

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0123235

(43) 공개일자 2021년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/569 (2017.01) A61K 38/48 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01) A61P 31/14 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/56983 (2013.01)

A61K 38/48 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0043363

(22) 출원일자 2021년04월02일

심사청구일자 2021년04월02일

(30) 우선권주장

1020200040546 2020년04월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

주식회사 바이오엠플

경상북도 포항시 남구 지곡로 394 (지곡동, 포항 테크노파크 내)

(72) 발명자

김동민

광주광역시 남구 봉선중앙로 6, 101동 302호 (봉선동, 쌍용스윗닷홈)

방미선

전라남도 화순군 화순읍 쌍충로 13-20, 109동 1402호 (화순 삼천 한양립스 아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 남앤남

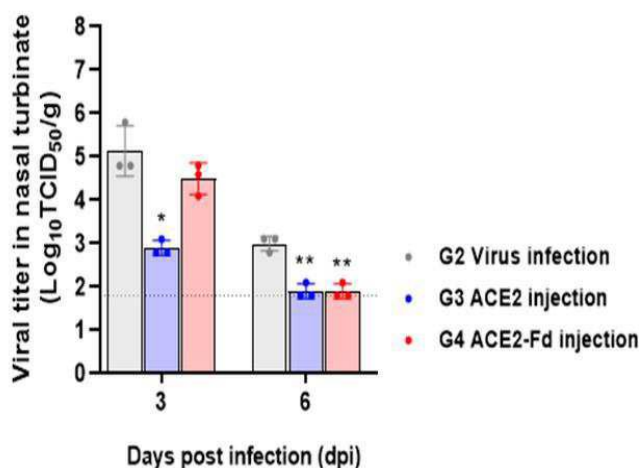
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 코로나바이러스 감염증-19의 치료제로서 ACE2의 용도

(57) 요약

본 발명은 코로나바이러스 감염증-19의 치료제로서 ACE2의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 재조합 ACE2 단백질 또는 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 재조합 ACE2 단백질 및 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질은 식물체로부터 발현 및 정제하여 수득한 것으로, 상기 재조합 ACE2 및 ACE2-Fd 융합 단백질 모두가 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 우수한 항바이러스 활성을 가지며, SARS-CoV-2 바이러스에 감염된 동물모델의 폐 조직에서 염증병변의 개선 효과를 확인함으로써, 이들 재조합 단백질들을 코로나바이러스-19 감염증에 대한 새로운 치료제로 사용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 47/6811 (2017.08)

A61P 31/14 (2018.01)

G01N 33/573 (2013.01)

G01N 2333/165 (2013.01)

G01N 2333/948 (2013.01)

(72) 발명자

김춘미

광주광역시 동구 계림로30번길 15, 204동 1201호
(계림동, 푸른길 두산위브)

손은주

경상북도 포항시 남구 지곡로 102, 2동 504호 (지곡동, 낙원아파트)

이상민

경상북도 포항시 북구 흥해읍 초곡지구로58번길
52, 105동 2003호 (초곡삼구트리니티 시티)

민경민

대전광역시 중구 대흥로 176-15, 5동 1102호 (대흥동, 현대아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

재조합 ACE2 단백질 또는 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 재조합 ACE2 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 재조합 ACE2 단백질 또는 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질은 식물체에서 발현시켜 정제한 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 발현은 식물세포의 소포체에서 발현되는 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 발현은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 재조합 ACE2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로 식물체를 형질전환시켜 상기 식물체 내에서 발현을 유도하는 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 발현은 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로 식물체를 형질전환시켜 상기 식물체 내에서 발현을 유도하는 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 재조합 발현 벡터는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 NB(New Bip; new chaperone binding protein) 유전자; 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 6개 히스티딘을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 HDEL 펩타이드 코딩 유전자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증-19의 예방

또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 조성물은 SARS-CoV-2 바이러스의 역가를 감소시키고, SARS-CoV-2 바이러스로 감염된 폐 조직에서의 염증을 억제 또는 개선하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신종 코로나바이러스감염증-19의 치료제로서 ACE2의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 코로나바이러스 감염증-19(coronavirus disease 2019, COVID-19)는 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 바이러스의 감염에 의해 발병하는 새로운 호흡기 감염질환이다. 2019년 12월 중국 우한지역에서 처음 발생한 뒤 전 세계적으로 확산되고 있으며, 국내 확진자가 급속도로 증가하여 2020년 3월 30일 현재 9,661명의 환자가 발생하였고, 사망자는 158명(1.6 %) 으로 확인되었다. 이러한 확진자는 국내를 포함하여 전 세계적으로 급속도로 증가하고 있으나 현재, 백신이나 치료제가 개발되지 않은 상황으로 세계적으로 심각한 보건 문제로 대두되고 있다.

[0003] 중국에서 7 만명 이상의 환자를 분석한 자료에 따르면 약 15%에서 중증 폐렴이 발생하고, 약 5%에서 중환자실 치료가 필요한 환자로 보고되었으며, 중환자실 치료를 받는 환자의 약 절반에서 사망하는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 코로나바이러스 감염증-19에 감염되면 나타나는 주 증상으로는 무기력감, 37.5도 이상의 고열, 기침, 인후통, 가래, 근육통, 두통, 호흡곤란 및 폐렴 등의 증상이 발생하며, 폐 손상에 의한 호흡부전 등이 있으며, 심하면 사망에 이를 수 있다. 그러므로 코로나바이러스 감염증-19에 대한 진단 또는 치료제의 개발이 매우 시급한 실정이다.

[0004] 한편, Renin-angiotensin system(RAS)은 심혈관(cardiovascular)과 신장계(renal system)의 항상성 제어와 세포 외 유체부피(fluid volume)를 조절하는 기능을 하는 펩타이드성 시스템(peptidergic system)이다. ACE2(Angiotensin-converting enzyme 2)는 안지오텐신 I (Ang I)을 Ang 1-9로, Ang II를 Ang 1-7로 분해하는 모노카르복시펩티다제(monocarboxypeptidase)다. 이와 관련된 연구 내용에 의하면, ACE2의 발현수준 및 활성이 증가할 때 심장 질환으로부터 보호됨이 보고된 바 있고, 재조합 ACE2 단백질이 심각한 폐 손상(acute lung injury)에 대한 보호 효과가 있음이 보고된 바 있다.

[0005] 그러나 아직까지 ACE2가 코로나바이러스 감염증-19를 진단 또는 치료할 수 있음을 보고한 예가 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 1.Circ Res. 2016 April 15; 118(8): 1313-1326.
(비특허문헌 0002) 2.Nature. 2005 Jul;436(7047):112-6.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 코로나바이러스 감염증-19의 진단 또는 치료를 위한 새로운 물질로서 재조합 ACE2 단백질 및 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 제조하였고, 이러한 재조합 단백질들이 코로나바이러스 감염증-19의 진단 및 치료에 유용하게 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 재조합 ACE2 단백질 또는 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 코로

나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 재조합 ACE2 단백질 또는 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 재조합 ACE2 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 재조합 ACE2 단백질 또는 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질은 식물체에서 발현시켜 정제한 것일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발현은 식물세포의 소포체에서 발현되는 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발현은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 재조합 ACE2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 식물체를 형질전환시켜 상기 식물체 내에서 발현을 유도하는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발현은 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 식물체를 형질전환시켜 상기 식물체 내에서 발현을 유도하는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 재조합 발현벡터는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 NB(New Bip; new chaperone binding protein) 유전자; 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 6개 히스티딘을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 HDEL 펩타이드 코딩 유전자를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 SARS-CoV-2 바이러스의 역가를 감소시키고, SARS-CoV-2 바이러스로 감염된 폐 조직에서의 염증을 억제 또는 개선하는 활성을 갖는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명은 코로나바이러스 감염증-19의 진단 또는 치료제로서 재조합 ACE2 단백질 및 재조합 ACE2-Fd 단백질의 신규 용도를 제공하는 것으로, 코로나바이러스-19와 우수한 결합력을 갖는 재조합 ACE2 단백질 및 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 식물체로부터 발현 및 정제하여 수득하였으며, 이들 재조합 단백질들이 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 우수한 항바이러스 활성을 가지며, SARS-CoV-2 바이러스에 감염된 동물모델의 폐 조직에서 염증병변이 개선됨을 확인함으로써, 이들 재조합 단백질들을 코로나바이러스-19 감염증에 대한 새로운 치료제로 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 본 발명의 일실시예에서 식물 발현 시스템을 통해 재조합 ACE2 단백질을 발현시키기 위한 벡터 구성을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에서 식물 발현 시스템을 통해 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 발현시키기 위한 벡터 구성을 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일실시예에서 재조합 ACE2 단백질의 처리 농도에 따른 SARS-CoV-2 바이러스의 NP RNA 바이러스 카피를 50%로 억제하는 농도인 EC₅₀(half-maximal effective concentration)을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일실시예에서 SARS-CoV-2 바이러스를 감염시킨 햄스터 동물모델을 대상으로 본 발명의 재조합 ACE2 단백질 및 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질 처리에 따른 체중변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일실시예에서 SARS-CoV-2 바이러스 감염 동물군, 재조합 ACE2 단백질 처리 동물군 및 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질 처리 동물군으로부터 분리한 비갑개 조직에서의 바이러스 역가를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에서 SARS-CoV-2 바이러스 감염 동물군, 제조합 ACE2 단백질 처리 동물군 및 제조합 ACE2-Fd 융합 단백질 처리 동물군을 대상으로 바이러스 감염 후, 3일째, 6일째 및 9일째의 폐 조직에 대한 염증 병변 부위를 헤마토크실렌 및 에오신 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19)의 진단 또는 치료를 위한 ACE2 단백질의 새로운 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 제조합 ACE2 단백질 또는 제조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함에 특징이 있다.
- [0021] 본 명세서에서 사용된 용어, "COVID-19"는, 신종 코로나바이러스를 지칭하는 것으로서, RNA 바이러스로서 사스와 메르스의 변종을 나타낸다. COVID-19는 사스와 약 77.5%의 서열 동일성을, 메르스와 약 50% 공유한다. 하지만, 사스와 메르스와는 대조적으로, COVID-19의 스파이크 당 단백질(spike glycoprotein)은 1 개의 RBD domain 이 위로 돌출된 형태의 구조를 형성하며, 이로 인해 타겟 리셉터(receptor)인 ACE2(angiotensin)과 100~1,000 배 더 강력한 결합력을 나타낸다. 이러한 강력한 결합력은 세포 내로 침투를 더욱 더 용이하게 하여 전염력을 높이는 원인으로 작용한다.
- [0022] 코로나바이러스 19(SARS-CoV-2)를 억제하기 위한 방법은 세포 내로 감염되어 유입된 바이러스를 중화시키는 것으로, 코로나바이러스 19가 세포 내로 유입되어 복제가 되고 새로운 비리온(virion)이 분비되어 다른 세포를 감염시키는 기작을 차단하는 것이다.
- [0023] 한편, 코로나바이러스 19(SARS-CoV-2)가 세포에 감염될 때 감염 대상 세포의 ACE2를 수용체로 하여 감염이 진행되므로, 본 발명에서는 이러한 ACE2 단백질을 이용하여 코로나바이러스 19 감염증을 진단 및 치료할 수 있는 새로운 제제를 개발하려고 연구하였고, 그 결과, 식물체에서 발현 및 분리한 제조합 ACE2 단백질 및 제조합 ACE2-Fd 단백질이 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 가지며, 코로나바이러스 19 감염증의 증상인 폐 조직의 염증을 개선하는 효과가 있음을 동물실험을 통해 확인하였다.
- [0024] 본 발명에 따른 상기 제조합 ACE2 단백질은 SARS-CoV-2에 직접적으로 결합하여 SARS-CoV-2가 감염 대상의 세포에 존재하는 내재적인 ACE2와의 결합을 억제할 수 있어 바이러스를 중화시킬 수 있는 작용이 있고, SARS-CoV-2 바이러스의 바이러스 역가를 감소시키는 활성이 있다.
- [0025] 본 발명에서 상기 제조합 ACE2 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명에서는 ACE2 단백질에 면역글로불린 Fd 단편과 융합된 제조합 ACE2-Fd 융합단백질을 제조하였고, 상기 융합단백질 역시 SARS-CoV-2 바이러스의 바이러스 역가를 감소시키며, COVID-19 감염증의 증상을 개선하는 활성이 있음을 확인하였다.
- [0027] ACE2 단백질 자체는 반감기가 짧기에 이로 인해 그 활성을 오랫동안 유지할 수 없다는 단점을 보완하기 위해, 면역글로불린 Fd 단편(T4 피브리틴(fibrin)의 foldon(Fd))을 융합시켜 제조합 ACE2-Fd 융합단백질을 제조하였다.
- [0028] 상기 'Fd 단편'이란 파지(phage) T4 fibrin의 C-말단 도메인 foldon 부위를 의미하는 것으로, 27개 아미노산으로 구성된 Fd 도메인은 fibrin trimer 구조 형성에 필수적인 영역으로 이는 제조합 단백질의 삼량체화(trimerization)를 유도하여 더욱 안정적인 단백질 발현이 가능하다.
- [0029] 따라서 foldon(Fd) 단편과 융합된 제조합 ACE2 단백질은 순환분자의 수명(lifespan)을 연장하고, 바이러스에 대한 면역 시스템의 효과를 더해 줄 수 있는 장점이 있다. 본 발명에서 상기 Fd 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 8에 나타내었고, Fd 도메인의 유전자 서열은 서열번호 9에 나타내었다.
- [0030] 또한, 본 발명에서 상기 제조합 ACE2-Fd 융합 단백질은 바람직하게 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명에 따른 제조합 ACE2 단백질 및 제조합 ACE2-Fd 융합 단백질은 식물 세포를 기반으로 한 식물 발현 시스템을 각각 이용하여 제조합 단백질을 발현 및 정제하였다.
- [0032] 식물체로부터 상기 제조합 ACE2 단백질 또는 제조합 ACE2-Fd 융합 단백질의 발현 및 정제를 위해, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 제조합 ACE2 단백질을 코딩하는 유전자 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 제조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 제조합 발현벡터로 식물체를 형질전환시켜 상기 식물체 내

에서 발현을 유도하였다.

- [0033] 보다 구체적으로, 상기 재조합 발현백터는 상기 재조합 ACE2 단백질 또는 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 코딩하는 염기서열의 앞쪽에 New Bip(chaperone binding protein) 유전자 서열(서열번호 5)이 오도록 하였고, 상기 재조합 단백질을 코딩하는 염기서열 다음에는 6개 히스티딘을 코딩하는 염기서열(서열번호 6) 및 HDEL 펩타이드 코딩 염기서열(서열번호 7)이 오도록 하였다.
- [0034] 본 발명에서 상기 '재조합 발현백터(recombinant expression vector)'란, 백터 내에 삽입된 핵산에 의해 코딩되는 펩타이드 또는 단백질을 발현할 수 있는 백터를 지칭하는 것으로, 바람직하게는 본 발명에 따른 COVID-19 진단용 재조합 항원 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하도록 제조된 백터를 의미한다.
- [0035] 상기 "백터"는 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내에서 숙주세포로 염기의 도입 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말하며, 다른 DNA 단편이 결합하여 결합된 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위(replicon)일 수 있으며, "복제단위"란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 자체의 조절로 복제 가능한, 임의의 유전적 단위(예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스 등)를 말한다.
- [0036] 본 발명의 재조합 발현 백터는 바람직하게는 RNA 중합효소가 결합하는 전사 개시 인자인 프로모터(promoter), 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열과 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열, 터미네이터 등을 포함할 수 있다.
- [0037] 또한, 재조합 단백질의 생산량을 증가시키기 위한 태그용 유전자, 재조합 단백질의 구조적 안정성을 유지하기 위한 태그용 유전자, 재조합 단백질을 용이하게 분리하기 위한 태그용 유전자, 형질전환체를 선별하기 위한 항생제 내성 유전자 등의 선별용 마커 유전자 등을 추가로 포함할 수 있으며, 용이한 분리를 위한 태그로는 이에 제한되지는 않으나, Avi 태그, Calmodulin 태그, polyglutamate 태그, E 태그, FLAG 태그, HA 태그, His 태그, Myc 태그, S 태그, SBP 태그, IgG-Fc 태그, CTB 태그, Softag 1 태그, Softag 3 태그, Strep 태그, TC 태그, V5 태그, VSV 태그, Xpress 태그 등이 포함될 수 있으며, 상기 선별용 마커 유전자에는 대표적으로 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자, aadA 유전자 등이 포함될 수 있으며, 상기 프로모터에는 대표적으로 pEMU 프로모터, MAS 프로모터, 히스톤 프로모터, Clp 프로모터, 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 유래 35S 프로모터, 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 유래 19S RNA 프로모터, 식물의 액틴 단백질 프로모터, 유비퀴틴 단백질 프로모터, CMV (Cytomegalovirus) 프로모터, SV40 (Simian virus 40) 프로모터, RSV (Respiratory syncytial virus) 프로모터, EF-1 α (Elongation factor-1 alpha) 프로모터 등이 포함될 수 있으며, 상기 터미네이터는 대표적으로 노팔린 신타아제(NOS), 벼 아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 과세울린 터미네이터, 아그로박테리움 튜머패시언스의 옥토파빈(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이나, 상기 추가되는 유전자의 종류는 기존에 재조합 단백질의 제조에 사용되고 있는 종류라면 제한이 없다.
- [0038] 이러한 재조합 발현백터를 식물체에 도입하여 형질전환된 식물체로부터 본 발명의 COVID-19 진단용 재조합 항원 단백질을 발현 및 분리정제할 수 있는데, 여기서 상기 식물체는 이에 제한되지는 않으나, 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근 및 셀러리로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상의 쌍자엽 식물; 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.
- [0039] 상기 "형질전환(transformation)"이란 주입된 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질이 변하는 것을 총칭하며, "형질전환체(transgenic organism)"란 분자유전학적 방법으로 외부의 유전자를 주입하여 제조된 생명체로서, 바람직하게는 본 발명의 재조합 발현 백터에 의하여 형질전환된 생명체이며, 상기 생명체는 미생물, 진핵세포, 곤충, 동물, 식물 등 생명이 있는 생물이라면 제한이 없으며, 바람직하게는 대장균, 살모넬라, 바실러스, 효모, 동물 세포, 마우스, 래트, 개, 원숭이, 돼지, 말, 소, 아그로박테리움 튜머패시언스, 식물 등이나 이에 제한되지 않는다. 상기 형질전환체는 형질전환(transformation), 형질감염(transfection), 아그로박테리움(Agrobacterium)-매개 형질전환 방법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 초음파 처리법(sonication), 전기천공법(electroporation), PEG (Polyethylen glycol)-매개 형질전환 방법 등의 방법으로 제조될 수 있으나, 본 발명의 백터를 주입할 수 있는 방법이라면 제한이 없다.
- [0040] 본 발명의 일실시예에서는 상기 재조합 백터를 아그로박테리아 균주에 전기 충격법을 이용하여 형질전환하였고,

형질전환된 아그로박테리아를 니코티니아 벤타미아나 잎의 뒷면에 주입하여 형질전환된 식물체를 제조하였다.

- [0041] 또한, 상기 형질전환된 식물체로부터 본 발명에 따른 COVID-19 치료용 재조합 단백질은, 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및 상기 형질전환체 또는 이의 배양액으로부터 COVID-19 치료용 재조합 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 통해 생산할 수 있다.
- [0042] 특히 본 발명자들은 COVID-19 치료용 재조합 단백질인 재조합 ACE2 단백질 또는 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 식물 세포에서 발현시키고 식물세포로부터 분리하여 사용하였는데, 식물세포는 단백질로의 번역(translation) 후 변형(modification)이 동물세포에서 이루어지는 것과 매우 유사하며 거의 정확하게 복합 단백질을 생성할 수 있으며, 당단백질의 경우 당화가 되어 있는 형태로 분리할 수 있어 원래의 단백질과 동일한 형태의 변형을 갖는 단백질을 수득할 수 있는 잇점이 있다.
- [0043] 이에 본 발명자들은 COVID-19 치료용 재조합 ACE2 단백질 또는 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 식물체로부터 생산함에 따라, 삼중 복합체 구조(trimeric complex structure)를 갖는 재조합 단백질을 상기 식물체로부터 수득할 수 있었다. 또한, 상기 형질전환체 또는 이의 배양액으로부터 본 발명의 COVID-19 치료용 단백질을 분리 및 정제하는 방법은, 당업계에서 공지된 방법인 식물체로부터 목적 단백질을 분리 및 정제하는 방법이라면 모두 사용 가능하다.
- [0044] 그러므로 본 발명은 재조합 ACE2 단백질 또는 재조합 ACE2-Fd 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 약학적 조성물은 추가적으로 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0046] 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 환부의 종류, 적용부위, 처리회수, 처리시간, 제형, 환자의 상태, 보조제의 종류 등에 따라 변할 수 있다. 사용량은 특별히 한정되지 않지만, 0.01 $\mu\text{g/kg/day}$ 내지 10 mg/kg/day 일일 수 있다. 상기 1일량은 1일에 1회, 또는 적당한 간격을 두고 하루에 2~3회에 나눠 투여해도 되고, 수일(數日) 간격으로 간헐(間歇)투여해도 된다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 0.1~100 중량%로 함유될 수 있고 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 약학적 조성물의 제조에는 고체 또는 액체의 제제용 첨가물을 사용할 수 있다. 제제용 첨가물은 유기 또는 무기 중 어느 것이어도 된다. 부형제로서는 예를 들면 유당, 자당, 백당, 포도당, 옥수수 전분(cornstarch), 전분, 탈크, 소르비트, 결정 셀룰로오스, 텍스트린, 카올린, 탄산칼슘 및 이산화규소 등을 들 수 있다. 결합제로서는 예를 들면 폴리비닐알코올, 폴리비닐에테르, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트래거캔스(tragacanth), 젤라틴, 셀락(shellac), 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 구연산칼슘, 텍스트린 및 펙틴(pectin) 등을 들 수 있다. 활택제로서는 예를 들면 스테아린산마그네슘, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 실리카, 경화식물유 등을 들 수 있다. 착색제로서는 통상 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것이라면 모두 사용할 수 있다. 이들의 정제, 과립제에는 당의(糖衣), 젤라틴코팅, 기타 필요에 따라 적절히 코팅할 수 있다. 또한, 필요에 따라 방부제, 항산화제 등을 첨가할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물은 당 업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며(예: 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 최신판;Mack Publishing Company, Easton PA], 제제의 형태는 특별히 한정되는 것은 아니다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌[Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042(Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기술되어 있다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여되는 것이 가능하며, 비경구 투여의 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육내 주입 및 복강 주입 등으로 투여할 수 있다.
- [0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 한정되는 것은 아니다.

- [0053] <실시예 1>
- [0054] 식물체로부터 재조합 ACE2 단백질 및 재조합 ACE2-Fd 단백질의 생산
- [0055] <1-1> 재조합 ACE2 단백질의 발현을 위한 재조합 발현벡터의 제조
- [0056] 본 발명자들은 인간 ACE2 단백질을 식물세포 발현시스템을 이용하여 생산하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 인간 ACE2 단백질의 805개 아미노산 중 신호 펩타이드에 해당하는 1-17 아미노산 부위와 트랜스막 도메인(transmembrane domain)에 해당하는 741-761 아미노산 부위를 제외한 18~740번째의 아미노산에 대한 유전자 서열을 식물세포 발현벡터에 각각 클로닝하여 재조합 발현벡터를 제조하였고, 이를 식물세포에 형질감염시켜 발현을 유도하였다.
- [0057] 구체적으로, ACE2 18~740번째의 아미노산에 대한 염기서열을 식물 발현 시스템에 맞게 항원 유전자를 코돈 최적화(codon optimization)하였고, 소포체(ER)로 표적되도록 new BiP(NB) 신호 펩타이드(signal peptide)가 포함된 벡터에 ACE2 염기서열을 삽입하여 도 1의 핵산 구조물이 도입된 재조합 발현벡터(pCambia1300-ACE2 vector)를 제조하였다. 이때 도 1의 식물 발현 시스템에 맞도록 코돈 최적화된 ACE2 단백질에 대한 염기서열은 서열번호 1에 나타내었다.
- [0059] <1-2> 재조합 ACE2-Fd 단백질의 발현을 위한 재조합 발현벡터의 제조
- [0060] 본 발명자들은 인간 ACE2 단백질을 식물세포 발현시스템을 이용하여 재조합 ACE2-Fd 단백질을 생산하기 위해, 상기 <1-1>의 재조합 발현벡터의 제조 과정에서 ACE2 18~740번째의 아미노산에 대한 염기서열에 면역글로불린의 Fd 단편을 코딩하는 염기서열을 결합시키고 이를 식물 발현 시스템에 맞게 항원 유전자를 코돈 최적화(codon optimization)하였고, 소포체(ER)로 표적되도록 new BiP(NB) 신호 펩타이드(signal peptide)가 포함된 벡터에 코돈 최적화된 ACE2-Fd 염기서열을 삽입하여 도 2의 핵산 구조물이 도입된 재조합 발현벡터(pCambia1300-ACE2-Fd vector)를 제조하였다. 이때 도 2의 식물 발현 시스템에 맞도록 코돈 최적화된 ACE2-Fd의 염기서열은 서열번호 2에 나타내었다. 상기 Fd 단편의 사용은 단백질의 삼량체화(trimerization)를 유도하여 보다 더 안정적인 단백질을 형성할 수 있도록 하며, 코로나바이러스-19를 중화시키기 위하여 결합 친화성이 증진될 수 있도록 하기 위함이다.
- [0062] <1-3> 식물세포의 형질전환 및 재조합 단백질의 발현유도
- [0063] 상기 <1-1> 및 <1-2>에서 제조한 각 재조합 발현벡터는 아그로박테리아 LBA4404 균주에 전기충격법(Electroporation)을 이용하여 각각 형질전환시켰다. 형질전환된 아그로박테리아를 5 mL의 YEP 액체배지(효모 추출물 10 g, 펩톤 10 g, NaCl 5 g, 카나마이신 50 mg/L, 리팜피신 25 mg/L)에서 28℃의 조건으로 16시간 동안 진탕 배양한 후 1차 배양액 1 mL을 50 mL의 새 YEP 배지에 접종하여 28℃의 조건에서 6시간 동안 진탕 배양하였다. 배양된 아그로박테리아는 원심분리(7,000 rpm, 4℃, 5분)하여 수집한 후, 600 nm의 파장에서 흡광도(O.D) 값이 1.0이 되도록 인필트레이션(Infiltration) 버퍼[10 mM MES(pH 5.7), 10 mM MgCl₂, 200 μM 아세트시린곤]에 현탁시켰다. 아그로박테리아 현탁액은 주사바늘을 제거한 주사기를 이용하여 니코티아나 벤타미아나 잎의 뒷면에 주입하는 방법으로 아그로-인필트레이션(Agro-infiltration)을 수행하여, 식물세포를 형질전환시켰다.
- [0064] 형질전환된 식물은 16(빛):8(어둠) 시간의 주기로 22±2℃ 온도 및 50±5% 습도 조건 하에서 배양 및 성장시켜 상기 식물체 내에서 ACE2 및 ACE2-Fd 재조합 단백질의 발현을 유도하였다.
- [0066] <1-4> 식물세포로부터 재조합 ACE2 및 ACE2-Fd 단백질의 정제
- [0067] 상기 <1-3>의 형질전환 식물세포로부터 재조합 ACE2 및 ACE2-Fd 단백질의 정제는 다음과 같은 방법으로 수행하였다.
- [0068] 먼저, 형질전환시킨 식물의 잎 1kg에 2L의 단백질 추출용액(25 mM Tris-Cl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 5% of glycerol, 0.5% of Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF))를 첨가하고 균질화 및 블렌더(32,000rpm)하여 단백질 추출물을 수득하였다. 이후 20,000g의 속도로 40분 동안 원심분리하여 상층액을 수득한 후, Miracloth (EMD Millipore Corp., Billerica MA, USA)을 이용하여 여과하였다. 여과시켜

수득한 단백질을 Ni-NTA 아가로스 레진(Bio-Rad, Seoul, South Korea) 100ml과 1시간 동안 반응시켰고, 컬럼크로마토그래피를 이용하여 ~250mM의 이마다졸 농도구배로 단백질을 용출시켰다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯을 통해 확인하였고, 정제된 재조합 ACE2 및 ACE2-Fd 단백질은 하기 실험의 사용을 위해 4℃에서 보관하였다.

[0070] <실시예 2>

[0071] 재조합 ACE2 단백질 및 재조합 ACE2-Fd 단백질의 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 항바이러스 활성분석

[0072] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 제조한 재조합 ACE2 및 재조합 ACE2-Fd 단백질이 코로나바이러스 감염증-19를 치료할 수 있는지를 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0073] 이를 위해, Vero E6 세포를 24 well cell culture plate에 90% confluence로 배양한 후 DPBS로 2회 세척하였다. SARS-CoV-2 바이러스 배양액(strain BetaCoV/South Korea/KUMC01/2020)을 Vero E6 세포에 1시간 동안 반응시켰다. 감염된 세포는 DPBS로 3회 세척한 후 10% FBS가 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에 식물체로부터 분리한 본 발명의 재조합 ACE2 및 재조합 ACE2-Fd 단백질을 각각 농도별로 처리한 후, 48시간 배양하였다. 이후 배양 상등액에서 viral total RNA를 추출하였고, SARS-CoV-2 NP 유전자 특이적 실시간 PCR을 수행하였다. NP gene $10^1 \sim 10^8$ 카피가 포함된 플라스미드를 주형으로 표준 커브(standard curve)를 정량 분석하였고, 이를 토대로 SARS-CoV-2 NP RNA 바이러스 카피수에 대한 농도별 재조합 ACE2 단백질을 처리한 SARS-CoV-2 NP RNA 바이러스 카피수의 50% 억제 농도를 non-linear regression 분석을 수행하여 EC₅₀ (half-maximal effective concentration) 농도를 확인하였다.

[0075] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 식물체로부터 분리한 본 발명의 재조합 ACE2 단백질의 처리 농도 의존적으로 SARS-CoV-2 바이러스의 NP RNA 바이러스 카피수가 감소하는 것으로 나타났으며, 바이러스 RNA의 카피를 50%로 억제하는 농도인 EC₅₀은 5.8ug/ml인 것으로 나타났다.

[0076] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 식물체로부터 분리한 본 발명의 재조합 재조합 ACE2 및 재조합 ACE2-Fd 단백질이 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

[0078] <실시예 3>

[0079] SARS-CoV-2 바이러스 감염 동물모델에서 재조합 ACE2 단백질 및 재조합 ACE2-Fd 단백질의 CIVID-19 감염증 치료 효과 분석

[0081] <3-1> 실험동물 및 재료준비

[0082] ① 실험동물 준비

[0083] 실험동물로서 시리안 햄스터(Mesocricetus auratus) (Virus Free Certified)를 사용하였다. 호흡기 바이러스의 소동물 감염 모델인 햄스터는 상부 및 하부 호흡기에서의 수용체 발현 양상이 인체와 비슷하고 사람과 햄스터의 ACE2 수용체 상동성이 높아 SARS-CoV-1과 SARS-CoV-2에 감수성을 보이는 것으로 보고되어 있어, 본 실험에서는 이를 근거로 시리안 햄스터를 SARS-CoV-2 감염 동물모델로 선정하여 사용하였다. 평균 2개월령의 햄스터 30마리를 준비하였고, 햄스터 입고 후 순화기간 동안 몸무게가 골고루 분포되도록 몸무게에 따라 분류하였고, 시험 시간 동안 21~23℃의 온도 및 50~60%의 습도가 유지되는 조건에서 사육하였으며, 햄스터 전용 사료를 급여하였다.

[0085] ② SARS-CoV-2 바이러스 준비

[0086] SARS-CoV-2(NMC-nCoV02)를 10^5 TCID₅₀/mL로 준비하여 사용하였다. 본 발명에서 사용한 상기 SARS-CoV-2(NMC-nCoV02)는 질병관리청 국가병원체 자원은행으로부터 충북대에서 분양받아 사용하였다.

[0088] ③ 재조합 단백질 준비

[0089] 상기 실시예에서 준비한 식물로부터 정제한 본 발명의 재조합 ACE2 단백질 및 재조합 ACE2-Fd 단백질은 각각 2.5mg/kg의 농도로 준비하였고 4℃에서 보관하였다.

[0091] <3-2> 실험방법

[0092] 햄스터를 이용한 실험은 하기 표 1에 기재된 각 실험군에 대해 수행하였다.

표 1

실험군

구분	실험군	마리 수	투여물질	처리량
G1	대조군(PBS 처리군)	3	PBS 처리	
G2	바이러스 감염군	9	SARS-CoV-2 감염	
G3	재조합 ACE2 단백질 처리군	9	SARS-CoV-2 감염 + 감염 후, 1~5일째 재조합 ACE2 단백질 처리	500u1
G4	재조합 ACE2-Fd 단백질 처리군	9	SARS-CoV-2 감염 + 감염 후, 1~5일째 재조합 ACE2-Fd 단백질 처리	500u1

[0095] 이때, 상기 바이러스의 감염은 SARS-CoV-2를 10^5 TCID₅₀/mL로 비강을 통해 0.1 mL의 양을 접종하였고, 바이러스 감염 후 1~ 5일 동안 매일 햄스터 복강 내로 500u1의 ACE2 재조합 단백질 및 ACE2-Fd 재조합 단백질을 투여하였다.

[0097] ① 체중변화 분석

[0098] 각 실험군에 대해 바이러스 감염 전 후, 매일 각 햄스터 개체의 체중을 측정하였고, 평균 체중을 계산하여 분석하였다.

[0100] ② 세포배양(TCID₅₀ assay)을 이용한 바이러스 역가 측정

[0101] 시험 시작 후 9일 제 각 실험군의 햄스터로부터 비강개 및 폐 조직을 채취하였고 바이러스 역가를 세포배양을 이용하여 측정하였다. 세포를 이용한 바이러스 적정 시험을 위해, 96웰 플레이트에 배지 180u1 및 햄스터로부터 채취한 조직 20u1를 넣은 후 10배씩 단계별로 희석하였다(10^0 - 10^{-7}). 희석된 샘플을 monolayer Vero 세포에 접종하고 5일 동안 배양 후 CPE(Cytopathic effect)를 관찰하였다.

[0103] ③ 조직병리학 분석

[0104] 바이러스 감염 후 3, 6 및 9일째 햄스터로부터 채취한 폐의 일부를 포르말린 처리하여 고정하였고, 고정된 조직은 바이러스 사멸을 확인 후 슬라이드 제작 및 폐 조직 병변을 현미경을 통해 관찰하였다

[0106] <3-3> 결과

[0107] ① 체중분석 결과

[0108] 햄스터 실험동물을 대상으로 SARS-CoV-2 바이러스 감염 전부터 감염 후 9일째까지 체중변화를 분석하였는데, 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, G1 대조군은 실험 마지막 날 평균 체중이 실험 시작 전 대비 약 5 % 증가한 것

으로 나타났고, 바이러스 감염군인 G2군은 감염 2일 후부터 현저한 체중 감소가 일어나는 것으로 나타났으며, 감염 4일째 약 10 %의 체중이 감소된 것으로 나타났다.

[0109] 한편, 재조합 ACE2 단백질을 처리한 군인 G3 및 재조합 ACE2-Fd 단백질을 처리한 군인 G4는 바이러스 감염군인 G2군에 비해 체중 감소가 개선된 것으로 나타났고, 감염 8일째에는 체중이 대조군에 가깝게 회복되는 것으로 나타났다.

[0111] ② 비갑개조직 내 바이러스 역가 분석 결과

[0112] SARS-CoV-2 바이러스를 감염시킨 군(GS), 재조합 ACE2 단백질을 처리한 군(G3) 및 재조합 ACE2-Fd 단백질을 처리한 군(G4)에 대하여 햄스터의 비갑개 조직의 바이러스 역가를 배로 세포를 이용하여 분석하였다.

[0113] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 바이러스를 감염한 G2군에서는 감염 3일째에 $4.8 \sim 5.8 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{g}$ 의 바이러스가 검출되었고, 감염 6일째에는 약 $2.8 \sim 3.1 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{g}$ 바이러스 역가가 검출되는 것으로 나타났다. 한편, 재조합 ACE2 단백질을 처리한 G3 군은 바이러스 감염 후, 3일째에 회수한 비갑개 조직에서 $2.8 \sim 3.1 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{g}$ 의 바이러스가 역가가 검출되었으며, 감염 6일째 회수한 비갑개 조직에서 $1.8 \sim 2.1 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{g}$ 의 바이러스가 역가가 검출되어, G2 군에 비해 바이러스 역가가 월등히 감소된 것으로 나타났다. 또한, 재조합 ACE2-Fd 단백질을 처리한 G4 군은 바이러스 감염 후, 3일째에 회수한 비갑개 조직에서 $4.1 \sim 4.8 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{g}$ 의 바이러스가 역가가 측정되었고, 감염 6일째 회수한 비갑개 조직에서 $1.8 \sim 2.1 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{g}$ 의 바이러스가 역가가 검출되어, 재조합 ACE2-Fd 단백질 처리군 역시 G2 군에 비해 바이러스 역가가 월등히 감소된 것으로 나타났다.

[0115] ③ 폐조직에서의 병리학적 분석결과

[0116] 상기 각 햄스터 실험군에 대하여, 폐 염증감소 효능을 확인하기 위해 폐조직에 대한 병리학적 소견 검사를 헤마토크실렌 및 에오신 염색 후 현미경 관찰을 통해 수행하였다.

[0117] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 감염 3일째 SARS-CoV-2 바이러스로 감염된 군에서는 폐조직에서 염증 세포가 증가된 것으로 나타났고, 재조합 ACE2 단백질 투여군과 재조합 ACE2-Fd 단백질 투여군 군에서도 폐조직에서 염증세포가 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 증가된 것으로 나타났다.

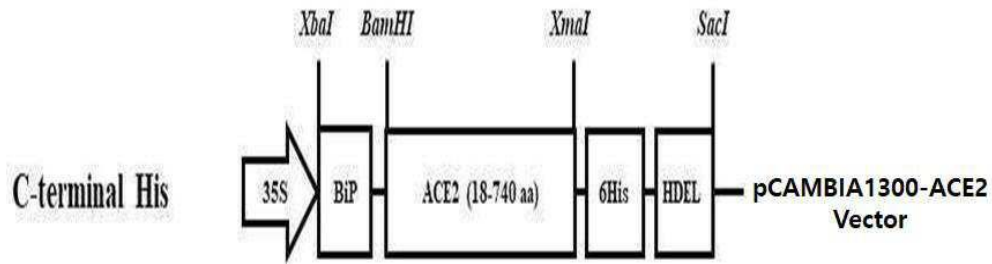
[0118] 한편, 감염 9일째에는 SARS-CoV-2 바이러스를 감염시킨 군에서는 폐조직 전반적으로 염증세포의 증가 및 폐포벽 두께 증가와 같은 염증소견을 나타내는 부위가 관찰되었으며, 3일째와 비교하여 심화된 염증소견을 나타내었다. 한편, 재조합 ACE2 단백질 투여군과 재조합 ACE2-Fd 단백질 투여군은 3일째 및 6일째와 비교하여 염증세포의 침윤 및 염증소견이 현저하게 감소되어 국소적인 부분에서만 염증소견이 관찰되었다(도 6).

[0120] 이상의 결과들을 통해 본 발명자들은 식물체로부터 생산한 재조합 ACE2 단백질 및 재조합 ACE2-Fd 단백질이 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 우수한 항바이러스 활성을 가질뿐만 아니라, SARS-CoV-2 감염에 의해 발생하는 폐염증의 증상을 개선 및 치료할 수 있는 효과가 있음을 확인함으로써, 이들 재조합 단백질들을 COVID-19 감염증의 새로운 치료제로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

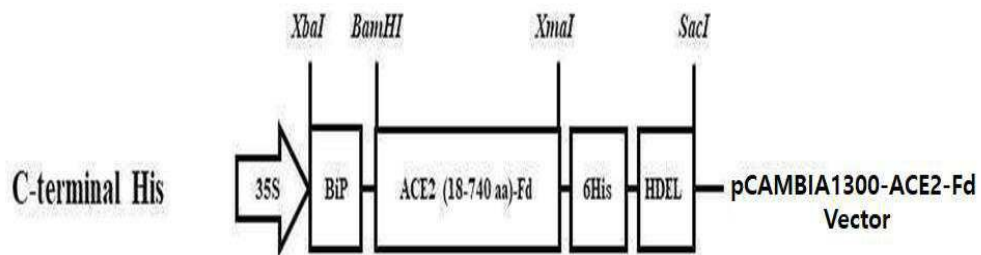
[0122] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

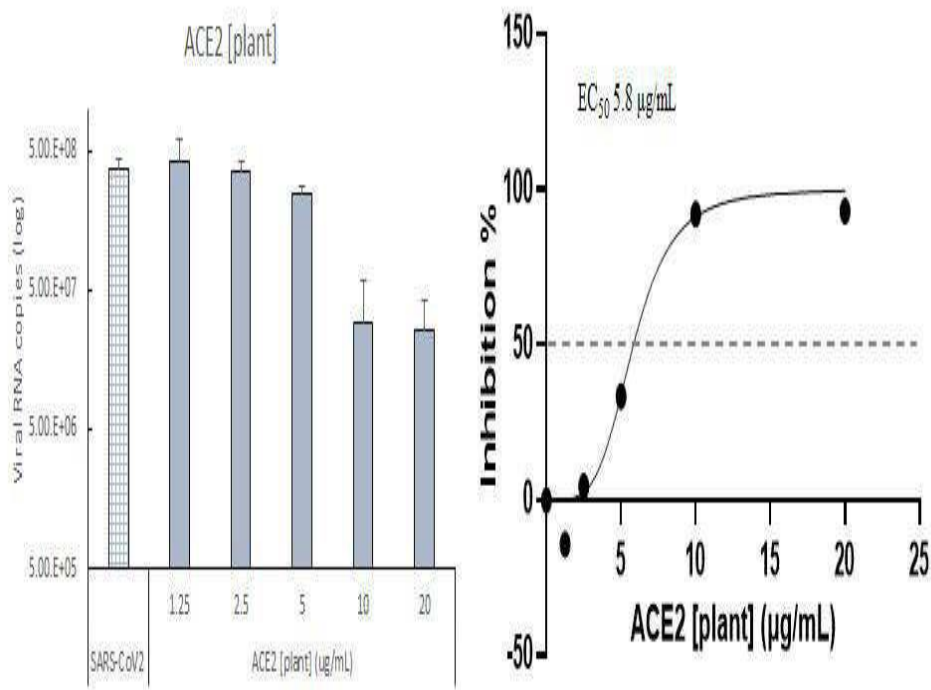
도면1



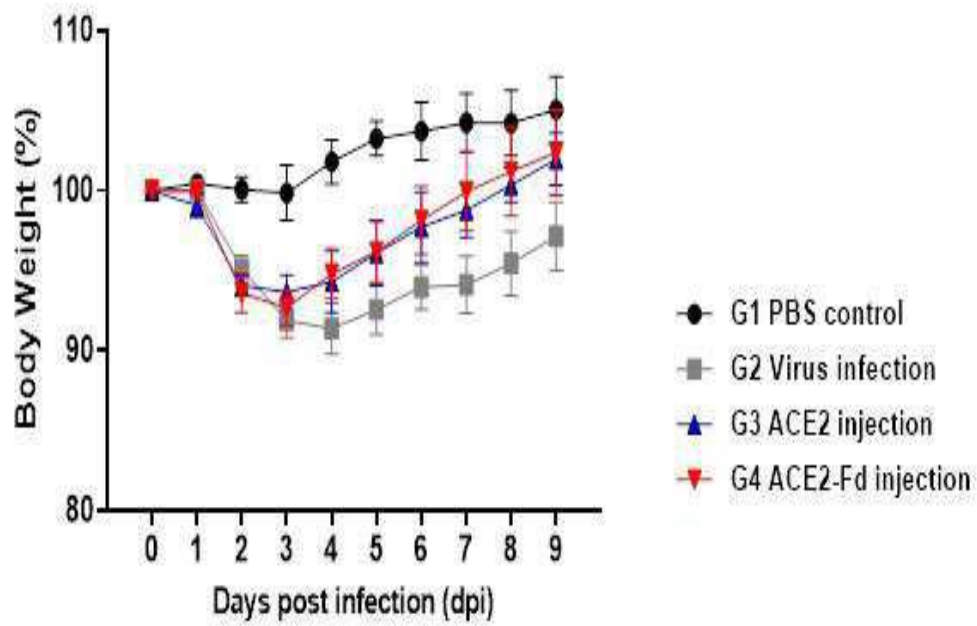
도면2



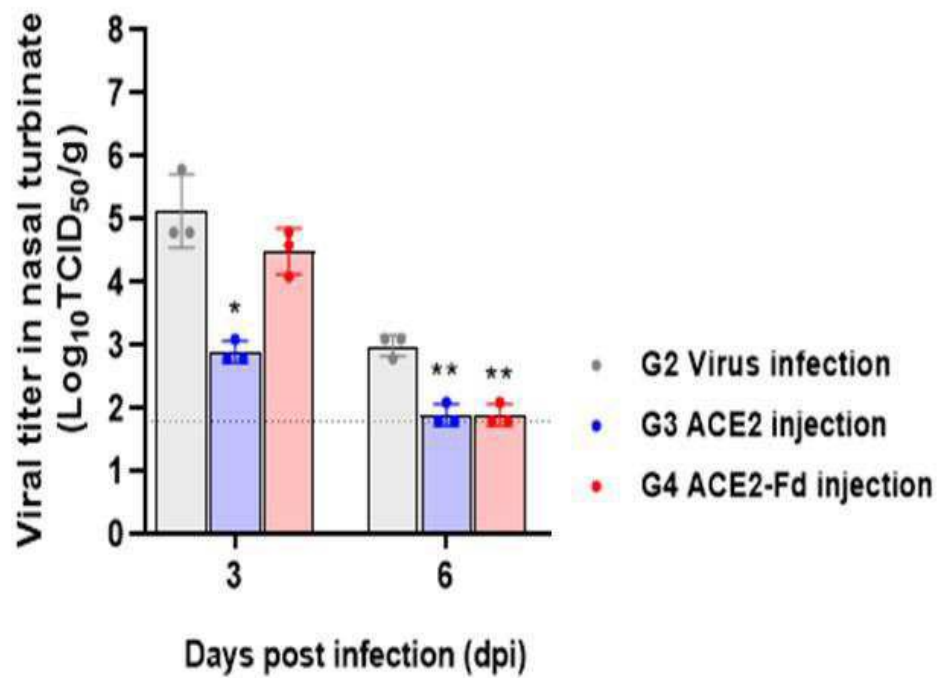
도면3



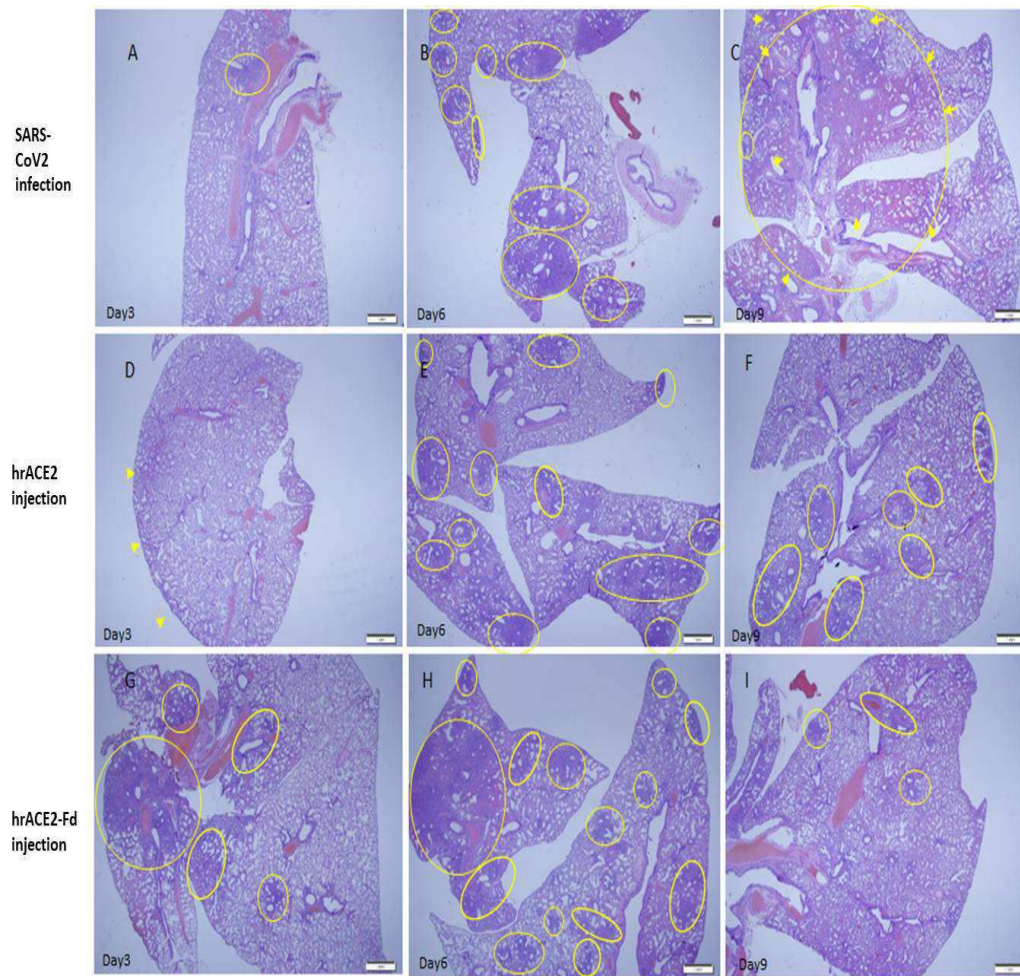
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of Chosun University
 - <120> Use of ACE2 as treatment of COVID-19
 - <130> NPDC85906.01
 - <160> 9
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 1989
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> Codon-optimized ACE2 DNA sequence for plant expression systems
 - <400> 1
- | | |
|---|-----|
| cagtccacca tcgaggaaca ggcaaagaca tttttggata agtttaatca cgaggccgaa | 60 |
| gatctgttct atcagagttc actggcttct tggaattata acaccaatat tactgaagag | 120 |

aatgtccaaa acatgaataa tgctggggac aaatggctctg cctttttaaa ggagcagtc	180
acgcttgccc aaatgtatcc gttacaagag attcaaaatc tcactgtcaa gcttcagctg	240
caggctcttc agcaaaatgg ttcttcagta ttgtcggagg acaagagcaa gcggttgaac	300
acaattctaa acacaatgag tactatctac agtactggaa aagtttgtaa cccggacaat	360
ccacaagagt gtttattact tgagcctggt ttgaatgaaa ttatggcaaa cagtctagac	420
tacaatgaga ggctctgggc ttgggaaagc tggagatcag aagtggcaa acagctgagg	480
ccattgtatg aggagtatgt tgtcttgaag aatgagatgg cttagacaaa tcattatgag	540
gactatggtg attattggcg gggagactat gaagtgaatg gagtagatgg ttacgactac	600
agccgcggcc agttgattga agacgtggaa cacacctttg aagagattaa accattatac	660
gaacatcttc atgcttatgt gcgcgcaaag ttgatgaatg cctatccttc ctacattagt	720
ccaattggat gcctccctgc tcacttgctt ggtgacatgt ggggtagatt ttggactaat	780
ctgtactctt tgacagttcc atttggacag aaaccaaca tagatgttac tgatgcaatg	840
gtggaccagg cctgggacgc acagagaata ttcaaggagg ccgagaagtt ctttgtatct	900
gttggctctc ctaacatgac tcaaggattt tgggaaaatt ccatgctaac ggacccaggt	960
aatgttcaga aggcagctctg ccctcctaca gcgtgggacc tcggaaggcg cgacttcagg	1020
atattgatgt gcacaaaggt gacaatggac gacttctga ctgctacca tgagatgggg	1080
catatccagt atgatatggc atatgctgcg caaccttttc ttctaagaaa tggagctaat	1140
gaaggattcc acgaagctgt tggggaaatc atgagctttt ctgctgccac acctaagcat	1200
ctcaagtcca ttggtcttct gtcgcccgat tttcaagaag acaatgaaac agaaataaac	1260
ttcctgctca agcaagcact cacgattgtt gggactttgc cattactta catgttgag	1320
aagtggaggt ggatggtctt taaaggtgag attcccaaag accagtggat gaagaagtgg	1380
tgggagatga agcgtgagat agttgggggtg gtggagcctg tgcccatga tgaaacttac	1440
tgtagacctg catctctgtt ccattgttct aatgactact cattcattcg ttactacacc	1500
agaacctttt accaattcca gtttcaagaa gcactttgtc aagcagctaa acatgaaggc	1560
ccgttacaca aatgtgacat ctcaaactct acagaggctg gccagaaact gttcaacatg	1620
ctgaggcttg gtaagtcaaa gccctggacc ctgccttttg aaaatgttgt aggagcgaaa	1680
aacatgaatg taaggccgtt gctaaactac tttagcctt tattcacctg gctgaaagac	1740
caaaacaaga attcttttgt cggatggagt actgactggt ctccatagc agaccaaagc	1800
atcaaagtgc gtataagcct aaaatcagct cttggagata aagcatatga atggaacgac	1860
aatgaaatgt atctgttccg atcatctgtt gcttatgcta tgcgtcaata ctttcttaag	1920

gtaaagaacc agatgattct ttttggtgaa gaggatgtgc gaggggctaa tttgaaacca	1980
agaatctcc	1989
<210> 2	
<211> 2256	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Codon-optimized ACE2-Fd DNA sequence for plant expression systems	
<400> 2	
cagtccacca ttgaggaaca ggccaagaca tttttggata agtttaatca cgaagcagaa	60
gacctgttct atcaaagttc acttgcttct tggaactata acactaatat tactgaagag	120
aatgtccaaa acatgaataa tgcgggggat aagtggctcg cctttttaaa ggagcagtc	180
acattggcac aaatgtatcc actacaggaa attcagaatc tcacagtcaa gcttcaactg	240
caggctcttc agcaaaatgg gtcacagtg ctctcggagg acaagagcaa acggttgaac	300
acaattctaa acactatgtc taccatctac agtactggaa aagtttgtaa cccagataat	360
ccacaagaat gcctcttact tgagccaggt ttgaatgaaa taatggctaa cagtttagac	420
tacaatgaga ggctctgggc ttgggaaagc tggagatctg aggtcggcaa gcaactgagg	480
ccattatatg aagagtatgt tgtcttgaag aatgagatgg caagagctaa tcattatgag	540
gactacggcg attattggag aggagactat gaagtaaatg gtgtggatgg ctacgattac	600
agccgcggtc agcttattga agatgttgag cacacctttg aggagattaa accattatat	660
gaacaccttc acgcttacgt gagggctaag ttgatgaatg cctatccttc gtatattagt	720
ccaattggat gcctccctgc tcatttgcct ggtgatatgt ggggtagatt ttggacaaat	780
ctgtactctt tgacagttcc gtttggacag aaaccgaaca tagacgttac tgatgcaatg	840
gtggatcagg ccctgggatgc acagagaata ttcaaggagg ccgagaagtt ctttgtatct	900
gttggctctc cgaatatgac tcaaggattc tgggaaaatt ccatgctaac ggaccagga	960
aacgttcaga aggcagtcctg ccatccacg gcttgggacc tggggaaggg cgacttcagg	1020
attcttatgt gcacaaaggt gacaatggat gacttcctga cagctcatca tgagatgggt	1080
catatccaat atgatatggc gtatctgcg caaccttttc tgctaagaaa tggagctaat	1140
gaaggattcc atgaagctgt tggggagatc atgtactta gtgccgccac tcctaagcat	1200
ctcaaaagta ttggtctttt gtcacccgat tttcaagaag acaatgaaac agaaataaac	1260
ttctgtctca aacaagcact cagattgtt ggtactctgc catttactta catgctcgag	1320
aatggaggt ggatggtctt taagggtgag attcccaaag accaatggat gaaaaagtgg	1380

tgggagatga agcgagagat cgttggtgtg gttgagcctg tgccgcatga tgaaacatac 1440
 tgtgacccgg catctctgtt ccacgtttct aatgactact cattcattcg gtattatact 1500
 aggacccttt accaattcca gtttcaggaa gcactttgtc aagcagctaa gcatgagggc 1560
 cctctacaca aatgtgacat ctcaaactct acagaggctg gccagaaact gttcaatatg 1620
 ctgaggcttg gaaaatcaga gccttggacc cttgcattgg aaaatgttgt aggagcaaag 1680
 aacatgaatg tacgtccact gctcaactat ttcgagccct tatttacctg gctgaaggat 1740
 cagaacaaga attcttttgt gggatggagt accgactgga gtccatatgc agaccaaagc 1800

ataaaagtgc gtatatcgct aaaatcagct cttggagata aggcttatga atggaatgac 1860
 aatgaaatgt acctgtttcg atcatctgtt gcatacgca tgaggcagta ctttttaaaa 1920
 gtaaaaaatc aaatgattct ttttggggag gaggatgtgc gagggtgctaa ttgaaacca 1980
 agaattctct tcaattctt tgtcactgca cctaagaatg tgtctgatat cattcctaga 2040
 actgaagtgt agaaggccat caggatgtcc cgcagccgta tcaatgacgc tttccggctg 2100
 aacgacaaca gcctagagtt tctggggata cagccaacgc ttggacctcc taaccagccc 2160
 cctgtttccg gttctggtta tattctgag gctcctagag atgggcaggc ttacgttcgt 2220

aaagatggcg aatgggtatt actttctacc tttttg 2256

<210> 3

<211> 663

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant ACE2 protein sequence

<400> 3

Gln Ser Thr Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn

1 5 10 15

His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp Asn

20 25 30

Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn Ala

35 40 45

Gly Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala Gln

50 55 60

Met Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln Leu

65 70 75 80

Gln Ala Leu Gln Gln Asn Gly Ser Ser Val Leu Ser Glu Asp Lys Ser

	85	90	95
Lys Arg Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser Thr			
	100	105	110
Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu Glu			
	115	120	125
Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu Arg			
	130	135	140
Leu Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu Arg			
145	150	155	160
Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg Ala			
	165	170	175
Asn His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu Val			
	180	185	190
Asn Gly Val Asp Gly Tyr Asp Tyr Ser Arg Gly Gln Leu Ile Glu Asp			
	195	200	205
Val Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu His			
	210	215	220
Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile Ser			
225	230	235	240
Pro Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly Arg			
	245	250	255
Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys Pro			
	260	265	270
Asn Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Val Asp Gln Ala Trp Asp Ala Gln			
	275	280	285
Arg Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu Pro			
	290	295	300
Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Pro Gly			
305	310	315	320
Asn Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly Lys			
	325	330	335

Gly Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp Phe
340 345 350

Leu Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala Tyr
355 360 365

Ala Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn Gly Ala Asn Glu Gly Phe His
370 375 380

Glu Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys His
385 390 395 400

Leu Lys Ser Ile Gly Leu Leu Ser Pro Asp Phe Gln Glu Asp Asn Glu
405 410 415

Thr Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly Thr
420 425 430

Leu Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe Lys
435 440 445

Gly Glu Ile Pro Lys Asp Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met Lys
450 455 460

Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr Tyr
465 470 475 480

Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe Ile
485 490 495

Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala Leu
500 505 510

Cys Gln Ala Ala Lys His Glu Gly Pro Leu His Lys Cys Asp Ile Ser
515 520 525

Asn Ser Thr Glu Ala Gly Gln Lys Leu Phe Asn Met Leu Arg Leu Gly
530 535 540

Lys Ser Glu Pro Trp Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Val Gly Ala Lys
545 550 555 560

Asn Met Asn Val Arg Pro Leu Leu Asn Tyr Phe Glu Pro Leu Phe Thr
565 570 575

Trp Leu Lys Asp Gln Asn Lys Asn Ser Phe Val Gly Trp Ser Thr Asp
580 585 590

Trp Ser Pro Tyr Ala Asp Gln Ser Ile Lys Val Arg Ile Ser Leu Lys
595 600 605

Ser Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Glu Trp Asn Asp Asn Glu Met Tyr

610 615 620
Leu Phe Arg Ser Ser Val Ala Tyr Ala Met Arg Gln Tyr Phe Leu Lys
625 630 635 640

Val Lys Asn Gln Met Ile Leu Phe Gly Glu Glu Asp Val Arg Val Ala
645 650 655

Asn Leu Lys Pro Arg Ile Ser

660

<210> 4

<211> 752

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant ACE2-Fd fusion protein sequence

<400> 4

Gln Ser Thr Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn
1 5 10 15

His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp Asn
20 25 30

Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn Ala
35 40 45

Gly Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala Gln
50 55 60

Met Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln Leu

65 70 75 80
Gln Ala Leu Gln Gln Asn Gly Ser Ser Val Leu Ser Glu Asp Lys Ser

85 90 95
Lys Arg Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser Thr

100 105 110
Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu Glu

115 120 125

Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu Arg
130 135 140

Leu Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu Arg
145 150 155 160

Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg Ala
165 170 175

Asn His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu Val
180 185 190

Asn Gly Val Asp Gly Tyr Asp Tyr Ser Arg Gly Gln Leu Ile Glu Asp
195 200 205

Val Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu His
210 215 220

Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile Ser
225 230 235 240

Pro Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly Arg
245 250 255

Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys Pro
260 265 270

Asn Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Val Asp Gln Ala Trp Asp Ala Gln
275 280 285

Arg Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu Pro
290 295 300

Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Pro Gly
305 310 315 320

Asn Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly Lys
325 330 335

Gly Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp Phe
340 345 350

Leu Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala Tyr
355 360 365

Ala Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn Gly Ala Asn Glu Gly Phe His

370 375 380
 Glu Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys His
 385 390 395 400
 Leu Lys Ser Ile Gly Leu Leu Ser Pro Asp Phe Gln Glu Asp Asn Glu
 405 410 415
 Thr Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly Thr
 420 425 430

 Leu Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe Lys
 435 440 445
 Gly Glu Ile Pro Lys Asp Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met Lys
 450 455 460
 Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr Tyr
 465 470 475 480
 Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe Ile
 485 490 495
 Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala Leu

 500 505 510
 Cys Gln Ala Ala Lys His Glu Gly Pro Leu His Lys Cys Asp Ile Ser
 515 520 525
 Asn Ser Thr Glu Ala Gly Gln Lys Leu Phe Asn Met Leu Arg Leu Gly
 530 535 540
 Lys Ser Glu Pro Trp Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Val Gly Ala Lys
 545 550 555 560
 Asn Met Asn Val Arg Pro Leu Leu Asn Tyr Phe Glu Pro Leu Phe Thr
 565 570 575

 Trp Leu Lys Asp Gln Asn Lys Asn Ser Phe Val Gly Trp Ser Thr Asp
 580 585 590
 Trp Ser Pro Tyr Ala Asp Gln Ser Ile Lys Val Arg Ile Ser Leu Lys
 595 600 605
 Ser Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Glu Trp Asn Asp Asn Glu Met Tyr
 610 615 620
 Leu Phe Arg Ser Ser Val Ala Tyr Ala Met Arg Gln Tyr Phe Leu Lys

625 630 635 640
Val Lys Asn Gln Met Ile Leu Phe Gly Glu Glu Asp Val Arg Val Ala

645 650 655
Asn Leu Lys Pro Arg Ile Ser Phe Asn Phe Phe Val Thr Ala Pro Lys

660 665 670
Asn Val Ser Asp Ile Ile Pro Arg Thr Glu Val Glu Lys Ala Ile Arg

675 680 685
Met Ser Arg Ser Arg Ile Asn Asp Ala Phe Arg Leu Asn Asp Asn Ser

690 695 700
Leu Glu Phe Leu Gly Ile Gln Pro Thr Leu Gly Pro Pro Asn Gln Pro

705 710 715 720

Pro Val Ser Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln

725 730 735
Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu

740 745 750

<210> 5

<211> 251

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NB(New Bip; new chaperone binding protein) DNA sequence

<400> 5

atggctcgct cgtttggagc taacagtacc gttgtgttgg cgatcatctt cttcggtgag 60

tgattttccg atcttcttct ccgatttaga tctcctctac attgttgctt aatctcagaa 120

ccttttttcg ttgttcttgg atctgaatgt gtttgtttgc aatttcacga tcttaaaagg 180

ttagatctcg attggtattg acgattggaa tctttacgat ttcaggatgt ttatttgcgt 240

tgctctctgc a 251

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6xHis DNA sequence

<400> 6

caccaccacc accaccac 18

<210> 7

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> DNA sequence of HDEL

<400> 7

cacgatgagc tc 12

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fd domain polypeptide sequence of Phage T4 Fibrin

<400> 8

Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys

1 5 10 15

Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu

20 25

<210> 9

<

211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA sequence of Foldon (Fd)

<400> 9

ggctacattc ctgaggctcc aagagatggt caagcatatg tgaggaagga tggagaatgg 60

gttttgcttt ctactttttt g 81