

특 허 법 원

제 1 부

판 결

사 건 2022허2530 거절결정(특)

원 고 A

대표자 소장 B

소송대리인 특허법인(유한) 대아, 담당변리사 박지은, 이상준

피 고 특허청장

소송수행자 김병숙

변 론 종 결 2023. 3. 16.

판 결 선 고 2023. 4. 27.

주 문

1. 원고의 청구를 기각한다.
2. 소송비용은 원고가 부담한다.

청 구 취 지

특허심판원이 2022. 2. 24. 2021원3203호 사건에 관하여 한 심결을 취소한다.

이 유

1. 기초사실

가. 이 사건 출원발명(갑 제2, 6, 18호증)

1) 발명의 명칭: COVID-19 항원용 단백질, 이를 코딩하는 DNA 단편 및 이를 포함한 유전자 백신

2) 원출원의 출원일/ 원출원번호/ 분할출원일/ 분할출원번호: 2020. 11. 12./ 제10-2020-0150689/ 2021. 3. 18./ 제10-2021-0035382호

3) 청구범위(2021. 10. 18. 자 보정에 의한 것)

【청구항 1】 (삭제)¹⁾

【청구항 2】 서열번호 4의 유전자 서열로 이루어지고, COVID-19 항원용 단백질을 코딩하는 COVID-19 유전자 백신용 DNA 단편으로서,

상기 COVID-19 항원용 단백질은 Y449A,²⁾ N487A, Q493A, N501G, Y505G, R683G, R685G, R815G, K986P 및 V987P로 치환되며,

상기 유전자 서열은 CMV 프로모터, Kozak 서열, IgM signal 펩타이드 서열, 표적 항원, BGH poly(A) tail 및 연속적인 2개의 SV40 인핸서의 순서로 배열된 재조합 벡터에 표적 항원으로 포함되고,

상기 재조합 벡터는 COVID-19 유전자 백신용 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는, COVID-19 유전자 백신용 DNA 단편(이하 '이 사건 제2항 발명'이라 한다).

1) 삭제 전 【청구항 1】 은 "서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, COVID-19 항원용 단백질"이었다.

2) 야생형(wild type) 단백질의 449번 아미노산 잔기가 티로신(Y)에서 알라닌(A)으로 치환되었다는 의미이다. 한편 DNA를 구성하는 네 가지 염기-아데닌<A>, 구아닌<G>, 시토신<C>, 티민<T>[RNA는 우라실<U>]-가 세 개 모이면 아미노산이 되는데, 이를 '코돈(codon)'이라 한다. 20여 개 아미노산이 각각 하나 이상의 코돈에 의해 지정된다. 예를 들어, 알라닌(A)은 GCT, GCC, GCA, GCG 코돈에 의해 지정되고, 글라이신(G)은 GGT, GGC, GGA, GGG 코돈에 의해 지정된다.

【청구항 3】 서열번호 4의 유전자 서열로 이루어지고, COVID-19 항원용 단백질을 코딩하는 COVID-19 유전자 백신용 DNA 단편을 포함하는 재조합 벡터로서,

상기 COVID-19 항원용 단백질은 Y449A, N487A, Q493A, N501G, Y505G, R683G, R685G, R815G, K986P 및 V987P로 치환되며,

상기 유전자 서열을 표적 항원으로 하고, CMV 프로모터, Kozak 서열, IgM signal 펩타이드 서열, 표적 항원, BGH poly(A) tail 및 연속적인 2개의 SV40 인핸서의 순서로 배열된 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.

【청구항 4, 5】 (각 삭제)³⁾

【청구항 6 내지 9】 (이 사건에서 구체적으로 살피지 않으므로 기재를 생략한다)

4) 이 사건 출원발명의 주요 내용은 [별지 1], 서열번호 4는 [별지 2] 기재와 같다.

나. 선행기술

1) 선행발명 1(갑 제7, 10, 12, 13호증, 을 제1, 6, 7, 9호증)

2020. 8. 14. 반포된 선행발명 1은 '히말라야 원숭이에서 SARS-CoV-2에 대한 DNA 백신 보호'라는 제목의 논문으로,⁴⁾ 그 주요 내용은 [별지 3-1] 기재와 같다.

선행발명 1에는 2016. 3. 2. 공개된 '인간 코로나바이러스 스파이크 단백질의 융합 전 구조'라는 제목의 논문,⁵⁾ 2017. 8. 14. 온라인 공개된 '합리적으로 설계된 융합 전

3) 위 삭제 전 청구항 2 내지 5는 다음과 같다. 【청구항 2】 서열번호 4의 유전자 서열로 이루어지고, COVID-19 항원용 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는, DNA 단편. 【청구항 3】 서열번호 4의 유전자 서열로 이루어진 DNA 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터. 【청구항 4】 제3항에 있어서, 상기 유전자 서열을 표적 항원으로 하고, CMV 프로모터, 표적 항원, BGH poly(A) tail, 연속적인 2개의 SV40 인핸서의 순서로 배열된 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터. 【청구항 5】 제4항에 있어서, CMV 프로모터와 표적 항원 사이에 Kozak 서열 및 IgM signal 펩타이드 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.

4) Jingyou Yu et al., "DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques", Science 369(6505), 806-811 (2020). 온라인 공개일은 2020. 5. 20.인 것으로 보인다.

5) Robert N. Kirchdoerfer et al. "Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein", Nature 531, 118-121 (2016).

MERS-CoV 스파이크 항원의 면역원성(免疫原性, immunogenicity) 및 구조'라는 제목의 논문,⁶⁾ 2020. 2. 19. 반포된 '전 융합 형태의 2019-nCoV 스파이크 초저온 전자현미경 구조'라는 제목의 논문⁷⁾이 인용되어 있다(이하 선행발명 1의 인용번호에 따라 순서대로 '참고문헌 11, 12, 13'이라 한다). 각 참고문헌의 주요 내용은 [별지 3-2] 기재와 같다.

2) 선행발명 2(갑 제8호증, 을 제2호증)

2020. 8. 7. 온라인 공개된 선행발명 2는 '변이가 숙주세포 수용체 ACE2를 가진 인간 SARS-CoV-2의 수용체 결합 도메인 구조, 기능, 역학에 미치는 영향'이라는 제목의 논문으로,⁸⁾ 그 주요 내용은 [별지 4] 기재와 같다.

ACE2(Angiotensin-Converting Enzyme 2)는 호흡기 등의 상피세포에 존재하는 효소수용체로, SARS-CoV-2가 숙주세포의 표면에 잘 달라붙게 하여 바이러스의 세포 침투능력을 높여준다.

3) 선행발명 3(갑 제9호증, 을 제3호증)

2020. 3. 30. 온라인 공개된 선행발명 3은 'SARS-CoV-2에 의한 수용체 인식의 구조적 기반'이라는 제목의 논문으로,⁹⁾ 그 주요 내용은 [별지 5] 기재와 같다.

다. 이 사건 심결 경위

1) 특허청 심사관은 2021. 5. 24. 원고에게, '이 사건 출원발명의 청구항 1 내지 9는 그 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람(이하 '통상의 기술자'라 한

6) Jesper Pallesen et al. "Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen", PNAS 114(35), E7348-7357 (2017). 간행일은 2017. 8. 29.

7) Daniel Wrapp et al. "Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation", Science 367(6438), 1260-1263 (2020).

8) Budheswar Dehury et al., "Effect of mutation on structure, function and dynamics of receptor binding domain of human SARS-CoV-2 with host cell receptor ACE2: a molecular dynamics simulations study", Journal of Biomolecular Structure and Dynamics 39(18), 7231-7245 (2021).

9) Jian Shang et al., "Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2", Nature 581, 221-224 (2020). 간행일은 2020. 5. 14.

다)이 선행발명 1, 2, 3을 결합하여 쉽게 발명할 수 있으므로 특허법 제29조 제2항에 따라 진보성이 부정되어 특허를 받을 수 없다'는 이유로 의견제출통지를 하였다.

2) 원고는 2021. 7. 22. 이 사건 출원발명의 청구항 1을 삭제하고, 청구항 2 내지 9를 정정하였으나, 특허청 심사관은 2021. 9. 17. '이 사건 출원발명의 보정된 청구항 2 내지 9는 선행발명 1, 2, 3의 결합에 의해 진보성이 부정되므로 거절이유가 해소되지 않았다'는 이유로 이 사건 출원발명에 대하여 특허거절결정을 하였다.

3) 원고는 2021. 10. 18. 이 사건 출원발명의 청구항 2에 보정 전 청구항 5와 9의 구성을 인용하여 한정하고, 청구항 3에 청구항 5의 구성을 병합하고, 그에 따라 보정 전 청구항 4, 5를 삭제하는 등으로 정정하는 보정을 하여 재심사를 청구하였다. 그러나 특허청 심사관은 2021. 11. 18. '보정된 청구항들을 재심사한 결과 여전히 선행발명 1, 2, 3의 결합에 의해 진보성이 부정되어 거절이유가 해소되지 않았다'는 이유로 이 사건 출원발명의 청구항 2, 3, 6 내지 9에 대하여 특허거절결정을 하였다.

4) 원고는 2021. 12. 17. 특허심판원에 위 재심사 거절결정에 대한 불복심판을 청구하였고(2021원3203), 특허심판원은 2022. 2. 24. '이 사건 출원발명은 통상의 기술자가 선행발명 1, 2, 3의 결합으로부터 쉽게 생각하여 예측해낼 수 있는 정도여서 진보성이 부정된다'는 이유로 원고의 심판청구를 기각하는 이 사건 심결을 하였다.

[인정근거] 다툼 없는 사실, 갑 제1 내지 13, 18호증, 을 제1, 2, 3, 6, 7, 9, 27호증 각 기재(가지번호 있는 것은 각 가지번호 포함, 이하 같다), 변론 전체 취지

2. 당사자 주장의 요지

가. 원고

1) 이 사건 제2항 발명 중 'COVID-19 항원용 단백질이 Y449A, N487A, Q493A,

N501G, Y505G, R683G, R685G, R815G, K986P, V987P로 치환'되는 구성은 선행발명 1, 2, 3에 제시되거나 암시되어 있지 아니하다. 즉, 스파이크 단백질의 ① 수용체-결합 영역(Receptor-Binding Domain; RBD) 중 493번 위치 글루타민(Q)을 알라닌(A)으로, 501, 505번 위치의 아스파라긴(N), 티로신(Y)을 글라이신(G)으로 치환하는 구성, ② S1/S2 퓨린(furin) 절단 부위 중 683, 685번 위치만 선택해 아르기닌(R)을 글라이신(G)으로 치환하는 구성, ③ S2' 절단 부위인 815번 위치의 잔기를 치환하는 구성에 관한 기재나 암시가 없다.

2) 이 사건 제2항 발명에서 "(상기 유전자 서열은) CMV 프로모터, Kozak 서열, IgM signal 펩타이드 서열, 표적 항원, BGH poly(A) tail 및 연속 2개의 SV40 인핸서의 순서로 배열된 재조합 벡터에 표적 항원으로 포함되고, 상기 재조합 벡터는 COVID-19 유전자 백신용 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는" 부분(이하 '이 사건 재조합 벡터 부분'이라 한다)은 이 사건 제2항 발명의 기술적 구성요소에 해당한다. 이러한 구성은 선행발명 1, 2, 3에 제시되거나 암시되어 있지 않고, 원고 특허 제2216078호(갑 제13호증, 이하 '원고 관련 특허'라 한다)로 등록되어 이미 진보성을 인정받은 바 있다.

3) 이 사건 제2항 발명은 통상의 기술자가 선행발명 1, 2, 3을 결합하여 쉽게 생각해 낼 수 없고, 선행발명에서 예측할 수 없는 현저한 효과를 가지므로, 진보성이 부정되지 아니한다.

나. 피고

1) 이 사건 제2항 발명은 'DNA 단편'에 관한 발명이고, 이것이 표적 항원으로 포함되는 재조합 벡터에 관한 기재는 DNA 단편 자체의 기술적 구성요소라 볼 수 없다.

2) 선행발명 1과 그 참고문헌에 S1/S2 퓨린 절단 부위(682~686번)의 아르기닌(R)이

글라이신(G)으로 변이·치환되는 구성, S' 절단 부위(815번)의 위치가 개시되어 있고, 선행발명 2, 3에 RBD 중 449, 487, 493, 501, 505번 위치의 잔기를 치환하는 구성이 개시 또는 암시되어 있다. 변이가 필요하다고 인식된 부위의 아미노산 잔기를 구조가 간단한 비극성 아미노산인 알라닌(A)이나 글라이신(G)으로 바꾸는 것은 통상적 시도에 불과하다.

3) 이 사건 제2항 발명에 선행발명에서 예측할 수 없는 현저한 효과가 있다고 볼 수도 없다. 결국 이 사건 제2항 발명은 통상의 기술자가 선행발명 1, 2, 3을 결합하여 쉽게 발명할 수 있으므로 진보성이 부정된다.

3. 이 사건 심결의 위법 여부

가. 관련 법리

어느 특허발명의 청구범위에 기재된 청구항이 복수의 구성요소로 되어 있는 경우는 각 구성요소가 유기적으로 결합한 전체로서의 기술사상이 진보성 판단의 대상이 되는 것이지 각 구성요소가 독립하여 진보성 판단 대상이 되는 것은 아니므로, 그 특허발명의 진보성을 판단할 때는 청구항에 기재된 복수의 구성을 분해한 후 분해된 개별 구성요소들이 공지된 것인지만 따져서는 안 되고, 특유의 과제 해결원리에 기초해 유기적으로 결합된 전체로서 구성의 곤란성을 따져야 하며, 이때 결합된 전체 구성으로서의 발명이 갖는 특유한 효과도 함께 고려하여야 한다.

그리고 여러 선행기술문헌을 인용하여 특허발명의 진보성을 판단할 때는 인용되는 기술을 조합 또는 결합하면 그 특허발명에 이를 수 있다는 암시, 동기 등이 선행기술문헌에 제시되어 있거나 그렇지 않더라도 특허발명 출원 당시의 기술수준, 기술상식, 그 기술분야의 기본적 과제, 발전경향, 업계의 요구 등에 비추어 통상의 기술자가 쉽게

그러한 결합에 이를 수 있다고 인정할 수 있으면 해당 특허발명의 진보성이 부정된다 (대법원 2007. 9. 6. 선고 2005후3284 판결 참조).

나. 이 사건 제2항 발명의 청구범위 해석

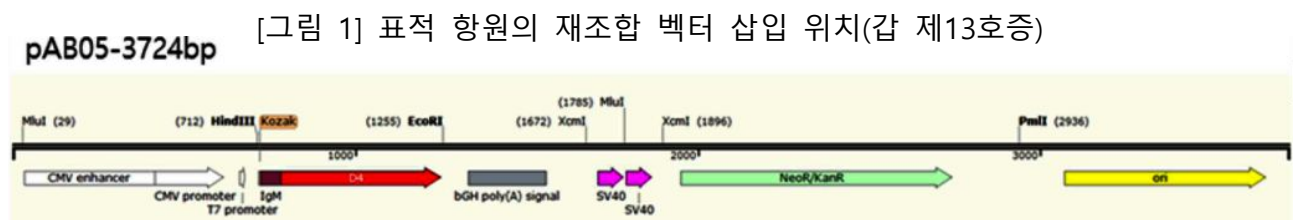
원고는 이 사건 재조합 벡터 부분이 이 사건 제2항 발명의 기술적 구성요소라고 주장한다. 그러나 앞서 인정한 사실, 앞서 든 증거 및 변론 전체 취지로 알 수 있는 다음 사정에 비추어 보면, 이 사건 재조합 벡터 부분은 이 사건 제2항 발명의 기술적 구성요소라고 볼 수 없다.

1) 이 사건 제2항 발명이 보호받으려는 사항은 '(서열번호 4의 유전자 서열로 이루어진, COVID-19 유전자 백신용) DNA 단편'이다.

2) 여기서 '벡터(vector)'는 외래 유전물질을 인위적으로 운반할 때 사용되는 DNA 분자로, 플라스미드, 박테리오파지, 바이러스 등이 사용된다(원고 관련 특허 식별번호 [0003, 0006] 참조). '재조합 벡터(recombinant vector)'란 형질전환(transformation) 등 유전자 재조합(genetic recombination)에 의하여 그러한 벡터를 제조하였음을 의미한다(원고 관련 특허 식별번호 [0042]). 운반체인 벡터는 거기에 삽입해 운반하려고 하는 유전물질(유전자 백신용 항원 유전자 등)과는 구별된다.

3) 원고 관련 특허는 "순차적으로 배열된 CMV 프로모터, Kozak 서열, IgM signal 펩타이드 서열, 표적 항원 및 BGH poly(A) tail 서열; 및 1개 또는 2개의 SV40 인핸서 서열;을 포함하고, 상기 SV40 인핸서 서열은, BGH poly(A) tail 뒤에 1개 위치하거나, CMV 프로모터 앞에 연속적으로 2개 또는 BGH poly(A) tail 뒤에 연속적으로 2개 위치하거나, 또는 CMV 프로모터 앞과 BGH poly(A) tail 뒤에 각각 1개 위치하는 것인, 유전자 백신용 항원 유전자를 전달하기 위한, 발현 벡터"(청구항 제1항) 등을 청구범위로

한다. 여기서 "표적 항원" 부분에는 무엇에 대한 백신을 만들려고 하는지에 따라 다른 항원이 들어갈 수 있다. 병원체 항원분자일 수 있고, 원고 관련 특허에서는 위 벡터에 '탄저균 D4 항원'을 삽입한 예를 들었다(원고 관련 특허 식별번호 [0016, 0022, 0072]). [그림 1](원고 관련 특허 도면 3 마지막 그림)은 표적 항원(붉은 색 화살표 "D4" 부분)이 재조합 벡터에 삽입되는 위치를 표현한 모식도이다.



4) 이 사건 제2항 발명이 바로 "표적 항원" 자리에 들어갈 'DNA 단편'에 해당한다. 이 사건 재조합 벡터 부분은 원고 관련 특허의 기술구성을 모두 가지고 있으므로, 이 사건 제2항 발명은 원고 관련 특허를 이용하는 것이라고 볼 수 있다. 위 모식도에서 "표적 항원" 자리에 '탄저균 D4 항원' 대신 '서열번호 4의 유전자 서열'을 삽입한다는 점이 다를 뿐이다. 원고 관련 특허는 "표적 항원" 자리에 다른 항원이 들어갈 수 있음을 예정하고 있었다(그런데 원고는 서열번호 4의 유전자 서열을 삽입한 '재조합 벡터'까지 별도로 이 사건 출원발명의 청구항 3항으로 청구하고 있다).

5) 이 사건 재조합 벡터 부분은 이 사건 제2항 발명으로 보호받으려고 하는 'DNA 단편'을 어떤 방법으로 유전자 백신으로 쓰는지에 관한 용법을 기재한 것에 불과하다. 원고는 '이 사건 재조합 벡터 부분이 제조방법을 기재한 것이고, 그로 인해 DNA 단편의 침투효과를 강화하는 효과가 있다'고 주장한다. 그러나 원고도 인정하는 바와 같이 그것이 'DNA 단편' 자체의 제조방법이라 볼 수 없을 뿐 아니라, 그로써 'DNA 단편'의 구조, 즉 서열번호 4의 유전자 서열이 변경되지도 아니므로, 이 사건 재조합 벡터 부분

은 이 사건 제2항 발명의 대상인 'DNA 단편' 자체를 한정하는 기술적 구성요소라고 볼 수 없다(원고와 피고가 언급하지는 않았지만 이 사건 제2항 발명에서 "COVID-19 항원용 단백질을 코딩하는 COVID-19 유전자 백신용"이라는 부분도 위 'DNA 단편'의 용도를 기재한 것에 불과하다).

따라서 이 사건 제2항 발명의 청구범위는, '서열번호 4의 유전자 서열로 이루어진, Y449A, N487A, Q493A, N501G, Y505G, R683G, R685G, R815G, K986P 및 V987P로 치환된 (COVID-19 항원용 단백질을 코딩하는 COVID-19 유전자 백신용) DNA 단편'이라고 해석함이 타당하다.

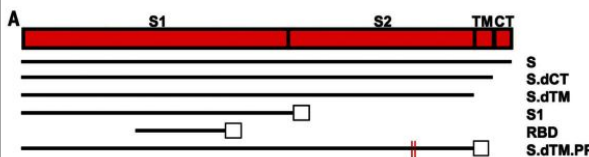
다. 이 사건 제2항 발명과 선행발명 1의 구성요소 대비

이 사건 제2항 발명은 SARS-CoV-2(COVID-19)¹⁰⁾ 스파이크 단백질 아미노산 치환을 통해 항원용 단백질을 코딩하는 유전자 백신용 DNA 단편을 제공함에 목적이 있는 발명이다[이 사건 출원발명 최종 명세서(이하 '최종 명세서'라 한다) 식별번호 [0001, 0007, 0011] 참조]. 선행발명 1은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 여섯 종류 변이체인 프로토타입 DNA 백신 후보군을 개발하고, 히말라야 원숭이에 대한 공격 후 방어 시험(challenge)을 통해 그 후보들의 면역원성과 보호효능을 평가하기 위한 논문이다(논문 806쪽). 따라서 기술분야와 발명의 목적이 공통된다.

앞서 본 바와 같은 청구범위 해석을 바탕으로, 이 사건 제2항 발명의 구성요소에 대응되는 선행발명 1의 구성요소를 대비하면 다음 표와 같다.

(표 삽입을 위한 여백)

10) COVID-19는 세계보건기구(WHO)가 SARS-CoV-2(사스코로나바이러스-2)에 의한 '질병'에 붙인 이름이다.

구성 요소	이 사건 제2항 발명	선행발명 1
1	서열번호 4의 유전자 서열로 이루어진, (COVID-19 항원용 단백질을 코딩하는 COVID-19 유전자 백신용) DNA 단편	SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 변이체 여섯 종류(도면 1. A) 
2	Y449A, N487A, Q493A, N501G, Y505G, R683G, R685G, R815G, K986P, V987P 로 치환	S1/S2 퓨린 절단 부위 682-685의 GSAS 치환, 잔기 986, 987의 프롤린(P) 치환(참고문헌 13)

라. 공통점과 차이점 분석

1) 공통점

선행발명 1이 유전자 서열을 모두 기재하고 있지 않은 반면, 이 사건 제2항 발명의 구성요소 1은 DNA 단편의 유전자 서열을 서열번호 4로 구체적으로 제시하고 있다. 그러나 이는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 아미노산 일부를 구성요소 2 기재처럼 치환한 것인바(최종 명세서 식별번호 [0043, 0049]), 그 치환된 부분 중 뒤에서 보는 차이점을 제외한 나머지 서열은 공통된다(K986P, V987P 치환도 공통¹¹⁾). SARS-CoV-2의 유전자 서열은 2020년 2월경 공개되었고,¹²⁾ 전 세계 과학자들이 그 직후부터 이를 토대로 많은 연구결과를 내놓기 시작하였음은 여러 사람이 두루 아는 사실이다.

2) 차이점 1

이 사건 제2항 발명의 구성요소 2 중 Y449A, N487A, Q493A, N501G, Y505G로 치환하는 구성은 선행발명 1에 개시되어 있지 않다(이하 '차이점 1'이라 한다).

11) 참고문헌 12 도면 1. A 및 참고문헌 13 'Supplementary Materials' 부분 참조.

12) Roujian Lu et al., "Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding", Lancet 395, 565-574 (2020) 등.

3) 차이점 2

이 사건 제2항 발명은 구성요소 2에서 S1/S2 퓨린 절단 부위를 R683G, R685G로 치환했는데, 선행발명 1의 변이체 S.dTM.PP(후술)는 퓨린 절단 부위를 삭제한 점, 참고 문헌 13은 682, 684번 위치까지 치환하고 683, 685번 위치 아르기닌(R)을 [글라이신(G)이 아닌] 세린(S)으로 치환했다는 점에서 차이가 있다(이하 '차이점 2'라 한다).

4) 차이점 3

이 사건 제2항 발명의 구성요소 2 중 S2' 절단 부위에서 R815G로 치환하는 구성은 선행발명 1에 개시되어 있지 않다(이하 '차이점 3'이라 한다).

마. 차이점 검토

1) 차이점 1

앞서 인정한 사실, 앞서 든 증거, 을 제12, 13, 21 내지 24호증 각 기재 및 변론 전체 취지를 종합하여 알 수 있는 다음 사정에 비추어 보면, 차이점 1은 통상의 기술자가 선행발명 1에 선행발명 2, 3을 결합하여 쉽게 극복할 수 있다.

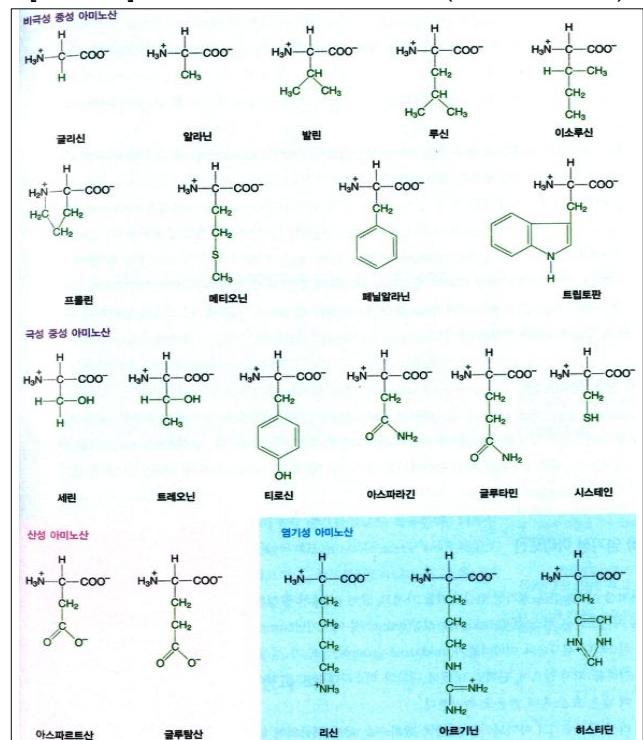
① 선행발명 2는 SARS-CoV-2에 대항하는 약물개발을 위한 기초자료로서 SARS-CoV-2 수용체 결합의 구조적 기초에 관한 정보를 제공하기 위한 논문이고, 선행발명 3은 SARS-CoV-2 수용체 인식을 목표로 하는 중재(intervention) 전략을 위한 지침을 제공하고자 SARS-CoV-2, SARS-CoV, RaTG13 사이에 ACE2와 결합 친화도를 비교한 논문이다. 위 논문들은 스파이크 단백질에 의해 매개되는 바이러스 진입 단계에서, ACE2와 결합하는 부분인 RBD 중 수용체-결합 모티프(Receptor-Binding Motif; RBM) 잔기의 변이가 ACE2 결합력을 낮출 수 있음을 보여주고 있다. 선행발명 2, 3도 기술 분야 및 발명의 목적이 이 사건 제2항 발명, 선행발명 1과 일부 공통된다.

② 선행발명 2에는 RBM 일부를 Y449A, N487A, Y489A, N501A, Y505A로 치환하는 구성이 ACE2의 결합 강도를 교란한다는 점, 493번 위치가 수용체 결합에 관여한다는 점¹³⁾이 개시되어 있다. 선행발명 3에는 Q493N, Q493Y, N501T로의 변이가 ACE2 결합 친화도를 낮춘다는 것이 개시되어 있다.

차이점 1 중 Y449A, N487A는 선행발명 2에 완전히 개시되어 있다. 나머지 Q493A, N501G, Y505G와 관련하여, 선행발명 2, 3에서는 493번 위치의 글루타민(Q)이

[알라닌(A)이 아닌] 아스파라긴(N), 티로신(Y)으로, 501, 505번 위치의 아스파라긴(N), 티로신(Y)이 [글라이신(G)이 아닌] 알라닌(A), 트레오닌(T)으로 각 치환·변이된 점이 다르나, 이 사건 제2항 발명이 채택한 글라이신(G), 알라닌(A)은 아미노산 중 구조가 가장 간단한 비극성 아미노산에 해당하여 통상의 기술자가 가장 먼저, 쉽게 고려할 수 있는 선택지에 속한다([그림 2] 참조).¹⁴⁾

[그림 2] 표준 아미노산 구조식(을 제13호증)



③ 이 사건 출원발명 원출원일 이전에 특정 위치의 아미노산에 돌연변이를 유발하여 알라닌으로 치환하는 방법인 알라닌 스캐닝이, 위 발명이 속한 미생물학, 분자생물학 등 기술분야에서 널리 행해지고 있었다[을 제12호증(1997년 논문), 을 제21호증

13) 3쪽 도면 1. A의 β9 아래 ★ 부분 "Q"가 순서상 493번 위치에 해당한다. 9쪽 Table 2.에도 명시되어 있다.

14) 원고도 이 사건 출원발명이 속한 기술분야에서 '아미노산 치환 무위의 결합력을 저해시키기 위한 목적으로 아미노산을 치환할 때는 주로 알라닌(A)과 글라이신(G)을 사용한다'는 점을 다투지 아니한다(2022. 9. 26. 자 준비서면 8쪽).

참조]. 단백질 복합체를 형성할 때 각 도메인의 기능을 방해하지 않으면서 유연한 링커를 제공하기 위해 글라이신을 도입할 수 있다는 것도 2012년경 이미 알려져 있었다(을 제22, 23호증).

원고는 '449, 487, 493, 501, 505, 683, 685, 815번 위치까지 총 여덟 군데, 또는 그보다 많은 잔기를 알라닌(A)이나 글라이신(G)으로 치환하는 조합은 256개($= 2^8$) 이상'이므로, 그중 뛰어난 1개 조합을 선택하는 것이 쉽지 않다'고 주장한다. 그러나 이 사건 출원발명 당시 알라닌 스캐닝 등 아미노산 잔기를 쉽게 치환하는 방법이 보편화되어 있었던 이상 여러 조합으로 치환을 시도하는 것이 특별히 곤란했다고 볼 수 없다.

④ SARS-CoV-2 수용체와 밀접하게 상호작용하는 RBM의 위치가 449, 487, 493, 501, 505번으로 알려진 이상 통상의 기술자라면 해당 위치 잔기부터 치환하려 시도할 것이고,¹⁵⁾ 알라닌(A) 또는 글라이신(G)으로 치환을 먼저 고려할 것이다. 따라서 차이점 1은 통상의 기술자의 일반적인 창작능력 범위 내에 있어 기술적 어려움이 없다.

2) 차이점 2

앞서 인정한 사실, 앞서 든 증거 및 변론 전체 취지를 종합하여 알 수 있는 다음 사정에 비추어 보면, 차이점 2는 통상의 기술자가 쉽게 극복할 수 있다.

① 선행발명 1에는 S.dTM.PP(퓨린 절단 부위 삭제, 두 개의 프롤린 치환,¹⁶⁾ 폴돈 삼량체 태그를 한, 융합 전 안정화된 가용성 세포외도메인)¹⁷⁾의 경우, 퓨린 절단 부위 돌연변이로 인해 분비 단백질의 가수분해 절단(proteolytic cleavage)이 일어나지 않은

15) 선행발명 3은 493, 455, 501번 위치 잔기가, 수용체 인식에 중요한 '핫스팟(hotspot)'의 안정화에 관여함을 개시하고 있다(223쪽, 도면 2a).

16) 앞서 본 K986P, V987P 치환으로, 구성요소 대비표 그림의 S.dTM.PP 중간에 두 줄 빨간 선으로 표시한 부분에 해당한다.

17) "prefusion-stabilized soluble ectodomain with deletion of the furin cleavage site, two proline mutations, and a foldon trimerization tag"을 줄여 S.dTM.PP로 표시한 것이다.

것으로 추정된다는 기재가 있고, 백신이 효과적으로 기능하려면 그와 같은 안정화가 중요하다는 취지의 기재가 있다. 참고문헌 12에는 바이러스가 RBD에서는 쉽게 항체-회피 돌연변이를 만들 수 있어 융합 전 안정화된 S 단백질 세포외도메인의 생산능력이 중요할 것이라는 내용이 있다. 이 사건 출원발명 원출원일 전인 2020. 9. 28. 공개된 논문(을 제24호증)¹⁸⁾에는 안정화 치환, 즉 퓨린 절단 부위의 변이와 S2의 경첩 영역(hinge region)에 있는 연속 두 개의 프롤린이 중화항체가를 높인다는 내용이 있다.

참고문헌 11에는 퓨린 절단 부위의 752 내지 756번 위치 RRKRR을 GGSGS로 치환하는 구성,¹⁹⁾ 참고문헌 12에는 퓨린 절단 부위의 748 내지 751번 위치 RSVR을 ASVG로 치환하는 구성, 참고문헌 13에는 퓨린 절단 부위 중 682 내지 685번 위치의 아미노산 잔기를 GSAS로 치환하는 구성 등이 개시되어 있다. 즉, 원고가 시도한 683, 685번 위치의 치환이 개시되어 있다.

② 원고는 '퓨린 절단 부위의 683, 685번 위치가 항원 안정성 확보에 가장 중요하다고 판단하였기 때문에 두 곳만 치환하였고, 선행발명 1 등에는 특정 위치가 다른 위치보다 더 중요하다는 기재나 암시가 없다'고 주장한다. 그러나 이 사건 출원발명의 명세서 어디에도 683, 685번 위치의 치환이 항원의 안정성에 영향을 미친다는 내용이 없고, 그러한 효과가 확인되지도 아니한다.

그렇다면 잔기 치환의 후보로 알려진 위치 중 일부만 글라이신(G)으로 치환하는

18) Rinke Bos et al., "Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses", npj Vaccines 5, 91 (2020).

19) 원고는 참고문헌 11이 COVID-19 전의 코로나 바이러스에 관한 연구라고 지적한다(2022. 4. 18. 자 준비서면 10쪽). 그러나 참고문헌 11의 저자들이 '(HKU1 바이러스에 관한) 우리 연구는 SARS-CoV, MERS-CoV 등 다른 베타코로나바이러스 일반에도 적용될 수 있다'고 쓰고 있는 것처럼(120쪽 왼쪽 하단), 같은 계통 코로나바이러스 사이에는 상동성이 높아서 통상의 기술자가 참고문헌 11을 기초로도 퓨린 절단 부위의 중요성을 충분히 인식할 수 있다고 봄이 타당하다. 선행발명 2에도 '지난 6개월 동안 RCSB PDB(단백질 데이터 뱅크) 등에 보고된 구조 데이터는 SARS CoV-2 RBD와 SARS CoV RBD가 거의 같은 결합면을 공유한다는 이전의 발견을 뒷받침한다'는 기재가 있다(2쪽 왼쪽 중간 부분). SARS-CoV와 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질을 비교한 [그림 5]도 참조.

것은, 통상의 기술자가 구체적인 개시나 암시가 없더라도 쉽게 시도할 수 있는 범위 내에 있다.

③ 원고는 '선행발명 어디에도 RBM 부위 치환과 퓨린 절단 부위 치환의 결합에 관한 기재나 암시가 없다'고도 주장한다. 그러나 위에서 본 바와 같이 RBD에서는 쉽게 면역 회피 돌연변이가 생길 수 있어 퓨린 절단 부위 및 프롤린 치환을 통한 안정화가 중요하다는 내용이 이미 개시되어 있다. 선행발명 2, 3에 실시례나 실험데이터가 없다는 것만으로 결합의 동기가 없다고 볼 수도 없다.

3) 차이점 3

앞서 인정한 사실, 앞서 든 증거, 을 제5, 10, 11, 25호증의 각 기재 및 변론 전체 취지를 종합하여 알 수 있는 다음 사정에 비추어 보면, 차이점 3은 통상의 기술자가 쉽게 극복할 수 있다.

① 참고문헌 11은 HKU1 바이러스의 901 내지 918 위치에 인접한 2차 절단 부위로서 S2'에 관하여 언급하면서, 도면 6[그림 3]에서 SARS-CoV, MER-CoV의 대응되는 위치를 표시하고 있다.

[그림 3] 참고문헌 11, S2' 절단 부위(갑 제10호증, 을 제6호증)

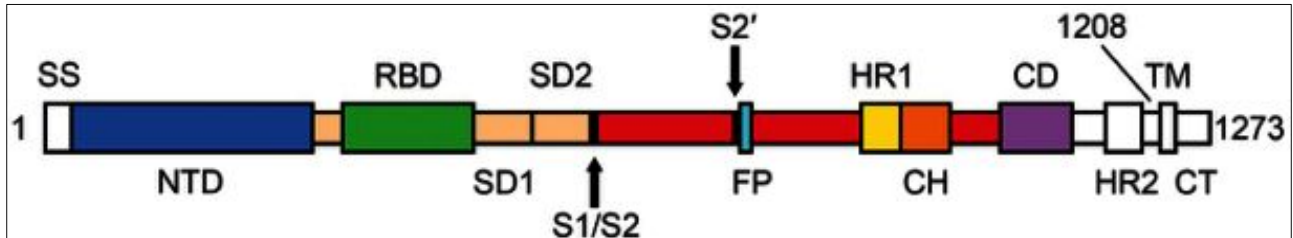
[illegible]

참고문헌 13의 도면 1. A.[그림 4]과, 이 사건 출원발명 원출원일 전인 2020. 6.
2. 온라인 공개된 논문(을 제5호증)²⁰⁾의 도면 3. A. B.[그림 5]도 S2' 절단 부위 위치를

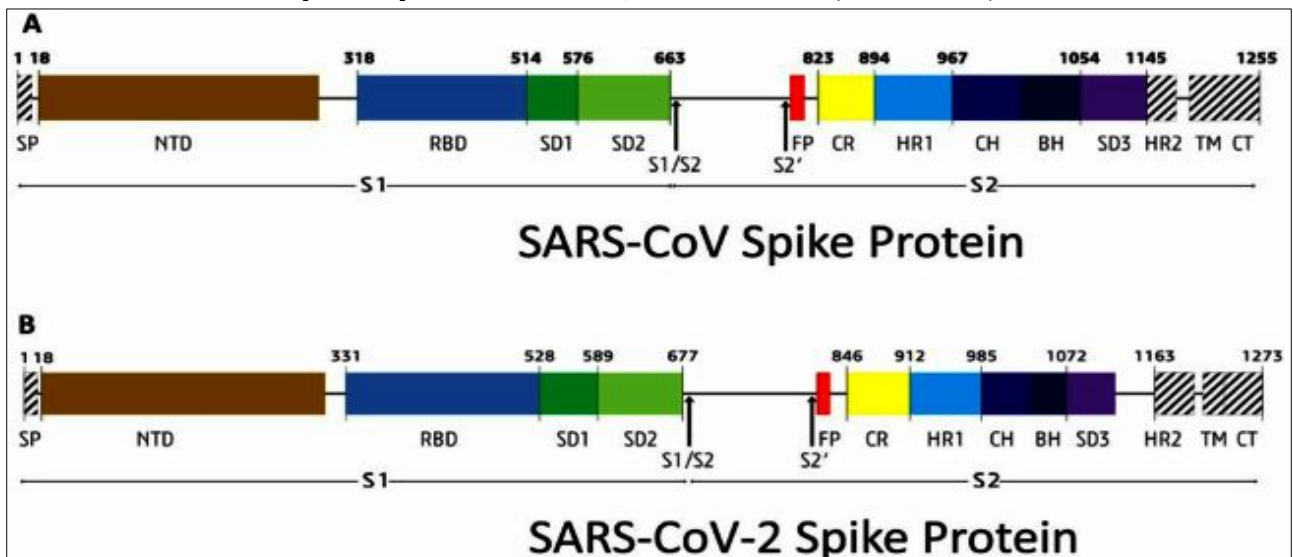
20) Syed Mohammad Lokman et al., "Exploring the genomic and proteomic variations of SARS-CoV-2 spike glycoprotein: A computational biology approach", *Infection, Genetics and Evolution* (2020).

표시하고 있다.

[그림 4] 참고문헌 13, S2' 절단 부위(갑 제12호증, 을 제7호증)



[그림 5] Lockman et al., S2' 절단 부위(을 제5호증)



그리고 이 사건 출원발명 원출원일 전에 반포된 여러 문헌에, SARS-CoV-2가 세포 내로 침투할 때 "S2'(R815 위치) 절단"은 S1/S2 절단이 있는 후 일어나는 것으로 보이고, 원형질막에서 숙주-수용체 결합이 일어나거나 바이러스의 세포 내 이입(endocytosis)이 있기까지는 일어나지 않을 수 있다는 점이 개시되어 있었다(을 제6, 9, 10, 11호증).²¹⁾ S2' 절단에 관여하는 TMPRSS2(transmembrane serine protease 2) 억제제와 S1/S2 절단에 관여하는 퓨린 억제제 MI-1851를 결합하면 SARS-CoV-2에 대하여 더 강력한 항바이러스 활성이 만들어진다는 것도 알려져 있었다(을 제25호증).²²⁾

21) 2020. 9. 17. 온라인 공개된 Donald J. Benton et al., "Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion", Nature 588, 327-330 (을 제10호증); 2020. 10. 5. 온라인 공개된 Canrong Wu et al., "Furin: A potential therapeutic target for COVID-19", iScience 23 (을 제11호증).

② 따라서 통상의 기술자는 S1/S2 퓨린 절단 부위와 함께 S2' 절단 부위 치환을 시도해 볼 것이고, 글라이신(G)으로의 치환은 앞에서 본 바와 같이 통상의 기술자의 일반적인 창작능력 범위 내에 있는 것으로 기술적 어려움이 없다.

③ 이에 대하여 원고는, "참고문헌 12가 S2' 절단 부위의 치환은 불필요하거나 S1/S2 절단 부위에 비해 그 필요성이 낮음을 암시하고 있다."고 주장한다.

참고문헌 12 중 원고가 근거로 든 부분은 "단백질 생합성 중에 퓨린이 S1/S2 부위에는 접근할 수 있는 반면, S2' 부위에는 접근할 수 없는 이유가 아직 밝혀지지 않았다. (...) 우리 구조에서 R887(Arg887)과 S888(Ser888) 사이의 펩타이드 결합은 프로테아제에 접근할 수 없는 상태로 남아 있고, 이는 융합 과정에 S2의 형태변화가 일어나기 전까지는 S2'가 효율적으로 절단될 수 없음을 시사한다."는 부분이다(7351쪽). 그런데 위 내용은 S2의 형태변화가 일어난 뒤에야 S2'가 효율적으로 절단될 수 있다는 의미, 즉 앞서 본 다른 문헌들처럼 S2' 절단은 S1/S2 절단이 있는 후 순차적으로 일어난다는 뜻이고, S2' 절단 부위의 치환 필요성이 없거나 적다는 의미로 해석될 수 없다.

4) 결합의 용이성

앞에서 본 바와 같이 선행발명 1과 선행발명 2, 3은 기술분야와 발명의 목적이 공통되고, 선행기술문헌에 차이점 1, 2, 3에 관한 기재나 암시가 있어 통상의 기술자는 이를 쉽게 극복하고 이 사건 제2항 발명과 같이 8개 아미노산 잔기를 치환하는 구성에 이를 수 있다. 선행발명들에 이러한 조합을 방해하는 부정적인 교시가 있지도 않다.

5) 효과 대비

원고는 '이 사건 제2항 발명에는 선행발명 1, 2, 3에서는 예측할 수 없는 현저한

22) 2020. 7. 23. 온라인 공개된 Dorothea Bestle et al., "TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells", Life Science Alliance 23 (2020).

효과가 있다'고 주장하면서, '이 사건 제2항 발명은 야생형 S 단백질보다 항체가가 약 10배 높게 나타났고, 1:2560 희석배율까지 중화능을 보였으며, 1:40 희석배율까지 95~100% 세포생존율을 나타냈다'는 비교실험결과를 제시한다. '이 사건 제2항 발명의 항체가가 선행발명 1보다 500배 높다'고도 주장한다.

그러나 앞서 인정한 사실, 앞서 든 증거, 갑 제14, 15호증, 을 제4호증 각 기재 및 변론 전체 취지를 종합하여 알 수 있는 다음 사정에 비추어 보면, 원고가 제출한 증거만으로는 이 사건 제2항 발명이 선행발명들에서는 예측할 수 없는 현저한 효과를 가진다고 인정할 수 없다.

① 원고가 비교실험에서 대조군으로 삼은 야생형 단백질(wtCoV) 아미노산 서열을 보면 986, 987번 위치의 아미노산이 각각 라이신(K)과 발린(V)이다.

그런데 참고문헌 13에는 986, 987번 위치 아미노산을 프롤린(P)으로 치환하는데 더해 퓨린 절단 부위를 치환한 구성이 개시되어 있고, 여러 선행기술문헌에 이러한 안정화가 중화항체 형성을 높인다는 점이 개시되어 있다. 원고가 이 사건 제2항 발명의 현저한 효과를 보이려면 프롤린 치환 등 선행발명들에 개시된 부분은 같은 조건으로 놓고 대조한 실험결과를 제시했어야 한다. 예컨대, 선행발명 1의 S.dTM.PP와 대비하여 효과가 우수하다는 점이 증명되어야 한다.

② 이 사건 제2항 발명과 선행발명 1의 효과를 직접 비교할 자료도 부족하다.

이 사건 제2항 발명은 골든 햄스터를 대상으로 실험하였고, 선행발명 1의 실험(도면 1B, 2D)은 히말라야 원숭이에 대한 것으로서 종차가 존재한다. 그런데 히말라야 원숭이는 비인간 영장류로서 인간에 가장 근접한 우수한 모델이라는 평가를 받고 있다(을 제4호증 83쪽). 또한 선행발명 1은 신속한 평가를 위해 프로토타입 DNA 백신으로

실험한 것으로서, 운반체로 pcDNA3.1+ 벡터를 사용하였는바, 이 사건 제2항 발명의 실험에서와 재조합 벡터 구성에 차이가 있다. 그러나 앞서 본 것처럼 이 사건 재조합 벡터 부분은 이 사건 제2항 발명의 기술적 구성요소라 볼 수 없으므로, 효과의 현저성을 판단할 때도 재조합 벡터의 조건을 같게 놓고 비교하여야 한다.

③ 결국 원고가 제시한 자료는 이 사건 제2항 발명이 선행발명들보다 현저한 효과를 갖는지 파악하기에 적합하지 않다.

바. 소결론

이 사건 제2항 발명은 진보성이 부정되어 특허를 받을 수 없다. 특허출원에서 청구범위가 둘 이상 청구항으로 이루어진 경우 어느 한 청구항에라도 거절이유가 있으면 그 출원은 일체로서 거절되어야 한다. 그렇다면 이 사건 출원발명은 나머지 청구항에 관하여 더 나아가 살펴볼 필요 없이 모두 특허를 받을 수 없다.

4. 결론

원고의 심판청구를 기각한 이 사건 심결은 적법하므로, 이 사건 심결 취소를 구하는 원고의 청구는 이유 없어 기각한다.

재판장 판사 문주형

판사 권보원

판사 한지윤

[별지 1]

이 사건 출원발명의 주요 내용

① 기술분야

[0001] 본 발명은 COVID-19 항원용 단백질, 이를 코딩하는 DNA 단편, 이를 포함한 재조합 벡터 및 이로 형질전환된 세포, 이 재조합 벡터의 제조방법 및 이 재조합 벡터를 포함한 유전자 백신용 조성물에 관한 것이다.

② 배경기술

[0004] COVID-19는 베타 코로나 바이러스로 분류되는 약 29kb 크기를 갖는 RNA 유전체를 가지고 있는 바이러스로써 사람에서 강한 전염성을 나타내고 있다. COVID-19가 체내에 침투하여 감염을 일으키는 기작의 주요한 역할을 하는 단백질은 바이러스 표면에 존재하고 있는 스파이크(spike) 단백질이다. 이 표면 단백질은 인간의 호흡기 및 장 점막 등 상피세포에 존재하고 있는 Angiotensin converting enzyme2(ACE2) 수용체와 상호작용에 의해 세포 내로 침투해 들어갈 수 있게 된다. 스파이크 단백질은 크게 S1 그리고 S2 도메인으로 나눌 수 있으며 이는 furin 절단 위치에 의해 구분된다. 스파이크 단백질이 세포 내로 침투하기 위해서는 furin에 의한 절단이 이뤄져야 하고 이로 인해 구조적인 변화가 동반됨으로써 ACE2 수용체와 결합을 통해 바이러스 감염이 이루어진다.

[0006] (...) 그러나 이러한 접근은 대부분 감염 후 치료를 위한 방법으로 COVID-19에 의한 감염을 조기에 예방하기 위한 백신은 아직 개발 중에 있으며 실제 적용된 사례는 없다. COVID-19를 예방하기 위한 백신으로 중국의 경우에는 불활성화 시킨 형태의 백신이 개발되어 임상시험 중에 있기도 하다. 그리고 차세대 백신으로 이전에 많은 환자를 발생시켰던 에볼라나 지카 바이러스에 대한 백신 형태로 유전자 백신이 시도되었던 것과 같이 세계적인 대형 제약사 등을 중심으로 하여 DNA나 RNA와 같은 형태의 유전자를 체내에 전달하는 형태의 백신으로 개발하기 위한 다양한 시도가 진행되고 있으며 일부는 임상시험 중에 있다.

[0007] 본 발명에서는 COVID-19를 예방할 수 있는 백신으로써 COVID-19 바이러스의 스파이크 단백질 또는 뉴클레오캡시드(Nucleocapsid) 단백질의 아미노산 치환을 통해 항원을 제작한 뒤 이를 재조합 벡터를 포함한 유전자 백신으로 개발하고, COVID-19에 대한 방어효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

③ 발명의 내용

【해결하고자 하는 과제】

[0010] 본 발명의 목적은 COVID-19 항원용 단백질을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 COVID-19 항원용 단백질을 코딩하는 DNA 단편을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 DNA 단편을 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 세포를 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 재조합 벡터의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터를 포함한 유전자 백신용 조성물을 제공하는 데 있다.

【과제의 해결 수단】

[0019] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 일 측면에 따르면, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, COVID-19 항원용 단백질을 제공한다.

[0020] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 서열번호 4의 유전자 서열로 이루어지고, COVID-19 항원용 단백질을 코딩하는, DNA 단편을 제공한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 서열번호 4의 유전자 서열로 이루어진 DNA 단편을 포함하는, 재조합 벡터를 제공한다.

[0022] 또한, 상기 재조합 벡터는 상기 유전자 서열을 표적 항원으로 하고, CMV 프로모터, 표적 항원, BGH poly(A) tail, 연속적인 2개의 SV40 인핸서의 순서로 배열된 것일 수 있다.

[0023] 또한, 상기 재조합 벡터는 CMV 프로모터와 표적 항원 사이에 Kozak 서열 및 IgM signal 펩타이드 서열을 더 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 세포를 제공한다.

[0038] COVID-19 항원용 단백질

[0039] 본 발명은, 서열번호 1, 2 및 3으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는, COVID-19 항원용 단백질을 제공한다.

[0040] 본 발명의 COVID-19 항원용 단백질은 COVID-19의 표면 단백질 중 하나인 스파이크 단백질의 아미노산 중 일부를 다른 아미노산으로 치환함으로써, 항원의 세포 내 유입을 용이하게 하고 항원의 안정화를 유지시켜 백신으로 사용될 수 있도록 한 것이다. 즉, 항원 단백질이 세포 표면에 존재하는 수용체와 결합하는 능력을 최소화하여 항체의 생성을 유도함으로써 백신으로 사용될 수 있도록 하고, 스파이크 단백질이 구조적으로 안정할 수 있도록 퓨린에 의한 절단 위치의 아미노산을 치환한 것이다.

[0041] COVID-19 스파이크 단백질을 구성하는 전체서열 중 S1과 S2 도메인을 모두 포함하거나, S1 도메인만을 포함하거나, 또는 S1 도메인과 뉴클레오캡시드 단백질을 포함한다.

[0042] 도 1은 본 발명의 COVID-19 항원용 단백질인 항원의 아미노산 치환 부위를 나타낸 것이고, 도 2는 본 발명의 COVID-19 항원용 단백질인 항원의 삼차원 구조 가상 시뮬레이션을 통해 모델링한 결과로, 구체적인 내용은 다음과 같다.

[0043] 도 1a와 도 2a는 COVID-19 스파이크 단백질의 아미노산에서 N-말단 글루타민 14번부터 C-말단 프롤린 1213 사이에 449번, 487번, 493번 아미노산을 알라닌으로 치환하고 501번, 505번, 683번, 685번, 815번 아미노산을 글라이신으로 치환하고 986번, 987번 아미노산을 프롤린으로 치환한 단백질에 관한 것이고, 이하 '항원 Co1V' 또는 'Co1V'라 하고, 서열번호 1로 나타내었다.

[0047] DNA 단편

[0048] 본 발명은, 서열번호 4, 5 및 6으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나로서, COVID-19 항원용 단백질을 코딩하는, DNA 단편을 제공한다.

[0049] 본 발명의 항원 Co1V를 코딩하는 DNA 단편은 서열번호 4로, 항원 Co2V를 코딩하는 DNA 단편은 서열번호 5로, 항원 Co3V를 코딩하는 DNA 단편은 서열번호 6으로 나타내었다.

[0051] 재조합 벡터

[0052] 본 발명은, 서열번호 4, 5 및 6으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자 서열을 포함하는, 재조합 벡터를 제공한다.

[0053] 본 발명의 재조합 벡터는 유전자 백신으로 사용하기 위해 COVID-19 항원 유전자를 전달하기 위한 플라스미드 벡터이며, 유전자 백신용 항원 서열을 생체 내에 효과적으로 전달하고, 효과적인 발현 및 중화항체 형성을 유도할 수 있다.

[0054] 본 발명의 재조합 벡터는, CMV 프로모터, 표적 항원, BGH poly(A) tail, 연속적인 2개의 SV40 인핸서의 순서로 배열된 것일 수 있다. 상기의 배열 순서는 표적항원을 생체 내에 효과적으로 전달하고, 표적항원의 발현량을 현저히 상승시키며, 중화항체 생성을 유도하여 대상 병원균에 대한 방어효과를 상승시킨다.

[0055] 또한, 상기 재조합 벡터는 CMV 프로모터와 표적 항원 사이에 Kozak 서열 및 IgM signal 펩타이드 서열을 더 포함할 것일 수 있다. 또한, 상기 재조합 벡터는 카나마이신 항생제 마커를 더 포함할 수 있다.

[0056] 도 3에서 도시한 바와 같이, 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, Kozak 서열, IgM signal 펩타이드 서열, 표적 항원, BGH(Bovine Growth Hormone) poly(A) tail, 연속적인 2개의 SV40 인핸서, 카나마이신 항생제 마커의 순서로 배열될 수 있다.

[0066] 유전자 백신용 조성물

[0067] 본 발명은, 상기 재조합 벡터를 포함하는 유전자 백신용 조성물에 관한 것이다. 즉, 본 발명에 의한 유전자 백신용 조성물은, 본 발명에 의한 재조합 벡터를 이용하여 유전자 백신용 항원 서열을 체내로 전달함으로써 효과적인 발현 및 중화 항체 형성을 유도하여 해당 병원체에 대한 방어능력을 개선시킬 수 있다.

[0068] 상기 조성물은, 재조합 벡터 및 담체를 포함하고, 상기 재조합 벡터는 유효성분으로 포함될 수 있다.

[4] 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 실시예 1: COVID-19 항원 제조

[0075] COVID-19는 질병관리본부로부터 분양받아서 사용하였다. COVID-19의 스파이크(Spike) 단백질 및 뉴클레오캡시드(Nucleocapsid) 단백질의 유전자 서열 및 아미노산 서열을 분석한 후, 해당 서열에서 각 도메인의 서열을 확정하였고, furin 절단 부위, ACE2 수용체와의 결합 부위에 해당하는 아미노산을 분석하였다. RCSB(Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) PDB(Protein DataBank)에서 항원으로 제작할 단백질에 대한 삼차원 구조를 획득한 뒤 이를 바탕으로 각 아미노산의 위치를 삼차원 상에서 확인하고 Discovery Studio 4.5 단백질 모델링 프로그램을 이용하여 분석을 진행하였다. 그 결과를 바탕으로 치환할 아미노산을 선정하였고, 치환에 적합한 아미노산으로 치환한 뒤 분석을 반복하여 최종 백신후보 항원 Co3V종에 대한 백신 후보를 상동성 모델링 방법을 통해 최종 항

원을 설계하였다.

[0076] 그 결과, COVID-19 스파이크 단백질의 아미노산에서 N-말단 글루타민 14번부터 C-말단 프롤린 1213번 사이의 449번, 487번, 493번 아미노산을 알라닌으로 치환하고, 501번, 505번, 683번, 685번, 815번 아미노산을 글라이신으로 치환하고, 986번, 987번 아미노산을 프롤린으로 치환하여 항원 Co1V(도 1a, 서열번호 1),

[0077] COVID-19 스파이크 단백질의 아미노산에서 N-말단 글루타민 14번부터 C-말단 알라닌 684번 사이의 449번, 487번, 493번 아미노산을 알라닌으로 치환하고, 501번, 505번, 683번 아미노산을 글라이신으로 치환하여 항원 Co2V(도 1b, 서열번호 2),

[0078] COVID-19 스파이크 단백질의 아미노산에서 N-말단 프롤린 337번부터 C-말단 글루탐산 516번 사이의 449번, 487번, 493번 아미노산을 알라닌으로 치환하고, 501번, 505번 아미노산을 글라이신으로 치환하고, 이어서 뉴클레오캡시드 단백질 N-말단 20번부터 C-말단 글루타민 409번을 포함하는 항원 Co3V(도 1c, 서열번호 3)을 제조하였다.

[0080] 실시예 2: COVID-19 항원을 포함하는 벡터의 제조

[0081] 도 3과 같이, pVAX1 original 벡터를 변형하여 CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, Kozak 서열, IgM signal 펩타이드 서열, COVID-19 항원(이하, Co1V, Co2V, Co3V라고 함, 도면에서는 CoV1, CoV2, CoV3와 혼용함), BGH(Bovine Growth Hormone) poly(A) tail, SV40 enhancer 2개 서열을 순차적으로 포함하는 재조합 벡터를 제작하였다. Kozak 서열 및 IgM signal 펩타이드 서열과 실시예 1에서 제조된 COVID-19의 항원 Co1V, 항원 Co2V, 항원 Co3V의 유전자를 합성하고, Hind III, EcoR I 제한효소로 처리한 후 벡터에 삽입하여 최종적으로 재조합 벡터 3종을 제작하였다.

[0083] 실시예 3: COVID-19 항원을 포함하는 벡터의 발현 확인

[0087] 도 4a는 상기 항원 Co1V로 형질전환된 세포에서 발현된 항원 Co1V의 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 것이고, 도 4b는 항원 Co2V로 형질전환된 세포에서 발현된 항원 Co2V와 Co3V의 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 것이다. 따라서, 도 4a 및 도 4b에 따르면, 항원 Co1V, Co2V, Co3V를 포함하는 재조합 벡터로부터 항원 Co1V, Co2V, Co3V이 발현된 것을 확인할 수 있었다.

[0089] 실시에 4: COVID-19 항원을 포함하는 벡터를 포함한 유전자 백신의 접종

[0090] 상기 실시예 2에서 제조된 3종의 재조합 벡터를 PBS에 녹여 유전자 백신을 제조하고, 200 μ g/head로 시리안 골든 햄스터(수컷, 6-8 주령)를 마취시킨 후, 상기 유전자 백신을 피내주사(ID, intradermal) 방법으로 접종하였다. 유전자 백신 투여 후 BTX ECM-830 electroporator를 이용하여 90V, 20ms length, 3 pulse, 100ms interval 조건으로 자극을 주어 전기천공을 하였다.

[0091] 유전자 백신은 2주 간격으로 총 3회 접종하였고, 3번째 접종 후 2주일 지난 뒤에 6.4x10⁴ PFU/head로 COVID-19 바이러스를 비강으로 투여한 뒤 5일 후에 부검을 통해 폐 손상 및 조직 내 바이러스를 정량하였다. 3번째 면역 후 안와정맥을 통해 채혈을 수행하였고 이로부터 혈청을 분리하여 이하 항체가 측정 및 중화능 확인에 사용하였다.

[0093] 실시에 5: COVID-19 항원을 포함하는 벡터를 포함한 유전자 백신의 항체가 측정

[0094] 유전자 백신을 접종한 햄스터에서 생성된 항체가의 측정을 위하여 실시예 4에서 준비된 혈청에 대해 ELISA 분석을 하였다.

[0097] 도 5에서 확인할 수 있듯이, 실시예 4의 유전자 백신을 접종한 햄스터에서 Co1V, Co2V, Co3V에 대한 항체가 형성된 것을 알 수 있었다. Co1V의 경우에서 가장 높은 항체가가 형성됨을 확인할 수 있었고, Co2V의 경우에는 이보다 약간 낮은 항체가로 약 1x10⁴로 확인되었다. 단, Co3V의 경우에는 항체가가 거의 나타나지 않았다.

[0099] 실시에 6: COVID-19 항원을 포함하는 벡터를 포함한 유전자 백신의 항체 중화능 확인

[0100] 유전자 백신을 접종한 햄스터에서 생성된 항체의 중화능을 확인하기 위하여 실시예 4에서 준비된 혈청을 PRNT(Plaque Reduction Neutralization Test)를 수행하였다. 각 백신마다 5마리의 햄스터를 사용하였고, 개체 간의 차이를 확인하기 위해 따로 분석을 시행하였다.

[0101] 햄스터 혈청을 2% FBS가 포함된 DMEM 배지로 1:20으로 희석한 시료 100 μ l를 준비하고, 도 6과 같이 1: 10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560으로 순차적으로 희석하여 96well 플레이트에 준비하였다. 준비된 혈청에 200TCID₅₀에 해당하는 COVID-19 바이러스 50 μ l를 모든 well에 넣어주었다.

[0103] 도 6에서 확인할 수 있듯이, 바이러스에 감염되지 않고 살아있는 세포(보라색)를 확인할 수 있었다. 개체 간에 일부 차이를 보였으나, 도 6a의 Co1V의 경우에는 1:2560 희석배

울까지 방어가 되는 것으로 확인할 수 있었고, 도 6b의 Co2V는 1:20 희석배율까지 방어되었으며, 도 6c의 Co3V는 거의 방어되지 않는 것으로 나타났다.

[0105] 실시에 7: COVID-19 항체에 대한 세포 생존여부 확인

[0106] 실시예 4에서 유전자 백신을 접종한 햄스터의 혈청과 바이러스를 함께 배양한 후, 바이러스에 감염되지 않고 살아있는 세포를 흡광도 측정을 통하여 확인하였다.

[0108] 도 7에 따르면, Co1V는 1:2560의 희석배율까지 80% 이상의 세포가 살아있는 것으로 나타났고, Co2V는 1:20의 희석배율까지 방어력이 우수하며, Co3V는 방어력을 거의 나타내지 않는 것을 알 수 있다.

[0110] 실시에 8: 실시간 PCR을 이용한 바이러스 양 분석

[0111] 실시예 4의 유전자 백신을 접종한 햄스터에 바이러스를 감염시킨 후 햄스터의 폐에 남아있는 바이러스의 양을 Real-time PCR을 통해 확인하였다.

[0113] 도 8a와 도 8b에 따르면, Co1V의 경우에는 남아있는 바이러스가 거의 확인되지 않는 것으로 나타났고, Co2V와 Co3V도 바이러스만 투여한 군에 대비하여 바이러스가 확연하게 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[도 1a]



[도 1b]



[도 1c]



[별지 2]

서열번호 4

<210> 4

<211> 3600

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> This is the gene (DNA) sequence encoding the protein for COVID-19 antigen (antigen Co1V).

<400> 4

cagtgcgtga acctgaccac cagaacacag ctgcctccag cctacaccaa cagcttcacc	60
agaggcgtgt actaccccga caaggtgttc agatccagcg tgctgcactc taccaggac	120
ctgttcctgc ctttcttcag caacgtgacc tggttccacg ccatccacgt gtccggcacc	180
aatggcacca agagattcga caaccccggtg ctgcccttca acgacggggt gtactttgcc	240
agcaccgaga agtccaacat catcagaggc tggatcttcg gcaccacact ggacagcaag	300
accagagccc tgctgatcgt gaacaacgcc accaacgtgg tcatcaaagt gtgcgagttc	360
cagttctgca acgacccctt cctgggcgtc tactaccaca agaacaacaa gagctggatg	420
gaaagcgagt tccgggtgta cagcagcgcc aacaactgca ccttcgagta cgtgtcccag	480
cctttcctga tggacctgga aggcaagcag ggcaacttca agaacctgcg cgagttcgtg	540
ttcaagaaca tcgacggcta cttcaagatc tacagcaagc acaccctat caacctcgtg	600
cgggatctgc ctcaaggctt ctgggctctt gagcccctgg tggatctgcc catcggcac	660
aacatcaccg ggtttcagac actgctggcc ctgcacagaa gctacctgac acctggcgat	720
agcagctctg gatggacagc tggcgccgct gctactatg tgggatacct gcagcctcgg	780
accttctctg tgaagtacaa cgagaacggc accatcacgg acgccgtgga ttgtgccctt	840
gacctctgca gcgagacaaa gtgcaccctg aagtccttca ccgtggaaaa gggcatctac	900
cagaccagca acttcggggt gcagcccacc gaatccatcg tgcggttccc caatatcacc	960
aatctgtgcc cttcggcgga ggtgttcaat gccaccagat tcgcctctgt gtacgcctgg	1020
aaccggaagc ggatcagcaa ttgcgtggcc gactactccg tgctgtacaa ctccgccagc	1080
ttcagcacct tcaagtgcta cggcgtgtcc cctaccaagc tgaacgacct gtgcttcaca	1140
aacgtgtacg ccgacagctt cgtgatccgg ggagatgaag tgcggcagat tgcccctgga	1200
cagacaggca agatcgccga ctacaactac aagtgcccg acgacttcac cggctgtgtg	1260
attgcctgga acagcaacaa cctggactcc aaagtcggcg gcaacgcaa ctacctgtac	1320
cggctgttca gaaagagcaa cctgaagcct ttcgagcggg acatctccac cgagatctat	1380
caggccggca gcaccccttg taacggcgtg gaaggcttcg cctgctactt tccactggcc	1440
agctacggct ttcagccaac aggcggcgtt ggcgggcagc cttatagagt ggtggtgctg	1500

tccttcgagc tgctgcatgc tcctgccaca gtgtgcggcc ctaagaaaag caccaatctc	1560
gtgaagaaca aatgcgtgaa cttcaacttc aacggcctga ccggcacagg cgtgctgaca	1620
gagagcaaca agaagttcct gccattccag cagttcggcc gggatatcgc cgataccaca	1680
gacgccgtta gagatcccca gacactggaa atcctggaca tcaccccttg cagcttcggc	1740
ggagtgtctg tgatcacccc tggcaccaac accagcaatc aggtggcagt gctgtaccag	1800
gacgtgaact gtaccgaagt gcccgtaggc attcacgccg atcagctgac acctacatgg	1860
cgggtgtact ccaccggcag caatgtgttt cagaccagag ccggctgtct gatcggagcc	1920
gagcacgtga acaatagcta cgagtgcgac atccccatcg gcgctggcat ctgtgccagc	1980
taccagacac agacaaacag ccctagaggc gccggatctg tggcctctca gagcatcatt	2040
gcctacacaa tgagcctggg cgccgagaac agcgtggcct actccaacaa ctctatcgct	2100
atccccacca acttcacat cagcgtgacc acagagatcc tgcctgtgtc catgaccaag	2160
accagcgtgg actgcacat gtacatctgc ggcgattcca ccgagtgtc caacctgtg	2220
ctgcagtacg gcagcttctg cacacagctg aacagagccc tgacagggat cgccgtggaa	2280
caggacaaga acaccaaga ggtgttcgcc caagtgaagc agatctacaa gacccctcct	2340
atcaaggact tcggcggctt caatttcagc cagattctgc ccgatactag caagcccagc	2400
aagggcagct tcatcgagga cctgtgttc aacaaagtga cactggccga cgccggcttc	2460
atcaagcagt atggcgattg tctggcgac attgccgcca gggatctgat ttgcgccag	2520
aagttaacg gactgacagt gctgcctcct ctgtgaccg atgagatgat cgcccagtac	2580
acatctgccc tgctggccgg cacaatcaca agcggctgga catttgagc tggcgtgcc	2640
ctgcagatcc cttttgctat gcagatggcc taccggttca acggcatcgg agtgaccag	2700
aatgtgtgt acgagaacca gaagctgac gccaccagt tcaacagcgc catcggaag	2760
atccaggaca gcctgagcag cacagcaagc gccctgggaa agctgcagga cgtggtcaac	2820
cagaatgtc aggccctgaa caccctggtc aagcagctgt ctagcaact cggcgccatc	2880
agctctgtgc tgaacgatat cctgagcaga ctggaccctc ctgaggccga ggtgcagatc	2940
gacagactga tcacaggcag actgcagagc ctccagacat acgtgacca gcagctgatt	3000
agagccgccg agatcagagc ctctgccaat ctggccgcca ccaagatgtc tgagtgtgtg	3060
ctgggccaga gcaagagagt ggacttttgc ggcaagggt accacctgat gagcttcct	3120
cagtctgccc ctcacggcgt ggtgtttctg cacgtgacat acgtccccgc tcaagagaag	3180
aatttcacca ccgtccagc catctgccac gacggcaaag cccactttcc tagagaaggc	3240
gtgttcgtgt ccaacggcac ccattggttc gtgacacagc ggaacttcta cgagccccag	3300
atcatcacca ccgacaacac ctctgtgtct ggcaactgcg acgtcgtgat cggcattgtg	3360
aacaataccg tgtacgacct tctgcagccc gagctggaca gcttcaaaga ggaactggac	3420
aagtacttta agaaccacac aagccccgac gtggacctgg gcgatatcag cggaatcaat	3480
gccagcgtcg tgaacatcca gaaagagatc gaccggctga acgaggtggc caagaatctg	3540
aacgagagcc tgatcgacct gcaagaactg gggaagtacg agcagtacat caagtggccc	3600. 끝.

선행발명 1의 주요 내용

초록

중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)가 유발한 전 세계적인 코로나바이러스 2019(COVID-19) 대유행은 백신 개발을 생물의학계의 최우선순위로 만들었다. 본 저자들은, 본 연구에서 다양한 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질 형태를 발현하는 일련의 DNA 백신 후보자들을 개발했으며 히말라야 원숭이(Rhesus macaques) 35마리에서 그것을 평가했다. 백신을 맞은 동물들은 체액 및 세포 면역 반응을 보였는데 여기에는 회복 중인 인간이나 SARS-CoV-2에 감염된 히말라야 원숭이와 비슷한 수준의 중화 항체 역가를 포함한다. 백신 접종 후 모든 동물은 SARS-CoV-2에 감염됐으며, 허위 대조군의 바이러스 부하와 비교하여 전장 S 단백질을 암호화하는 백신은 기관지 폐포 세척과 코 점막의 바이러스 부하 중앙값에서 각각 >3.1 및 $>3.7 \log_{10}$ 감소를 보였다. 백신-유도된 중화 항체 역가는 보호 효과와 상관관계가 있으며 이는 보호와 면역의 상관관계를 시사한다. 이러한 데이터는 비인간 영장류에서 SARS-CoV-2에 대한 백신 보호를 입증한다.

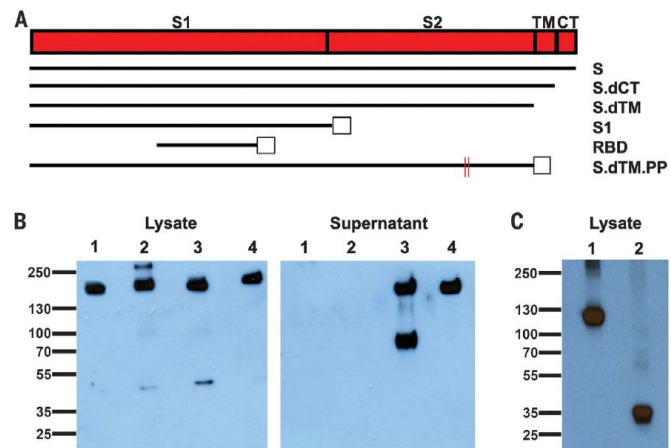
(806쪽 오른쪽)

이 연구에서, 저자들은 다양한 형태의 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질을 발현하는 프로토타입 DNA 백신 세트를 구성하고 히말라야 원숭이에서 SARS-CoV-2 바이러스 감염에 대한 면역원성과 보호 효능을 평가했다.

DNA 백신 후보의 구성 및 면역원성

SARS-CoV-2 S 단백질의 6가지 변형을 발현하는 일련의 프로토타입 DNA 백신을 생산했다: (i) 전장(S), (ii) 세포질 꼬리의 결실(S.dCT), (iii) 가용성 엑토도메인을 반영하는 막관통 도메인 및 세포질 꼬리의 결실(S.dTM), (iv) 폴돈 삼량체 태그가 있는 S1 도메인(S1), (v) 폴돈 삼량체 태그가 있는 수용체 결합 도메인(RBD) 및 (vi) 퓨린 절단 부위 결실, 두 개의 프롤린 돌연변이 및 폴돈 삼량체가 태그된 융합 전 안정화 가용성 엑토도메인(S.dTM.PP)(도 1 A). 웨스턴 블롯 분석 결과 모든 구조에 대한 세포 용해물과 가용성 S.dTM 및 S.dTM.PP의 배양 상청액에서 발현이 확인되었다(도 1, B 및 C). 분비된 단백질의 단백질 가수분해 절단은 S.dTM에서는 나타났으나 S.dTM.PP에서는 보이지 않았으며 이는 S.dTM.PP의 퓨린 절단 부위의 돌연변이에 의한 결과일 것이다.

Fig. 1. Construction of candidate DNA vaccines against SARS-CoV-2. (A) Six DNA vaccines were produced expressing different SARS-CoV-2 spike (S) variants: (i) full length (S), (ii) deletion of the cytoplasmic tail (S.dCT), (iii) deletion of the transmembrane (TM) domain and cytoplasmic tail (CT) reflecting the soluble ectodomain (S.dTM), (iv) S1 domain with a foldon trimerization tag (S1), (v) receptor-binding domain with a foldon trimerization tag (RBD), and (vi) prefusion-stabilized soluble ectodomain with deletion of the furin cleavage site, two proline mutations, and a foldon trimerization tag (S.dTM.PP). Open squares depict foldon trimerization tags; red lines depict proline mutations. (B) Western blot analyses for expression from DNA vaccines encoding S (lane 1), S.dCT (lane 2), S.dTM (lane 3), and S.dTM.PP (lane 4) in cell lysates and culture supernatants using an anti-SARS polyclonal antibody (BEI Resources). (C) Western blot analyses for expression from DNA vaccines encoding S1 (lane 1) and RBD (lane 2) in cell lysates using an anti-SARS-CoV-2 RBD polyclonal antibody (Sino Biological).



35마리의 성체 히말라야 원숭이(6~12세)를 DNA 백신으로 면역화했다: S(N=4), S.dCT(N=4), S.dTM(N=4), S1(N=4), RBD(N=4), S.dTM.P(N=5) 및 허위 대조군(N=10). 동물들은 제 0주 및 제3주에 보조제 없이 근육주사로 5mg의 DNA 백신을 맞았다. 제5주에 부스트 면역 접종 후, 효소결합면역흡착검사(ELISA)(도 2A)에 의해 S-특이적 결합 항체를 관찰하고, 슈도 바이러스 중화 분석(도 2B) 및 활성 바이러스 중화 분석(도 2C)으로 중화 항체(NABs)를 관찰했다. ELISA로 결정된 바에 따르면, 2마리의 동물이 베이스라인에 기타 자연적인 영장류 코로나 바이러스의 교차 반응성을 반영할 수 있는 결합 항체를 가지고 있었다. 슈도바이러스 중화 분석으로 측정한 NAb 역가는 활성 바이러스 중화 분석으로 측정한 NAb 역가와 상관관계가 있다($P < 0.0001$, $R = 0.8052$, 양측 Spearman 순위 상관관계 검정; 도 S1). 또한, 백신 접종한 히말라야 원숭이의 NAb 역가(중앙값 역가=74; S 및 S.dCT 그룹의 중앙값 역가=170)는 9마리의 회복기 히말라야 원숭이 코호트(중앙값 역가=106)와 SARS-CoV-2 감염에서 회복된 27명의 회복기 인간 코호트(중앙값 역가=93)에서의 NAb 역가와 크기가 비슷했다(도 2D).

백신 접종한 히말라야 원숭이의 S-특이적 및 RBD-특이적 항체는 항체 의존성 호중구 식세포 활동(ADNP), 항체 의존성 보체 침전(ADCD), 항체 의존성 단핵구 식세포 활동(ADCP), 항체 의존성 자연 살해(NK) 세포 활성화[인터페론- γ (IFN- γ) 분비, CD107a 탈과립 및 MIP-1 β 발현]를 비롯한 다양한 하위분류 및 효과기 기능을 포함했다(도 2E). 더 높은 ADCD 반응에 대한 추세가 S와 S.dCT군에서 관찰되었으나 RBD와 S.dTM.PP군에서는 더 높은 NK세포 활성화가 관찰되었다. 기능적 및 생체물리학적 항체 특징에 대한 주성분 분석은 상이한 백신군의 중첩을 보여주었으며, S 및 RBD군에서 더욱 뚜렷한 프로필을 보여주었다(도 2E).

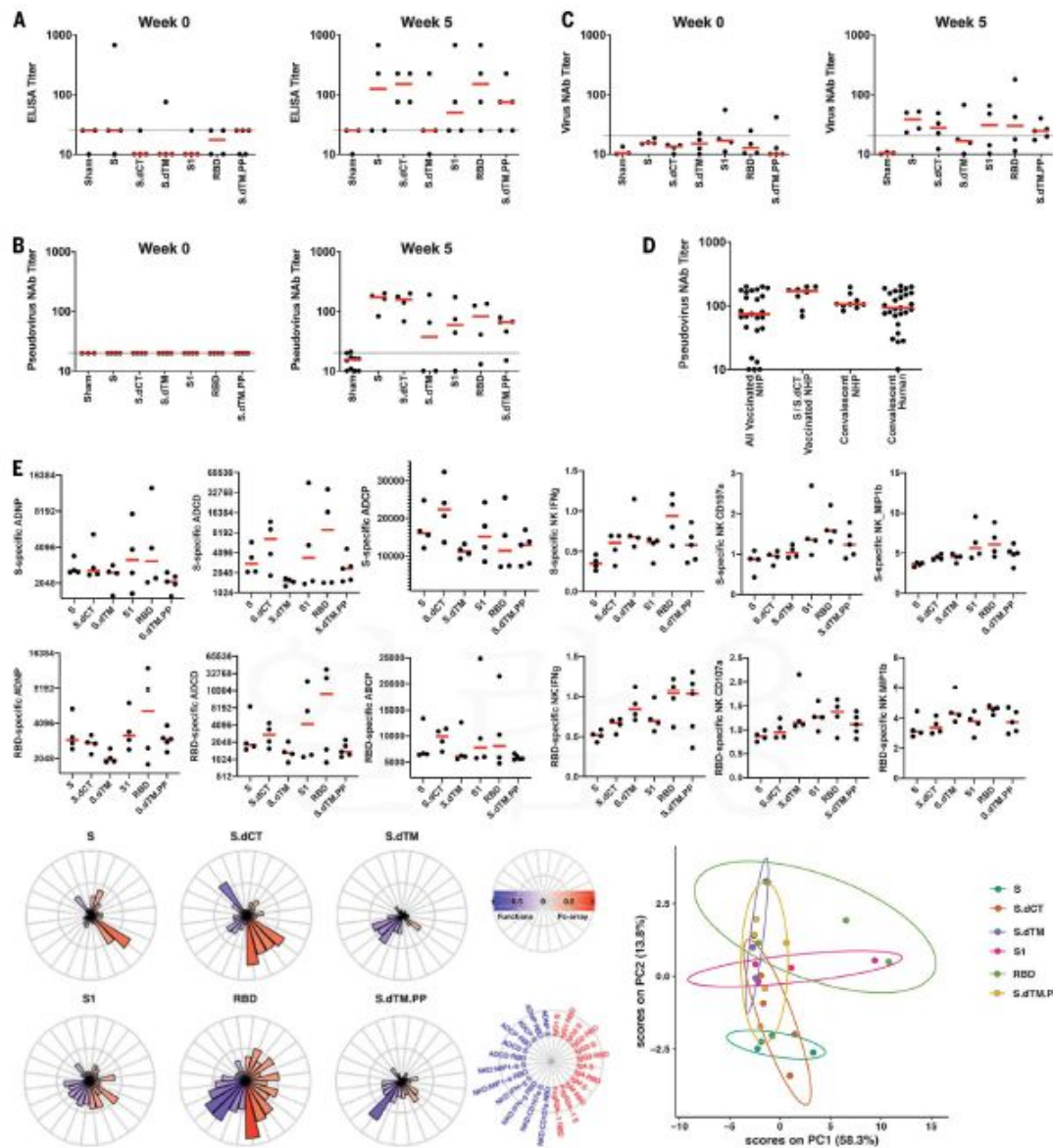
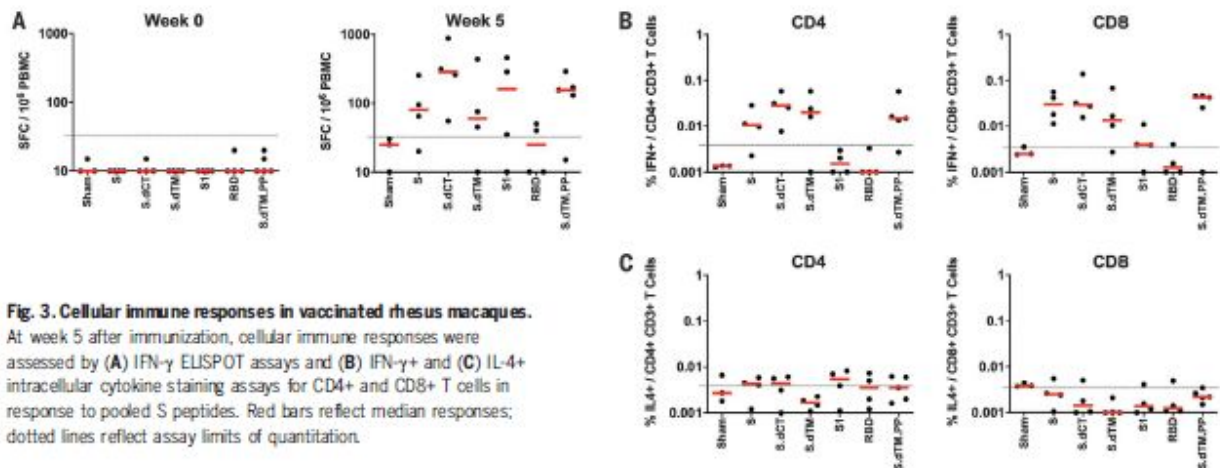


Fig. 2. Humoral immune responses in vaccinated rhesus macaques. (A to C) Humoral immune responses were assessed after immunization by (A) binding antibody ELISA, (B) pseudovirus neutralization assays, and (C) live virus neutralization assays. (D) Comparison of pseudovirus neutralization titers in vaccinated macaques (all animals as well as the S and S.dCT groups), a cohort of 9 convalescent macaques, and a cohort of 27 convalescent humans from Boston, United States, who had recovered from SARS-CoV-2 infection. NHP, nonhuman primates. (E) S- and RBD-specific antibody-dependent neutrophil phagocytosis (ADNP), antibody-dependent complement deposition (ADCD), antibody-dependent monocyte cellular phagocytosis (ADCP), and antibody-

dependent NK cell activation (IFN- γ secretion, CD107a degranulation, and MIP-1 β expression) are shown. Radar plots show the distribution of antibody features across the vaccine groups. The size and color intensity of the wedges indicate the median of the feature for the corresponding group (blue depicts antibody functions; red depicts antibody isotype, subclass, and Fc γ R binding). The principal components analysis (PCA) plot shows the multivariate antibody profiles across groups. Each dot represents an animal, the color of the dot denotes the group, and the ellipses show the distribution of the groups as 70% confidence levels assuming a multivariate normal distribution. In the dot plots above, red bars reflect median responses, and dotted lines reflect assay limits of quantitation.

또한 제5주에 IFN- γ 효소결합 면역흡착 스팟(ELISPOT) 분석을 통해 대부분의 백신 접종 동물에서 폴링된 S 펩타이드에 대한 세포 면역 반응이 관찰되었다(도 3A). 제5주에서의 세포내 사이토카인 염색 분석은, S-특이적 IFN- γ + CD4+ 및 CD8+ T 세포 반응 유도를 보여

주었고, 짧은 S1 및 RBD 면역원에 의해 유도된 반응이 더 낮았다(도 3B). S-특이적 IL-4+ CD4+ 및 CD8+T 세포 반응은 미미했으며(도 3C) 이는 보조 T1(TH1)-편향 세포 면역 반응의 유도를 시사했다.



SARS-CoV-2 감염에 대한 보호 효과

부스트 접종 후 3주가 지난 시점인 제6주에 모든 동물은 SARS-CoV-2의 1.2×10^8 바이러스 입자(VP)[1.1×10^4 플라크 형성 단위(PFU)]를 비강 내 경로에 1ml, 기관 내 경로에 1ml 투여받았다. 감염 후 기관지 폐포 세척(BAL) 및 비강 면봉(NS)에서 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 바이러스 RNA 수치를 평가했다. 바이러스 RNA는 혈장에서 음성으로 나타났으며, 동물들은 가벼운 임상 증상만 보였다. 허위 대조군에서는 높은 수준의 바이러스 RNA가 관찰되었으며, BAL의 경우 6.46(범위=4.81~7.99) \log_{10} RNA 카피/ml의 중앙값 피크 그리고 NS의 경우 6.82(범위=5.96~7.96) \log_{10} RNA 카피/ml의 중앙값 피크를 보였다(도 S2). 백신 군에서 바이러스 RNA의 낮은 수치가 관찰되었으며(도 S3 및 S4), 허위 대조군에 비해 S 백신 접종 동물에서 각각 BAL과 NS 바이러스 RNA 중앙값 피크의 1.92 및 2.16 \log_{10} 감소를 포함한다($P=0.02$ 및 0.04 , 양측 Mann-Whitney 검정)(도 S5). 바이러스 RNA 분석은 PFU 분석으로 확인되었으며, 마찬가지로 허위 대조군에 비해 S 백신 접종 동물에서 낮은 감염성 바이러스 역가를 보여주었다($P=0.04$, 양측 Mann-Whitney 검정)(도 S5).

감염 후 BAL과 NS에서 바이러스 RNA 상당 부분이 주입된 감염 바이러스를 나타내는 것으로 추측했다. 그러므로 비리온으로 포장되지 않는 바이러스 복제 세포 중간체를 반영하는 것으로 믿어지며 따라서 세포 내 바이러스 복제가 추정되는 서브게놈 mRNA(sgmRNA)의 수준도 평가했다. 허위 대조군에서는 높은 수준의 sgmRNA가 관찰되었으며(그림 4A) BAL의

경우 5.35(범위=3.97~6.95) \log_{10} sgRNA 카피/mL의 중앙값 피크 그리고 NS의 경우 6.40(범위=4.91~7.01) \log_{10} sgRNA 카피/면봉의 중앙값 피크를 보였다. 피크 바이러스 부하는 감염 후 제1일~제4일 동안 다양하게 발생했다. 백신군에서 바이러스 RNA의 뚜렷하게 낮은 수치가 관찰되었으며(도 4, B 및 C), 허위 대조군에 비해 S 백신 접종 동물에서 각각 BAL과 NS에서 sgRNA 중앙값 피크의 >3.1 및 $>3.7 \log_{10}$ 감소를 포함한다($P=0.03$ 및 0.01 , 양측 Mann-Whitney 검정)(도 4D). 비록 S.dTM 군에서는 거의 또는 아무 보호도 관찰되지 않았지만, S.dCT, S1, RBD 및 S.dTM.PP를 포함한 기타 백신군에서도 sgRNA의 감소된 수치가 관찰되었고, 이는 앞서 보고된 바와 같이 융합 전 엑토도메인 안정화의 중요성을 확인한다.

고찰

세계적인 코로나 19 대유행을 종식시키기 위해 안전하고 효과적인 SARS-CoV-2 백신이 필요할 수 있다. 여러 백신 후보들이 임상실험을 시작했으며, 다른 많은 백신 후보들이 전 임상 단계에 있다. 그러나 현재까지 동물모델에서 SARS-CoV-2 백신 후보의 보호의 면역 상관관계 및 보호 유효성에 대해서는 알려져 있는 것이 거의 없다. 본 연구에서, 다양한 S 면역원을 발현하는 일련의 프로토타입 DNA 백신을 생성하여 히말라야 원숭이에서 비강 및 기관 내 SARS-CoV-2 감염에 대한 보호 유효성을 평가했다. 허위 대조군과 비교하여 S 면역된 동물에서 각각 BAL과 NS의 바이러스 부하 중앙값이 >3.1 및 $>3.7 \log_{10}$ 로 상당히 감소하는 백신 보호를 입증했다. 보호는 멸균이 아닌, 감염 후 신속한 면역 제어에 의해 매개되는 것처럼 보였다. (...) 이를 요약하자면, SARS-CoV-2로부터 히말라야 원숭이에 대한 효과적인 백신 보호를 입증했고, NAb 역가를 보호를 면역 상관관계로 정의했으며, 이는 인간을 위한 SARS-CoV-2 백신 개발을 가속화할 것이다.

참고문헌 11, 12, 13의 주요 내용

1. 참고문헌 11

(119쪽 왼쪽 넷째 문단) 숙주 프로테아제에 의한 코로나 바이러스 S 단백질의 처리는 진입 과정에서 중요한 역할을 한다. HKU1 S는 단백질 생합성 동안 S1 및 S2 소단위로 절단된다. 이번에 사용된 단백질 제작물이 돌연변이된 것이고 밀도 지도에서 무질서된 상태였을지라도, S1/S2 접합부의 HKU1 S 퓨린-절단 부위는 SD-2 루프에 존재한다(도 3 및 Extended Data 도 6). 퓨린 절단은 SD-2 β -시트에 참여하는 단일 S2 β -가닥을 남길 것이다(도 2d). 코로나바이러스 S 단백질은 또한 바이러스 융합 펩타이드(아미노산 901-918)에 인접한 S2'(Arg900)라고 명명된 2차 절단 부위를 갖고 있다(도 3b 및 Extended Data 도 6). 이는 호흡기 세포융합 바이러스(RSV) 및 에볼라 바이러스의 융합 단백질에서 일어나는 다중 단백질 내 분해(endoproteolytic) 절단 사건과 유사하다. S2'에서의 프로테아제 절단은 S1/S2 절단 후 일어나는 것으로 보이고, 원형질막에서 숙주-수용체 결합이 일어나거나 바이러스의 세포 내 이입(endocytosis)이 발생할 때까지 일어나지 않을 수 있다.

(112쪽 Methods 부분) 단백질 발현 및 정제 HKU1 S를 암호화하는 포유류 코돈 최적화 유전자(분리 N5, NCBI 수탁 Q0ZME7) C-말단 T4 피브리틴 삼량체화 도메인, HRV3C 절단 부위 및 6xHis-태그를 갖는 잔기 1-1276을 합성하고 진행 발현 벡터 pVRC8400에 서브클로닝하였다. S1/S2 퓨린 인식 부위 752-RRKRR-756은 GGSGS로 돌연변이되어 cryoEM 연구에 사용되는 절단되지 않은 제작물을 생성했다.

2. 참고문헌 12

(초록) 여기서 우리는 구조 기반 디자인을 사용하여 코로나바이러스 S 단백질을 항원으로서 최적의 융합 전 형태로 유지하기 위한 일반화 가능한 전략을 개발하고 우리가 공학적으로 제조한 면역원이 MERS-CoV에 대해 높은 중화 항체 역가를 이끌어낼 수 있음을 입증한다. (...) 우리의 연구는 순차적인 수용체 결합 사건을 통한 융합 개시의 잠재적 기전을 제안하고 코로나바이러스 백신의 구조 기반 설계를 위한 토대를 제공한다.

(E7349 왼쪽 둘째 문단) 바이러스 외피 표면의 1차 당단백질인 S 단백질은 자연 감염에 의해 유도된 중화 항체의 주요 표적이며 실험 백신 후보의 주요 항원이다. 그러나 MERS-CoV의 S 단백질 세포외도메인은 다른 S 단백질보다 덜 안정적이고 생산하기가 더 어려우므로 구

조 연구, 항체 분리 연구, 및 소단위 백신 개발은 가용성 RBD 제작물에 집중되어 왔다. 이 접근법의 단점은 코로나바이러스가 RBD에서 항체 회피 돌연변이를 쉽게 생성할 수 있다는 것이다. 따라서, 비-RBD 에피토프 일부를 포함하는 항체 혼합물의 사용은 바람직한 전략이며 에볼라 바이러스 질병의 치료에 성공적으로 사용되었다. 그러나 융합 전 안정화 MERS-CoV S 단백질 생산의 어려움으로 인해 비-RBD 항체가 거의 기술되지 않았으며 그러한 에피토프에 대해 알려진 바가 적다. S2 기둥의 융합 전 형태에 대한 항체는 기둥이 S1 캡보다 더 보존되기 때문에 특히 매력적이다. 따라서 강력한 중화 항체에 의해 인식되는 비-RBD 에피토프의 구조적 특성과 결합된, 고병원성 코로나바이러스로부터 융합 전 안정화된 S 단백질 세포외도메인을 생산하는 능력은 현재 및 새롭게 나타날 코로나바이러스에 대한 광범위한 보호적 치료중재법 개발을 크게 촉진할 것이다. (...) 이 연구에서 우리는 베타코로나바이러스 S 단백질을 융합 전 형태로 유지하기 위한 일반적인 전략을 합리적으로 설계했다. 융합 전 안정화된 MERS-CoV S 단백질(MERS S-2P)은 이량체 수용체 DPP4 및 중화 항체 패널에 대한 고친화성 결합을 유지했으며, 마우스에서 중화 항체의 높은 역가를 도출했다. (...) 종합적으로 이러한 결과는 MERS-CoV 진입 및 항체 매개 중화에 대한 이해를 높이고 미래에 나타날 것으로 예상되는 코로나바이러스를 포함하여 고병원성 코로나바이러스에 대한 백신 항원의 구조 기반 설계를 위한 기반을 제공한다.

(E7350 왼쪽) 융합 전 형태를 유지하는 코로나바이러스 S 단백질 공학 (...) MERS-CoV S2 소단위의 유사한 영역에 단일 프롤린 치환을 도입하면 세포외도메인의 발현 수준이 극적으로 증가했고, 잔기 V1060 및 L1061(이하 “2P”라 함)에서 2개의 연속적인 프롤린 치환은 결과적으로 >50배 수율을 향상시켰다(도 1C와 도 S1A). 음성 염색 EM에 의해 입증된 바와 같이, 2P 변이체는 원형 융합 전 형태를 유지했다(그림 1D). SARS-CoV의 S 단백질(도 1C 및 D, 도 S1B) 및 HCoV-HKU1(도 S1 B 및 C)의 동종 치환도 세포외도메인의 발현 수준을 증가시켰고 형태적 균질성을 개선했다. 따라서 중앙 나선의 시작 부분에 두 개의 연속적인 프롤린 잔기를 도입하는 것은 베타코로나바이러스 S 단백질을 원형 융합 전 형태로 유지하기 위한 보편적인 전략인 것 같다. (...) 종합적으로, 이러한 데이터는 2P 치환이 융합 발생을 방지하지만 S 단백질의 형태를 변경하지는 않는다는 것을 입증한다.

(E7350의 오른쪽 넷째 문단) 표적 세포의 효율적인 감염을 위해 MERS-CoV S 단백질은 막 융합을 촉진하기 위해 2단계 프로테아제 매개 활성화가 필요하다. S1/S2 접합부 퓨린 절단은 바이러스 생산 세포에서 발생하는 반면, 융합 펩타이드의 업스트림인 S2' 부위에서의 절단은

바이러스가 세포 표면이나 엔도솜에 진입하는 동안 발생하며 퓨린, TMPRSS2 및 카텝신 L을 비롯한 여러 단백질분해효소에 의해 매개될 수 있다. 그러나 단백질 생합성 과정에서 퓨린이 S1/S2 자리에는 접근할 수 있지만 S2' 자리에는 접근할 수 없는 이유는 아직 밝혀지지 않았다. S1/S2 퓨린 영역(RSVR)은 돌연변이 유발(ASVG)로 인해 우리 구조에서 절단되지 않은 채로 남아 있으며 우리 구조에서 무질서한 접근 가능한 용매 노출 루프에 있다(그림 4B). 대조적으로, S2' 부위(RSAR)는 노출이 적고, 특히 P1 위치의 Arg887은 융합 펩티드에서 Asp892 및 Phe895와 상호작용한다(그림 4C). 우리의 구조에서 Arg887과 Ser888 사이의 펩티드 결합은 단백질 분해 효소에 접근할 수 없는 상태로 유지되며, 이는 융합 과정 동안 S2에서 구조적 변화가 발생할 때까지 S2'가 효율적으로 절단될 수 없음을 시사한다. DPP4 결합 및 S1 탈락(shedding) 후 HR1의 리폴딩은 그러한 변화를 일으키고 최종 단백질 분해 활성화 단계를 숙주 세포 부착에 연결하여 적절한 시간과 장소에서 S2의 돌이킬 수 없는 리폴딩이 발생하도록 한다. 실제로 가용성 DPP4 수용체와 함께 MERS-CoV 비리온을 배양하면 S2' 부위에서 퓨린 절단 효율이 증가한다.

(E7354 왼쪽 둘째 문단) 융합 전 구조에 대한 클래스 I 바이러스 융합 단백질 공학은 중화에 민감한 형태 및 4차 에피토프의 보존을 통해 면역원성을 크게 향상시킬 수 있다. 이것은 융합 후 RSV F 당단백질 백신 항원의 실패와 융합 전 안정화된 RSV F 당단백질의 가능성으로 예시된다. 최근 MERS-CoV S1 단량체는 마우스에서 RBD 특이적 중화 항체를 유도하고 MERS-CoV로 유발된 폐렴으로부터 히말라야 원숭이를 보호하는 것으로 나타났다. 비-RBD 영역 기반 중화 항체로 유도된 전장 S 항원으로 감작된 동물에서 보호가 개선되었다. 이러한 데이터는 RBD가 위치 가변성을 갖는다는 관찰과 함께 바이러스가 RBD 특이적 항체에 의한 중화를 피하기 위해 여러 메커니즘을 진화시켰음을 시사한다. RBD 서열 가변성은 구조 차폐, 4차 표면 및 중화 민감 부위 일시적인 노출을 허용하는 위치 가변성이 복합적으로 작용된다. 융합 전 안정화 MERS-CoV S 삼량체(S-2P)가 S1 모노머 또는 S WT보다 마우스에서 더 강력한 중화 항체 반응을 이끌어낸다는 우리의 증명은 MERS S-2P가 백신 개발에 선호되는 항원이며 비-RBD 에피토프의 포함 및 유리한 제조 특성으로 인해 더 매력적으로 만들어졌다는 것을 시사한다.

2. 참고문헌 13

(1260쪽 왼쪽 둘째 문단) 2019-nCoV는 조밀하게 글리코실화된 스파이크(S) 단백질을 사용하여 숙주 세포에 진입한다. S 단백질은 바이러스 막과 숙주 세포막을 융합시키기 위해 상당한

구조적 재배열을 겪는 준안정 융합 전 형태로 존재하는 삼량체 클래스 I 융합 단백질이다. 이 과정은 S1 소단위가 숙주 세포 수용체에 결합할 때 시작된다. 수용체 결합은 융합 전 삼량체를 불안정화하여 S1 소단위를 제거하고 S2 소단위를 안정적인 융합 후 형태로 전환한다. 숙주 세포 수용체와 결합하기 위해 S1의 RBD는 수용체 결합의 결정자를 일시적으로 숨기거나 노출시키는 경첩(hinge) 같은 구조적 움직임을 겪는다. 이 두 상태는 “하향” 배열 형태와 “상향” 배열 형태로 불리며, 여기서 하향은 수용체에 접근할 수 없는 상태에 해당하고 상향은 덜 안정적이라고 생각되는 수용체에 접근할 수 있는 상태에 해당한다. S 단백질의 필수적인 기능으로 인해 항체 매개 중화의 표적이 되며 융합 전 S 구조의 특성화는 백신 설계 및 개발을 안내하는 원자 수준의 정보를 제공한다.

(1260쪽 오른쪽 둘째 문단) 2019-nCoV의 첫 번째 보고된 게놈 서열을 기반으로, 우리는 2019-nCoV S 엑토도메인 잔기 1에서 1208까지 표현했으며, 이전의 안정화 전략을 사용하여 다른 베타코로나바이러스 S 단백질에서 유효한 것으로 증명된 C-말단 S2 융합 기구(machinery)에 두 개의 안정화 프롤린 돌연변이를 추가했다.

(1263쪽 왼쪽 셋째 문단) WHO의 PHEIC 선언을 촉발한 2019-nCoV의 급속한 전 세계 확산은 코로나바이러스 백신과 치료제의 긴급한 필요성을 시사한다. 2019-nCoV 스파이크의 원자 수준 구조를 알면 백신 개발을 위한 항원성과 단백질 발현을 개선할 수 있는 추가적인 단백질 공학 활동이 가능할 것이다. 구조 데이터는 또한 바이러스가 유전적 드리프트를 겪으면서 발생할 2019-nCoV 스파이크 돌연변이의 평가를 용이하게 하고 이러한 잔기가 표면 노출을 가지고 있는지 여부를 정의하고 다른 코로나바이러스 스파이크 단백질에 대한 알려진 항체 에피토프의 위치에 매핑하는 데 도움이 될 것이다. 또한 구조는 이 제작물에 의해 생성된 단백질이 균질하고 융합 전 형태여서, 중화 인간 mAb를 분리하기 위한 후보 백신 항원 또는 B 세포 프로브로 사용될 때 가장 중화에 민감한 에피토프를 유지할 것이라는 것을 보증한다. 또한, 원자 수준의 세부 사항은 융합 억제 가능성이 있는 작은 분자의 설계 및 스크리닝을 가능하게 한다. 이 정보는 정밀 백신 설계 및 항바이러스 치료제 발견을 지원하여 의료 대책 개발을 가속화한다.

(부속의 Materials and Methods의 단백질 발현 및 정제) 융합 전 S 엑토도메인을 발현하기 위해 2019-nCoV S(GenBank: MN908947) 잔기 986 및 987에서 프롤린 치환, 퓨린 절단 부위에서 “GSAS” 치환(잔기 682-685), C-말단 T4 피브리틴 삼량체화 모티브, HRV3C 퓨린 절단 부위, TwinStrepTag 및 8XHisTag가 합성되어 포유류에 복제되었다.

선행발명 2의 주요 내용

초록

최근 연구는 바이러스 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인(RBD)에 결합함으로써 숙주 세포에 SARS-CoV-2의 진입을 매개하는 데 안지오텐신 전환효소 II(ACE2)의 역할 및 세포 단백질 분해효소에 의한 후속적인 프라이밍이 감염을 개시함을 발견했다. SARS-CoV 복제 속도와 질병 중증도는 RBD와 ACE2의 결합 친화도성에 의해 제어된다. RBD의 보존 잔기의 변이가 ACE2와의 분자 상호작용에 어떻게 영향을 미치는지 확인하기 위해 ACE2-RBD SARS-CoV-2 복합체(PDB: 6M0J)의 수용체 결합 모티프(RBM)에 5개의 알라닌 변종(즉, Y449A, N487A, Y489A, N501A, Y505A)을 생성했다. 150ns의 전원자 분자 역학(MD) 시뮬레이션을 통해 야생형 및 변종 복합체에서 계산 위치 지정 돌연변이 생성 유도된 역학을 광범위하게 연구했다. In silico 변이 분석에서, ACE2의 SARS-CoV-2 RBD 분자 인식에 필수적인 분자 간 수소 결합 손실 및 기타 비결합 접촉이 밝혀졌으며, 이는 결합면 잔기의 포화 돌연변이 유발 연구에 의해 충분히 입증된다. MD 시뮬레이션 결과는 RBM 모티프가 유연하다는 것을 보여주었는데, 여기서 변종 잔기는 상응하는 야생형 잔기보다 상대적으로 더 이동성이 높다. 주성분 연구를 통한 전반적인 활동 분석은 RBD가 분자 상호작용에 필수적일 수 있는 인간 ACE2 결합면을 향해 돌출된 내향 운동을 보인다는 것을 밝혀냈다. 결론적으로, 본 발견은 이전의 실험 보고서와 일치하고 SARS-CoV-2에 대항하기 위한 새로운 억제제 또는 약물의 개발에 중요한 인간 SARS-CoV-2에 의한 수용체 결합의 구조적 기초에 관한 자세한 정보를 제공한다.

(1쪽 둘째 문단부터)

코로나바이러스는 모든 RNA 바이러스 중 가장 큰 유전체를 가진 포지티브 센스 단일 가닥 RNA 바이러스이며 길이는 26~32Kb이다(Malik et al., 2020). 바이러스 유전체는 뉴클레오캡시드 단백질로 구성된 나선형 캡시드 내부에 가득 차 있으며 추가로 스파이크 단백질, 작은 외피 단백질, 및 막 단백질의 세 가지 주요 구조 단백질로 구성된 외피로 둘러싸여 있다(Li et al., 2020). 이 네 가지 중요한 당단백질은 모든 코로나바이러스의 구조에 크게 기여하며 발병에 중요한 역할을 한다. 특히, 스파이크 단백질은 숙주 세포 용체에 결합하여 숙

주 세포에 대한 코로나바이러스의 진입을 매개하며 바이러스와 숙주의 막을 융합하는 일련의 반응을 촉발한다(Li, 2016). 또한 스파이크 단백질은 넓은 숙주 범위와 바이러스 조직 형성에 필수적인 결정 요인이다.

전자현미경 연구에서 코로나바이러스 스파이크 단백질의 3개 도메인(즉, N 말단 대형 엑토도메인, 중간 막관통영역 및, C 말단 짧은 세포 내 꼬리) 구조를 밝혀냈다. 엑토도메인은 두 가지 기능적 소단위, 즉, 수용체 결합 도메인(RBD)이 있는 S1-소단위 및 막융합 S2-소단위로 구성된다. 스파이크 단백질은 먼저 S1 소단위의 RBD 도메인을 통해 숙주 수용체에 결합하고 S2 소단위의 도움을 받아 숙주와 바이러스막을 융합함으로써 바이러스 유전체를 숙주세포로 매개한다(Li et al., 2005; Liu et al., 2004; Tai et al., 2020). (...) SARS-CoV-2 스파이크의 구조에 대한 최근 보고는 스파이크 단백질의 RBD 도메인이 ACE2의 펩티다아제 도메인에 결합한다는 것을 보여주었다(Wrapp et al., 2020). 또한 SARS-CoV 감염에 대한 숙주의 감수성은 주로 스파이크 단백질의 바이러스 RBD 도메인과 숙주 수용체 ACE2 사이의 친화도에 의해 결정되며, 상호작용과 바이러스 결합에 잠재적으로 관여하는 일부 특정 아미노산 잔기가 있다(Huentelman et al., 2004; Wan et al., 2020; Zhan et al., 2005).

(2쪽 왼쪽 아래부터)

SARS CoV-2 RBD의 고도로 보존된 수용체 결합 모티프는 숙주 세포 수용체 ACE2와의 상호작용을 매개하는 데 필수적이다. 그러나 RBD의 이러한 보존된 잔기에서의 변이가 분자 인식에 어떻게 영향을 미치는지, 그리고 이러한 변이가 ACE2와의 구조, 역학 및 상호작용에 미치는 영향은 잘 설명되지 않았다. 분자 역학 시뮬레이션은 원자 규모에서 단백질 구조, 기능 및 분자 상호작용의 변이 유도 변화를 조사하는 주요 접근 방식이었다(Dehury et al., 2015, 2017; Pan et al., 2019, Dehury et al., 2014). SARS-CoV-2 스파이크 RBD 및 ACE2 복합체의 구조에 대한 더 많은 이해를 제공하기 위해, 실험적인 ACE2-RBD 복합체(PDB: 6M0J)를 사용하여, 전원자 분자 역학 시뮬레이션과 함께 위치 지정 계산 돌연변이 생성을 결합했다. SARS-CoV-2의 RBD와 ACE2의 상호작용에 의해 매개되는 주요 비결합 상호작용을 종합적으로 탐구했고 수용체 결합 부위의 변이가 인식 역학에 영향을 미치는 방식을 밝혀냈다. 본 연구의 결과는 새로운 코로나바이러스 SARS-CoV-2 감염과 싸우기 위한 강력한 약물 또는 억제제의 구조 기반 설계에 유용할 수 있는 원자론적 수준에서의 RBD 스파이크 단백질과 숙주 수용체 결합의 안정성 및 유연성에 대해 심층 이해를 제공한다.

재료 및 방법

[시스템 준비]

SARS-CoV-2에서, 삼량체 스파이크 단백질에 의해 매개되는 바이러스 진입은 그 수명에서 가장 중요한 단계이며 바이러스-세포막 융합 또는 공동 수용체 상호작용을 차단하는 매력적인 치료 중재 지점을 나타낸다. SARS-CoV-2와 다른 인간 코로나바이러스는 바이러스 침입에 필수인 동일한 인간 ACE2 수용체를 공유하는 유사한 감염 메커니즘을 가지고 있다. 그러므로 ACE-RBD 복합체의 실험 결정 구조(PDB ID: 6M0J)를 본 연구의 참조 구조로 사용하였다. (...) 본 연구에서는 SARS-CoV-2 RBD의 3개 보존 부위와 2개 가변 부위에 무작위로 5개의 변종이 도입되었다.

결과 및 고찰

[RBD의 서열 구조 유사성]

(...) SARS-CoV-2 및 SARS-CoV에 대한 ACE2-RBD 경계면 잔기의 서열 구조 분석은 최소한의 변동으로 보존되는 것이 확인되었으며(그림 1(A)), 특히 상호작용에 필수적이라고 알려진 소수성 잔기가 고도로 보존되었다(Lan et al., 2020; Li et al., 2005). 대부분의 아미노산이 고도로 보존되거나 유사한 곁사슬을 공유하는, 두 RBD의 상호작용을 담당하는 결합 부위 잔기는 별(파란색: SARS-CoV 및 녹색: SARS-CoV-2)로 표시된다. RBD의 수용체 결합 모티프는 ACE2(도 1(C))의 발톱 유사 구조의 외부 표면에 결합하는 것을 선호하며 SARS-CoV RBD와 유사한 곁사슬 특성을 공유한다. 주로 바이러스-숙주 결합을 담당하기 때문에 '핫스팟'이라고 주로 불리는 RBD 스파이크 단백질의 RBM 영역 근처에서 다수의 자연 변이가 발생하는데, 이는 SARS-CoV의 숙주 범위를 결정하는 것으로 추정된다. SARS-CoV에서, 여러 아미노산, 즉 Asp442, Leu472, Asn479, Asp480 및 Thr487은 자연선택을 거쳤으며 이는 숙주 수용체 인식, 세포 진입 및 SARS-CoV의 숙주 범위에 필수인 것으로 밝혀졌다(Li, 2008; Wu et al., 2012). 따라서 인간 세포로 SARS-CoV-2 진입을 매개하는 구조적 기반을 제공하는 이러한 복합체의 친화도의 강도에 변이가 영향을 미치는 방식을 이해하는 것이 매우 중요하다.

여기서, SARS-CoV-2으로부터의 ACE2-RBD 복합체의 실험 구조에 기초하여 RBM의 보존된 잔기를 알라닌으로 변이 후 분자 역학을 수행했다. 시뮬레이션 실험(도 2 및 S1)을 수행하여 ACE2-RBD 잔기 상호작용의 안정성을 측정하였다.

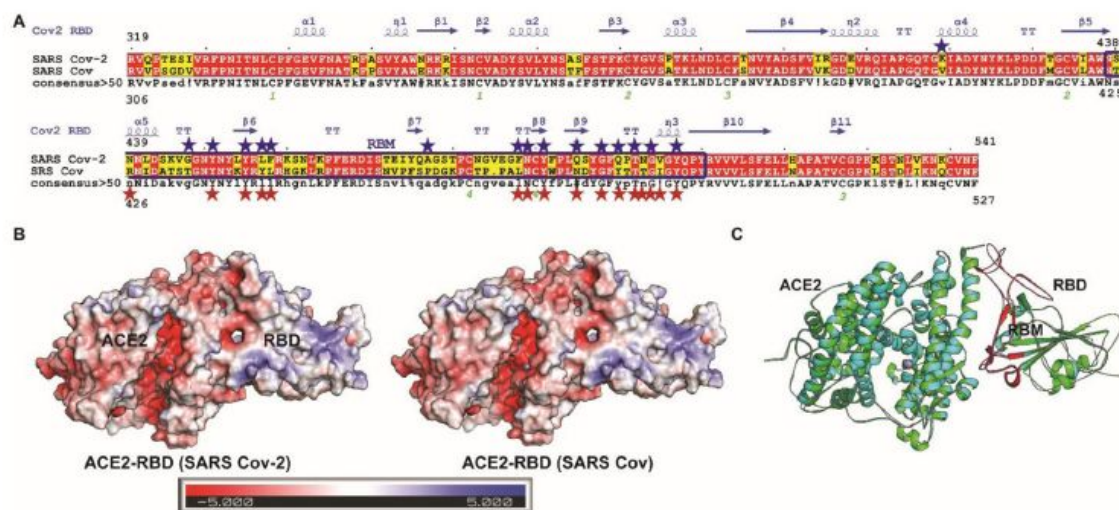


Figure 1. Sequence-structure comparison of receptor binding domain (RBD) from SARS CoV-2 and SARS CoV and structural features of ACE2-RBD complex (6M0J): ACE2-RBD complex of SARS CoV-2 and 2AJF:ACE2-RBD complex of SARS CoV. (A) Pair-wise sequence structure alignment of RBD from SARS CoV-2 and SARS CoV (B). Electrostatic properties of ACE2-RBD complexes using the experimental structure 6M0J and 2AJF (Blue, red, and white colors represent positively charged, negatively charged, and neutral surfaces, respectively). (C) Structural superimposed view of ACE2-RBD complexes displaying the receptor binding motif marked in pink (green: 6M0J; SARS-CoV-2 and cyan: 2AJF; SARS-CoV).

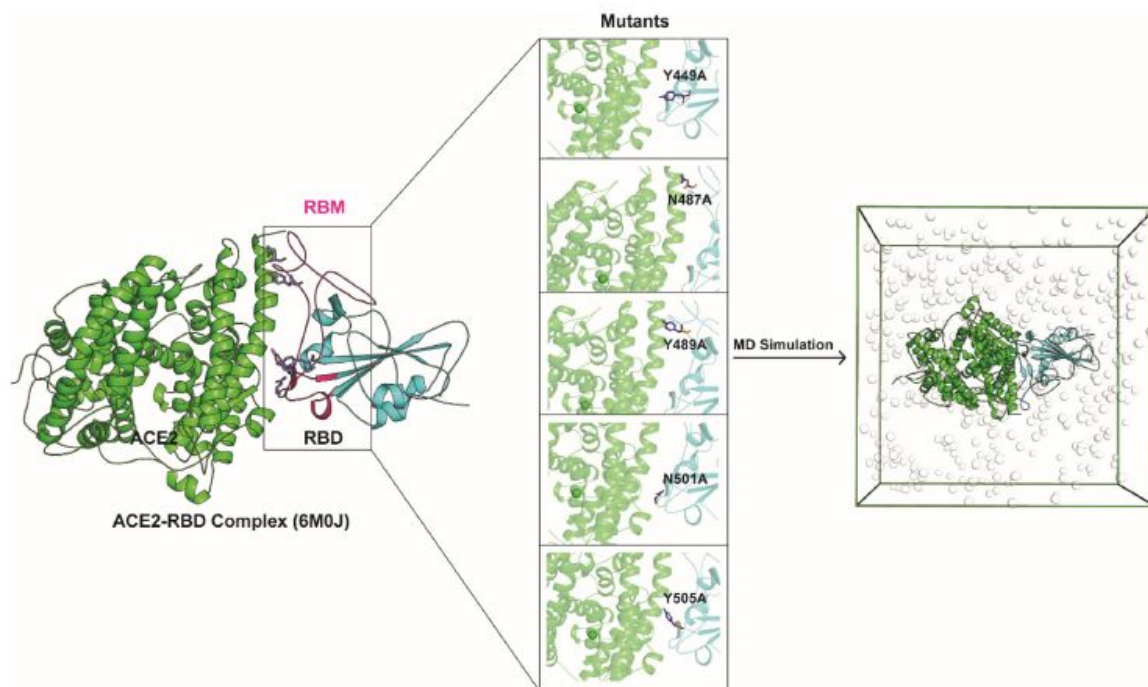


Figure 2. Schematic representation of the present work where point mutations are induced at Tyr449, Asn487, Tyr489, Asn501 and Tyr505 of the RBM in ACE2-RBD (SARS CoV-2) complex and subjected to all-atoms MD simulation.

[분자 역학]

(...) ACE2-RBD 복합체의 야생형과 Y505A 시스템은 각각 $0.25 \pm 0.03 \text{ nm}$ 와 0.25 ± 0.03 으로 가

장 낮은 RMSD를 나타냈고, Y449A, N487A, Y489 및 N501A 변종 시스템이 그 뒤를 이었다. 변종 시스템 중에서 N501A는 다른 복합체 시스템에 비해 $0.33 \pm 0.09 \text{ nm}$ 의 높은 RMSD를 나타냈다. 전반적으로 대부분의 시스템은 시작 구조에서 상당히 유사한 작은 범위로 이탈하여, 분자 역학 시뮬레이션의 150ns 동안 약 $0.27 \pm 0.05 \text{ nm}$ 의 백본 RMSD를 생성한다. 위의 데이터는 평형 후 약간의 ns 후에 모든 시스템이 평형에 도달했음을 나타낸다. 야생형 6M0J 복합체(2.45 \AA 해상도)와 비교하는 경우 각 시스템 대표 구조의 $C\alpha$ -RMSD는 야생형, Y449A, N487A, Y489A, N501A 및 Y505A에 대해 각각 1.87, 1.68, 1.66, 2.66, 1.77 및 2.28 \AA 로 나타났다. 이는 복합체 시스템이 MD 시뮬레이션 내내 구조적으로 무결성을 유지하고 있음을 의미한다.

[MD 중 이차 구조 요소의 진화]

복합체 시스템의 안정성을 추가로 확인하기 위해, DSSP 알고리즘을 사용하여 MD 시뮬레이션 중 이차 구조의 변화를 또한 모니터링했다(도S3). (...) 이는 모든 시스템이 구조적 무결성을 유지하고 SARS-CoV-2의 RBM에서 사소한 변화가 있으나 동일한 접힘을 유지한다는 것을 의미한다.

[분자 간 수소 결합 역학]

(...) 야생형 시스템에서 수소 결합은 MD 시뮬레이션 동안 유지되는 반면, 변종에서는 H 결합이 감소했으며 N487A 및 Y489A 시스템에서 가장 적은 수가 관찰되었다. 변종 시스템의 MD 시뮬레이션 동안 다수의 필수적인 결합이 깨지는 것으로 밝혀졌는데, 이는 보존된 아미노산을 알라닌으로 대체하면 RBD-인간 ACE2 경계면에서 바람직하지 않은 상호작용을 초래하여 분자 간 H-결합 안정성에 영향을 미친다는 것을 의미한다.

[분자 간 접촉 분석]

(...) 결과는 변이가 RBM 세그먼트에 해당하는 경계면의 5 개 잔기에서 결합 상호작용의 현저한 감소를 초래했음을 보여준다. 이는 PRODIGY로 계산한 수용체와 잔기의 결합 친화도에 의해 입증되었는데, 여기서 변이는 중요한 잔기의 결합 친화도를 감소시켰다. (...) Y449A 시스템은 돌연변이로 인한 비결합 접촉의 수가 더 많은 반면 ACE2-RBD 복합체의 안정성에 필수적인 수소 결합은 거의 손실되지 않았다. 또한, Wan et al. (2020)의 이전 연구는 SARS-CoV-2의 잔기 N501(SARS-CoV의 잔기 487에 해당)이 수용체 ACE2에 대한 바이러스 결합을 강화하고 사람 간 전염에 중요한 역할을 한다는 것을 보여주었다. 시뮬레이션

한 복합체에서도 동일한 상호작용을 관찰했지만 잔기 501의 변이는 바람직한 상호작용을 잃게 된다는 것 또한 관찰했으며 이는 SARS-CoV-2의 발병, 항성 및 전염에 중요한 영향을 미친다는 것을 의미한다.

야생형과 변종 SARS-CoV-2 RBD-ACE2 시스템 간의 완전한 상호작용은 도 8에 설명되어 있다. ACE2에 대한 SARS-CoV2 및 SARS-CoV RBD의 결합 친화도 사이의 유의한 차이가 실험적으로 관찰되었지만, 결합 친화도만으로 SARS-CoV-2의 비정상적인 전염성을 설명할 수는 없다. 여기서 스파이크 단백질의 S1/S2 주변부에 위치한 퓨린 절단 부위를 포함한 다른 중요한 요인들이 신속한 사람 간 전염을 촉진하는 중요한 역할을 할 수 있다는 것이 주목할 만하다. 또한 최근 연구에 따르면 바이러스 진입은 또한 TMPRSS2 단백질 분해효소 활성화에 의존적이며 카텝신 B/L 활성이 TMPRSS를 대체할 수 있음이 밝혀졌다(Sungnak et al., 2020).

결론

COVID-19 발생 이후의 최신 연구에서 SARS-CoV-2가 인간 SARS-CoV(2005)와 매우 상응하며, 스파이크 단백질이 안지오텐신 전환효소 II(ACE2)에 결합함으로써 인간 숙주 세포에 진입한다는 것을 밝혀냈다(Zhou et al., 2020). 그러나 인식에 대한 분자 메커니즘과 인간 ACE2에 대한 SARS-CoV-2 결합으로부터의 RBD의 RBM에서 보존된 아미노산의 역할이 연구되고 있다. 본 연구에서는 전원자 MD 시뮬레이션을 통해 야생형 ACE2-RBD 복합체뿐만 아니라 무작위로 선택한 5개의 변종 복합체(SARS-CoV-2 RBM의 보존 및 가변 부위에 위치)를 포괄적으로 탐색했다.

SARS-CoV-2 및 SARS-CoV의 ACE2-RBD 복합체의 쌍별 서열 구조 정렬 및 구조적 중첩은 ACE2가 보존된 수용체 결합 모티프에 동일한 방식으로 결합하고 결합을 구성, 상호작용 잔기의 매립된 표면적 및 RBM 내외부의 경미한 변화와 함께 기타 비결합 접촉 네트워크 수에서 유의한 유사성을 공유한다는 것을 보여주었다(도 9).

대부분의 시스템은 평형 후 10~20ns에 평형에 도달했고 150ns까지 실험 ACE2-RBD (SARS-CoV-2) 복합체와 같은 구조적 무결성을 유지했다. SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 RBM은 고도의 유연성을 나타내며, 가장 중요하게는 이러한 영역에서 변이를 유도하여 ACE2 결합면을 향한 RBM의 이동성에 영향을 미친다.

주성분 분석은 RBD가 숙주 수용체 ACE2의 결합면을 향한 내향 운동을 유도한다는 것을

시사했으며, 이는 분자 상호작용 뒤의 기타 메커니즘 외에 분자 인식 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다. 결합의 강도는, 변이가 결합 친화도에 영향을 미치는 경향이 있는 RBM에 위치한 보존된 결합 잔기에 의해 주로 유도되는 결합면에서의 상호작용하는 두 단백질 쌍의 완벽하게 중첩되는 겹사슬에 의존한다.

위치 지정 변이 생성 및 계산 결합 친화도 연구는 보존된 RBM의 변이가 복합체의 구조 역학에 영향을 미치고, 전하 분포에 영향을 미치며, 분자 간 비결합 접촉을 방해하여 숙주 세포 수용체 ACE2에 대한 결합 강도를 교란시킨다는 것을 보여주었다. 최근 한 연구는, SARS-CoV-2가 SARS-CoV보다 더 안정적이고 높은 온도에서 견딜 수 있다고 지적했는데, 박쥐가 사람에 비해 높은 체온을 가지고 있음을 고려하면 SARS-CoV-2가 박쥐에서 유래함을 암시한다(Chin et al., 2020; Qi et al., 2020). 그러므로 가까운 미래에 SARS-CoV-2를 예방하고 제어하기 위한 중재 치료 전략을 수립하기 위해 전 세계의 서로 다른 온도대에서 ACE2-RBD 복합체 상호작용을 이해하기 위한 추가 연구가 필요하다.

본 결과는 전반적으로 SARS-CoV-2에 대항하는 신규 억제제의 개발에 매우 유용할 수 있는 바이러스-숙주 매개 수용체 상호작용에서 유망한 발견을 보여주었다. 본 저자들은 이 결론이 인간에서 전염성이 강한 SARS-CoV-2 감염의 병인을 이해하는 것에 추가적인 발전을 위한 적절한 출발점을 제공한다고 강하게 믿는다.

선행발명 3의 주요 내용

초록

신종 중증 급성 호흡기 증후군(SARS) 유사 코로나바이러스(SARS-CoV-2)가 최근 등장해 사람에게 급속히 퍼지면서 COVID-19를 유발하고 있다. 이 전염병을 해결하기 위한 열쇠는 바이러스의 감염성, 발병 및 숙주 범위를 조절하는 수용체 인식 메커니즘을 이해하는 것이다. SARS-CoV-2와 SARS-CoV는 인간에서 동일한 수용체인 안지오텐신 전환 효소 2(ACE2)를 인식한다. 본 저자들은, 여기서 ACE2와의 복합체에서 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(결정화를 용이하게 하도록 설계됨)의 수용체 결합 도메인(RBD)의 결정 구조를 결정했다. SARS-CoV RBD에 비해 SARS-CoV-2 RBD의 ACE2 결합 능선은 보다 조밀한 형태를 가지고 있으며, 그밖에도 SARS-CoV-2 RBD의 여러 잔기 변화는 RBD-ACE2 경계면의 두 바이러스 결합 핫스팟을 안정화한다. 이러한 SARS-CoV-2 RBD의 구조적 특징은 ACE2 결합 친화도를 증가시킨다. 또한 SARS-CoV-2와 밀접한 관련이 있는 박쥐 코로나바이러스인 RaTG13도 인간 ACE2를 수용체로 사용한다는 것을 발견했다. ACE2 인식에서 SARS-CoV-2, SARS-CoV 및 RaTG13 간의 차이는 SARS-CoV-2의 잠재적인 동물-인간 전염을 밝힌다. 본 연구는 SARS-CoV-2의 수용체 인식을 목표로 하는 중재 전략에 대한 지침을 제공한다.

(221쪽 왼쪽 첫째 문단) SARS-CoV-2의 갑작스러운 출현과 급속한 확산은 세계 보건과 경제를 위협하고 있다. SARS-CoV-2는 2002~2003년의 SARS-CoV보다 훨씬 더 많은 감염, 사망 및 경제적 혼란을 야기했다. SARS-CoV-2의 기원은 아직 불명확하다. 밀접한 관계의 코로나바이러스인 RaTG13이 박쥐로부터 분리되었기 때문에, 박쥐는 SARS-CoV-2의 원천으로 간주된다. 그러나 SARS-CoV-2의 박쥐-사람 전염을 가능하게 한 분자 이벤트는 알려져 있지 않다. SARS-CoV-2를 특정 표적으로 하는 임상적으로 승인된 백신이나 약물도 부족하다. 코로나바이러스에 의한 수용체 인식은 바이러스 감염성, 발병 및 숙주 범위의 중요한 결정 요인이다. 이는 백신 접종과 항바이러스 전략을 위한 주요 목표를 제시한다.

(221쪽 왼쪽 셋째 문단) SARS-CoV와 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 간 서열 유사성 때문에, 최근 SARS-CoV-2도 ACE2를 수용체로 사용한다고 예측되었으며 이는 다른 연구에서 검증되었다. SARS-CoV-2에 의한 수용체 인식의 구조적 기반을 확인하고 SARS-CoV-2,

SARS-CoV 및 RaTG13 간 ACE2 결합 친화도를 비교했다. 본 저자들의 발견은 단단한 ACE2 결합으로 이어지는 SARS-CoV-2 RBM의 분자 및 구조적 특징을 확인한다. 이는 SARS-CoV-2의 동물 기원에 대한 통찰을 제공하고 SARS-CoV-2-ACE2 상호작용을 목표로 하는 중재 전략의 안내를 지원할 수 있다.

(222쪽 오른쪽 둘째 문단부터) SARS-CoV RBM-ACE2 경계면에 비해 SARS-CoV-2 RBM-ACE2 경계면의 두 바이러스 결합 핫스팟 근처에서 미세하지만 기능적으로 중요한 구조적 변화가 일어난다(도. 2a, b). SARS-CoV-ACE2 경계면에서는 이전에 2개의 바이러스 결합 핫스팟이 확인되었다. 핫스팟 Lys31(즉, 핫스팟 31)은 Lys31과 Glu35 사이의 염다리로 구성되며 핫스팟 Lys353(즉, 핫스팟 353)은 Lys353과 Asp38 사이의 염다리로 구성된다. 상대적으로 먼 거리에 있는 이들 상호작용을 고려하면, 이들 염다리는 모두 약하다. 소수성 환경에서 이러한 약한 염다리를 바이러스 결합에 매립하는 것은 유전율의 감소로 인해 에너지를 향상시킬 것이다. 이 과정은 핫스팟과 근처 RBD 잔기 간 상호작용에 의해 촉진된다. 우선, SARS-CoV-RBM-ACE2 경계면에서 핫스팟 31은 SARS-CoV RBM의 Tyr442로부터의 지지가 필요하다(도 2b). 이에 비해 SARS-CoV-2 RBM-ACE2 경계면에서 SARS-CoV-2 RBM의 Leu455 (SARS-CoV RBM의 Tyr442에 상응)는 부피가 보다 작은 곁사슬을 가지고 있으며 ACE2의 Lys31에 지지를 적게 제공한다. 그 결과 핫스팟 31의 구조는 재배열된다. Lys31 및 Glu35 사이의 염다리는 쪼개지며 각 잔기는 SARS-CoV-2 RBM의 Gln493과 수소 결합을 형성한다(도 2a). 두 번째로 SARS-CoV RBM-ACE2 경계면에서 핫스팟 353은 SARS-CoV RBM의 Thr487의 곁사슬 메틸 그룹의 지지가 필요한 반면 Thr487 곁사슬 하이드록실 그룹은 RBM 주사슬과 수소 결합(Thr487 곁사슬의 형태를 고정함)을 형성한다(도 2b). 이에 비해 SARS-CoV-2 RBM-ACE2 경계면에서는 SARS-CoV-2 RBM의 Asn501은 곁사슬 및 RBM 주사슬 간에 수소 결합을 통해 그 형태를 고정한다. 이에 따라, 그 곁사슬은 상응하는 SARS-CoV RBM의 Thr487보다 핫스팟 353에 적은 지지를 제공한다(그림 2a). 따라서 ACE2의 Lys353는 SARS-CoV-2 RBM 주사슬과 수소 결합을 형성하면서 ACE2의 Asp38와 염다리를 유지하는 약간 다른 형태를 취한다(도 2a). 따라서 두 핫스팟 모두 근처 RBD 잔기의 지지 감소에 적응했으나 여전히 SARS-CoV-2 RBM-ACE2 경계면에서 양호하게 안정화되었다.

구조적 관찰을 확증하기 위해, 중요한 ACE2 상호작용 잔기에 변이를 포함하는 SARS-CoV-2 스파이크의 ACE2 결합 친화도를 특성화했다. 이를 위해 정제된 재조합 ACE2

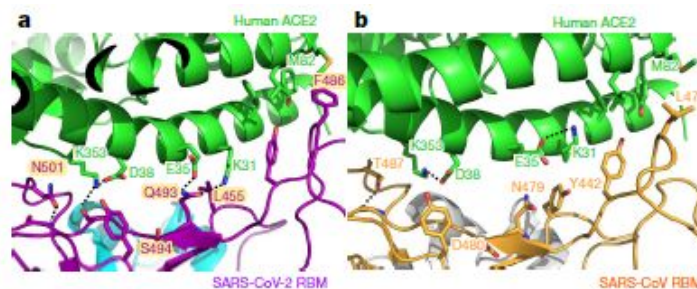


Fig. 2|Structural details at the interface between the SARS-CoV-2 RBM and ACE2. a, The interface between the SARS-CoV-2 RBM and ACE2. b, The interface between SARS-CoV RBM and ACE2.

를 미끼, 세포 관련 SARS-CoV-2 스파이크를 표적으로 하여 단백질 폴다운 분석을 수행하였다(도 3a). 교차 검증을 위해 His6 및 Fc 라는 두 개의 상이한 태그가 있는 ACE2를 사용했다. SARS-CoV-2 스파이크는 다음 RBM 변화 중 1개를 포함했다. 481-487(SARS-CoV-2의 481-NGVEGFN-487이 SARS-CoV와 같이 TPPALN으로 변이), Q493N(SARS-CoV-2의 Gln493이 인간 SARS-CoV와 같이 아스파라긴으로 변이), Q493Y(SARS-CoV-2의 Gln493이 박쥐 RaTG13와 같이 티로신으로 변이) 및 N501T(SARS-CoV-2의 Asn501이 인간 SARS-CoV와 같이 트레오닌으로 변이). 결과는 이러한 모든 도입된 돌연변이가 SARS-CoV-2 스파이크의 ACE2 결합 친화도를 감소시킨다는 것을 보여주었다. 이는 ACE2 결합 능선과 핫스팟 안정화 잔기를 포함한 SARS-CoV-2 RBM의 구조적 특징이 모두 SARS-CoV-2의 높은 ACE2 결합 친화도에 기여한다는 것을 확증한다.

(224쪽 왼쪽 둘째 문단) 마지막으로, 이 연구는 중재 전략 발견을 지원한다. 첫째, SARS-CoV-2 RBM을 표적으로 하는 단일 클론 항체의 중화는 바이러스가 ACE2에 결합하는 것을 막을 수 있으며 이는 따라서 유망한 항바이러스 약물이다. 본 연구의 구조는 항체 약물을 중화함으로써 잠재적으로 표적이 될 수 있는 SARS-CoV-2 RBM에서 기능적으로 중요한 모든 에피토프를 설계했다. 따라서 이 연구는 이러한 항체 약물의 개발 및 최적화 안내에 도움이 될 수 있다. 둘째, RBD 자체가 소단위 백신으로 기능할 수 있다. 본 연구에서 식별된 SARS-CoV-2 RBM에서 기능적으로 중요한 에피토프는 매우 효과적인 RBD 백신의 구조 기반 설계로 이어질 수 있다. 이러한 소단위 백신 설계를 위한 구조 기반 전략은 이전에 개발되었다. 이러한 전략은 SARS-CoV-2 RBD 백신 설계를 지원할 수 있다. 전반적으로, 본 연구는 SARS-CoV-2에 의한 수용체 인식을 목표로 하는 구조 기반 중재 전략 개발을 지원할 수 있다.