(borderline tuberculoid, BT), iv) 경계성 경계(borderline borderline, BB) 및 v) 경계성 나병성(borderline lepromatous, BL) 나병이 있다. 나병은 엄청난 지역적 변이 형태를 보여 주로 인도와 아프리카에서는 90%의 TT 환자가 나타나는 반면 멕시코에서는 90%의 LL 환자가 나타나며, 아시아의 남동부에서는 TT 및 LL 변종 형태가 동등하게 관찰된다(Han et al., 2014; Blok et al., 2015). 지난 40년 동안 다제 요법(multidrug therapy, MDT)이 도입된 후 인도에서는 분포 패턴이 변경되었다. 최근에는, 더 많은 다균성 나병(multibacillary leprosy), 즉 BB, BL 및 LL 형태가 관찰되었다(Rao and Suneetha, 2018).

[0003] 마이코박테리움 레프라에 및 이에 의해 발병되는 나병은 주로 말초 신경, 피부, 상부 호흡기의 점막층, 뼈, 고환, 때로는 눈에 영향을 미친다(White and Franco-Paredes, 2015). 나병은 유아기부터 아주 노년층에 이르기까지 모든 연령대에서 발생하며, 전세계적으로 나병의 유병률은 10,000명당 1명 미만이지만, WHO(2020)에 따르면 매년 202,185명 이상의 새로운 사례가 보고된다.

[0004] 나병의 치료를 위해, 다제 요법은 1982년부터 사용되었다(Kar and Gupta, 2015). 나병은 클로파지민(clofazimine), 리팜피신(rifampicin), 및 답손(dapsone)의 다중 약물 조합으로 치료된다(Reibel et al., 2015). 수십 년에 걸쳐 나병 치료의 진전이 관측되고 있으며, 나병에 대한 몇 가지 치료 옵션이 제공되었다. 1차 항생제와 함께 2차 항생제도 등장하였으며, 1차 항생제로는 클로파지민, 리팜피신, 답손 등이 있으며, 2차 항생제로는 미노사이클린(minocycline), 플로로퀴놀론 클래리스로마이신(fluoroquinolones clarithromycin)이 있다(Reibel et al., 2015). 단일 약물 내성 또는 다중 약물 내성은 이 질병의 또 다른 문제이고(Lavana et al., 2018; Saunderson, 2016), 항생제는 기존 또는 새로운 항생제 내성 병원성 균주의 확산으로 인해 문제되는 상황이다(Maymone et al., 2020; Williams and Gillis, 2012). 이미 나병의 다제 내성(multidrug resistance)은 중국, 미얀마, 일본, 브라질, 한국, 콜롬비아, 인도네시아, 말레이시아, 인도 및 미국과 같은 여러 국가에서 관찰되었다(Singh and Sengupta, 2021; Williams et al., 2013). 따라서 나병의 치료를 위해 새롭고 효과적인 치료 분자(약물, 백신)가 절실히 필요한 실정이다.

[0005] 한편, 백신 조성물의 개발을 위한 면역정보학적 접근 방식이 최근 대두되고 있다. 화학적, 생화학적, 생물학적 또는 기타 약물의 개발을 위한 각종 물리적인 접근 방식에 소요되는 과도한 시간은 신속한 질병의 확산 방지 및 인류의 보건환경의 향상이라는 목표를 달성하기에 종종 적합하지 않다. 따라서, 면역정보학적 접근 방식을 통한 백신 조성물의 개발은 다양한 질병에 대해 요구되고 있으며, 나병에 대해서도 마찬가지로 요구되는 실정이다.

[0006] 한편, 잠재적인 치료 표적을 사용하는 약물 개발은 우수성이 입증된 수단이다. 시판되는 약물의 대부분은 단백질질을 표적으로 하는 것으로 관찰된 바 있고(Chakraborty et al., 2021), 따라서 단백질 약물 표적을 매핑하여 M. leprae의 약물 개발을 시작할 수 있다. 한편, 나병을 완전히 치료할 수 있는 이상적인 백신은 공지된 바 없다. 따라서 M. leprae에 대한 가능한 약물의 프로테옴 매개 치료 표적 매핑을 수행하고 기존의 약물 데이터

베이스와 비교하는 것을 통해, 나병의 완전한 치료를 위한 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법이 요구되는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 면역정보학적 접근 방식을 통한 마이코박테리움 레프라에의 TN 균주에 대한 4가지 유형의 공통 B세포 및 T세포 에피토프를 가진 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되는 것은 아니며, 언급되지 않은 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 하기의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 일 실시예에서 다음의 단계를 포함하는 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법을 제공할 수 있다.
- [0010] 단백질 서열을 검색하는 제1 단계;
- [0011] B세포 에피토프 및 B세포 에피토프 내 T세포 에피토프를 예측하는 제2 단계;
- [0012] 상기 예측된 에피토프를 3D 모델링하는 제3 단계;
- [0013] 상기 에피토프를 포함하는 백신 모델을 3D 모델링하는 제4 단계;
- [0014] 상기 백신 모델에 대한 이황화 엔지니어링을 수행하는 제5 단계;
- [0015] 상기 백신 모델의 3D 구조를 개선하고 검증하는 제6 단계;
- [0016] 상기 백신 모델의 물리화학적 특정 및 용해도를 평가하는 제7 단계;
- [0017] 상기 백신 모델의 항원성을 분석하고 알레르기성을 평가하는 제8 단계;
- [0018] TLR 단백질과 상기 백신 모델 간의 분자 도킹을 분석하는 제9 단계;
- [0019] 상기 도킹 복합체의 분자 역학을 시뮬레이션하는 제10 단계; 및
- [0020] 상기 백신 모델의 코돈 최적화 및 인실리코 클로닝을 수행하는 제 11단계.
- [0021] 또한, 본 발명에서 상기 제1 단계는 약물 데이터베이스 및 프로테옴 데이터를 마이닝하는 단계; 표적 단백질의 세포내 국소화를 수행하는 단계; 및 단백질의 약물-가능성을 분석하는 단계를 포함하는 단계일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명은 마이코박테리움 레프라에의 TN 균주에 대한 B세포 에피토프 또는 T세포 에피토프를 가진 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법을 제공할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명은 공통 B세포 및 T세포 에피토프를 가진 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법을 제공할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명은 마이코박테리움 레프라에의 TN 균주에 대한 공통 B세포 및 T세포 에피토프를 가진 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법을 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따른 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법에 따라, 특히 우수한 항원성과 낮은 알레르기성을 가지는 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물이 신속하게 제공될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법에 따라, B세포 에피토프 및 T세포 에피토프를 가지는 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물이 제공될 수 있다.
- [0027] 본 발명에 따른 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법에 따라, 공통 B세포 및 T세포 에피토프를 가지는 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물이 제공될 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법에 따라, 마이코박테리움 레프라에의 TN 균주에 대한 공통 B세포 및 T세포 에피토프를 가지는 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물이 제공될 수 있다.

[0029] 본 발명에서 언급되는 효과들은 이상에서 언급된 효과로 제한되는 것은 아니며, 언급되지 않은 본 발명의 효과들은 하기의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발을 위한 흐름도이다.

도 2는 Mycobacterium_leprae_TN_NC_002677 균주의 83개 단백질 표적에 대한 약물 후보 분자들을 분류한 결과의 도시이다.

도 3은 약물 후보 분자들의 표적 단백질을 세포 내 위치를 기준으로 통계적으로 분류한 결과의 도시이다.

도 4는 비활성 디히드로프테로에이트 신타제 2(Inactive dihydropteroate synthase 2), 디히드로프테로에이트 신타제(Dihydropteroate synthase) 및 리보뉴클레오시드-디포스페이트 환원효소 서브유닛 베타(Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta)의 모델링의 도시이다.

도 5는 임계값 수준 0.500보다 높은 잔기 값을 기준으로 B세포 에피토프로 간주한 결과의 도시이다.

도 6 및 도 7은 4개의 9mer 에피토프 SLFQSHNRK, VVGIGQHAA, MMHRSPRTR 및 LGVDQTQPV는 B세포 및 T세포 모두에 대한 유망한 공통 에피토프의 도시이다.

도 8은 4개의 9mer 에피토프의 3D 구조 이미지의 도시이다.

도 9는 본 발명에 따라 도출된 4개의 공통 에피토프와 링커 펩타이드의 결합된 도시이다.

도 10은 본 발명에 따른 백신 모델의 3D 단백질 구조가 SPARKS-X 서버에서 모델링된 결과의 도시이다.

도 11은 4개의 돌연변이가 두 쌍의 잔기, 즉 SER37-THR40 및 HIS35-GLY48에서 선택된 결과의 도시이다.

도 12는 PROCHECK 서버에 제공된 백신 단백질의 모든 아미노산 잔기에 대해 입체화학적 특성이 계산된 결과, 상기 제공된 백신 단백질을 검증하기 위한 라마찬드란(Ramachandran) 플롯, 및 ProSA 웹 서버를 통해 제공된 에너지 플롯 그래프의 도시이다.

도 13은 4개의 에피토프 영역(SLFQSHNRK, VVGIGQHAA, MMHRSPRTR 및 LGVDQTQPV)의 아미노산 분포 구성과 4개 영역의 아미노산 분포를 비교한 결과의 도시이다.

도 14는 백신 모델의 용해도의 측정 결과의 도시이다.

도 15는 단백질-단백질 도킹 복합체(TLR4/MD2 및 백신 구성체)의 3D 구조 및 TLR4 수용체와 백신 구성체 사이의 비결합 접촉의 분자간 상호작용 분석 결과의 도시이다.

도 16은 모든 단백질 잔기의 RMSF를 계산한 결과의 도시이다.

도 17은 도킹 복합체의 B-인자 플롯의 도시이다.

도 18은 단백질의 RMSD 플롯의 도시이다.

도 19는 분자 역학 시뮬레이션의 다양한 기간에서 TLR4/MD2-백신 구조의 나선, 시트 및 루프의 변화의 도시이다.

도 20은 대규모 유연성과 단백질의 안정성을 평가하기 위해 NMA가 수행된 결과의 도시이다.

도 21은 백신 모델의 in silico 면역화 분석 결과의 도시이다.

도 22는 최적화된 코돈을 pGEX-4 T1 발현 벡터에 클로닝한 결과의 도시이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[0032] 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적인 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 안되

며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

- [0033] 한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속하고, 일 구현예에서 생략된 기재는 다른 구현예에서 기재된 바와 같은 방식으로 해석될 수 있다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0034] 본 발명에 따른 백신은 정상적인 적응 면역계(adaptive immune system)를 사용하여 항원에 대한 예방 효과를 제공하고, 상기 면역성을 제시하는 에피토프는 mRNA 형태 또는 펩타이드 형태로 제공될 수 있다. 적응 면역계는 모든 외래 항원이 상기 외래 항원에 대한 면역 반응을, 항원 제시(antigen presentation)라고 불리는 과정 도중의 특정 "비자기(non-self)" 항원의 인식에 의하여 특이적으로 유발될 수 있는 것이다.
- [0035] 본 발명에서 "예방"은 본 발명의 개발 방법에 따라 수득되는 조성물의 투여로 항원의 감염 또는 증식을 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 개발 방법에 따라 수득되는 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 개발 방법에 따라 수득되는 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 개발 방법에 따라 수득되는 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 개발 방법에 따라 수득되는 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0039] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 폴리포스페이트, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 개발 방법에 따라 수득되는 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 경구 또는 비경구로 투여하는 것일 수 있고, 상기 비경구 투여는 피하, 피내, 설하, 직장, 정맥내, 동맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 골수내, 심장내, 병소내 및 두개골내 투여일 수 있고, 좌제, 주사 또는 그 밖의 주입 기술로 투여할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 개발 방법에 따라 수득되는 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 식이, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 개발 방법에 따라 수득되는 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로도 제형될 수 있다.
- [0042] 본 발명에서, 용어 "에피토프(epitope)"는 특정 항체에 의해 인식되는 항원결합부위의 아미노산 잔기 세트, 또는 T세포 에서는 T세포 수용체 단백질 및/또는 주요 조직적합성 복합체(Major Histocompatibility Complex; MHC)수용체에 의해 인식되는 잔기이다. 본 발명에서, 상기 에피토프는 항체, T세포 수용체 또는 HLA 분자에 의

해 인식되는 부위를 형성하는 분자로, 일차, 이차 및 삼차 펩타이드 구조, 또는 전하를 의미하는 것일 수 있다. 또한 상기 에피토프는, 본 발명의 mRNA로부터 체내에서 발현되는 것이거나, 체외에서 발현되어 체내로 투여되는 목적 펩타이드 또는 목적 단백질에 해당할 수 있다.

- [0043] 본 발명에서, 용어 "주요 조직 적합성 복합체(Major histocompatibility complex; MHC)"는 본 발명에 따른 에피토프와 결합하여 MHC-에피토프 복합체를 형성하도록 하는 것이다. 적응 면역계의 세포는 림프구, 특히 B세포와 T세포고, 여기서 상기 B세포는 체액성 면역 반응에 관여하고, 상기 T세포는 세포성 면역 반응에 관여하는데, 상기 면역 반응들은 MHC 분자와 복합체로 가공 및 제시되었을 때 이를 인식한다. 상기 T세포는 세포독성 T 림프구(CTL) 또는 헬퍼 T 림프구(HTL)를 포함하는 것일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법이 제공될 수 있다.
- [0045] 단백질 서열을 검색하는 제1 단계;
- [0046] B세포 에피토프 및 B세포 에피토프 내 T세포 에피토프를 예측하는 제2 단계;
- [0047] 상기 예측된 에피토프를 3D 모델링하는 제3 단계;
- [0048] 상기 에피토프를 포함하는 백신 모델을 3D 모델링하는 제4 단계;
- [0049] 상기 백신 모델에 대한 이항화 엔지니어링을 수행하는 제5 단계;
- [0050] 상기 백신 모델의 3D 구조를 개선하고 검증하는 제6 단계;
- [0051] 상기 백신 모델의 물리화학적 특정 및 용해도를 평가하는 제7 단계;
- [0052] 상기 백신 모델의 항원성을 분석하고 알레르기성을 평가하는 제8 단계;
- [0053] TLR 단백질과 상기 백신 모델 간의 분자 도킹을 분석하는 제9 단계;
- [0054] 상기 도킹 복합체의 분자 역학을 시뮬레이션하는 제10 단계; 및
- [0055] 상기 백신 모델의 코돈 최적화 및 인실리코 클로닝을 수행하는 제 11단계.
- [0056] 본 발명에서, 상기 제1 단계는 약물 데이터베이스 및 프로테옴 데이터를 마이닝하는 단계; 표적 단백질의 세포 내 국소화를 수행하는 단계; 및 단백질의 약물-가능성을 분석하는 단계를 포함하는 단계일 수 있다.
- [0057] 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 마이코박테리움 레프라의 TN 균주에 대한 B세포 에피토프 또는 T세포 에피토프를 가진 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법이 제공될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, 공통 B세포 및 T세포 에피토프를 가진 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법이 제공될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, 마이코박테리움 레프라의 TN 균주에 대한 공통 B세포 및 T세포 에피토프를 가진 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발 방법이 제공될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 개발 방법에 따라 서열번호 1 및 2로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상으로 나타나는 제1 영역을 포함하는 제1 펩타이드, 서열번호 3 및 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상으로 나타나는 제2 영역을 포함하는 제2 펩타이드, 서열번호 5 및 6으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상으로 나타나는 제3 영역을 포함하는 제3 펩타이드, 및 서열번호 7 및 8로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상으로 나타나는 제4 영역을 포함하는 제4 펩타이드를 포함하는 마이코박테리움 레프라에 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물을 제공할 수 있다.
- [0061] 본 발명에서, 본 발명의 개발 방법에 따라 제공되는 상기 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물은 서열번호 9 및 10으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상으로 나타나는 펩타이드를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0062] 상기 서열번호 1 내지 10은 다음 표 1과 같이 나타낼 수 있다.

표 1

서열번호	서열
1	SLFQSHNRKHP
2	SLFQSHNRK

3	TAVNTNRAATNLVAVTNDVVIGQHAAGIG
4	VVGIGQHAA
5	EGMMHRSPRTRAHCHFAD
6	MMHRSPRTR
7	GLGVDQTQPVGDLTAGGPQQ
8	LGVDQTQPV
9	TKRKSLQKEPE
10	PRRL

[0064] 본 발명에서, 본 발명의 개발 방법에 따라 제공되는 상기 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물은 서열번호 11 내지 15로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열로 나타나는 펩타이드를 더 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에서, 상기 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물은 서열번호 11 내지 15로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열로 나타나는 복수의 펩타이드를 더 포함하는 것일 수 있고, 상기 서열번호 11 내지 15로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열로 나타나는 펩타이드는 링커 내지 스페이서로 기능할 수 있다. 일 예로, 상기 펩타이드는 서열번호 11의 서열로 나타나는 펩타이드일 수 있고, 상기 펩타이드는 서열번호 15의 서열로 나타나는 펩타이드일 수 있다.

[0065] 상기 서열번호 11 내지 15는 다음 표 2와 같이 나타낼 수 있다.

표 2

서열번호	서열
11	EEAAK
12	GPGPG
13	KK
14	EEAAKASYQTQTNSPSGAGSVASQSGPVGIDLQELGKYEQYIKGSGRENGPGPGDQLTPTWRVYSTGSGNVFQTRGPG PGRQIAPGQTGKKVFLHVTYVKKVRFPNITNLKKQLTPTWRVYKKQIAPGQTGKKKQSLIVNNATNVVIKKKLLQ YGSFCTQLNRAKKVLSFELLHAPATVCCKTESIVRFPNITNLCPKK
15	GGGSGGGSGGGGS

[0067] 본 발명에서, 상기 링커 내지 스페이서는 에피토프 서열 간 구비되는 것 또는 에피토프 말단에 구비되는 것일 수 있고, 이를 통하여 에피토프 간 구조적 안정성을 제공할 수 있다. 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 공통 B세포 및 T세포 에피토프를 포함하는 마이코박테리움 레프라에 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물이 제공될 수 있다.

[0068] 본 발명에서, 상기 공통 B세포 및 T세포 에피토프는 서열번호 1 내지 8로 나타나는 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0069] 또한, 본 발명에서 상기 공통 B세포 및 T세포 에피토프는 서열번호 1 및 2로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 제1 서열, 서열번호 3 및 4로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 제2 서열, 서열번호 5 및 6으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 제3 서열, 및 서열번호 7 및 8로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 제4 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0070] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, 본 발명의 개발 방법에 따라 제공되는 조성물로서 서열번호 1 내지 8로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 가닥을 포함하는 마이코박테리움 레프라에 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물이 제공될 수 있다.

[0071] 본 발명에서, 상기 뉴클레오티드 가닥은 상기 서열의 mRNA인 것일 수 있다.

[0072] 본 발명에서, 벡터는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 것으로, 상기 목적 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사와 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있으며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 벡터는 적당한 숙주 내로 형질전환된 후, 숙주 세포와 무관하게 클로닝되거나 기능할 수 있으며, 세포 그 자체에 통합될 수 있다.

[0073] 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주세포 중에서 클로닝 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며 당 업계에 알려진

임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합 된 상태의 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, Charon4A, 및 Charon21A를 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII 계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계를 사용할 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 벡터는 특별히 제한되는 것이 아니며 공지된 발현 벡터를 사용할 수 있다.

[0074] 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열 중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열의 예에는, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스파타제의 프로모터들, 예를 들어 Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다.

[0075] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)" 된다. 이것은 전사 활성화 단백질과 같은 적절한 한 분자 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열일 수 있다. 예를 들면, 전사(pre-sequence) 또는 분비 리더(leader)에 대한 DNA는 펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미할 수 있다.

[0076] 본 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 통상 이중의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어(recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 클로닝될 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 이중 DNA가 생성될 수 있다.

[0077] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되어야만 하고, 적절한 서열 길이를 포함하여야 하는데, 일 예로, 상기 CDS는 500 nts 내지 800 nts인 것일 수 있고, 또는 상기 CDS는 500 nts 이상 550 nts 미만, 550 nts 이상 580 nts 미만, 580 nts 이상 620 nts 미만, 620 nts 이상 650 nts 미만, 650 nts 이상 700 nts 미만, 또는 700 nts 이상 800 nts 미만인 것일 수 있으며, 이 경우 전사과정이 안정되어, 발현 효율을 높일 수 있다.

[0078] 한편, 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 클로닝 시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵세포인 경우에는, 발현 벡터는 진핵세포 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0079] 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 유전자를 발현시키기 위해 매우 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵세포 숙주에 적합한 발현 벡터에는, 예를 들어 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토크갈로바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열을 포함한다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pBluescript, pGEX2T, pUC벡터, colE1, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 E. coli에서 얻는 것을 예시할 수 있는 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λ 와 λ NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA, 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2 μ 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL 941이다.

[0080] 본 발명의 일 실시 양태에서, M. leprae의 단백질 약물 표적이 식별되고 매핑되고, 약물 후보에 대해 83개의 약물 표적 단백질과 106개의 소분자가 채택되었으며, 54개의 약물 후보가 막 성분을 표적으로 하고 6개는 세포질, 12개는 세포외 부분, 24개는 세포벽 성분을 표적으로 하는 것으로 분석된 결과, M. leprae의 세 가지 잠재적인 약물 표적으로 비활성 디히드로프테로에이트 신타제 2(Inactive dihydropteroate synthase 2), 디히드로프테로에이트 신타제(Dihydropteroate synthase) 및 리보뉴클레오시드-디포스페이트 환원효소 서브유닛 베타(Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta)가 선정되었다.

- [0081] 후속적으로, BepiPred 2.0 알고리즘을 사용하여 IEDB 서버를 통한 B 세포 에피토프 분석을 통해 6개의 B 세포 에피토프가 예측되었으며, 상기 에피토프는 공통 에피토프를 확인하고 평가하기 위해 Proped-I 및 Proped 서버에서 추가로 처리되었다. 공통 에피토프는 MHC-I, MHC-II 및 B 세포 수용체와 상호작용하는 데 필수적인 것으로 알려져 있으며, 백신 조성물에 사용되는 경우 뛰어난 효율성을 가지고 효과적인 면역 반응을 생성하는 것으로 알려져 있다.
- [0082] 후속적으로, 4개의 9mer 에피토프(SLFQSHNRK, VVGIGQHAA, MMHRSPRTR 및 LGVDQTQPV)가 공통 에피토프로 지정되었고, VaxiJen 2.0 웹 서버를 사용하여 0.9751의 보호 항원 점수를 나타내어 에피토프의 강력한 항원성이 입증되었다. 상기 4개의 에피토프는 GGGGSGGGSGGGGS 링커로 연결되었고, 모노포스포릴 지질 A 또한 연결되었다.
- [0083] 후속적으로, 백신 구성요소는 SPARKS-X 서버를 통해 모델링되고, ProSA 및 PROCHECK 서버를 통해 품질 평가가 수행되었다. 이후 PATCHDOCK 서버 및 HawkDock 서버를 사용하여 분자 도킹이 평가되었고, NAMD 소프트웨어 패키지를 사용하여 도킹 콤플렉스의 안정성이 평가되었다. 다음으로 RMSF 및 RMSD 플롯을 통해 분자 안정성과 유연성이 평가되었고, RMS 비교를 통한 원자 변동성이 평가되었다.
- [0084] 후속적으로, 유도된 면역 반응이 전형적이고 자연적인 면역 시스템과 일치할 수 있는지 여부를 예측하기 위한 실리코(in silico) 최적화가 수행되었고, 클로닝이 수행되었다.
- [0085] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세하게 설명한다. 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 통상의 기술자에게 자명하게 이해되어야 한다.
- [0086] **실시예 1. 약물 데이터베이스 및 프로테옴 데이터 마이닝**
- [0087] 도 1A는 프로테옴 매개 치료 표적 매핑 및 다중 에피토프 펩타이드 기반 백신 조성물의 개발을 위한 흐름도이다. 박테리아 매개 질병 감염에 대한 효율적인 백신 조성물을 설계하는 데에 있어 중요한 데이터를 마이닝하였다.
- [0088] 먼저, 마이코박테리움 레프라에(*Mycobacterium leprae*, *M.leprae*)의 핵심 프로테옴을 EDGAR 2.0 데이터베이스에서 검색하였다(2020년 12월 22일). 상기 데이터베이스에는 *M.leprae*의 신약 및 백신 표적 예측을 위해 선택된 65개의 마이코(Myco) 박테리아 균주가 포함되었고, 표적 단백질과의 약물 상호작용을 확인하기 위해 *Mycobacterium_leprae_TN_NC_002677*의 참조 균주가 포함되었다. 각각의 데이터베이스에서는 83개의 약물 표적 단백질과 101개의 소분자가 발견되었다.
- [0089] 다음으로, 컴퓨터 매개 에피토프 백신 조성물의 개발을 위해 요구되는 아미노산 서열을 얻기 위해 *M.leprae*의 T 세포 자극 T5 항원의 아미노산 서열을 NCBI 데이터베이스에서 검색하였다. 144개의 아미노산으로 구성된 *M.leprae*의 T세포 자극 T5 항원의 아미노산 서열을 얻었고, 아미노산 서열의 FASTA 형식(GenBank: CAA19095.1) 파일을 얻은 다음, 추가 컴퓨터 기반 분석을 위해 준비하였다.
- [0090] **실시예 2. 표적 단백질의 세포내 국소화**
- [0091] PSORTb 버전 3.0.2 및 CELLO v.2.5 서버를 사용하여 단백질의 세포내 국소화를 예측하였다. 표적 단백질의 위치를 막, 세포질, 세포외 및 박테리아 세포벽으로 분류하였다. 이후 세포질 단백질을 기초적인 약물 표적으로 설정하고, 막 단백질을 상대적으로 우수한 항원성을 가진 백신 표적으로 설정하였다.
- [0092] 다음으로, *Mycobacterium_leprae_TN_NC_002677* 균주의 83개 단백질 표적에 대한 약물 후보 분자들이 선택되었다. 상기 약물 후보 분자는 막 기반 약물 표적 표적 54개, 세포질 표적 표적 약물 6개, 세포 외 단백질 표적 표적 약물 12개, 세포벽 성분 표적 약물 24개였다(도 2 참조).
- [0093] 그 후, 상기 약물 후보 분자들의 표적 단백질을 세포 내 위치를 기준으로 통계적으로 분류하였고, 그 결과 세포질/세포질(47%), 막/세포벽(43%) 및 세포외/세포내(10%) 후보가 발견되었다(도 3 참조).
- [0094] **실시예 3. 단백질의 약물-가능성 분석**
- [0095] *M.leprae*의 약물 가능성을 분석하기 위해 약물 데이터베이스를 검색하였다. 상기 약물 데이터베이스에서는 FDA 승인을 받은 실험적 약물 표적이 포함된다. 약물 설계를 위해 이로부터 약물 후보(소분자)를 선택하였다. *M.leprae*(TN 균주)의 세 가지 잠재적 약물 표적이 UniportKB 등록 번호(UniportKB accession number), 약물 बैं크 표적 ID(Drug bank targets ID)와 함께 표 3에 표시되었다. 도 4에 이들 표적 단백질 모델(비활성 디히드로프테로에이트 신타제 2(Inactive dihydropteroate synthase 2), 디히드로프테로에이트 신타제(Dihydropteroate synthase) 및 리보뉴클레오시드-디포스페이트 환원효소 서브유닛 베타(Ribonucleoside-diphosphate reductase

subunit beta))의 모델링을 도하였다.

[표 3]

Sl. no.	UniportKB accession number	Drug bank targets ID	Target protein name	Drug group	Docking affinity score (Kcal/mol)	Reference
1	P0C0X2	drugbank_target DB00250	Inactive dihydropteroate synthase 2	Approved, Investigational	-6.0	Gengenbacher et al., 2008
2	P0C0X1	drugbank_target DB00250	Dihydropteroate synthase	Approved, Investigational	-6.8	Cole et al., 2001
3	Q9CBQ2	drugbank_target DB04272 drugbank_target DB01627 drugbank_target DB01051 drugbank_target DB00976	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta	Approved	-12.6	Mohanty et al., 2018

실시예 4. 약물 후보(소분자) 및 표적 단백질과의 분자 상호작용

약물-단백질 복합체 간의 결합 상호작용을 분자 도킹 연구를 통해 평가되었다. 먼저, 결합 친화도를 계산하기 위해 Auto DockVina 소프트웨어 분석이 수행되었다. AutoDock 도구 소프트웨어에서 그리드 상자를 기본값으로 설정하고 3차원 축의 그리드 상자를 준비하고, 그리드 크기는 모든 도킹 준비에서 각각 X, Y 및 Z 치수에서 40Å, 40Å 및 40Å로 설정되었다. AutoDockVina를 통해 3개의 신약 후보물질과 표적 단백질 사이의 분자 도킹을 확인하였다.

다음으로, PyMOL ver.2.3 분자 그래픽 시스템을 사용하여 도킹 복합체를 설계하고 이 도킹 복합체를 시각화하였다. 도킹 복합체는 9가지 다른 모드로 표시되었고, 이 중 최상위 도킹 복합체만 선택되었다. 약물(소분자) 및 표적 단백질이 있는 3개의 최상위 도킹 복합체의 도킹 친화도 점수(Docking affinity score)(Kcal/mol)가 상기 표 3에 표시되었다.

실시예 5. B세포 에피토프의 예측

B세포 에피토프는 혈청 항체를 배치하여 체액성 면역 반응을 유도한다. 따라서 B세포 에피토프 예측은 백신 개발 및 잠재적인 치료 항체 생산과 같은 많은 생명엔지니어링 및 면역학적 목적에 필수적이다.

먼저, BepiPred 2.0 서버를 사용하여 IEDB 면역 데이터베이스로 예측되는 선형 B세포 에피토프를 얻었다. 에피토프 백신을 제공하기 위해 B세포 에피토프 동정(identification)을 수행하였다. IEDB 분석 리소스 서버에 기탁된 T5 항원의 아미노산 서열과, Bepipred 선형 에피토프 예측 알고리즘(ver. 2.0)을 선택하였다.

다음으로, 임계값 수준 0.500보다 높은 잔기 값을 기준으로 B세포 에피토프로 간주하고, 이를 도 5에 그래프로 도하였다. 그래프에서 에피토프 영역은 노란색으로 표시되고 비-에피토프 영역은 녹색으로 표시되었다.

이후 IEDB 서버를 통해 6개의 B세포 에피토프, 시작 위치에서 끝 위치까지의 아미노산 서열 길이를 예측하고, 이를 하기 표 4에 표시하였다.

[표 4]

Sl. no	Start point	End point	Amino acid sequence	Length
1	5	15	TKRKSLQKEPE	11
2	21	31	SLFQSHNRKHP	11
3	36	65	TAVNTNRAATNLVAVTNDVVGIGQHAAGIG	30
4	78	95	EGMMHRSRTRAHCHFAD	18
5	116	135	GLGVDQTQPVGDLTAGGPQQ	20
6	137	140	PRRL	4

실시예 6. B세포 에피토프 내의 T세포 에피토프의 예측

T세포는 원생동물, 바이러스 및 세포내 세균과의 싸움과 세포외 병원체에 대한 항체 반응의 발달에 중요한 역할을 수행한다. 일반 B세포와 T세포는 면역 반응에 매우 효과적이며, 그 중추 효과는 세균성 질병의 단백질 캐스케이드 경로를 파괴한다. 또한 세포독성 T 림프구(CTL, CD8+ 마커)는 에피토프를 인식하고 항원에 대한 세포 면역 반응에서 중요한 역할을 수행한다.

먼저, 항원성 단백질 서열에서 MHC class-II 및 MHC class-I 결합 영역을 예측하기 위해 그래픽 웹 서버인 Propred 및 Propred-I를 사용하였다. 그 결과, 51개의 MHC-II 및 47개의 MHC-I 대립유전자를 분류하였다.

[0111] 이후, 앞서 식별된 B세포로부터 T세포 에피토프를 식별하기 위해 Propred 및 Propred-I를 사용하였다. 그 결과, 4개의 9mer 에피토프 SLFQSHNRK, VVGIGQHAA, MMHRSPRTR 및 LGVDQTQPV는 B세포 및 T세포 모두에 대한 유망한 공통 에피토프로 확인되었다. 그 결과를 도 6 및 도 7에 도시하였다.

[0112] 다음으로, MHC 클래스 I-결합 친화도, 리스케일 결합 친화도, 프로테아좀 C 말단 절단 친화도 및 항원 처리 (TAP) 수송 효율과 관련된 수송체를 기반으로 예측된 에피토프를 추가로 검증하기 위해 NetCTL 1.2 웹 서버를 사용하였다. 그 결과를 하기 표 5에 표시하였다. 최종적으로 4개의 상기 에피토프는 B세포 및 T세포 모두와 반응하고 높은 항원성 반응을 생성할 가능성이 있는 것으로 판단되었다.

[0113] [표 5]

Epitopes (peptide sequence)	Predicted MHC binding affinity	Rescale binding affinity	C- terminal cleavage affinity	TAP transport efficiency	Prediction score
SLFQSHNRK	0.0695	0.2951	0.9715	0.6970	0.4757
VVGIGQHAA	0.0588	0.2496	0.1799	-0.6370	0.2447
MMHRSPRTR	0.0618	0.2622	0.8550	1.6530	0.4731
LGVDQTQPV	0.0539	0.2290	0.7720	0.1000	0.3498

[0114]

[0115] 실시예 7. 에피토프의 3D 모델링

[0116] 에피토프의 3차원 구조는 백신 성분 개발에 중요한 역할을 수행한다. 일반적으로 3D 모델은 상동성 모델 서버를 통해 제공되었고 검색 템플릿은 PDB 데이터베이스에서 제공되었지만, 본 발명에서 선별된 상기 에피토프는 서열이 상대적으로 짧기 때문에 상기 방법을 통해 3D 모델을 개발하는 데 어려움이 있어, 본 발명에서는 구조적 예측을 위해 양방향 순환 신경망 방법을 사용하는 DISTILL(V.2) 서버를 활용하여 선택된 에피토프의 3D 구조를 제공하였다.

[0117] 먼저, 선택된 4개의 공통 에피토프 SLFQSHNRK, VVGIGQHAA, MMHRSPRTR 및 LGVDQTQPV를 DISTILL 서버(V2.0)에 기탁하고, 예측된 모델 중 1위 모델을 PDB 파일로 선정하였다. 그 후, 3D 모델 에피토프의 PDB 파일을 UCSF 키메라 서버(ver.1.13.1)로 시각화하였다. 4개의 9mer 에피토프의 3D 구조 이미지를 도 8에 도시하였다.

[0118] 실시예 8. 백신 조성물의 제공 및 3D 모델링

[0119] 백신 조성물을 제공하기 위해 선정된 에피토프와 보조제는 링커 펩타이드의 도움으로 결합된다. 면역 반응은 일반적으로 백신 단백질의 적절한 3D 구조에 의해 유발된다. 본 발명에서, 백신 조성물을 제공하기 위해 4개의 공통 에피토프를 GGGSGGGSGGGGS 링커 펩타이드와 결합시켰다. 상기 링커는 안정성, 접합 능력이 우수하고 생물학적 활성을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 추가로, 더 나은 항원성 반응을 위해 보조제가 사용되었고, 이를 도 9에 도시하였다. 예를 들어, 모노포스포릴 지질(MPL)은 체액 및 세포 매개 면역 반응을 강화하기 위한 보조제로 사용되었다. 모노포스포릴 지질은 수용체 단백질과 결합하는 리간드로 작용하며 TLR4 수용체 경로에 의해 활성화된다.

[0120] 다음으로, 백신 모델의 3D 단백질 모델을 접합 인식 서버인 SPARKS-X를 통해 생성하였다. 3D 단백질 구조 예측 외에도 SPARKS-X 서버는 여러 벤치마크를 사용하여 정렬 정확도와 접합 인식을 예측할 수 있다. 서버 입력 단백질 시퀀스는 FASTA 형식이며 3D 단백질 구조를 제공하는 데 사용된다. 본 발명에 따른 백신 모델의 3D 단백질 구조가 SPARKS-X 서버에서 모델링되었으며, 그 결과를 도 10에 도시하였다.

[0121] 실시예 9. 백신 안정성을 제공하기 위한 이황화 엔지니어링

[0122] 이황화 엔지니어링이 백신 구조에서 새로운 이황화 결합을 제공하기 위해 적용되었다. 이황화 결합은 정확한 기하학적 형태와 함께 단백질 구조에 상당한 안정성을 제공하는 공유 상호 작용이다.

[0123] 이황화 엔지니어링을 위해 Design 2.0 온라인 서버를 사용하였다. 먼저, 상기 서버에 PDB 파일을 입력하고 잔류 쌍 검색을 수행하였고, 그 결과 상기 서버에 의해 이황화 상호작용이 표시되었다.

[0124] 이를 통해 이황화 엔지니어링 목적으로 사용할 수 있는 총 10쌍의 잔기를 예측하였고, 결합 에너지 및 Chi3(?) 값과 같은 다른 매개변수를 평가한 후 두 쌍의 잔기를 선정하였다. 즉, 결합 에너지 값이 2.2(kcal/mol) 미만이고, Chi3(?) 각도 범위 값은 -87° 와 +97° 사이인 두 쌍의 잔기를 선정하였다. 최종적으로, 4개의 돌연변이가 두 쌍의 잔기, 즉 SER37-THR40 및 HIS35-GLY48에서 선택되었다. 그 결과를 도 11에 도시하였다.

[0125] **실시예 10. 백신 모델의 3D 구조 개선 및 검증**

[0126] 백신 모델의 예측된 3D 구조의 오류를 피하기 위해, 먼저 분자 역학 시뮬레이션을 통해 단백질의 사이드 체인 재패킹(repacking) 및 이완된 전체 단백질 모델의 개선(refine)을 수행하는 Galaxy Refine 웹 서버를 통해 그 3D 형태를 검증하였다. Galaxy Refine 웹 서버에서 우수한 3D 모델을 확인하기 위해 6개의 매개변수(TMscore, RMSD, MolProbity, Clash Score, Poor Rotamers, Ramachandran plot)를 평가하였다.

[0127] 다음으로, 주어진 백신 단백질에 대한 여러 입체화학적 매개변수를 계산하는 PROCHECK 서버를 사용하여 백신 모델의 3D 구조를 검증하였다. PROCHECK 서버에 제공된 백신 단백질의 모든 아미노산 잔기에 대해 입체화학적 특성이 계산되었고, 상기 제공된 백신 단백질을 검증하기 위한 라마찬드란(Ramachandran) 플롯이 제공되었다. 이를 도 12에 그래프로 도시하였다.

[0128] 또한, 원하는 백신 단백질 구조를 검증하기 위해 에너지 플롯을 평가하고 모델 품질을 나타내는 백신 단백질의 'Z' 점수 값을 계산하는 ProSA 웹 서버를 사용하였다. 여기서, 상기 'Z' 점수의 음수 값은 예측된 단백질의 우수한 품질 모델을 나타낸다. ProSA 웹 서버를 통해 에너지 플롯 그래프가 제공되었고, 'Z' 점수는 -1.54로 계산되었다. 이를 도 12에 그래프로 도시하였다.

[0129] **실시예 11. 물리화학적 특성 및 용해도 평가**

[0130] 먼저, 백신 모델의 물리화학적 특성을 확인하기 위해 ExPASy ProtParam 서버를 사용하였다. ExPASy ProtParam 서버는 원자 구성, 분자량, 흡광 계수, 추정된 반감기, 불안정 지수, 지방족 지수 및 GRAVY(grand average hydropathy, 대평균 수력병증)를 포함한 다양한 매개변수를 제공한다. 모델링된 백신 단백질의 분자량은 5885.64 Da, 불안정 지수 값(instability index value)은 37.73, 지방족 지수 값(aliphatic index value)은 47.17, 백신 모델의 GRAVY 값은 0.673으로 측정되었다.

[0131] 단백질-단백질 상호작용에서 중요한 역할을 수행하는 아미노산 조성을 확인하기 위해 상기 서버를 사용하였다. ExPASy ProtParam 서버를 사용하여 4개의 에피토프 영역에서 아미노산 분포의 구성을 예측하였다. 4개의 에피토프 영역(SLFQSHNRK, VVGIGQHAA, MMHRSPTR 및 LGVDQTQPV)의 아미노산 분포 구성과 4개 영역의 아미노산 분포 비교를 도 13에 도시하였다.

[0132] 다음으로, 백신 모델의 용해도를 결정하기 위해 Protein-Sol 온라인 웹 서버가 사용되었다. 백신 모델의 용해도의 측정 결과는 0.710으로 제공되었고, 이는 백신의 상당한 용해도를 의미한다. 그 결과를 도 14에 도시하였다.

[0133] **실시예 12. 항원성 분석 및 알레르기성 평가**

[0134] 항원성은 T세포 수용체 및 항체 또는 B세포 수용체와 특이적으로 결합하는 항원의 경향으로, 채택된 에피토프 영역의 특성과 단백질의 항원성은 펩타이드 백신 개발에 필수적이다.

[0135] 먼저, 에피토프의 항원성을 평가하기 위해 아미노산 서열의 항원성을 계산하는 기능을 하는 Auto Cross-covariance(ACC) 매트릭스를 기반으로 하는 독립적인 정렬 알고리즘을 사용하는 VaxiJen2.0 웹 서버가 사용되었다. 그 결과, 백신 모델의 단백질 항원성의 예측 정확도는 약 70-89%인 것으로 확인되었다. 상기 서버가 링커 펩타이드를 통해 연결된 다중 에피토프 서열의 도움으로 새로운 약물을 설계하도록 설정되었다. 그 결과 0.4의 가능한 항원 역치가 관찰되었고, 0.9751의 보호 항원 점수를 예측하여, 백신 성분이 항원성이 충분함을 확인하였다.

[0136] 또한, 백신 서열의 항원성을 즉 기본 시퀀스의 다중 표현과 2단계 구조를 통한 5가지 기계 학습 알고리즘을 기반으로 하는 ANTIGENpro 서버에 의해 검증하였다. 그 결과, 백신 모델의 항원성이 0.761359으로 평가되었다. 이는 백신 모델이 항원 특성에 의해 면역 반응을 촉발할 것임을 의미한다.

[0137] 알레르기는 IgE 항체 반응과 관련된 과민성 및 염증 반응을 유발하므로, 백신 모델의 알레르기 특성은 투여 전에 반드시 확인되어야 한다. 이를 위해 단백질 서열을 균일한 길이의 벡터로 변환하는 자동 교차 공분산(ACC) 알고리즘을 기반으로 하는 Autocross-covariance(ACC) 기반 AllergenFP 서버가 백신 모델의 알레르기성을 평가하기 위해 사용되었다. 그 결과, 백신 모델에 의한 예상되는 알레르기 반응이 없음이 확인되었고, 이후의 in silico 검증에 고려될 수 있음이 예측되었다.

[0138] **실시예 13. TLR 단백질과 백신 조성물 간의 분자 도킹 분석**

[0139] 백신을 개발하기 위해서는 수용체 기반 백신 개발을 위한 가장 중요한 절차 중 하나인 수용체 단백질과 펩타이드

드 사이의 분자 도킹(molecular docking) 분석이 필수적으로 요구된다. 분자 도킹은 기하학적 형상 상보성(geometric shape complementarity)과 원자 접촉 에너지(atomic contact energy, ACE)를 기반으로 분석된다. 이를 위해 PATCHDOCK 웹 서버를 사용하였다. 단백질-펩타이드 도킹을 통해 TLR4/MD2와 백신 단백질 간의 상호작용을 분석하였다. PDB(Protein Data Bank) 데이터베이스로부터 얻어진 수용체 단백질 분자(TLR4)의 PDB 파일이 입력되었다. 전산 분자 도킹 프로세스를 통해 분자의 3D 구조가 예측되었다. 또한 클러스터링 RMSD(제공 평균 제공근 편차)도 계산되었다.

[0140] 그 결과, 도킹 콤플렉스의 ACE 값은 244.12로 계산되었고, 기하학적 형상 상보성 점수(geometry shape complementary score)는 10,196로 계산되었다. 현저하게 낮은 ACE 값은 백신 모델이 TLR4 수용체와 긍정적인로 부착되고 나병 및 기타 관련 질병에 대한 전염증성 면역 반응을 유도할 수 있음을 의미한다.

[0141] 또한, 단백질-단백질 도킹 복합체(TLR4/MD2 및 백신 구성체)의 3D 구조를 통해, 이들이 다양한 세포 기능을 활성화할 수 있는 방법이 예측되었고, 약물 설계 및 잔기 기반 아미노산 사슬 상호작용이 개발될 수 있음이 예측되었다. 그 결과를 도 15에 도시하였다.

[0142] 실시예 14. 결합 자유 에너지 계산

[0143] 단백질-단백질 상호작용(PPI)은 세포 시스템의 다양한 기능에서 중요한 역할을 수행하므로, 단백질의 결합 친화도 계산은 PPI를 설명하는 중요한 매개변수이다. 또한 열역학적으로 결합 친화도는 자유 에너지 값에 반비례하므로, 결합 친화도 점수의 음수 값은 리간드와 수용체 단백질 사이의 자발적 결합을 나타낸다.

[0144] 결합 자유 에너지를 계산하기 위해 MM/GBSA(Molecular Mechanics / Generalized Born Surface Area) 접근 방식을 사용하여 HawkDock 서버 분석을 수행하였다. ATTRACT 알고리즘 기반 HawkDock 도킹 서버는 MM/GBSA 접근 방식으로 결합 자유 에너지를 추정하는 데 널리 사용되는 서버이다. MM/GBSA 접근 방식에서 시스템의 결합 자유 에너지(ΔG_{bind})는 자유 에너지의 변화로 정의된다. TLR4/MD2-백신 구성 복합체의 결합 자유 에너지는 112.46 kcal/mol로 계산되었다. 또한 정전기 에너지($\Delta E_{electrostatic}$)는 -1079.59 kcal/mol로, 반 데르 발스 에너지(ΔE_{vdw})는 -119.49 kcal/mol로, 정전기 용매화 에너지(ΔG_{GB})는 1103.55 kcal/mol로, 그리고 비전기적 용매화 에너지(ΔG_{SA})는 -16.93 kcal/mol로 계산되었다.

[0145] 또한 도킹 복합체의 PPI 분석 및 시각화를 PDBsum 및 PyMOL 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 수소 결합, 염다리 및 단백질 복합체의 안정성을 담당하는 TLR4 수용체와 백신 구성체 사이의 비결합 접촉의 분자간 상호작용이 분석되었고, 그 결과를 도 15에 도시하였다.

[0146] 실시예 15. 도킹 복합체의 분자 역학 시뮬레이션

[0147] 분자 역학(MD) 시뮬레이션은 생물학적 거대분자의 다양한 동적 측면을 특성화하는 데 매우 유용한 계산 기술이다. 도킹 복합체(TLR4/MD2 및 백신 구조)의 MD 시뮬레이션은 도킹 복합체의 에너지 최소화화를 확인하기 위한 적절한 CHARMM27 단백질 포스필드(forcefield) 토폴로지의 선택과 함께 NAMD 2.14 패키지를 통해 수행되었다. 원자 에너지 최소화는 기본적으로 NVT 및 NPT 앙상블과 결합된 NAMD 최소화로 수행되었다.

[0148] 이어서 모든 시스템에 대해 50,000단계의 최소화에 이어 0.5ns의 용매 분자 NVT가 수행되었다. 시뮬레이션은 전체 시뮬레이션 에피소드에 대해 계산된 RMSD(Root Mean Square Deviation) 및 RMSF(Root Mean Square Fluctuation) 플롯으로 평가되었다. 구성 궤적 파일의 분자 시각화는 VMD 1.9.3 소프트웨어에서 확인되었다.

[0149] 유연성을 나타내기 위해 모든 단백질 잔기의 RMSF를 계산하고 이를 도 16에 도시하였다. 도킹 복합체의 B-인자 플롯은 RMS에 비해 구조적 안정성을 가짐이 확인되었고, 이는 도 17에 도시되었다. 약간의 변동은 모든 잔기의 변형을 나타내며, 이는 백신 분자가 TLR4 수용체 단백질과의 지속적인 상호작용으로 인식될 수 있음을 의미한다.

[0150] 또한 구조적 안정성의 측면에서도 구별될 수 있는 RMSD 플롯을 도 18에 도시하였다. 분자 역학 시뮬레이션의 다양한 기간에서 TLR4/MD2-백신 구조의 나선, 시트 및 루프의 변화를 도 19에 도시하였다.

[0151] 실시예 16. 도킹 복합체의 일반 모드 분석

[0152] 분자 역학(MD) 분석은 생물학적 거대분자의 이동성과 안정성을 결정한다. 생물학적 거대분자의 이동성을 기술하는 경우 내부 좌표에 NMA(Normal Mode Analysis) 접근 방식이 적용된다.

[0153] 분자 역학 시뮬레이션은 내부 2면 좌표의 NMA 기반 iMODS 서버를 통해 수행되었다. iMODS는 분자 운동 시각화

및 고분자 도메인 역학의 개선된 아핀 모델 기반(affine-model-based) 화살표 표현을 지원하는 데 사용된다. iMODS 서버는 C α 의 2면체 좌표를 고려하여 NMA를 계산하고, 이를 위해 PDB 파일이 요구된다. 상기 서버는 B-인자, 구조적 복합체의 변형성, 탄성 네트워크, 분산, 공분산 맵 및 고유값을 계산할 수 있고, 여기서 낮은 고유값은 단백질 복합체가 쉽게 변형될 수 있음을 나타낸다.

[0154] 대규모 유연성과 단백질의 안정성을 평가하기 위해 NMA가 수행되었고 그 결과를 도 20에 도시하였다. 화살표는 각 잔류물의 방향을 나타내고 선 길이는 도킹 콤플렉스의 3D 모델에서 이동성 정도를 나타낸다. 백신 성분과 TLR4의 이동성은 서로를 향한 화살표를 통해 표시되었다. 주쇄 변형성은 사슬 잔기의 힌지로 표시되는 단백질 각 잔기의 유연성과 왜곡을 나타낸다. NMA에서 B-인자 또한 계산되었으며 이는 원자의 상대적 진동 운동을 나타낸다. 탄성 네트워크 맵에 표시된 스프링으로 연결된 잔류물은 단백질 접힘을 안정화한다. 모든 점은 해당 원자 쌍과 스프링의 연결을 나타내며 측정된 점 색상은 많은 스프링이 뺏겼음을 의미한다. 한편, 공분산 매트릭스는 단백질 복합 잔기 간의 상호 상관을 계산하고 정확한 변동을 측정하고, 쌍 잔기 내의 색상 변화를 나타낸다. 상관된 잔기는 빨간색으로 표시되고, 상관되지 않은 잔기는 흰색으로 표시되고, 반상관된 잔기는 파란색으로 표시되었다. 단백질 복합체의 추정 고유치는 1.3982892e-05였다. 고유값은 에너지 요구량과 직접 연결되며, 정상 모드는 이 값에 해당하여, 운동 강성을 나타낸다.

[0155] 실시예 17. 백신 모델의 in silico 면역화 분석

[0156] C-ImmSim 서버를 사용하여 적절한 항원성과 면역 반응 프로파일을 예측하기 위한 백신 모델의 in silico 면역 분석을 수행하였다. C-ImmSim 서버를 사용한 분석은 적응 면역 자극(adaptive immunity stimulation)뿐만 아니라 특정 핵심 표적과 높은 항원성 에피토프의 면역 상호 작용을 평가하고, 이는 실제 발현으로 설계된 백신 후보를 투여한 후의 실제 세포 및 체액성 면역 변형을 나타낸다.

[0157] C-ImmSim은 위치별 매트릭스 스코어링 매트릭스(position-specific matrix scoring matrix, PSSM)뿐만 아니라 다양한 시간 간격에서 항원 반응의 통계를 설명하기 위해 적용된 기계 학습 기술의 사용을 기반으로 한다. Random Seed, Simulation Volume과 같은 계적 매개변수는 1050으로 설정된 시뮬레이션 단계를 제외하고 일정하였다(여기서 1회 단계는 실제의 8시간에 상응한다). 시간 간격은 1, 84, 및 168로 유지되었지만, 대부분의 상용 백신의 권장 간격이 4주인 것을 참조하면 최종적으로 4주 동안 3회 접종이 더 요구되었다.

[0158] 그 결과, 도 21을 참조하면, 백신 후보에 대한 1차 면역 반응은 상이한 면역 글로불린 농도를 점진적으로 증가 시킴이 관찰되었고, 활성 B세포, 헬퍼 T세포, 조절 T세포 및 세포독성 T세포의 농도의 연속적인 확장 또한 예측되었다. 이는 본 발명에 따라 선정된 백신 후보가 매우 강력한 2차 면역 반응을 생성하는 능력을 가짐을 의미한다.

[0159] 또한, 도 21을 참조하면, 350일 동안 증가하는 자연 살해(NK) 세포에 대한 평가는 mm3당 최대 380개 세포 수준에 도달한 것으로 관찰되었고, 본 발명에 따른 백신 모델은 주로 IFN- γ 인 상이한 유형의 사이토카인을 생성할 것으로 예측되었다. 또한, 수지상 세포 및 대식세포의 농도 증가가 관찰되었고, 이는 이들 항원 제시 세포(APC)에 의한 항원의 매우 강력한 출현을 의미한다.

[0160] 상기와 같은 in silico 면역 시뮬레이션 결과에 따르면, 본 발명에 따라 선정된 백신 후보가 면역 체계를 활성화시키는 기전을 가지는 것으로 예상될 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 다중 에피토프 기반 펩타이드 백신 조성물은 병원성 감염에 대한 1차 면역 반응 활성제인 TLR 수용체와 결합할 수 있고, 투여 후 강력한 항원성 반응을 유발할 수 있음이 입증되었다.

[0161] 실시예 18. 코돈 적응 및 백신 조성물의 in silico 클로닝

[0162] 백신 성분의 in silico 클로닝의 경우, 역번역 및 코돈 최적화가 필수적인 발현 벡터 내에서 발현된다. 인간과 대장균 K12는 단백질 발현에 대해 서로 다른 조절 시스템을 가지므로, 코돈의 최적화는 호스트와 도너의 발현 시스템 사이의 균등화를 위해 고려되어야 한다.

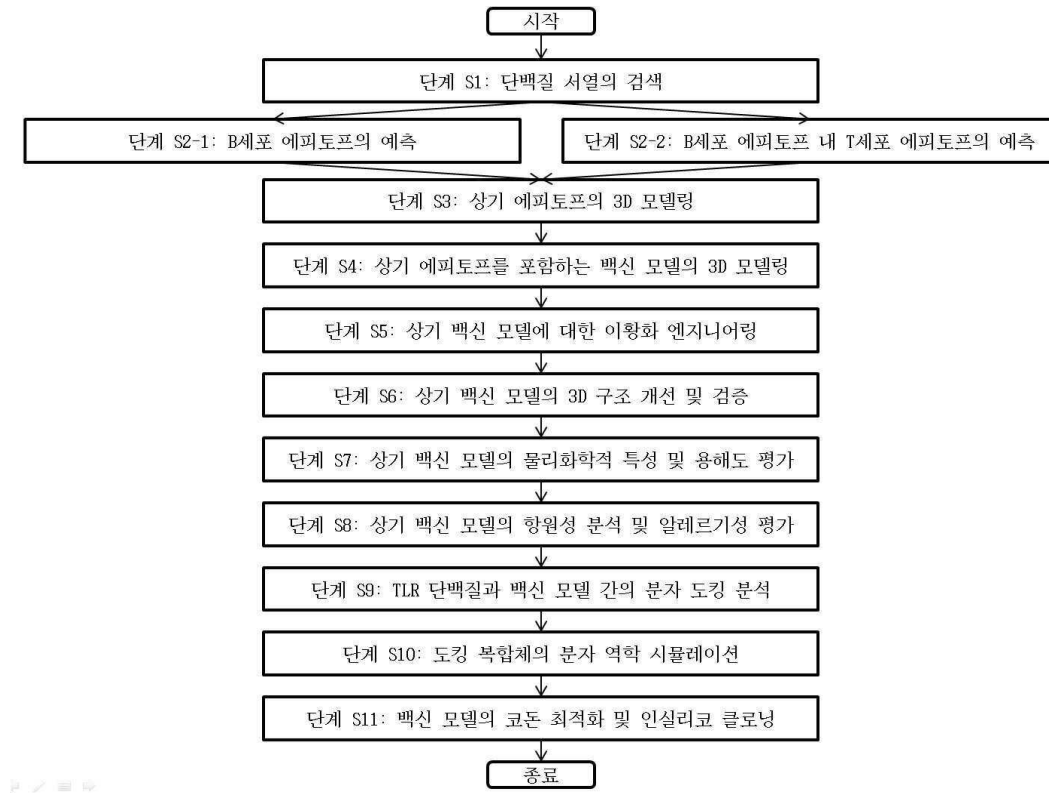
[0163] 먼저 Jcat(Java Codon Adaptation Tool)은 역번역을 위해 지정되었다. Jcat이 단백질 서열로부터 mRNA를 재형성하고, 코돈 최적화가 이어서 제공된다. 그 결과, 최적화된 코돈의 CAI 값은 1.0으로 관찰되어 숙주 체내에서 본 발명에 따른 백신 성분의 발현에 적합한 것으로 판단되었다. 최적화된 아미노산 서열의 GC 함량 비율은 63.33으로 상당한 최적화를 나타내었다. 일반적으로, 30%와 70% 사이의 범위는 안정적인 최적화를 의미한다.

[0164] 다음으로, 발현 벡터로 pGEX-4 T1이 선택되었고, 벡터 서열은 'addgene' 벡터 데이터베이스에서 검색되었다. 클로닝은 SnapGene 5.1.7 소프트웨어를 통해 설계되었다. 2개의 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 pGEX-4T1 발

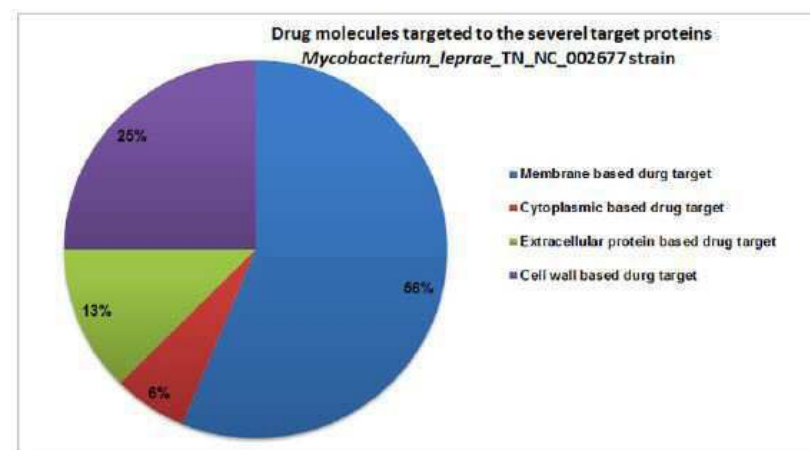
현 박터를 절단하고 백신 성분을 삽입하였다. 마지막으로, 최적화된 코돈을 pGEX-4 T1 발현 박터에 클로닝하였다. 사용된 두 개의 제한된 엔도뉴클레아제는 발현 박터에서 각각 위치 930 및 939를 갖는 BamHI 및 EcoRI였다. 이는 도 22에 도시되었다.

도면

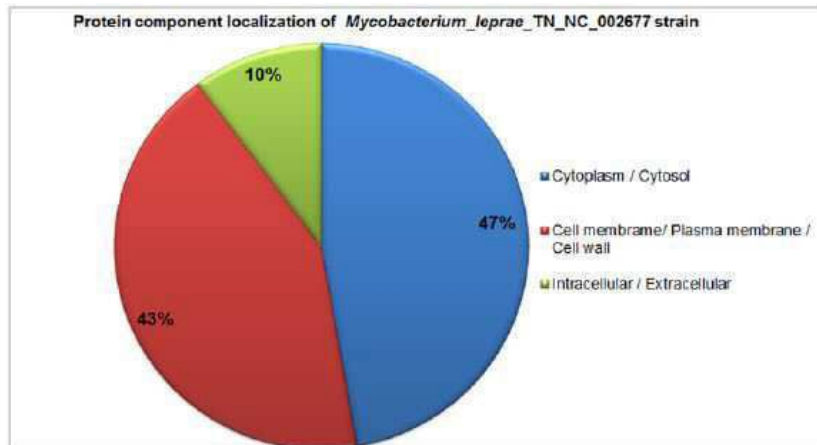
도면1



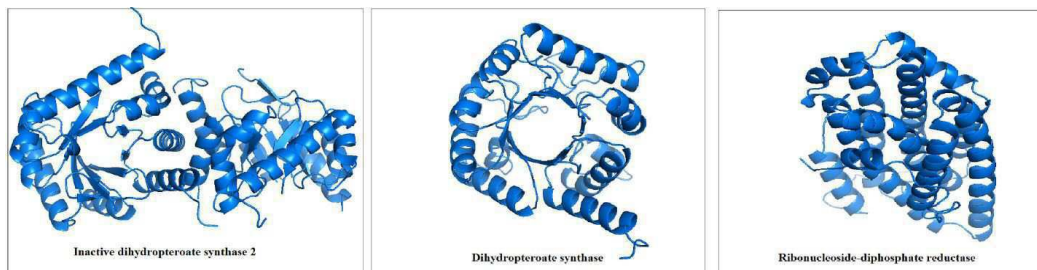
도면2



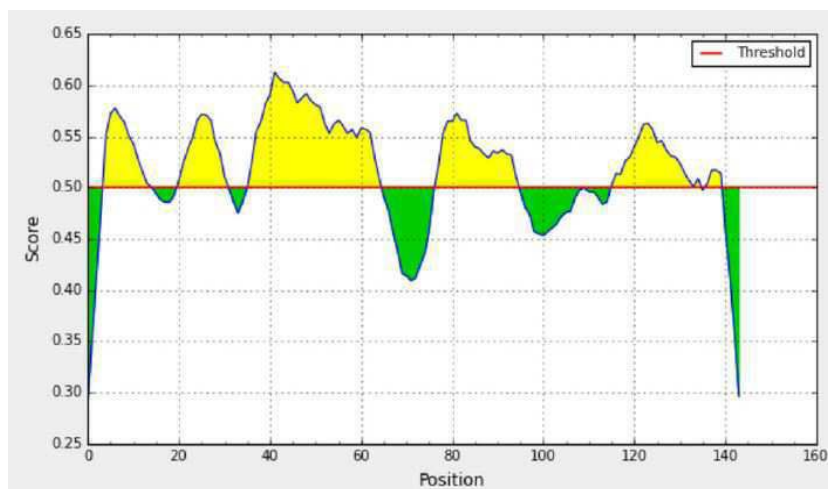
도면3



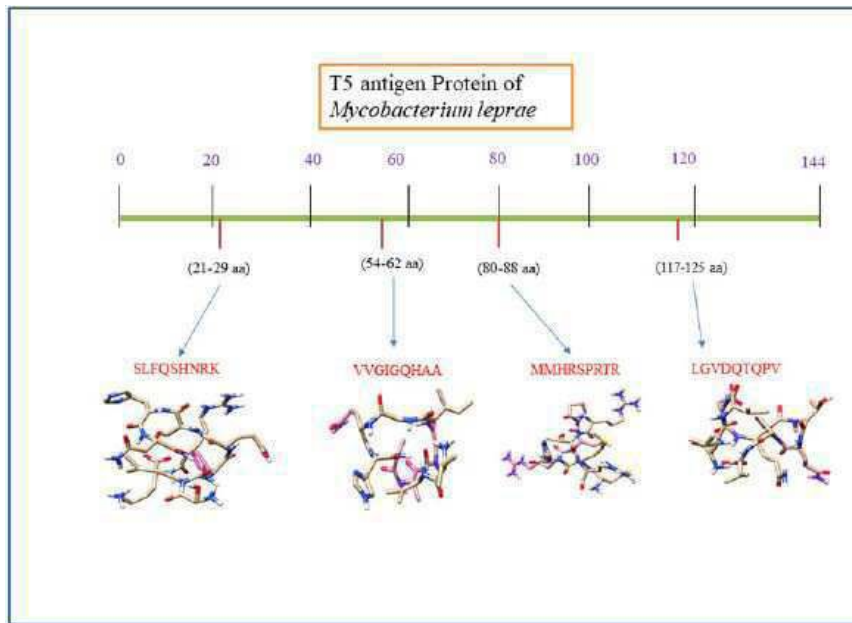
도면4



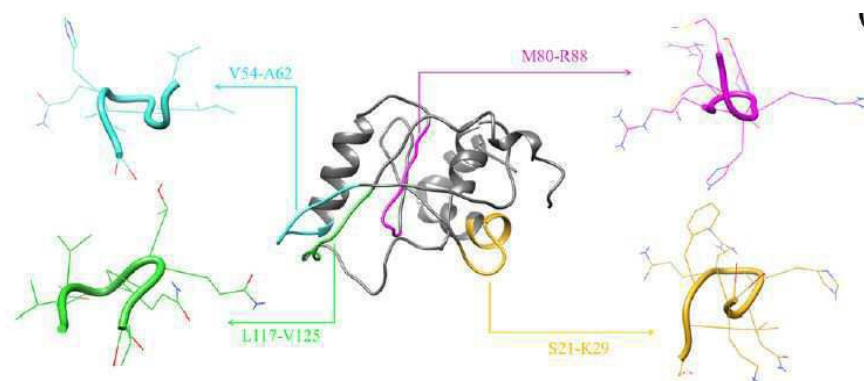
도면5



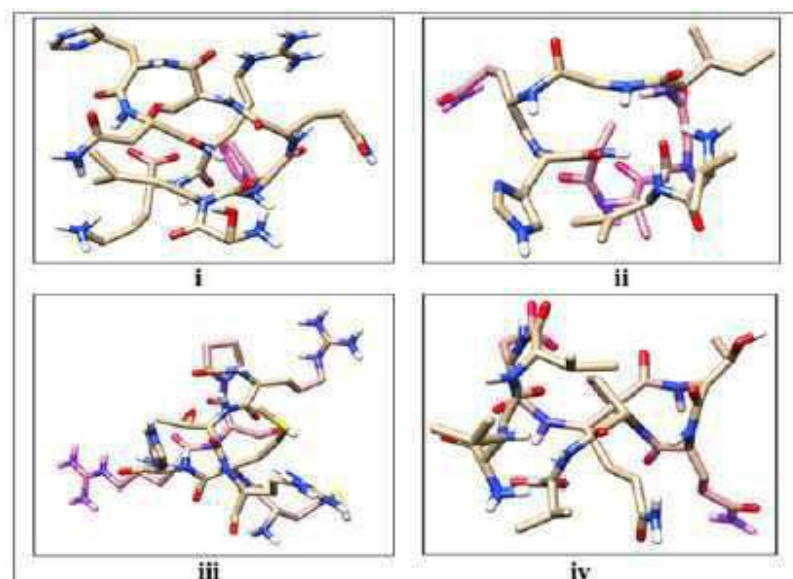
도면6



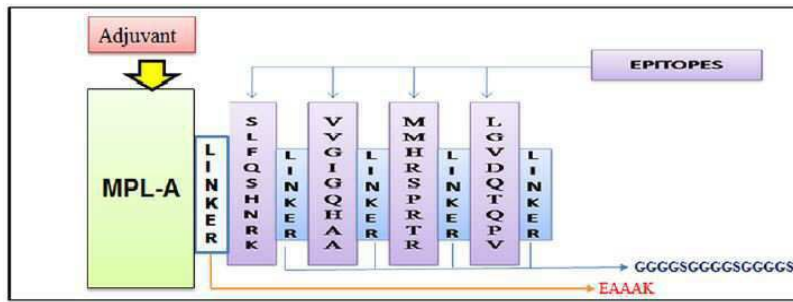
도면7



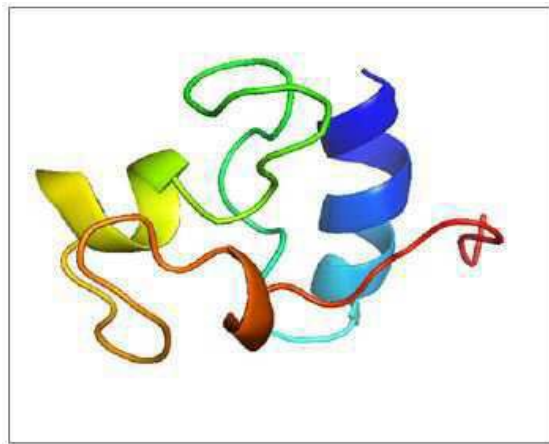
도면8



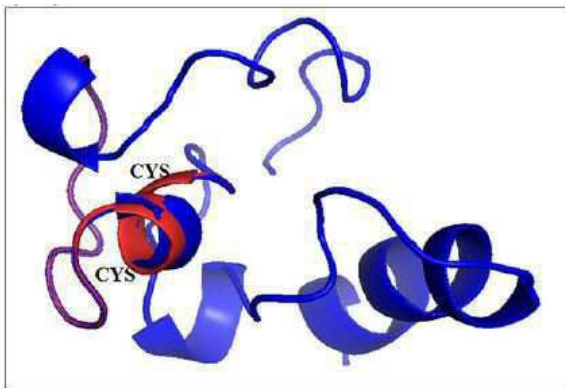
도면9



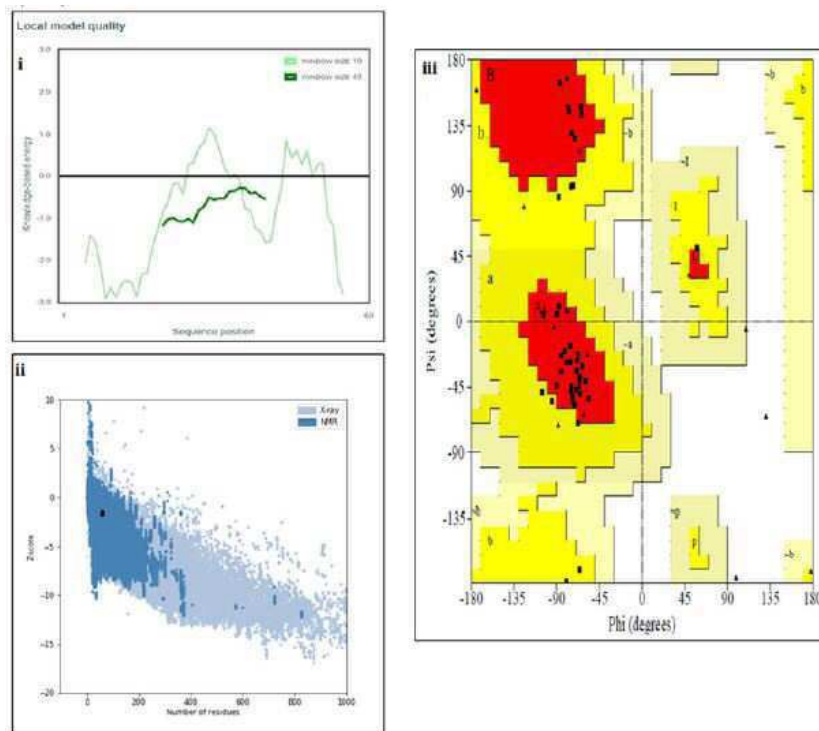
도면10



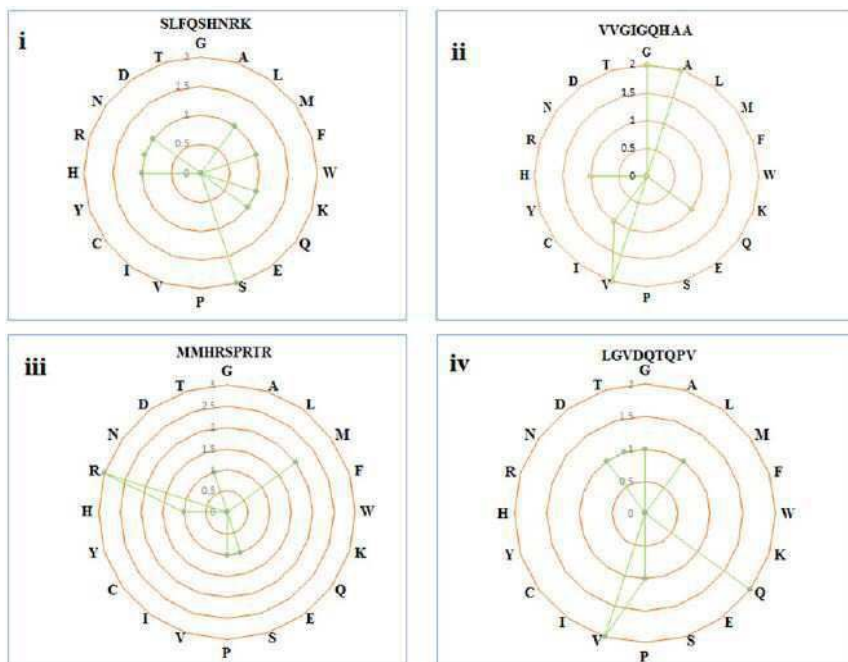
도면11



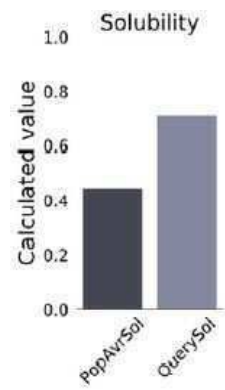
도면12



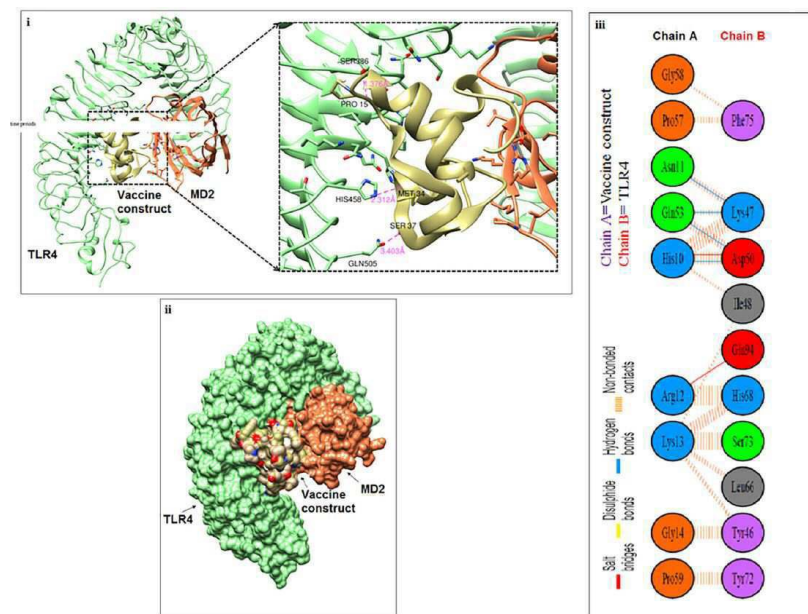
도면13



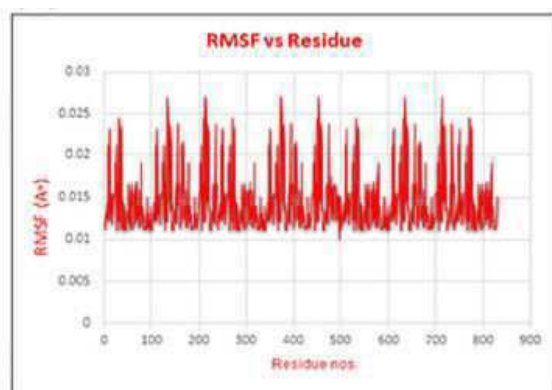
도면14



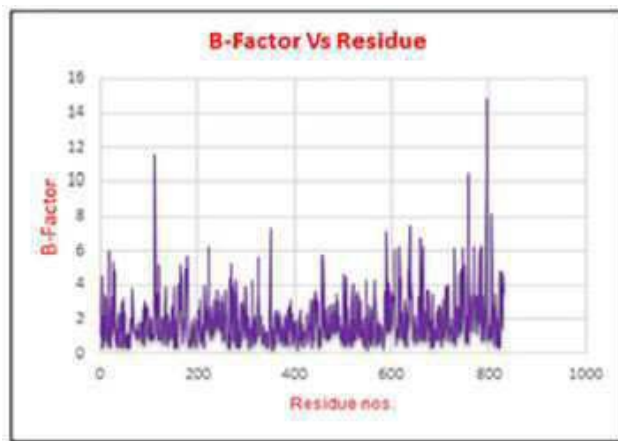
도면15



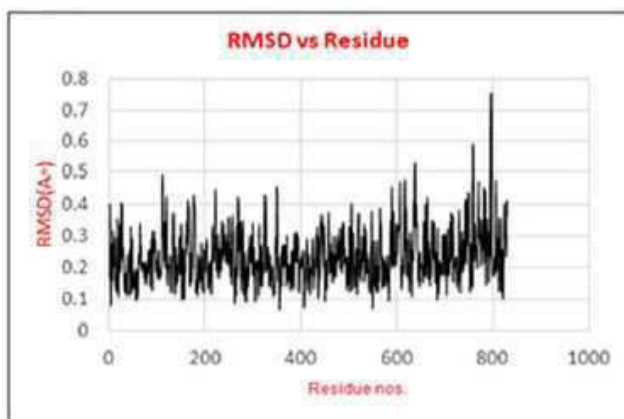
도면16



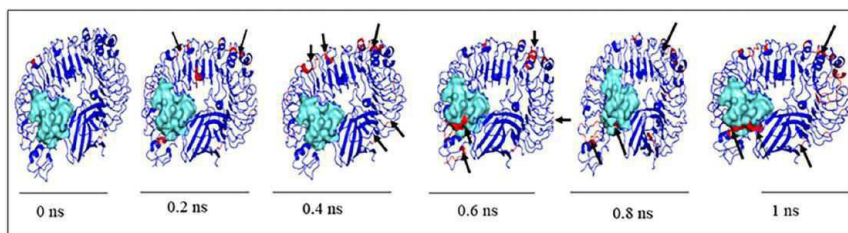
도면17



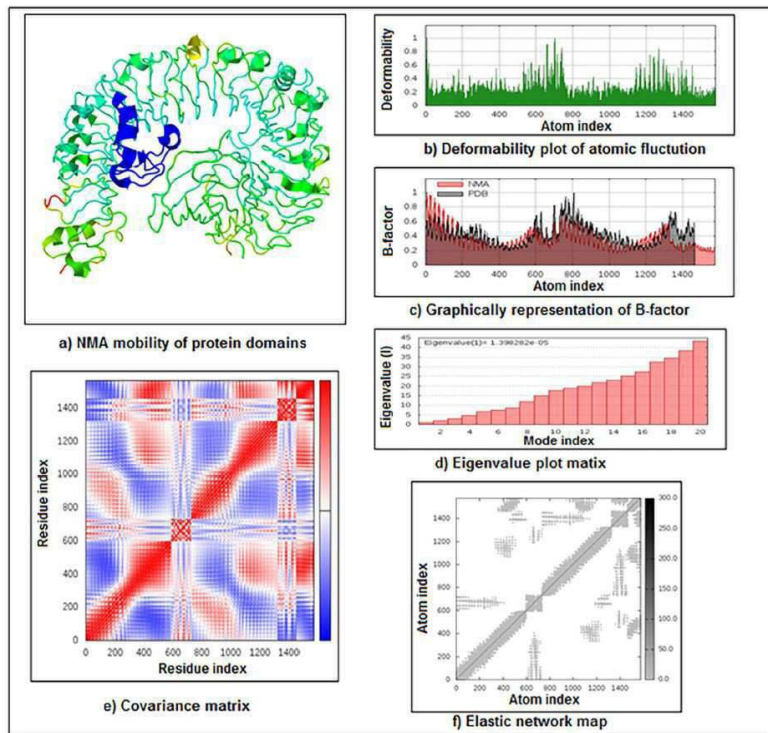
도면18



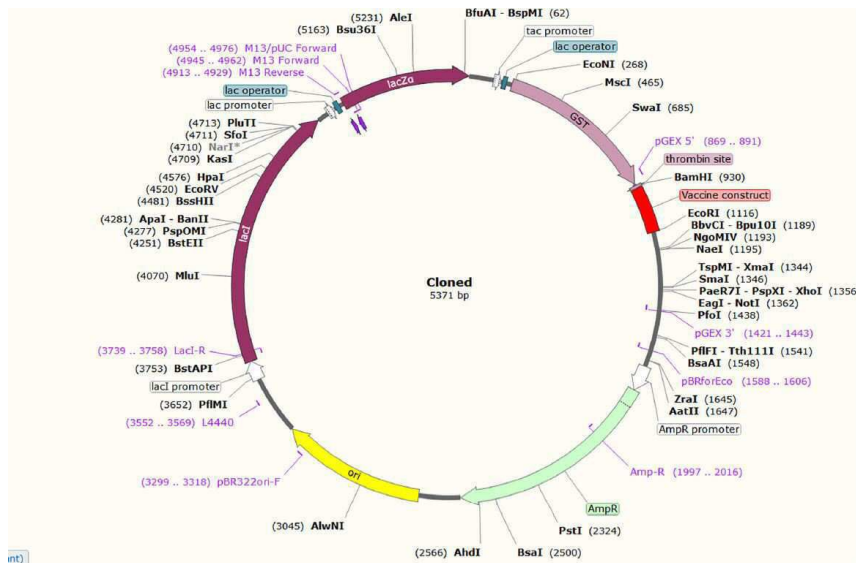
도면19



도면20



도면22



서열 목록

- <110> ***
- <120> Method for Developing a Multi-epitope Peptide-based Vaccine
Composition
- <130> P221270
- <160> 15
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Artificial
- <400> 1
- Ser Leu Phe Gln Ser His Asn Arg Lys His Pro
- 1 5 10
- <210> 2
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Artificial
- <400> 2
- Ser Leu Phe Gln Ser His Asn Arg Lys

1 5
 <210> 3
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial
 <400> 3

Ser Leu Phe Gln Ser His Asn Arg Lys Thr Ala Val Asn Thr Asn Arg

1 5 10 15
 Ala Ala Thr Asn Leu Val Ala Val Thr Asn Asp Val Val Gly Ile Gly
 20 25 30
 Gln His Ala Ala Gly Ile Gly
 35

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 4

Val Val Gly Ile Gly Gln His Ala Ala

1 5
 <210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial
 <400> 5

Glu Gly Met Met His Arg Ser Pro Arg Thr Arg Ala His Cys His Phe

1 5 10 15
 Ala Asp

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 6

Met Met His Arg Ser Pro Arg Thr Arg

1 5

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 7

Gly Leu Gly Val Asp Gln Thr Gln Pro Val Gly Asp Leu Thr Ala Gly

1 5 10 15

Gly Pro Gln Gln

20

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 8

Leu Gly Val Asp Gln Thr Gln Pro Val

1 5

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 9

Thr Lys Arg Lys Ser Leu Gln Lys Glu Pro Glu

1 5 10

<210> 10

<211> 4

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial
 <400> 10
 Pro Arg Arg Leu
 1
 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial
 <400> 11
 Glu Ala Ala Ala Lys
 1 5
 <210> 12

 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial
 <400> 12
 Gly Pro Gly Pro Gly
 1 5
 <210> 13
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial
 <400> 13
 Lys Lys
 1
 <210> 14
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 14

Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Ser

1 5 10 15

Gly Ala Gly Ser Val Ala Ser Gln Ser Gly Pro Gly Pro Gly Ile Asp

20 25 30

Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Arg

35 40 45

Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val

50 55 60

Tyr Ser Thr Gly Ser Asn Val Phe Gln Thr Arg Gly Pro Gly Pro Gly

65 70 75 80

Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Lys Val Val Phe Leu His

85 90 95

Val Thr Tyr Val Lys Lys Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Lys

100 105 110

Lys Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Lys Lys Gln Ile Ala Pro

115 120 125

Gly Gln Thr Gly Lys Lys Lys Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala

130 135 140

Thr Asn Val Val Ile Lys Lys Lys Leu Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe

145 150 155 160

Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Lys Lys Val Val Leu Ser Phe Glu Leu

165 170 175

Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Lys Lys Thr Glu Ser Ile Val Arg

180 185 190

Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Lys Lys

195 200

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15