

명세서

**발명의 명칭: 신규한 코로나바이러스 재조합 스파이크 단백질,
이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를
포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 코로나바이러스감염증
예방 또는 치료용 백신**

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 코로나바이러스 재조합 스파이크 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 코로나바이러스감염증 예방 또는 치료용 백신에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 심각한 호흡기 질환을 유발하여 사망을 초래하는 코로나바이러스감염증은 Coronaviridae에 속하는 RNA 바이러스로 분류되며, 코로나바이러스 감염에 의한 호흡기 증후군으로 정의된다. Coronaviridae에 속하는 바이러스 중 사람에게 감염을 일으키다고 알려진 바이러스는 총 7종으로 감기를 일으키는 4종(229E, OC43, NL63, HKU1), 중증 폐렴을 일으키는 2종(SARS-CoV, MERS-CoV) 및 이번 팬데믹 사태의 원인 바이러스인 SARS-CoV-2가 있다. 중증 폐렴을 일으키는 3종의 바이러스(SARS-CoV, MERS-CoV 및 SARS-CoV-2)는 2002년 SARS-CoV를 시작으로 2012년 MERS-CoV에 이어 SARS-CoV와 유전자 서열의 상동성이 높은 현재의 SARS-CoV-2까지 전세계적 대유행이 진행되고 있다.
- [3] 코로나 바이러스(Coronaviridae)는 불안정한 RNA를 유전체로 가지고 있어 돌연변이가 쉽게 발생하고, 이러한 특성으로 인해 동물과 사람 모두에서 전염될 가능성이 있다. 현재까지 연구에 따르면, SARS-CoV는 사향 고양이에서 인간으로, MERS-CoV는 단봉 낙타에서 인간으로 전염되었으며, 이러한 사례를 미루어 보아 동물을 숙주로 하는 다른 종의 코로나바이러스는 인간에게 감염을 일으키는 변종 바이러스로 진화할 수 있는 잠재성을 가지고 있다.
- [4] SARS-CoV-2는 2019년 후반에 최초 보고되었다. 2002년 중국에서 발생한 SARS-CoV와 비교했을 때 중증도는 SARS-CoV가 높지만 전파력은 SARS-CoV-2가 월등히 높는데, 이는 SARS-CoV-2의 세포 수용체 결합부위인 스파이크 단백질의 돌연변이에 의한 것으로 분석하고 있다. 이러한 결과로 전세계적인 대유행을 초래하게 되었다. 감염의 일반적인 징후로는 호흡기 증상, 발열, 기침, 호흡 곤란 및 호흡 곤란이 있다. 더 심한 경우 감염은 폐렴, 심각한 급성 호흡기 증후군, 신부전 및 심지어 사망을 유발할 수 있다.
- [5] 현재 수많은 국가와 기관에서 COVID-19 팬데믹 사태를 근절하기 위한 백신 개발에 진력하고 있다. 예방백신의 종류는 제작 방법에 따라 사백신(inactivated vaccine), 약독화 생백신(attenuated vaccine), 단백질 서브유닛 백신(subunit

vaccine), 바이러스 벡터 기반 백신(viral vector based vaccine), DNA 백신, mRNA 백신과 같이 분류된다. 전통적으로 백신 제형으로 많이 이용되어 왔던 사백신(inactivated vaccine)과 약독화 생백신(attenuated live vaccine)은 제작과정이 간단한 장점이 있지만, 사백신의 경우 높은 수준의 면역반응을 유도하지 못하고, 약독화 생백신은 돌연변이를 통해 병원성을 다시 획득할 수 있는 위험성이 존재한다. 단백질 서브유닛 백신(Subunit vaccine)은 면역 반응을 잘 유도하지 못하기 때문에 면역증강제를 함께 사용해야 하는 문제점이 있다.

- [6] 생명공학 기술의 발전에 따라 새로운 플랫폼의 백신 제형이 개발되기 시작했는데, 그 중 하나가 바이러스 벡터 기반 백신(viral vector based vaccine)이다. 벡터 기반 백신은 인체 세포에 백신 항원 유전자를 높은 효율로 전달하여 항원 단백질을 체내에서 스스로 생성하게 하여 면역반응을 활성화한다. 바이러스 벡터 기반 백신은 안전하며, 높은 수준의 면역반응을 유도하기 때문에 반복 투여가 필요없이 단회 투여만으로 효율적인 면역화가 가능하다. 또한, 구조적으로 바이러스에 기반 하여 항체 생성뿐 아니라 세포독성 T 세포 면역을 효율적으로 유도할 수 있는 장점이 있다. 많은 바이러스가 유전자 벡터로서 연구가 되고 있으며, 그 중 아데노바이러스(Adenovirus)는 많은 연구가 이루어져 조작이 용이하고 안전성이 검증되어 유전자 치료분야에서 많이 사용되고 있으며, 비교적 크기가 큰 항원(9~35kb)을 전달할 수 있기 때문에 다른 바이러스 벡터와 비교하여 높은 경쟁력을 가지고 있다.
- [7] 아데노바이러스는 선형, 이중 가닥의 DNA 바이러스로, 직경 70-90nm이며, 외피가 없고, 이십면체형 캡시드를 가지며, 이는 각 20면체의 꼭짓점에서 연장되는 240 핵손, 12 펜톤 및 섬유에 의해 형성된다. 이들 핵손, 펜톤 및 섬유는 주류 아데노바이러스 항원 및 이의 혈청형을 결정한다. 아데노바이러스 게놈은 크기가 약 30-45kb이며 4개의 초기 영역 (E1, E2, E3 및 E4) 및 5개의 후기 영역 (L1-L5)을 갖는다. 아데노바이러스는 감염성이 높고 그들 중 다수는 병원성이 없기 때문에 백신 생산을 위한 재조합 벡터로서 좋은 후보이다. 또한, 아데노바이러스 벡터는 대형 유전자를 효율적으로 번역할 수 있으며, 동물에서 면역 반응을 연장시킬 수 있다. 아데노바이러스 벡터는 자가복제를 담당하는 E1 유전자를 제거한 형태로 주로 이용되며, E1 유전자가 제거된 아데노바이러스 벡터는 인체 세포에서는 자가 복제가 불가능하기 때문에 체내에서 병원성을 유발하지 않아 안전하다.
- [8] Ad5/35 벡터는 복제불능 아데노바이러스 혈청형 5(Ad5)의 돌기(knob) 유전자가 아데노바이러스 혈청형 35(Ad35)의 돌기 유전자로 치환된 형태이다. 이러한 변형을 통해 Ad5/35 벡터는 기존 Ad5의 세포 수용체가 아닌 인간 면역세포에 높게 발현하는 CD46 수용체를 통해 세포 내로 도입될 수 있게 된다. 즉, Ad5/35는 인간의 항원제시세포로 효율적으로 도입되어, 항원의 생산을 극대화할 수 있는 효율적인 백신 플랫폼이 될 수 있다. 또한, Ad5/35 벡터는 Ad5 벡터와 비교했을 때, 간 독성을 유발할 위험성이 현저히 낮다는 것이 보고된 바

있다. 실제로 본 발명자들은 아데노바이러스 벡터를 이용해 암 환자에게 암 항원 유전자를 전달하면 높은 수준의 면역반응이 유도됨을 전임상 및 임상시험에서 확인한 바 있으며, 임상 시험에서 다수의 환자들에게 투여되었을 때 안전성 및 독성과 관련한 문제도 발생하지 않음을 확인하였다.

- [9] 백신 후보물질을 제작할 때의 고려사항은, 발현되는 항원의 안정성 (stability)이다. 백신 항원은 다량 분비되는 것도 중요하지만, 발현되더라도 초기에 빠르게 분해되면, 면역세포를 효과적으로 활성화 시키지 못할 우려가 있다. 이에 항원을 장기간 안정적으로 유지시키는 것이 중요하다.
- [10] 이에, 본 발명자들은 코로나바이러스감염증-19(COVID-19) 예방 또는 치료용 백신을 개발하기 위하여, SARS-CoV-2의 세포 감염에 핵심적인 역할을 하는 스파이크 단백질(Spike protein)을 코딩하는 S1 유전자와 S2 사이에 위치한 절단 인지 서열(Cleavage site)을 링커 서열로 치환한 폴리뉴클레오티드를 벡터에 도입하여 예방 또는 치료용 백신을 제작하였고, 상기 백신이 SARS-CoV-2에 대한 항체 생성량 및 T 세포 반응성이 높음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 신규한 코로나바이러스 재조합 스파이크 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 코로나바이러스감염증 예방 또는 치료용 백신을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 코로나바이러스 스파이크 단백질(Spike protein)의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(Spike protein)의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 코로나바이러스 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 코로나바이러스 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단

인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

- [18] 또한, 본 발명은 코로나바이러스 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 아데노바이러스에 도입한 것을 특징으로 하는 벡터를 제공한다.
- [19] 또한, 본 발명은 코로나바이러스 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 Ad5/35 바이러스에 도입한 것을 특징으로 하는 벡터를 제공한다.
- [20] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 Ad5/35 바이러스에 도입한 것을 특징으로 하는 벡터를 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 코로나바이러스 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신을 제공한다.
- [22] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신을 제공한다.
- [23] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(Spike protein)의 S1 및 S2 유전자의 폴리뉴클레오티드를 아데노바이러스에 도입한 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신을 제공한다.
- [24] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(Spike protein)의 S1 및 S2 유전자의 폴리뉴클레오티드를 Ad5/35 바이러스에 도입한 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신을 제공한다.
- [25] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(Spike protein)의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 폴리뉴클레오티드를 Ad5/35 바이러스에 도입한 것을 특징으로 하는 벡터를 포함하는 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19) 예방 또는 치료용 백신을 제공한다.

발명의 효과

- [26] 본 발명은 신규한 코로나바이러스 재조합 스파이크 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신에 관한 것이다. 본 발명의 코로나바이러스 재조합 스파이크 단백질은 안정하여 세포 내에서 잘 분해가 되지 않고, 면역세포를 효과적으로 활성화시켜 항체 생성량 및 T 세포 반응성이 높고, 본 발명의 벡터는 항원 발현도가 높게 나타남에 따라, 항체

생성량 및 T 세포 반응성이 높고, 항체 생성 발현 기간이 길었으며, 간 독성을 보이지 않음이 확인되었으므로, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [27] 도 1은 아데노바이러스 혈청형 5(Adenovirus serotype 5)를 기반으로, 수용체 결합부위인 E3 유전자 영역을 아데노바이러스 혈청형 35(Adenovirus serotype 35)의 파이버(fiber) 유전자로 치환하고, 여기에 SARS-CoV-2의 세포 감염에 핵심적인 역할을 하는 스파이크 단백질을 항원으로 탑재한 본 발명에 따른 코로나바이러스감염증-19 예방 또는 치료용 백신을 나타낸 모식도이다.
- [28] 도 2는 본 발명의 코로나바이러스감염증-19 예방 또는 치료 백신이 항원으로서 스파이크 단백질을 코딩하는 유전자의 절단 인지 서열을 링커 서열로 치환한 재조합 스파이크 단백질이 구조의 안정성 및 항원 발현도가 높고, 항체 생성 B세포에 중화 항체를 생산하는 능력이 뛰어난을 나타낸 모식도이다.
- [29] 도 3은 본 발명의 코로나바이러스감염증-19 예방 또는 치료용 백신의 작용 기전을 나타낸 모식도이다.
- [30] 도 4는 아데노바이러스 혈청형 5(Adenovirus type 5, Ad5)의 유전체를 사용하여 제작한 대조군 발현 벡터를 나타낸 모식도이다.
- [31] 도 5는 항원 발현 유전자인 스파이크 단백질 항원을 탑재한 아데노바이러스 #1 내지 #4 벡터를 나타낸 모식도이다.
- [32] 도 6은 항원 발현 유전자인 스파이크 단백질 항원을 탑재한 아데노바이러스 #1 내지 #4 벡터를 배양 세포주에 도입하였을 때 항원 발현도를 나타낸 도이다.
- [33] 도 7은 항원 발현 유전자인 스파이크 단백질 항원을 탑재한 아데노바이러스 #1 내지 #4 벡터를 배양 세포주에 도입하였을 때 세포 밖으로 배출되는 항원 발현도를 나타낸 도이다.
- [34] 도 8은 항원 발현 유전자인 스파이크 항원을 탑재한 아데노바이러스 #1 내지 #4 벡터를 마우스에 주입 후 항체 생성량을 나타낸 도이다.
- [35] 도 9는 항원 발현 유전자인 스파이크 항원을 탑재한 아데노바이러스 #3 벡터를 마우스에 주입 후 혈액 내에 존재하는 항원 특이 항체의 양을 나타낸 도이다.
- [36] 도 10은 항원 발현 유전자인 스파이크 항원을 탑재한 아데노바이러스 #3 벡터를 원숭이에 주입 후 항체 생성량을 나타낸 도이다.
- [37] 도 11은 항원 발현 유전자인 스파이크 항원을 탑재한 아데노바이러스 #3 벡터를 원숭이에 주입 후 중화 항체 농도를 나타낸 도이다.
- [38] 도 12는 항원 발현 유전자인 스파이크 항원을 탑재한 아데노바이러스 #1 내지 #4 벡터를 원숭이 주입 후 혈중 간 독성 수치를 나타낸 도이다.
- [39] 도 13은 항원 발현 유전자인 스파이크 항원을 탑재한 아데노바이러스 #1 내지 #3 벡터를 마우스에 주입 후 비장 세포 및 말초혈액단핵세포(PBMC)에서 T 세포 반응성을 나타낸 도이다.

- [40] 도 14는 항원 발현 유전자인 스파이크 항원을 탑재한 아데노바이러스 #3 벡터를 영양류에 주입 후 말초혈액단핵세포(PBMC)에서 T 세포 반응성을 나타낸 도이다.
- [41] 도 15는 마우스에 실시예 3에서 제작한 스파이크 항원을 발현하는 #3 벡터 또는 #3 벡터의 아데노바이러스 유전자 중 E4 유전자를 바이러스 유전체의 E1 영역으로 재배치한 벡터를 주입하였을 때, 유사한 수준의 중화 항체를 생산한 것을 확인한 도이다.
- [42] 도 16은 원숭이에 실시예 3에서 제작한 스파이크 항원을 발현하는 #3 벡터 또는 #3 벡터의 아데노바이러스 유전자 중 E4 유전자를 바이러스 유전체의 E1 영역으로 재배치한 벡터를 주입하였을 때, 유사한 수준의 중화 항체를 생산한 것을 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [44] 본 발명은 코로나바이러스 스파이크 단백질(Spike protein)의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 제공한다.
- [45] 상기 코로나바이러스는 베타 코로나바이러스 속에 속하는 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 SARS-CoV-2인 것을 특징으로 한다.
- [46] 상기 SARS-CoV-2와 SARS-CoV의 유전체 상동성은 79.6%, SARS-CoV-2와 MERS-CoV의 유전체 상동성은 50%로 높은 것이 특징이다. 특히, SARS-CoV-2와 MERS-CoV는 상기 발명의 표적인 스파이크 단백질의 상동성이 35%로 유사한 반면, SARS-CoV-2와 SARS-CoV의 스파이크 단백질 상동성은 76%로 매우 높은 것을 특징으로 한다.
- [47] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(Spike protein)의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 제공한다.
- [48] 백신에서 항원은 다량 분비되는 것도 중요하지만, 다량으로 발현되더라도 초기에 분해되면 면역세포를 자극하여 면역반응을 충분히 유도하지 못하기 때문에, 발현된 항원의 안정성이 높은 것이 매우 중요하다. 본 발명의 S1 및 S2 사이에 링커 서열이 연결된 재조합 스파이크 단백질은 항원 발현도가 높을 뿐만 아니라 안정성이 향상되어 중화 항체 생성 능력 및 T 세포 반응성을 유도하는 능력이 뛰어나다.
- [49] 용어 "면역 반응"은, 이로 한정되는 것은 아니지만, 체액성 면역 반응 및 세포성 면역 반응, 예를 들어, CD4+ 또는 CD8+ 세포 활성화를 포함할 수 있다.
- [50] 상기 링커 서열로 연결된 스파이크 단백질 항원은 항원 발현도가 증가하는 것을 특징으로 한다.
- [51] 상기 스파이크 단백질(Spike protein, S protein)은 코로나바이러스 입자의

표면을 덮고 있고, 코로나바이러스가 인체 세포에 침입할 때 이용하는 돌기 모양의 단백질로 S1와 S2의 서브유닛으로 구성되고 인체 세포의 안지오텐신변환효소-2(Angiotensin Converting Enzyme 2, ACE-2) 수용체와 결합한 후 세포 속으로 침투해 유전 물질(RNA)를 밀어 넣어 자신을 복제하는 방식으로 인체를 감염시킨다.

- [52] 상기 재조합 단백질은 스파이크 단백질의 서브유닛인 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열(cleavage site)이 제거된 것을 특징으로 한다.
- [53] 상기 단백질은 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열로 연결되는 것을 특징으로 한다.
- [54] 상기 링커는 (GGGS) n 으로 구성되는 것을 특징으로 하고, 상기 n 은 1 내지 5의 정수이다.
- [55] 각 단백질을 구성하는 도메인들은 고유의 특성에 따라 상호 작용에 최적화된 거리(링커 서열의 길이)를 가지며, 링커 서열의 길이에 따라 단백질의 구조적 안정성이 발현된다. 따라서, 상기 단백질은 바람직하게는 n 은 1 내지 3일 수 있고, 가장 바람직하게는 n 은 1이다.
- [56] n 이 4를 초과하는 경우 반복적인 서열이 다수 발생하게 되어 의도하지 않은 상동 재조합에 의해 링커 서열이 삭제될 수 있을 뿐만 아니라, 단백질의 안정성이 감소 되는 결과를 초래한다.
- [57] 상기 링커 서열로 연결된 스파이크 단백질 항원은 안정성(stability)이 증가된 것을 특징으로 한다.
- [58] 상기 링커 서열은 서열번호 19 또는 서열번호 20으로 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [59] 코로나바이러스는 모두 공통적으로 스파이크 단백질을 가지고 있으며, 스파이크 단백질은 S1 및 S2의 서브유닛으로 구성되어 있으므로 코로나바이러스의 모든 스파이크 단백질이 사용 가능하다.
- [60] 이들 스파이크 단백질(Spike protein)의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커로 연결된 스파이크 단백질은 모두 이 발명에 속한다.
- [61] 코로나 바이러스에는 감기를 일으키는 229E, OC43, NL63, HKU1, 중증 폐렴을 일으키는 SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2가 있으며, 이들의 스파이크 단백질이 모두 사용 가능하다.
- [62] 바람직하게는 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질의 S1, S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질이다.
- [63] 상기 재조합 스파이크 단백질은 면역원성을 향상시키기 위하여 어쥬번트(adjuvant)를 추가적으로 포함할 수 있고, 상기 어쥬번트는 GM-CSF, IL-17, IFN γ , IL-15, IL-5, JNK, NF κ B, NKKKKLIGAND, PD1/2, NKKKKG2B, NKG2C, NKKKKG2E, NKKKK2F, TAPAPAP2, 및 이의 기능적 단편, E-selectin, IL- α , IL-6, INF- γ , Lymppmpmphotoxin α , hGH-1, MIPPP1, IL-7, IL-8, APP, IRARAK, IkB, KILILUX, TRAIL-1, IL-1, AIR, and ICAM-1, ICAM-1, TAP2,

CD40의 기능적 단편, TAP1, TRAILrecDRC5, CD34, CD40L, DR3, GlyCAM1, p55, CD2, Ox40, TRAF6, DR4, ICAM3, DR5, MyD88, p65Rel, pl5095, p38, CPG 및 TLR로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

- [64] 상기 어쥬먼트는 재조합 스파이크 단백질의 C-말단에 연결될 수 있다.
- [65] 또한, 본 발명은 코로나바이러스 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [66] 상기 코로나바이러스는 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 SARS-CoV-2인 것을 특징으로 한다.
- [67] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [68] 상기 링커는 9 내지 45개의 염기로 구성되는 것을 특징으로 하고, 바람직하게는 9 내지 21개의 염기로 구성되며, 더 바람직하게는 15개의 염기로 구성된다.
- [69] 상기 링커 서열로 연결된 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 안정성(stability)이 증가된 것을 특징으로 한다.
- [70] 상기 링커 서열로 연결된 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 항원 발현도가 증가하는 것을 특징으로 한다.
- [71] 상기 링커 서열은 서열번호 11 또는 서열번호 15로 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [72] 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 12 또는 16일 수 있다.
- [73] 또한, 본 발명은 코로나바이러스 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [74] 상기 코로나바이러스는 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 SARS-CoV-2인 것을 특징으로 한다.
- [75] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [76] 또한, 본 발명은 코로나바이러스 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 아데노바이러스에 도입한 것을 특징으로 하는 벡터를 제공한다.
- [77] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 아데노바이러스에 도입한 것을 특징으로 하는 벡터를 제공한다.
- [78] 상기 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지

서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 아데노바이러스에 도입한 벡터는 서열번호 27 또는 29일 수 있다.

- [79] 또한, 본 발명은 코로나바이러스 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 Ad5/35 바이러스에 도입한 것을 특징으로 하는 벡터를 제공한다.
- [80] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 Ad5/35 바이러스에 도입한 것을 특징으로 하는 벡터를 제공한다.
- [81] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론 유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 탑재하여 표적 세포로 운반하는 전달체를 의미한다.
- [82] 상기 벡터는 플라스미드는 및 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 1종일 수 있다.
- [83] 플라스미드 DNA의 구체적인 예로는 pCMV3, pET28a 및 pET 같은 상업적인 플라스미드를 포함한다. 본 발명에 사용될 수 있는 플라스미드의 다른 예로는 대장균 유래 플라스미드(pCMV3, pET28a, pET, pGEX, pQE, pDEST 및 pCOLD), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50)가 있다. 이러한 플라스미드는 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주 세포를 선택하여 사용하면 된다.
- [84] 상기 바이러스는 벡터로 사용될 수 있는 공지의 바이러스는 모두 사용할 수 있으며, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노 연관 바이러스(Adeno-associated virus, AAV), modified vaccinia virus ankara(MVA), Herpes simplex virus, Baculovirus 중 어느 1종 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면 상기 바이러스는 아데노바이러스인 것이 바람직하다.
- [85] 본원에서 사용된 용어 "아데노바이러스 벡터"는 아데노바이러스 게놈이 아데노바이러스 게놈과 관련하여 고유하지 않은(non-native) 핵산 서열을 지니도록 조작된 아데노바이러스를 나타낸다. 따라서, 본원에서 사용된 "재조합 아데노바이러스 벡터"는 전형적으로는 아데노바이러스 게놈 및 필요한 단백질(예, SARS-CoV-2의 스파이크단백질 또는 S1 및 S2 사이의 절단 인지 서열을 링커 서열로 치환한 재조합 스파이크 단백질)를 인코딩하는 적어도 하나의 외래 핵산 서열이 포함되어 있는 발현 카세트를 포함한다.
- [86] 아데노바이러스 벡터는 바람직하게는 바이러스 DNA의 복제를 지지하기에 요구되는 각각의 말단 반복서열의 적어도 일부, 바람직하게는, 적어도 약 90%의 완전 역전된 말단 반복(inverted terminal repeat: ITR) 서열, 및 게놈을 바이러스

캡시드 내로 인캡시드화(encapsidate)하기에 요구되는 DNA를 함유한다. 다양한 기원으로부터의 아데노바이러스가 아데노바이러스 벡터를 위한 바이러스 계놈의 공급원으로서 사용될 수 있다. 인간 아데노바이러스, 예를 들어, 서브그룹 A(예, 혈청형 12, 18 및 31), 서브그룹 B(예, 혈청형 3, 7, 11, 14, 등), 서브그룹 C(예, 혈청형 1, 2, 5, 및 6), 서브그룹 D(예, 혈청형 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 등), 서브그룹 E(예, 혈청형 4), 서브그룹 F(예, 혈청형 40 및 41) 및 그 밖의 것들이 바람직하다. 바람직하게는, 아데노바이러스 벡터는 인간 서브그룹 C, 특히, 혈청형 2, 더욱더 바람직하게는 혈청형 5의 벡터이다.

[87] 아데노바이러스 벡터는 복제 적격 벡터일 수 있다. 전형적으로는, 아데노바이러스 벡터는 숙주 세포에서 복제-결손 벡터이다. 용어 "복제-결손(replication-defective)"은 아데노바이러스 벡터가 복제를 위한 아데노바이러스 계놈의 하나 이상의 유전자 기능 또는 영역(예, E1, E3 또는 E4 영역)에서 결핍을 지녀서 벡터가 어떠한 낮은 수준의 복제를 유지하거나 정상 숙주 세포, 특히, 아데노바이러스 벡터에 의해서 감염되는 인간에서의 세포들에서 복제하지 않게 함을 의미한다. 복제-결손 아데노바이러스 벡터는 백신의 안전성을 보장한다. 한 가지 구체예에서, 아데노바이러스 벡터는 E1 또는 E3 또는 이들 둘 모두를 제거한 벡터이다. 유전자에서의 결핍은 유전자의 기능을 완전히 제거하거나 손상시켜서, 예를 들어, 유전자 생성물의 기능이 천연 유전자에 비해서 적어도 약 2-배, 5-배, 10-배, 20-배 또는 그 초과까지 감소되게 하기 위한 돌연변이 또는 결실로서 정의된다. 생성되는 복제-결손 아데노바이러스 벡터는, 하나 이상의 요망되는 단백질의 발현을 위해서, 아데노바이러스 계놈 내의 적절한 부위에 하나 이상의 외인성 핵산 서열을 수용할 수 있으면서, 아데노바이러스 캡시드내로 포장되는 능력을 유지한다. 원액을 위한 바이러스 벡터의 높은 역가를 생성시키기 위한 목적으로, 복제-결손 아데노바이러스 벡터는 전형적으로는 복제-결손 아데노바이러스 벡터에 존재하지 않는 유전자 기능을 제공하는 보완 세포주, 예컨대, HEK293 또는 HEK293R 세포에서 생산된다.

[88] 상기 아데노바이러스는 아데노바이러스 혈청형 2(Adenovirus serotype 2, Ad2), 아데노바이러스 혈청형 4(Adenovirus serotype 4, Ad4), 아데노바이러스 혈청형 5(Adenovirus serotype 5, Ad5), 아데노바이러스 혈청형 11(Adenovirus serotype 11, Ad11), 아데노바이러스 혈청형 26(Adenovirus serotype 26, Ad26), 아데노바이러스 혈청형 35(Adenovirus serotype 35, Ad35), 침팬지 아데노바이러스 혈청형 68(Chimpanzee adenovirus serotype 68, ChAd68), 조류 아데노바이러스 혈청형 9(Fowl adenovirus serotype 9, FAd9) 또는 돼지 아데노바이러스 혈청형 3(Porcine Adenovirus serotype 3, PAd3) 일 수 있다.

[89] 상기 아데노바이러스는 Ad5를 기본으로 하여 변형된 형태일 수 있다.

[90] 상기 아데노바이러스는 아데노바이러스 혈청형 5(Adenovirus serotype 5, Ad5)의 knob 유전자가 아데노바이러스 혈청형 35(Adenovirus serotype 35,

- Ad35)의 knob 유전자로 치환된 아데노바이러스(Ad5/35)일 수 있다.
- [91] 상기 아데노바이러스는 E1 유전자 및 E3 유전자가 결실된 것을 특징으로 한다.
- [92] 상기 아데노바이러스는 E1 유전자 및 E3 유전자 결실에 더하여 E4 유전자의 일부 또는 전부가 결실되고 E4 유전자가 E1 영역으로 재배치한 형태일 수 있다.
- [93] 상기 아데노바이러스는 인간 면역 세포에서 높게 발현하는 CD46 수용체를 통하여 세포 내로 도입되는 것을 특징으로 한다.
- [94] 상기 아데노바이러스는 간 독성 유발 효과가 낮은 것을 특징으로 한다.
- [95] 상기 아데노바이러스는 항원 발현도가 높은 것을 특징으로 한다.
- [96] 또한, 본 발명은 코로나바이러스 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신을 제공한다.
- [97] 상기 코로나바이러스는 SARS-CoV, MERS-CoV 및 SARS-CoV-2로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 1종일 수 있다.
- [98] 상기 벡터는 벡터로 사용될 수 있는 공지의 바이러스는 모두 사용할 수 있으며, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노 연관 바이러스(Adeno-associated virus, AAV), modified vaccinia virus ankara(MVA)중 어느 1종 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면 상기 바이러스는 아데노바이러스인 것이 바람직하다.
- [99] 상기 아데노바이러스는 아데노바이러스 혈청형 2(Adenovirus serotype 2, Ad2), 아데노바이러스 혈청형 4(Adenovirus serotype 4, Ad4), 아데노바이러스 혈청형 5(Adenovirus serotype 5, Ad5), 아데노바이러스 혈청형 11(Adenovirus serotype 11, Ad11), 아데노바이러스 혈청형 26(Adenovirus serotype 26, Ad26), 아데노바이러스 혈청형 35(Adenovirus serotype 35, Ad35), 침팬지 아데노바이러스 혈청형 68(Chimpanzee adenovirus serotype 68, ChAd68), 조류 아데노바이러스 혈청형 9(Fowl adenovirus serotype 9, FAd9) 또는 돼지 아데노바이러스 혈청형 3(Porcine Adenovirus serotype 3, PAd3)일 수 있다.
- [100] 상기 아데노바이러스는 Ad5를 기본으로 하여 변형된 형태일 수 있다.
- [101] 상기 아데노바이러스는 아데노바이러스 혈청형 5(Adenovirus serotype 5, Ad5)의 knob 유전자가 아데노바이러스 혈청형 35(Adenovirus serotype 35, Ad35)의 knob 유전자로 치환된 아데노바이러스(Ad5/35)일 수 있다.
- [102] 상기 아데노바이러스는 E1 유전자 및 E3 유전자가 결실된 것을 특징으로 한다.
- [103] 상기 아데노바이러스는 E1 유전자 및 E3 유전자 결실에 더하여 E4 유전자의 일부 또는 전부가 결실되고 E4 유전자가 E1 영역으로 재배치한 형태일 수 있다.
- [104] 상기 아데노바이러스는 인간 면역 세포에서 높게 발현하는 CD46 수용체를 통하여 세포 내로 도입되는 것을 특징으로 한다.
- [105] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신을 제공한다.

- [106] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(Spike protein)의 S1 및 S2 유전자의 폴리뉴클레오티드를 아데노바이러스에 도입한 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신을 제공한다.
- [107] 또한, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(Spike protein)의 S1 및 S2 유전자의 폴리뉴클레오티드를 Ad5/35 바이러스에 도입한 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신을 제공한다.
- [108] 또한, 본 발명의 백신은 경구형 또는 비경구형 제제로 제조할 수 있으며, 진피내, 근육내, 비강 경로로 투여할 수 있고, 바람직하게는 근육 내 경로로 투여될 수 있다.
- [109] 본 발명의 백신은 상기 S1 및 S2 단백질 사이의 절단 인지 서열(cleavage site)이 제거된 것을 특징으로 한다.
- [110] 상기 백신은 스파이크 단백질의 S1 및 S2 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열로 연결되는 것을 특징으로 한다.
- [111] 상기 링커는 9 내지 45개의 염기로 구성되는 것을 특징으로 하고, 바람직하게는 9 내지 21개의 염기로 구성되며, 더 바람직하게는 15개의 염기로 구성된다.
- [112] 또한, 본 발명은 상기 백신을 개체에 투여하여 코로나바이러스감염증-19, 중증급성호흡기증후군(SARS 또는 중동호흡기증후군(MERS))를 포함하는 코로나바이러스 감염증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [113] 본 발명에 있어서, "개체"란 코로나바이러스에 감염될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 백신을 개체에 투여함으로써, 상기 질환을 효율적으로 예방할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 백신으로 인간을 코로나바이러스로부터 예방할 수 있다.
- [114] 본 발명에 있어서, "예방"이란 백신의 투여에 의해 코로나바이러스 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [115] 본 발명에 있어서, "치료"란 백신의 투여에 의해 코로나바이러스를 제거하거나 코로나바이러스로 인한 증상을 경감시키는 모든 행위를 의미한다.
- [116] 본 발명의 백신은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체의 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로, 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 백신은 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.
- [117] 용어 "유효한 양"은 치료되는 대상자에게 요망되는 치료 효과를 제공하기에

충분한, 예를 들어, 이의 수용체에서의 병원체 또는 항원에 대항하는 면역 반응을 생성시키거나 유도하기에 충분한 용량을 나타낸다. 유효량은 다양한 이유, 예컨대, 투여 경로 및 빈도, 상기 약제를 수용하는 개체의 체중 및 종, 및 투여 목적에 따라서 변화될 수 있다. 당업자는 본원에서의 개시내용, 확립된 방법 및 그들 자신의 경험을 기초로 하여 각각의 경우에서의 투여량을 결정할 수 있다. 예를 들어, 특정의 구체예에서, 본 발명의 재조합 아데노바이러스 벡터는 1×10^9 내지 1×10^{12} 바이러스 입자(VP), 예를 들어, 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 또는 1×10^{12} VP의 용량으로 투여될 수 있다.

- [118] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 코로나바이러스에 속하는 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 S1 및 S2 사이의 절단 인지 서열을 링커 서열로 치환한 폴리뉴클레오티드를 아데노바이러스의 E1와 E3 유전자가 결실되어 있으며, 아데노바이러스 혈청형 5의 세포수용체 결합부위인 파이버(Fiber)를 혈청형 35의 파이버로 치환한 아데노바이러스에 도입한 벡터를 제조하고(도 4 참조), 상기 벡터가 항원 발현도, 항체 생성량 및 T 세포 반응성이 높고, 항체 생성 발현 기간이 길며, 간 독성을 보이지 않음을 확인하였다(도 6, 도 7, 도 9, 도 12, 도 13 및 도 14). 또한, Ad5/35 벡터 뿐만 아니라 E1 유전자 및 E3 유전자 결실에 더하여 E4 유전자의 일부 또는 전부가 결실되고 E4 유전자가 E1 영역으로 재배치된 벡터에 항원을 탑재하여 제조한 백신을 마우스 및 원숭이에 투여한 결과 중화항체 생성량이 Ad5/35 벡터에 항원이 탑재된 백신과 유사한 것을 확인하였다(도 15 및 도 16).
- [119] 따라서, 본 발명의 코로나바이러스 재조합 스파이크 단백질은 안정하여 세포 내에서 잘 분해가 되지 않고, 면역세포를 효과적으로 활성화시켜 항체 생성량 및 T 세포 반응성이 높고, 본 발명의 벡터는 항원 발현도가 높게 나타남에 따라, 항체 생성량 및 T 세포 반응성이 높고, 항체 생성 발현 기간이 길었으며, 간 독성을 보이지 않음이 확인되었으므로, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 백신으로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [120] 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [121] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [122] <실시예 1> 대조군 발현 벡터 제작 (플라스미드 #1 벡터)
- [123] 스파이크 단백질 항원이 포함되지 않은 아데노바이러스 서열(서열번호 21)을 포함한 플라스미드를 pAdk35F(서열번호 1, 34,030 bp)로 명명하고 아데노바이러스 혈청형 5(Adenovirus type 5, Ad5)의 유전체를 사용하여 제작하였다. pAdk35F는 아데노바이러스의 E1와 E3 유전자가 결실되어 있으며, 아데노바이러스 혈청형 5의 세포수용체 결합부위인 파이버(Fiber)를 혈청형 35의 파이버로 치환한 형태의 아데노바이러스를 포함한다. pAdk35F의 E1

유전자 결실 부위에 CMV(Cytomegalovirus) 프로모터와 테트라사이클린 오퍼레이터(Tetracycline Operator, Tet O), 제한효소 SmaI 부위, SV40 poly A 서열이 탑재되어 있다.

- [124] 도 4에 나타난 바와 같이 항원 발현 유전자인 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 탑재한 pCMV3-SARS-CoV-2(Spike ORF) 벡터(Sino Biological, Cat. #: VG40589-UT, 서열번호 2, 9,858bp)를 주형으로 스파이크 단백질 항원 유전자의 세포 외 도메인 부위를 하기 표 1의 스파이크 단백질 항원 증폭용 프라이머 세트를 이용하여 증폭시킨 다음, 제한효소 SmaI로 절단한 pAdk35F 벡터와 인퓨전 클로닝 라이게이션(in-fusion cloning ligation, Clontech, Cat. #: 639648)하여 대조군 발현 벡터인 플라스미드 #1 벡터(서열번호 22)를 제작하였다. 상기 플라스미드 #1 벡터에서 스파이크 단백질을 코딩하는 부분은 서열번호 3에, 스파이크 단백질이 도입된 아데노바이러스의 염기서열은 서열번호 23에 나타나 있다.

- [125] [표1]

	서열(5'→3')	서열번호
정방향 프라이머	TCC AGC CTC CGA TTT GCC ACC ATG TTT GTG TTC CTG G	4
역방향 프라이머	GAT TAT GAT CAA TTT TCA TGG CCA CTT GAT GTA TTG TTC	5

- [126] <실시예 2> 개량형 스파이크 항원 발현 벡터 제작
- [127] <2-1> 개량형 스파이크 항원 발현 벡터의 제작 (플라스미드 #2 벡터)
- [128] 상기 실시예 1에서 중합효소 연쇄반응의 주형으로 사용한 pCMV3-SARS-CoV-2(Spike ORF) 벡터의 스파이크 단백질 항원의 도메인 S1과 S2의 절단 인지 서열(서열번호 6, 아미노산 서열: TNSPRRAR)을 부위 지향 돌연변이 유발 기법(Site Directed Mutagenesis)을 이용하여 하기 표 2의 프라이머 세트로 TILR(Thr-Ile-Arg-Leu) 서열(서열번호 7)로 치환하여 pCMV3-SARS-CoV-2(Spike IL) 도 5와 같이 벡터를 제작하였다.
- [129] 이후 TILR 서열로 치환된 벡터를 주형으로 플라스미드 #1 벡터와 동일한 상기 표 1의 스파이크 항원 증폭용 프라이머 세트를 사용하여 증폭한 다음, 제한효소 SmaI로 절단한 pAdk35F 벡터와 인퓨전 클로닝 라이게이션(in-fusion cloning ligation, Clontech, Cat. #: 639648)하여 개량형 스파이크 항원 발현 벡터인 플라스미드 #2 벡터(서열번호 24)를 제작하였다. 상기 플라스미드 #2 벡터에서 스파이크 단백질을 코딩하는 부분은 서열번호 8에, 스파이크 단백질이 도입된 아데노바이러스의 염기서열은 서열번호 25에 나타나 있다.

[130] [표2]

	서열(5'→3')	서열번호
정방향 프라이머	AGA CCA TCC TCA GGT CTG TGG CAA GCC AGA G	9
역방향 프라이머	CCT CCT ACC AGA CCC AGA CCA TCC TCA GGT	10

[131] <2-2> 개량형 스파이크 항원 발현 벡터의 제작 (플라스미드 #3 벡터;
pAdCLD-CoV19 벡터)

[132] 상기 실시예 1에서 중합효소 연쇄반응의 주형으로 사용한
pCMV3-SARS-CoV-2(Spike ORF) 벡터의 스파이크 항원의 도메인 S1과 S2의
절단 인지 서열(서열번호 6, 아미노산 서열: TNSPRRAR)을 부위지향 돌연변이
유발 기법(Site Directed Mutagenesis)을 이용하여 하기 표 3의 프라이머를
이용하여 TGGGGSR 링커 서열(서열번호 11)로 치환하여
pCMV3-SARS-CoV-2(Spike GGGGS) 벡터를 제작하였다. 이후 TGGGGSR
서열로 치환된 벡터를 주형으로 #1 벡터와 동일한 상기 표 1의 스파이크 항원
증폭용 프라이머 세트를 사용하여 증폭한 다음, 제한효소 SmaI로 절단한
pAdk35F 벡터와 인퓨전 클로닝 라이게이션(in-fusion cloning ligation, Clontech,
Cat. #: 639648)하여 개량형 스파이크 항원 발현 벡터인 플라스미드 #3
벡터(pAdCLD-CoV19 벡터)(서열번호 26)를 제작하였다. 상기 플라스미드 #3
벡터에서 스파이크 단백질을 코딩하는 부분은 서열번호 12에, 스파이크
단백질이 도입된 아데노바이러스의 염기서열은 서열번호 27에 나타나 있다.

[133] [표3]

	서열(5'→3')	서열번호
정방향 프라이머	CGG TGG CGG TGG GTC GAG GTC TGT GGC AAG CCA GAG	13
역방향 프라이머	GAC CCA CCG CCA CCG GTC TGG GTC TGG TAG GAG G	14

[134] <2-3> 개량형 스파이크 항원 발현 벡터의 제작 (플라스미드 #4 벡터)

[135] 상기 실시예 1에서 중합효소 연쇄반응의 주형으로 사용한
pCMV3-SARS-CoV-2(Spike ORF) 벡터의 스파이크 항원의 도메인 S1과 S2의
절단 인지 서열 (아미노산 서열: TNSPRRAR)을 부위지향 돌연변이 유발
기법(Site Directed Mutagenesis)을 이용하여 하기 표 4의 프라이머를 이용하여
TGGGGSGGGSGGGGSR 서열(서열번호 15)로

치환하였다(pCMV3-SARS-CoV-2(Spike GGGGSx3)). 이후 TGGGGSGGGSGGGSR 서열로 치환된 벡터를 주형으로 플라스미드 #1 벡터와 동일한 스파이크 항원 증폭용 프라이머 세트를 사용하여 증폭한 다음, 제한효소 SmaI으로 절단한 pAdk35F 벡터와 인퓨전 클로닝 라이게이션(in-fusion cloning ligation, Clontech, Cat. #: 639648)하여 개량형 스파이크 항원 발현 벡터인 플라스미드 #4 벡터(서열번호 28)를 제작했다. 상기 플라스미드 #4 벡터에서 스파이크 단백질을 코딩하는 부분은 서열번호 16에, 스파이크 단백질이 도입된 아데노바이러스의 염기서열은 서열번호 29에 나타나 있다.

[136] [표4]

	서열(5'→3')	서열번호
정방향 프라이머	GGG CGG TGG TGG GTC GGG TGG CGG CGG TTC CAG GTC TGT GGC AAG CCA GAG	17
역방향 프라이머	GAC CCA CCA CCG CCC GAC CCA CCG CCA CCG GTC TGG GTC TGG TAG GAG G	18

[137] <실시예 3> 스파이크 항원 탑재 아데노바이러스 벡터의 제작 (#1 내지 #4 벡터)

[138] 상기 실시예 1 및 2의 벡터(플라스미드 #1~#4 벡터)는 HEK293R 세포주를 이용하여 아데노바이러스 벡터(#1~#4 벡터)를 생산했다. 아데노바이러스는 T25 플레이트에 약 80% 차 있는 HEK293R 세포주에 25 μ l의 리포펙타민 2000(ThermoFisher, Cat. #: 11668027)과 함께 각 12.5 μ g의 벡터를 형질 전환 시켜 초기 아데노바이러스 벡터를 생산했다. 초기 생산된 각 아데노바이러스는 4 $\times$ 10⁷ 개의 HEK293R 세포주가 있는 T175 플라스크 20장에 감염시켜 증폭시켰다.

[139] 이후 증폭한 아데노바이러스 #1~#4 벡터는 세슘클로라이드(CsCl) 밀도 구배 원심분리법(cesium chloride density gradient centrifugation)을 1차(1.2g/ml CsCl+1.4 g/mL CsCl, 32,000 RPM, 90분)와 2차(1.35g/ml CsCl, 32,000 RPM, 18시간)에 걸쳐 정제하였고, 투석(20mM Tris-HCl, 25mM 염화나트륨, 2.5% 글리세롤)을 통해 완제 아데노바이러스를 생산하였다.

[140] <실시예 4> 시험관 내(in vitro)에서 항원 발현 벡터의 항원 발현도 비교

[141] <4-1> 항원 발현 벡터 주입에 따른 세포 내 항원 발현도 비교

[142] 상기 실시예 3에서 제작한 #1 내지 #4 벡터의 세포 내 항원 발현도를 비교하기 위해 단핵 세포 유래의 THP-1 세포주에서의 항원 발현도를 유세포 분석법(FACS)으로 측정하였다.

[143] 구체적으로, 유세포 분석법은 96-웰 배양 접시에 THP-1 세포가 각 웰 당 2.5 $\times$ 10⁵ 세포가 되도록 분주한 후, 각 벡터를 10 MOI (Multiplicity of infection)가 되도록 세포에 접종한 다음, 24시간 동안 배양하였다. 이후 각 웰의 세포를 각각 1.5 ml 튜브로 옮기고 FACS 버퍼 500 μ l를 넣고 원심분리(5000rpm, 3분, 4°C)

시켰다. 상층액을 제거한 후, 1:1000으로 희석한 생존도 지시염료 (eFluor™450, ebioscience, cat #:65-0863-14) 를 각 50 μ l씩 넣고 4°C에서 30분 동안 표면염색을 수행하였다.

- [144] 세포 내부에서 발현하는 항원 검출을 위해, 세포 고정/투과 농축액(ebioscience, Cat. #: 00-5123-43)을 세포 고정/투과 희석액(ebioscience, Cat. #: 00-5223-56)에 1:4로 희석하여 각 100 μ l씩 넣고 4°C에서 30분 동안 세포 고정/투과를 진행했다. 스파이크 항원 염색은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 항체(GeneTex, Cat. #: GTX632604)를 투과 버퍼(ebioscience, Cat. #: 00-8333-56)에 1:2500으로 희석한 용액(항체 농도: 0.4 μ g/ml)으로 4°C에서 1시간 동안 진행 후 워싱한 다음, 2차 항체인 APC Goat anti-mouse IgG antibody(Biolegend, Cat: 405308)를 1:100으로 희석한 용액(항체 농도: 2 μ g/ml)으로 항원 염색(4°C, 30분)했다. 염색 반응 후, 시료당 300 μ l 버퍼를 넣고 유세포 분석기(BD bioscience, LSRFORESSA)로 항원 발현 정도를 측정하였다.
- [145] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 실시예 3에서 제작한 아데노바이러스 #3 벡터가 단백질을 생성하는 능력인 항원 발현도가 가장 높은 것을 확인하였다.
- [146] <4-2> 항원 발현 벡터 주입에 따른 세포 밖 항원 발현도 비교
- [147] 상기 실시예 3에서 제작한 #1 내지 #4 벡터의 세포 밖 항원 발현도를 비교하기 위해 단핵 세포 유래의 THP-1와 근육 세포 유래의 RD 세포주에서의 항원 발현도를 웨스턴 블랏 분석법으로 측정하였다.
- [148] 구체적으로, 세포 밖으로 배출되는 스파이크 단백질 항원 발현도 측정을 위한 웨스턴 블랏 분석법은 다음과 같다. 6-웰 배양 접시에 THP-1 및 RD 세포가 각 웰 당 5×10^5 세포가 되도록 분주한 후, 각 벡터를 50 MOI가 되도록 세포에 접종한 다음 24시간 동안 배양하였다. 이후 원심분리를 통해 배양 배지를 수확한 다음 Microcon (Millipore, 50,000 MWCO, Cat. #: UFC805024)를 이용하여 배양 배지를 농축시켰으며, 배양한 세포는 RIPA 버퍼(ThermoFisher, Cat. #: 89901)를 이용하여 단백질 단위로 분해시켰다. 농축한 배양 배지의 단백질 총량은 BCA 단백질 어세이 키트(Thermo Fisher, Cat. #: 23225)를 이용하여 측정하였다.
- [149] 농축된 배양 배지 시료에 스파이크 단백질(삼량체, 약 250 kDa 이상)을 확인하기 위해 Bolt™ Bis-Tris 4-12% plus, 젤(ThermoFisher, Cat. #: NW04120BOX)을 이용하여 60 μ g/웰의 시료를 180V에서 전기 영동하였다.
- [150] 전기영동한 젤은 iBlot 2 Dry blotting system (Invitrogen, Cat. #: IB21001)을 이용하여 20V에서 10분간 PVDF 막에 단백질을 이동시켰다. 이후 Rabbit SARS-CoV-2 spike 항체(GeneTex, Cat. #: GTX135360)과 Goat anti-Rabbit IgG H&L (HRP)에 각각 반응시킨 후 ECL prime western blotting detection reagent (Amersham, Cat. #: RPN2232)로 SARS-CoV-2가 가지고 있는 삼량체 스파이크 단백질을 검출하였다.
- [151] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 실시예 3에서 제작한 아데노바이러스 #3 벡터가 단백질을 생성하고 배출하는 항원 발현도가 가장 높은 것을 확인하였다.

- [152] <실시예 5> 항원 발현 벡터 주입에 따른 마우스에서 항체 생성량의 비교
- [153] <5-1> #1 내지 #4 항원 발현 벡터 주입에 따른 마우스 항체 생성량의 비교
- [154] 상기 실시예 3에서 제작한 #1 내지 #4 벡터를 마우스에 주입 후 항체 생성량을 비교하였다.
- [155] 구체적으로, 상기 실시예 3에서 제작한 스파이크 항원 발현 벡터(#1 벡터~#4 벡터)를 6~7주령 BALB/c 마우스에 각 그룹당 6마리씩 2×10^8 IFU/마우스로 근육주사를 수행했다. 투여 후 마우스에서 2-3주차 시기에 안와 채혈로 약 $300 \mu\text{L}$ 의 혈액 시료를 채취했다. 이후 원심분리(8000rpm, 10분, 20°C)를 통해 혈장을 분리하여, 혈액 내에 존재하는 중화 항체의 양을 효소결합면역흡착검사(ELISA)를 통해 측정했다.
- [156] 효소결합면역흡착검사는 96-웰 플레이트에 스파이크 단백질(Acro Biosystems, Cat. #: SPN-C52H84)을 PBSN(PBS 1 L + Sodium Azide 0.01 g)에 녹여 100 ng/웰로 코팅해준 다음, 16시간 동안 4°C 에서 냉장 반응시켰다. 96-웰 플레이트 코팅 16시간 후 코팅 단백질을 제거하고 PBS로 3회 세척한 뒤, $150 \mu\text{L}$ 차단 버퍼(Blocking buffer, PBSN+BSA 1%)를 각 웰에 넣고 반응(37°C , 90분)시켰다. 반응시간 동안 희석 버퍼(Dilution buffer, PBSN+0.1% BSA+0.05% Tween-20)에 혈장을 6400배 희석하고, 차단 반응이 끝난 후 플레이트를 PBS로 3회 세척 후 희석한 혈장 샘플을 $50 \mu\text{L}$ 씩 웰에 넣고 반응(37°C , 3시간)시켰다. 반응 이후, PBS 3회 세척 및 2차 항체인 GAM-IgG-HRP(southernbiotech, Cat. #: 1030-05), GAM-IgM-HRP(southernbiotech, Cat. #: 1020-05)을 희석 버퍼에 1000배 희석하여 $50 \mu\text{L}$ 씩 웰에 넣고 반응(37°C , 2시간)하였다. 이후 2차 항체를 제거하고 PBS 5회 세척 후, 발색 시약(TMB Peroxidase Substrate buffer, ROCKLAND, Cat. #: TMBE-1000)을 $50 \mu\text{L}$ 씩 넣고 15분간 발색시키고 0.25N HCl을 $50 \mu\text{L}$ 넣어 발색을 멈추고, 시료를 마이크로리더기로 450nm 파장에서 분석하였다.
- [157] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 실시예 3에서 제작한 아데노바이러스 #3 벡터의 항체 생성량이 가장 높은 것으로 나타났다.
- [158] <5-2> 항원 발현 벡터 주입에 따른 마우스 항체 생성 발현 기간 비교
- [159] 또한, 상기 실시예 3에서 제작한 아데노바이러스(#1 내지 #3 벡터)는 8주령 BALB/c 마우스에 각 그룹당 6마리씩 1×10^9 VP/Mouse 또는 2×10^8 VP/Mouse로 근육주사를 수행했다. 투여 후 마우스에서 2 내지 4주차 시기에 안와 채혈을 통해 약 $300 \mu\text{L}$ 의 혈액 시료를 채취했다. 이후 원심분리(8000rpm, 10분, 20°C)를 통해 혈장을 분리하여, 혈액 내에 존재하는 항원 특이 항체의 양을 실시예 5-1에 따라 효소결합면역흡착검사(ELISA)를 통해 측정하였다.
- [160] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 실시예 3에서 제작한 아데노바이러스 #3 벡터의 혈액 내에 존재하는 항원 특이 항체의 양이 #2 벡터보다 4주 이상 높은 수준을 유지하는 것으로 나타났다.
- [161] <실시예 6> 항원 발현 벡터 주입에 따른 원숭이에서 항체 생성량 및 간독성의 비교

- [162] <6-1> 항원 발현 벡터 주입에 따른 원숭이에서 항체 생성량의 비교
- [163] 상기 실시예 3에서 제작한 아데노바이러스(#1 및 #3 벡터) 주입에 따른 원숭이에서 항체 생성량을 비교하였다.
- [164] 구체적으로, 상기 실시예 3에서 제작한 아데노바이러스 #1 및 #3 벡터를 6~7주령 원숭이(cynomolgus monkey)에 각 그룹당 2마리씩 1×10^{11} VP/Monkey로 근육주사를 수행했다. 면역화 후 2, 3주차에 원숭이의 정맥채혈을 통해 혈액시료를 채취하였으며, 혈구를 분리(8000rpm, 10분, 20°C)한 혈장을 사용하여 혈액 내에 존재하는 항체의 양을 효소결합면역흡착검사(ELISA) 및 슈도바이러스 중화 분석(Pseudovirus Neutralization Assay)를 통해 측정하였다.
- [165] 효소결합면역흡착검사는 96-웰 플레이트에 스파이크 단백질(Acro Biosystems, Cat. #: SPN-C52H84)을 PBSN에 녹여 100 ng/웰로 코팅해준 다음, 16시간 동안 4°C에서 냉장 반응시켰다. 96-웰 플레이트 코팅 16시간 후 코팅 단백질은 제거하고 PBS로 3회 세척한 뒤, 150 μ l의 차단 버퍼를 각 웰에 넣고 반응(37°C, 90분)했다. 반응시간 동안 희석 버퍼에 혈장을 1600배 희석하고, 차단 반응이 끝난 후 플레이트를 PBS로 3회 세척 후 희석한 혈장 샘플을 50 μ l씩 웰에 넣고 반응(37°C, 3시간)시켰다. 반응 이후, PBS 3회 세척 및 2차 항체인 Human total Ig-HRP(southernbiotech, Cat. #: 1010-05)을 희석 버퍼에 1000배 희석하여 50 μ l씩 웰에 넣고 반응(37°C, 2시간)하였다. 이후 2차 항체를 제거하고 PBS 5회 세척 후, 발색 시약(TMB Peroxidase Substrate buffer, ROCKLAND, Cat. #: TMBE-1000)을 50 μ l씩 넣고 15분간 발색시키고 0.25N HCl을 50 μ l 넣어 발색을 멈춘 후 시료를 마이크로리더기의 450nm 파장에서 분석하였다.
- [166] 슈도바이러스 중화 분석은 1×10^4 세포/웰의 HEK293T-hACE2(인간 안지오텐신 전환효소 2; hACE2) 세포주를 96-웰 플레이트의 각 웰에 넣고 10시간 배양(37°C, 5% CO₂) 했다. 면역화 후 2, 3주차에 원숭이의 정맥채혈을 통해 채취한 혈장은 100~6400배 4배수 희석하여 7×10^5 TU/ml의 슈도바이러스(스�파이크 단백질과 루시퍼레이즈를 발현하는 렌티바이러스)와 함께 1시간 반응(37°C)시킨 후, 배양 중인 HEK293T-hACE2 96-웰 플레이트에 2 μ g/웰(200 μ l) 폴리브렌(Merck, Cat. #: TR-1003-G)과 함께 접종하고 2일간 배양했다. 이후 스파이크 단백질에 결합하는 혈장 내 중화 항체 존재 여부는 슈도바이러스가 HEK293T-hACE2 세포주에 감염되어 루시퍼레이즈 단백질을 발현하는 정도를 측정하여 확인하였다. 2일간 배양한 세포는 DPBS 워싱 후 25 μ g 세포 용해 시약(Promega, Cat. #: E153A)으로 용해시켰다. 용해된 시료는 불투명 96-웰 플레이트에 옮긴 후 100 μ g 루시퍼레이즈 검출 지시약(Promega, Cat. #: E151A)을 넣고 루미노미터(Luminometer Centro XS3 LB960, Berthold Technologies, Cat. #: LB960, software: Mikro 2000 program)를 이용하여 발광 정도를 측정(검출 지시약 주입-5초 쉬임-2초 지연-10초 측정)하여 분석하였다.
- [167] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, #3 벡터를 주입한 경우 항체 생성량이 우수하였고, 벡터 주입 후 5주가 지나도 항체 역가가 유지되는 것을 확인하였다.

또한, 도 11에 나타난 바와 같이, #3 백터를 주입한 경우 중화 항체 농도가 높은 것을 확인하였다. 상기 결과는 백신 투여 2주 후부터 다량의 중화 항체가 생성되기 시작하여 바이러스의 세포 감염을 효과적으로 차단할 수 있음을 제시한다.

- [168] **<6-2> 항원 발현 백터 주입에 따른 원숭이에서 간 독성 비교**
- [169] 아데노바이러스 특성상 대부분 간으로 이동하여 간 독성을 나타낼 우려가 있고, 간 독성을 나타낼 경우 인체에 치명적이므로 고용량의 바이러스 입자를 투여해도 간 독성을 나타내지 않는 백신을 제조하는 것이 매우 중요하다. 따라서 상기 실시예 3에서 제작한 아데노바이러스(#1 및 #3 백터) 주입에 따른 원숭이에서 간 독성을 비교하였다.
- [170] 상기 실시예 3에서 제작한 아데노바이러스 #1 및 #3 백터를 6~7주령 원숭이(cynomolgus monkey)에 각 그룹당 2마리씩 1×10^{11} VP/Monkey로 근육주사를 수행했다. 모든 동물에서 투여 전(pre), 9, 22, 36일 간격으로 혈액을 채취하였다. 모든 채혈은 절식(음수는 자유섭취) 상태에서 실시하며, 일회용 주사기(3mL, 23G, 한국백신, KOR)를 이용하여 대퇴정맥(Femoral vein)에서 약 3mL을 채혈하였다.
- [171] 혈액생화학적 검사를 위해 채혈한 혈액에서 약 0.6 mL을 SSTTM tube(Vacutainer®, BD, USA)에 분주하고 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리(5424R, Eppendorf, USA)하여 혈청을 분리한 다음, 생화학분석기(7180, HITACHI, JPN)를 이용하여 간 독성 수치인 아스파테아미노전이효소(Aspartate Aminotransferase, AST), 알라닌아미노전이효소(Alanine Aminotransferase, ALT) 항목을 측정하였다.
- [172] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 동일한 아데노바이러스 백터 플랫폼을 사용한 #1 및 #3 백터의 원숭이에서 고용량의 바이러스 입자 투여에도 불구하고 심각한 간 독성을 보이지 않았음을 확인하였다.
- [173] **<실시예 7> 항원 발현 백터를 마우스 및 원숭이에 주입하였을 때의 T 세포 반응성 측정**
- [174] **<7-1> 마우스의 비장 세포 및 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 T 세포 반응성 측정**
- [175] 상기 실시예 3에서 제작한 스파이크 항원 발현 백터(#1 백터, #3 백터) 주입에 따른 마우스에서 T 세포 반응성을 하기와 같이 측정하였다.
- [176] 구체적으로, 상기 실시예 5의 백신(#1, #3 백터) 투여 마우스를 투여 10주차에 각 1마리씩 희생하여 혈액을 안와 채혈을 통해 채취하고 비장을 분리했다. 비장세포는 70 μ m cell strainer (BD Bioscience, Cat. #: 352350)을 이용하여 분쇄하여 단일 세포 상태로 만든 후, ACK lysis buffer (Gibco, Cat. #: A1049201)를 이용하여 적혈구를 제거했다. 혈액 샘플은 Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, Cat. #: 10771)을 이용한 밀도 구배 원심분리법을 이용하여 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 분리했다. 분리한 비장 세포 및 PBMC는 세포 수를 측정한 후

- 2×10⁶ cells/ml로 RF10 배양 배지(RPMI1640 + 10% FBS + 1% penicillin/streptomycin)에 현탁 시켰다.
- [177] 마우스 IFN- γ ELISPOT kit (CTL, Cat. #: MIFNgp-2M/10)에 코팅된 플레이트를 예열된 RF10 배양배지에 Peptivator SARS-CoV-2 Prot_S (Miltenyi Biotec, Cat. #: 130-126-701)을 50 μ g/ml의 농도로 첨가하여 100 μ l씩 웰을 채워 20분간 37°C CO₂ 배양기에 보관했다 (각 그룹당 웰은 duplicate로 진행했다). 그 후, 재현탁되어 있는 마우스 비장 세포와 PBMC 함유 배양액을 100 μ l씩 웰에 첨가하고 37°C, CO₂ 배양기에서 배양했다. 양성 대조군 웰에는 항-CD3 mAb(1 μ g/ml, Biolegend, Cat. #: 100331)을 첨가하였고, 음성 대조군 웰에는 세포를 넣어주지 않고 RF10만 넣었다. 24시간 동안 배양 후, Mouse IFN- γ ELISPOT kit에 포함되어 있는 제조사의 프로토콜과 같은 방식으로 ELISPOT development를 진행했다. 발색 후 차광하여 24시간 동안 상온에서 플레이트를 건조시킨 후 Immunospot S6 micro analyzer (CTL)를 이용하여 분석했다. 결과는 1×10⁶ PBMC 단위로 환산하였다.
- [178] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, #3 벡터를 마우스에 주입한 경우 마우스의 비장 세포 및 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 벡터를 주입하지 않은 군 및 #1 벡터를 주입한 군에 비해 T 세포 반응성이 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과는 본 발명의 백신 조성물은 SARS-CoV-2에 재감염되었을 때, 항체 생성뿐만 아니라 T 세포에 의한 기억 면역 반응도 활발하게 유도할 수 있음을 제시한다.
- [179] <7-2> 원숭이 말초혈액단핵세포(PBMC)에서 T 세포 반응성 측정
- [180] 상기 실시예 3에서 제작한 아데노바이러스(#1 벡터, #3 벡터) 주입에 따른 원숭이에서 T 세포 반응성을 하기와 같이 측정하였다.
- [181] 상기 실시예 6의 백신 (#3 벡터) 투여 원숭이를 투여 4주차에 정맥채혈을 통해 혈액샘플을 5ml 채취했다. 혈액 샘플은 Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, Cat. #: 10771)을 이용한 밀도 구배 원심분리법을 이용하여 PBMC를 분리했고, 잔존하는 적혈구는 ACK lysis buffer (Gibco, Cat. #: A1049201)를 이용하여 제거했다. 분리한 PBMC는 세포수를 측정한 후 2E+06 cells/ml로 RF10 media (RPMI1640 + 10% FBS + 1% penicillin/streptomycin)에 현탁했다.
- [182] Human IFN- γ ELISPOT kit (CTL, Cat. #: HIFNgp-2M/10)에 코팅된 플레이트를 예열된 RF10 배양 배지에 Peptivator SARS-CoV-2 Prot_S(Miltenyi Biotec, Cat. #: 130-126-701)을 100 μ g/ml의 농도로 첨가하여 100 μ l씩 웰을 채워 20분간 37°C CO₂ 배양기에 보관했다 (각 그룹당 웰은 2배수로 진행하였다). 그 후, 현탁된 PBMC 함유 배양배지를 100 μ l씩 웰에 첨가하고 37°C, CO₂ 배양기에서 배양했다. (양성 대조군 웰에는 PMA(10ng/ml)와 이오노마이신(1 μ g/ml)을 첨가하였고 음성 대조군 웰에는 세포를 넣어주지 않고 RF10만 넣었다. 24시간 동안 배양 후, Human IFN- γ ELISPOT kit에 포함되어 있는 제조사의 프로토콜과 같은 방식으로 ELISPOT development를 진행했다. 발색 후 차광하여 24시간 동안 상온에서 플레이트를 보관했다. 플레이트 건조가 끝나면 Immunospot S6 micro analyzer

- (CTL)를 이용하여 분석하여 결과를 도출하고 1×10^6 PBMC 단위로 환산하였다.
- [183] 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이, #3 벡터를 원숭이에 주입한 경우 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에서 벡터를 주입하지 않은 군에 비해 T 세포 반응성이 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과는 본 발명의 백신 조성물은 SARS-CoV-2에 재감염되었을 때, 항체 생성뿐만 아니라 T 세포에 의한 기억 면역 반응도 활발하게 유도할 수 있음을 제시한다.
- [184] <실시예 8> #3 항원 발현 벡터 내지 #3 항원 이형 벡터 주입에 따른 마우스 및 원숭이에서의 항원 특이적 중화 항체 생성량 동등성 비교
- [185] <8-1> #3 항원 발현 벡터 내지 #3 항원 이형 벡터 주입에 따른 마우스에서의 항원 특이적 중화 항체 생성량 동등성 비교
- [186] 상기 실시예 3에서 제작한 #3 벡터와, 동등성 비교군으로 제작한 #3 이형 벡터(서열번호 30)를 마우스에 주입 후 항체 생성량을 비교했다. #3 이형 벡터는 실시예 3에서 사용한 #3 벡터의 아데노바이러스 유전자 중 E4 유전자를 바이러스 유전체의 E1 영역으로 재배치한 형태이며, E1/E3 결손된 Ad5에서 E3의 knob 유전자가 Ad35로 치환된 Ad5/35 벡터에서, E4orf6의 711bp가 결실되고, 제조합 스파이크 단백질(SARS-CoV-2 S1 도메인 및 S2 도메인이 GGGGS 링커로 연결된 융합 단백질) 및 E4orf6 유전자가 정방향으로 E1 결실부위에 삽입된 형태로, 제작 방법은 실시예 3의 방식과 동일하다.
- [187] 구체적으로, 스파이크 항원 발현 벡터(#3 벡터 및 #3 이형 벡터)를 6~7주령 BALB/c 마우스에 각 그룹당 5마리씩 1×10^9 VP/마우스로 근육주사를 수행했다. 투여 후 마우스에서 9주차 시기에 안와 채혈로 약 $300 \mu\text{l}$ 의 혈액 시료를 채취했다. 이후 원심분리(8000rpm, 10분, 20°C)를 통해 혈장을 분리하여, 혈액 내에 존재하는 중화 항체의 양을 슈도바이러스 중화 분석(Pseudovirus Neutralization Assay)를 통해 측정했다.
- [188] 슈도바이러스 중화 분석은 1×10^4 세포/웰의 HEK293T-hACE2(인간 안지오텐신 전환효소 2; hACE2) 세포주를 96-웰 플레이트의 각 웰에 넣고 10시간 배양(37°C , 5% CO_2) 했다. 면역화 후 8주차에 마우스의 정맥채혈을 통해 채취한 혈장은 100~6400배 4배수 희석하여 7×10^5 TU/ml의 슈도바이러스(스�파이크 단백질과 루시퍼레이스를 발현하는 렌티바이러스)와 함께 1시간 반응(37°C)시킨 후, 배양 중인 HEK293T-hACE2 96-웰 플레이트에 3일간 배양했다. 이후 스파이크 단백질에 결합하는 혈장 내 중화 항체 존재 여부는 슈도바이러스가 HEK293T-hACE2 세포주에 감염되어 루시퍼레이스 단백질을 발현하는 정도를 측정하여 확인하였다. 3일간 배양한 세포는 DPBS 워싱 후 $25 \mu\text{g}$ 세포 용해 시약(Promega, Cat. #: E153A)으로 용해시켰다. 용해된 시료는 불투명 96-웰 플레이트에 옮긴 후 $100 \mu\text{g}$ 루시퍼레이스 검출 지시약 (Promega, Cat. #: E151A)을 넣고 루미노미터(Luminometer Centro XS3 LB960, Berthold Technologies, Cat. #: LB960, software: Mikro 2000 program)를 이용하여 발광 정도를 측정(검출 지시약 주입-5초 섞임-2초 지연-10초 측정)하여 분석하였다.

- [189] 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, #3 항원 벡터와 #3 항원 이형 벡터는 우수한 항체 생성량을 보였고, 두 그룹 간의 차이는 없었다. 상기 결과는 서로 다른 플랫폼 벡터에 탑재하더라도 #3 항원은 동등한 수준의 중화 항체 활성이 있음을 시사한다.
- [190] **<8-2> #3 항원 발현 벡터 내지 #3 항원 이형 벡터 주입에 따른 원숭이에서의 항원 특이적 중화 항체 생성량 동등성 비교**
- [191] 상기 실시예 8-1의 #3 벡터 내지 동등성 비교군으로 제작한 #3 이형 벡터를 원숭이(cynomolgus monkey)에 주입 후 항원 특이적 중화 항체 생성량을 비교했다.
- [192] 구체적으로, 스파이크 항원 발현 벡터(#3 벡터 및 #3 이형 벡터)를 6~7주령 원숭이에 각 그룹당 2마리씩 2×10^{10} VP/Monkey로 근육주사를 수행했다. 면역화 후 9주차에 원숭이의 정맥채혈을 통해 혈액시료를 채취하였으며, 혈구를 분리(8000rpm, 10분, 20°C)한 혈장을 사용하여 혈액 내에 존재하는 항체의 양을 슈도바이러스 중화 분석(Pseudovirus Neutralization Assay)를 통해 측정하였다.
- [193] 슈도바이러스 중화 분석은 1×10^4 세포/웰의 HEK293T-hACE2(인간 안지오텐신 전환효소 2; hACE2) 세포주를 96-웰 플레이트의 각 웰에 넣고 10시간 배양(37°C, 5% CO₂) 했다. 면역화 후 9주차에 원숭이의 정맥채혈을 통해 채취한 혈장은 100~6400배 4배수 희석하여 7×10^5 TU/ml의 슈도바이러스(스파이크 단백질과 루시퍼레이즈를 발현하는 렌티바이러스)와 함께 1시간 반응(37°C)시킨 후, 배양 중인 HEK293T-hACE2 96-웰 플레이트에 3일간 배양했다. 이후 스파이크 단백질에 결합하는 혈장 내 중화 항체 존재 여부는 슈도바이러스가 HEK293T-hACE2 세포주에 감염되어 루시퍼레이즈 단백질을 발현하는 정도를 측정하여 확인하였다. 3일간 배양한 세포는 DPBS 워싱 후 25μg 세포 용해 시약(Promega, Cat. #: E153A)으로 용해시켰다. 용해된 시료는 불투명 96-웰 플레이트에 옮긴 후 100μg 루시퍼레이즈 검출 지시약 (Promega, Cat. #: E151A)을 넣고 루미노미터(Luminometer Centro XS3 LB960, Berthold Technologies, Cat. #: LB960, software: Mikro 2000 program)를 이용하여 발광 정도를 측정(검출 지시약 주입-5초 섞임-2초 지연-10초 측정)하여 분석하였다.
- [194] 그 결과, 도 16에 나타난 바와 같이, #3 벡터 및 #3 이형 벡터를 주입한 경우 두 그룹 모두 항체 생성량이 우수하였고, 발현량에 차이를 보이지 않았다.
- [195] **<실시예 9> 재조합 스파이크 단백질 주입에 따른 마우스에서 항체 생성량의 비교**
- [196] **<9-1> 재조합 스파이크 단백질 주입에 따른 마우스 항체 생성량의 비교**
- [197] 상기 실시예 3에서 제작한 #1 내지 #3 벡터로부터 유래한 재조합 스파이크 단백질(#2 재조합 단백질 및 #3 재조합 단백질)을 마우스에 주입 후 항체 생성량을 비교하였다.
- [198] 구체적으로, 6~7주령 BALB/c 마우스에 각 그룹당 6마리씩 #1 내지 #3 벡터에서 유래한 재조합 스파이크 단백질을 주입하였다. #1 내지 #3 재조합 스파이크

단백질 10 μ g을 각 150 μ l의 PBS용액(pH 7.4)에 희석하여 근육주사로 투여하였다. 투여 후 마우스에서 2 내지 4주차 시기에 안와 채혈로 약 300 μ l의 혈액 시료를 채취하고, 원심분리(8000rpm, 10분, 20°C)를 통해 혈장을 분리하여, 혈액 내에 존재하는 중화 항체의 양을 효소결합면역흡착검사(ELISA) 및 슈도바이러스 중화 분석(Pseudovirus Neutralization Assay)를 통해 측정하였다.

- [199] 효소결합면역흡착검사는 96-웰 플레이트에 스파이크 단백질(Acro Biosystems, Cat. #: SPN-C52H84)을 PBSN(PBS 1L + Sodium Azide 0.01g)에 녹여 100 ng/웰로 코팅해준 다음, 16시간 동안 4°C에서 냉장 반응시켰다. 96-웰 플레이트 코팅 16시간 후 코팅 단백질은 제거하고 PBS로 3회 세척한 뒤, 150 μ l 차단 버퍼(Blocking buffer, PBSN+BSA 1%)를 각 웰에 넣고 반응(37°C, 90분)시키고, 반응시간 동안 희석 버퍼(Dilution buffer. PBSN+0.1% BSA+0.05% Tween-20)에 혈장을 6400배 희석하고, 차단 반응이 끝난 후 플레이트를 PBS로 3회 세척 후 희석한 혈장 샘플을 50 μ l씩 웰에 넣고 반응(37°C, 3시간)시켰다. 반응 이후, PBS 3회 세척 및 2차 항체인 GAM-IgG-HRP(southernbiotech, Cat. #: 1030-05), GAM-IgM-HRP(southernbiotech, Cat. #: 1020-05)을 희석 버퍼에 1000배 희석하여 50 μ l씩 웰에 넣고 반응(37°C, 2시간) 시켰다. 이후 2차 항체를 제거하고 PBS 5회 세척 후, 발색 시약(TMB Peroxidase Substrate buffer, ROCKLAND, Cat. #: TMBE-1000)을 50 μ l씩 넣고 15분간 발색 시키고 0.25N HCl을 50 μ l 넣어 발색을 멈추고, 시료를 마이크로리더기로 450nm 파장에서 분석하였다.
- [200] 슈도바이러스 중화 분석은 1 $\times$ 10⁴ 세포/웰의 HEK293T-hACE2(인간 안지오텐신 전환효소 2; hACE2) 세포주를 96-웰 플레이트의 각 웰에 넣고 10시간 배양(37°C, 5% CO₂) 하였다. 면역화 후 2 내지 4주차에 마우스의 정맥채혈을 통해 채취한 혈장은 100~6400배(4 배수) 희석하여 7 $\times$ 10⁵ TU/ml의 슈도바이러스(스파이크 단백질과 루시퍼레이스를 발현하는 렌티바이러스)와 함께 1시간 반응(37°C)시킨 후, 배양 중인 HEK293T-hACE2 96-웰 플레이트에 3일간 배양하였다. 이후 스파이크 단백질에 결합하는 혈장 내 중화 항체 존재 여부는 슈도바이러스가 HEK293T-hACE2 세포주에 감염되어 루시퍼레이스 단백질을 발현하는 정도를 측정하여 확인하였다. 3일간 배양한 세포는 DPBS 워싱 후 25 μ g 세포 용해 시약(Promega, Cat. #: E53A)으로 용해시킨 후 용해된 시료는 불투명 96-웰 플레이트에 옮긴 후 100 μ g 루시퍼레이스 검출 지시약 (Promega, Cat. #: E151A)을 넣고 루미노미터(Luminometer Centro XS3 LB960, Berthold Technologies, Cat. #: LB960, software: Mikro 2000 program)를 이용하여 발광 정도를 측정(검출 지시약 주입-5초 섞임-2초 지연-10초 측정)하여 분석하였다.
- [201] <실시예 10> 스파이크 항원 플라스미드 주입에 따른 마우스에서 항체 생성량의 비교
- [202] <10-1> 스파이크 항원 플라스미드 주입에 따른 마우스 항체 생성량의 비교
- [203] 상기 실시예 1, 2에서 제작한 #1 내지 #3 벡터를 플라스미드 형태(플라스미드 #1 벡터 및 플라스미드 #3 벡터)로 마우스에 주입 후 항체 생성량을 비교하였다.

- [204] 구체적으로, 상기 실시예 1, 2에서 제작한 플라스미드 #2 내지 플라스미드 #3 벡터를 대장균에 도입하고 200 mL LB 배양배지에서 하루동안 배양하였다. 배양한 플라스미드는 QIAGEN Endofree Plasmid Maxi kit(Cat.# 12362)를 이용하여 수확한 후 6~7주령 BALB/c 마우스에 각 그룹당 6마리씩 투여하였다. #2 내지 p#3 벡터 100 μ g을 각 50 μ l의 PBS용액(pH 7.4)에 희석하여 근육주사로 투여하였다. 투여 후 마우스에서 2 내지 4주차 시기에 안와 채혈로 약 300 μ l의 혈액 시료를 채취한 후 원심분리(8000rpm, 10분, 20°C)를 통해 혈장을 분리하여, 혈액 내에 존재하는 중화 항체의 양을 효소결합면역흡착검사(ELISA) 및 슈도바이러스 중화 분석(Pseudovirus Neutralization Assay)를 통해 측정하였다.
- [205] 효소결합면역흡착검사는 96-웰 플레이트에 스파이크 단백질(Acro Biosystems, Cat. #: SPN-C52H84)을 PBSN(PBS 1L + Sodium Azide 0.01 g)에 녹여 100 ng/웰로 코팅해준 다음, 16시간 동안 4°C에서 냉장 반응시켰다. 96-웰 플레이트 코팅 16시간 후 코팅 단백질은 제거하고 PBS로 3회 세척한 뒤, 150 μ l 차단 버퍼(Blocking buffer, PBSN+BSA 1%)를 각 웰에 넣고 반응(37°C, 90분)시키고, 반응시간 동안 희석 버퍼(Dilution buffer. PBSN+0.1% BSA+0.05% Tween-20)에 혈장을 6400배 희석하고, 차단 반응이 끝난 후 플레이트를 PBS로 3회 세척 후 희석한 혈장 샘플을 50 μ l씩 웰에 넣고 반응(37°C, 3시간)시켰다. 반응 이후, PBS 3회 세척 및 2차 항체인 GAM-IgG-HRP(southernbiotech, Cat. #: 1030-05), GAM-IgM-HRP(southernbiotech, Cat. #: 1020-05)을 희석 버퍼에 1000배 희석하여 50 μ l씩 웰에 넣고 반응(37°C, 2시간)한다. 이후 2차 항체를 제거하고 PBS 5회 세척 후, 발색 시약(TMB Peroxidase Substrate buffer, ROCKLAND, Cat. #: TMBE-1000)을 50 μ l씩 넣고 15분간 발색 시키고 0.25N HCl을 50 μ l 넣어 발색을 멈추고, 시료를 마이크로리더기로 450nm 파장에서 분석하였다.
- [206] 슈도바이러스 중화 분석은 1 $\times$ 10⁴ 세포/웰의 HEK293T-hACE2(인간 안지오텐신 전환효소 2; hACE2) 세포주를 96-웰 플레이트의 각 웰에 넣고 10시간 배양(37°C, 5% CO₂)하였다. 면역화 후 2 내지 4주차에 마우스의 정맥채혈을 통해 채취한 혈장은 100~6400배(4 배수) 희석하여 7 $\times$ 10⁵ TU/ml의 슈도바이러스(스파이크 단백질과 루시퍼레이즈를 발현하는 렌티바이러스)와 함께 1시간 반응(37°C)시킨 후, 배양 중인 HEK293T-hACE2 96-웰 플레이트에 3일간 배양하였다. 이후 스파이크 단백질에 결합하는 혈장 내 중화 항체 존재 여부는 슈도바이러스가 HEK293T-hACE2 세포주에 감염되어 루시퍼레이즈 단백질을 발현하는 정도를 측정하여 확인하였다. 3일간 배양한 세포는 DPBS 워싱 후 25 μ g 세포 용해 시약(Promega, Cat. #: E153A)으로 용해시킨다. 용해된 시료는 불투명 96-웰 플레이트에 옮긴 후 100 μ g 루시퍼레이즈 검출 지시약 (Promega, Cat. #: E151A)을 넣고 루미노미터(Luminometer Centro XS3 LB960, Berthold Technologies, Cat. #: LB960, software: Mikro 2000 program)를 이용하여 발광 정도를 측정(검출 지시약 주입-5초 쉬임-2초 지연-10초 측정)하여 분석하였다.

청구범위

- [청구항 1] 코로나바이러스 스파이크 단백질(Spike protein)의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 코로나바이러스는 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 SARS-CoV-2인 것을 특징으로 하는, 단백질.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 코로나바이러스는 SARS-CoV-2인 것을 특징으로 하는, 단백질.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 링커는 (GGGS)_n으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 단백질.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 n은 1 내지 5의 정수인 것을 특징으로 하는, 단백질.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 서열로 연결된 스파이크 단백질 항원은 안정성(stability)이 증가된 것을 특징으로 하는, 단백질.
- [청구항 7] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 서열로 연결된 스파이크 단백질 항원은 항원 발현도가 증가하는 것을 특징으로 하는, 단백질.
- [청구항 8] 코로나바이러스 스파이크 단백질(Spike protein)의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 코로나바이러스는 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 SARS-CoV-2인 것을 특징으로 하는, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 링커 서열은 (GGGS)_n으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 11] 코로나바이러스 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자 사이의 절단 인지 서열이 제거되고 링커 서열을 도입한 것을 특징으로 하는, 재조합 스파이크 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 코로나바이러스는 SARS-CoV, MERS-CoV 또는 SARS-CoV-2인 것을 특징으로 하는, 벡터.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 코로나바이러스는 SARS-CoV-2인 것을 특징으로 하는, 벡터.
- [청구항 14] 제11항에 있어서, 상기 벡터는 바이러스 또는 플라스미드인 것을 특징으로 하는, 벡터.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 바이러스는 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, modified vaccinia virus ankara(MVA), 아데노 연관 바이러스(Adeno-associated virus, AAV), 단순 헤르페스 바이러스(Herpes simplex virus) 또는 배큘로 바이러스(Baculovirus) 인 것을 특징으로 하는, 벡터.

- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 Ad2, Ad4, Ad5, Ad11, Ad26, Ad35, ChAd68, FAd9 또는 PAd3인 것을 특징으로 하는, 벡터.
- [청구항 17] 제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 아데노바이러스는 항원 발현도가 높은 것을 특징으로 하는, 벡터.
- [청구항 18] 코로나바이러스 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 코로나바이러스 감염증 예방용 또는 치료용 백신.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 코로나바이러스 감염증은 SARS, MERS 또는 COVID-19인 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증 예방용 또는 치료용 백신.
- [청구항 20] 코로나바이러스 스파이크 단백질의 S1 및 S2 유전자의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 코로나바이러스 감염증을 예방 또는 치료하는 방법.