(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0154796
(43) 공개일자 2022년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/48 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/485 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7035927
(22) 출원일자(국제) 2021년03월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년10월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/022611
(87) 국제공개번호 WO 2021/188576
국제공개일자 2021년09월23일
(30) 우선권주장
62/989,976 2020년03월16일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
더 보오드 오브 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 일리노이즈
미국 61801 일리노이 어바나 사우쓰 라이트 스트리트 506 헨리 어드미니스트레이션 빌딩 352
(72) 발명자
프록코 에릭
미국 일리노이 61821 샴페인 웨스트 윌리엄 스트리트 1215
말릭 아스랄
미국 일리노이 60612 시카고 웨스트 포크 스트리트 1853 엠씨-682 스위트 446 오피스 오브 테크놀로지 매니지먼트
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

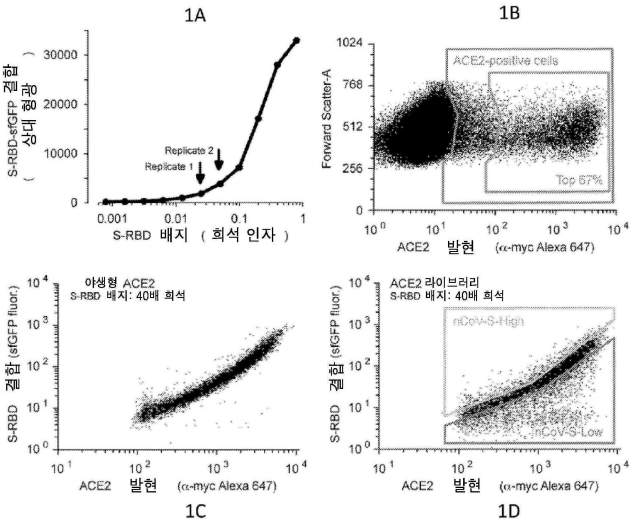
전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 **변형된 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2) 및 이의 용도**

(57) 요 약

변형된 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2) 폴리펩티드가 기재된다. 상기 변형된 폴리펩티드는 ACE2를 세포 진입 수용체로서 사용하는 코로나바이러스의 S 표면 당단백질에 폴리펩티드가, 친화도의 직접적인 증가를 통해 또는 ACE2의 폴딩 및 발현 개선을 통해 더 잘 결합하도록 하는 적어도 1개의 아미노산 치환을 포함한다. CoV 진입, 복제 및/또는 확산의 억제, CoV 노출 전 및 노출 후 예방, 및 CoV 감염 (예: COVID-19)의 치료를 위한, 변형된 ACE2 폴리펩티드의 용도가 또한 기재되어 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 38/48 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)
C12Y 304/17023 (2013.01)
G01N 33/56983 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)
G01N 2333/165 (2013.01)

(72) 발명자
러만 잘레스
미국 일리노이 60612 시카고 웨스트 포크 스트리트 1853 엠씨-682 스위트 446 오피스 오브 테크놀로지 매니지먼트
장 리앙휘
미국 일리노이 60612 시카고 웨스트 포크 스트리트 1853 엠씨-682 스위트 446 오피스 오브 테크놀로지 매니지먼트
시옹 시친
미국 일리노이 60612 시카고 웨스트 포크 스트리트 1853 엠씨-682 스위트 446 오피스 오브 테크놀로지 매니지먼트

(30) 우선권주장
63/022,151 2020년05월08일 미국(US)
63/042,907 2020년06월23일 미국(US)
63/089,895 2020년10월09일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 안지오텐신-전환 효소 2 (angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) 또는 이의 단편을 포함하는 변형된 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2) 폴리펩티드로서, 상기 폴리펩티드는 서열번호: 1의 야생형 인간 ACE2에 비해 적어도 1개의 아미노산 치환을 포함하고, 야생형 인간 ACE2에 비해 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2)의 S 단백질에의 결합이 증가한 것인 변형된 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2) 폴리펩티드.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 1개의 아미노산 치환은 서열번호: 1에 대해, T27Y, L79T, N330Y, S19P, E23F, Q24T, A25V, K26I, K26A, K26D, T27M, T27L, T27A, T27D, T27K, T27H, T27W, T27F, T27C, L29F, D30I, D30E, K31W, K31Y, N33D, H34V, H34A, H34S, H34P, E35V, E35C, L39K, L39R, F40D, F40R, Y41R, Q42M, Q42L, Q42I, Q42V, Q42K, Q42C, A65W, W69I, W69V, I69T, I69K, F72Y, E75A, E75S, E75T, E75K, E75R, E75W, E75G, Q76M, Q76I, Q76V, Q76T, Q76R, Q76Y, L79I, L79V, L79W, L79Y, L79F, L79P, M82C, Q89I, Q89D, Q89P, N90M, N90L, N90I, N90V, N90A, N90S, N90T, N90Q, N90D, N90E, N90K, N90R, N90H, N90W, N90Y, N90F, N90P, N90G, N90C, L91P, T92M, T92L, T92I, T92V, T92A, T92N, T92Q, T92D, T92E, T92K, T92R, T92H, T92W, T92Y, T92F, T92P, T92G, T92C, T324E, T324P, Q325P, N330L, N330H, N330W, N330F, L351F, A386L, A386I, P389D, R393K 및 R518G로 구성된 그룹으로부터 선택된 치환인 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 1개의 아미노산 치환은 서열번호: 1에 대해, T27Y, L79T, N330Y, S19P, A25V, T27M, T27L, T27A, T27D, T27H, T27W, T27F, T27C, D30E, K31W, H34V, H34A, H34P, L39K, L39R, Q42M, Q42L, Q42C, W69V, F72Y, E75K, E75R, Q76V, Q76T, L79I, L79V, L79W, L79Y, L79F, Q89P, N90M, N90L, N90I, N90V, N90A, N90S, N90T, N90Q, N90D, N90E, N90K, N90R, N90H, N90P, N90G, N90C, L91P, T92M, T92L, T92I, T92V, T92A, T92N, T92Q, T92D, T92E, T92K, T92R, T92H, T92W, T92Y, T92F, T92P, T92G, T92C, T324E, T324P, Q325P, N330L, N330H, N330W, N330F, L351F 및 A386L로 구성된 그룹으로부터 선택된 치환인 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 1개의 아미노산 치환은 서열번호: 1에 대해, T27Y, L79T, N330Y, A25V, T27M, T27L, K31W, H34V, H34A, H34P, Q42L, Q42C, L79I, L79V, L79W, L79Y, L79F, N90A, N90S, N90T, N90Q, N90E, N90H, L91P, T92M, T92L, T92I, T92V, T92N, T92Q, T92D, T92E, T92R, T92H, T92W, T92Y, T92F, T92G, T92C, T324P, Q325P, N330H, N330W, N330F 및 A386L로 구성된 그룹으로부터 선택된 치환인 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 적어도 1개의 아미노산 치환은 서열번호: 1의 인간 ACE2의 잔기 19, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 41, 42, 65, 69, 72, 75, 76, 79, 82, 89, 90, 91, 92, 324, 325, 330, 351, 386, 389, 393 또는 518에 존재하는 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 적어도 1개의 아미노산 치환은 서열번호: 1에 대해, T27Y, L79T, N330Y, S19P, A25V, K26D, L29F, N33D, L39R, F40D, W69V, F72Y, Q76T, Q89P, L91P, T324P, T324E, Q325P, R518G, L351F, A386L, Q24T, T27H, D30E, K31Y, H34A, Y41R, Q42L, Q42K, E75K, L79V, N90Q, T92Q, N330H 및 R393K로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1개의 아미노산 치환은 서열번호: 1의 인간 ACE2의 잔기 N90, L91 및 T92에서 글리코실화 모티프 (glycosylation motif)를 제거하는 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 8

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서,

T27Y, L79T, 및 N330Y 아미노산 치환;

H34A, T92Q, Q325P, 및 A386L 아미노산 치환;

T27Y, L79T, N330Y, 및 A386L 아미노산 치환;

L79T, N330Y, 및 A386L 아미노산 치환;

T27Y, N330Y, 및 A386L 아미노산 치환;

T27Y, L79T, 및 A386L 아미노산 치환;

A25V, T27Y, T92Q, Q325P, 및 A386L 아미노산 치환;

H34A, L79T, N330Y, 및 A386L 아미노산 치환;

A25V, T92Q, 및 A386L 아미노산 치환; 또는

T27Y, Q42L, L79T, T92Q, Q325P, N330Y, 및 A386L 아미노산 치환을 포함하고,

상기 아미노산 치환은 서열번호: 1에 대한 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 9

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호: 1의 인간 ACE2에 대해 단일 아미노산 치환을 갖는 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 전장 인간 ACE2를 포함하고, 야생형 인간 ACE2에 비해 적어도 1개의 아미노산 치환을 포함하는 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열번호: 1에 대해 적어도 95% 동일한 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열번호: 1에 대해 적어도 99% 동일한 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 13

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 인간 ACE2의 단편으로 구성된 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 인간 ACE2의 단편은 세포외 단편인 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 세포외 단편은 서열번호: 1의 인간 ACE2의 잔기 19 내지 615에 해당하는 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 세포외 단편은 서열번호: 1의 인간 ACE2의 잔기 20 내지 615에 해당하는 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 17

청구항 14 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포외 단편의 아미노산 서열은 서열번호: 1의 잔기 19 내지 615에 대해 적어도 95% 동일한 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 18

청구항 14 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포외 단편의 아미노산 서열은 서열번호: 1의 잔기 19 내지 615에 대해 적어도 99% 동일한 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 19

청구항 13에 있어서, 상기 단편은 서열번호: 1의 인간 ACE2의 잔기 1-732, 19-732 또는 19-740에 해당하는 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 단편은 서열번호: 1의 인간 ACE2의 잔기 19-732에 해당하는 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 단편의 아미노산 서열은 서열번호: 10으로 구성된 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 22

청구항 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 이량체를 형성하는 것인 변형된 폴리펩티드.

청구항 23

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항의 변형된 폴리펩티드 및 이종 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 이종 폴리펩티드는 Fc 단백질인 것인 융합 단백질.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 상기 Fc 단백질은 인간 Fc 단백질인 것인 융합 단백질.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 인간 Fc 단백질은 인간 IgG1 Fc인 것인 융합 단백질.

청구항 27

청구항 23 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호: 11을 포함하거나 또는 이로 구성된 것인 융합 단백질.

청구항 28

청구항 23에 있어서, 상기 이종 폴리펩티드는 형광 단백질, 효소, 항체 또는 항원-결합 단백질, 사이토카인, 세포 리간드 또는 수용체, 또는 혈청 알부민인 것인 융합 단백질.

청구항 29

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항의 변형된 폴리펩티드, 또는 청구항 23 내지 28 중 어느 한 항의 융합 단백질, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 30

청구항 29에 있어서, 기관내 또는 흡입 투여를 위해 제제화된 것인 조성물.

청구항 31

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항의 변형된 폴리펩티드 또는 청구항 23 내지 28 중 어느 한 항의 융합 단백질과 코로나바이러스 (coronavirus: CoV)를 접촉시키는 단계를 포함하는, 코로나바이러스 (CoV)의 복제를 억제하는인 비트로 방법.

청구항 32

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항의 변형된 폴리펩티드, 청구항 23 내지 28 중 어느 한 항의 융합 단백질, 또는 청구항 29 또는 30의 조성물의 치료적 또는 예방적으로 유효한 양을 대상체에게 투여하고, 이에 의해 대상체에서 코로나바이러스 (CoV) 복제 및/또는 확산을 억제하는 단계를 포함하는, 대상체에서 코로나바이러스 (CoV) 복제 및/또는 확산을 억제하는 방법.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 상기 변형된 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 정맥내, 기관내 또는 흡입에 의해 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 상기 변형된 폴리펩티드 또는 융합 단백질은 네뷸라이저 (nebulizer)를 사용한 흡입에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 35

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항의 변형된 폴리펩티드 또는 청구항 23 내지 28 중 어느 한 항의 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 36

청구항 35의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 37

청구항 35의 핵산 분자 또는 청구항 36의 벡터, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

청구항 38

청구항 35의 핵산 분자, 청구항 36의 벡터, 또는 청구항 37의 조성물의 치료적 또는 예방적으로 유효한 양을 대상체에게 투여하고, 이에 의해 대상체에서 코로나바이러스 (CoV) 복제 및/또는 확산을 억제하는 단계를 포함하는, 대상체에서 코로나바이러스 (CoV) 복제 및/또는 확산을 억제하는 방법.

청구항 39

청구항 32 내지 34 및 청구항 38 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 (i) 의료 종사자; (ii) CoV에 대해 양성인 환자; (iii) COVID-19 환자 (iv) 고령이거나, 또는 기저 의학적 병태가 있는 대상체; 또는 (iv) CoV에 노출된 대상체인 것인 방법.

청구항 40

청구항 38 또는 39에 있어서, 상기 핵산 분자, 벡터 또는 조성물은 정맥내, 기관내 또는 흡입 투여에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 41

생물학적 샘플에서 코로나바이러스 (CoV)를 검출하는 방법으로서,

상기 생물학적 샘플을 청구항 1 내지 22 중 어느 한 항의 변형된 폴리펩티드, 또는 청구항 23 내지 28 중 어느 한 항의 융합 단백질과 접촉시키는 단계; 및

상기 생물학적 샘플에 대한 상기 변형된 폴리펩티드 또는 융합 단백질의 결합을 검출하고, 이에 의해 상기 생물학적 샘플에서 CoV를 검출하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 42

청구항 41에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 혈액, 타액, 객담, 비강 면봉 (nasal swab) 또는 기관지폐포 세척액 샘플인 것인 방법.

청구항 43

청구항 31 내지 34 및 38 내지 42 중 어느 한 항에 있어서, 상기 코로나바이러스는 인간 코로나바이러스인 것인 방법.

청구항 44

청구항 43에 있어서, 상기 인간 코로나바이러스는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 (SARS-CoV), SARS-CoV-2, 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스 (MERS-CoV), 인간 코로나바이러스 HKU1 (HKU1-CoV), 인간 코로나바이러스 OC43 (OC43-CoV), 인간 코로나바이러스 229E (229E-CoV), 또는 인간 코로나바이러스 NL63 (NL63-CoV)인 것인 방법.

청구항 45

청구항 31 내지 34 및 38 내지 42 중 어느 한 항에 있어서, 상기 코로나바이러스는 인수공통 (zoonotic) 코로나바이러스인 것인 방법.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 상기 인수공통 코로나바이러스는 박쥐 (bat) 코로나바이러스 또는 설치류 (rodent) 코로나바이러스인 것인 방법.

청구항 47

청구항 46에 있어서, 상기 박쥐 코로나바이러스는 LYRa11, Rs4231, Rs7327, Rs4084 또는 RsSHC014인 것인 방법.

청구항 48

고체 지지체에 결합된 청구항 1 내지 22 중 어느 한 항의 변형된 폴리펩티드 또는 청구항 23 내지 28 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2020년 10월 9일자로 제출된 미국 가출원 번호 제63/089,895호, 2020년 6월 23일자로 제출된 미국 가출원 번호 제63/042,907호, 2020년 5월 8일자로 제출된 미국 가출원 번호 제63/022,151호, 및 2020년 3월 16일자로 제출된 미국 가출원 번호 제62/989,976호의 우선권을 주장하며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

[0003] **분야**

[0004] 본 개시내용은 SARS-CoV-2 및 안지오텐신-전환 효소 2 (angiotensin-converting enzyme 2: ACE2)를 세포 진입 수용체로 사용하는 다른 코로나바이러스 (coronaviruses)에 대한 결합이 증가하고 폴딩 (folding)이 향상된 변형된 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2) 단백질에 관한 것이다.

[0005] **정부 지원 사사**

[0006] 본 발명은 국립 보건원 (National Institutes of Health)에서 수여한 보조금 번호 5R01AI129719-03에 따라 정

부 지원으로 이루어졌다. 정부는 발명에 대한 특정 권리를 가지고 있다.

배 경 기 술

[0007] 2019년 12월에, 박쥐 코로나바이러스 (bat coronaviruses)와 밀접한 관련이 있는 새로운 인수공통 (zoonotic) 베타코로나바이러스 (betacoronavirus)가 중국 우한시의 화난 수산물 시장에서 인간에게 유출되었다 (Zhu et al., N Engl J Med. 2020 Feb 20;382(8):727-733; Zhou et al., Nature. 2020 Feb 3;579(7798):270-273). SARS-CoV-2로 불리는 이 바이러스는 거의 20년 전에 더 작게 발병을 일으킨 SARS (severe acute respiratory syndrome) 코로나바이러스와 유사하기 때문에 (Peiris et al., Lancet. 2003 Apr 19;361(9366):1319-1325; Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Nat Microbiol. 2020 Mar 2;4(5):3), 그 이후로 전 세계적으로 인간 대 인간으로 빠르게 확산되어, 정부들의 비상 봉쇄 조치를 촉발하였다 (Patel et al., MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020 Feb 7;69(5):140-146). 주식 시장이 하락하였고, 여행 제한이 부과되었으며, 공개 모임이 취소되었고, 많은 사람들이 격리되었다. 이러한 이벤트들은 여러 세대에 걸쳐 경험했던 것과는 다르다. COVID-19 (coronavirus disease 2019)의 증상은 경증에서 마른 기침, 발열, 폐렴 및 사망에 이르기까지 다양하며, SARS-CoV-2는 노인 및 기타 취약 그룹에서 치명적이다 (Wang et al, J Med Virol. 2020 Apr;92(4):441-447; Huang et al., Lancet. 2020 Feb 15;395(10223):497-506). 현재 SARS-CoV-2 감염을 예방하기 위한 백신은 없으며, 이 바이러스 감염을 특별히 치료하기 위해 승인된 약물도 없다. 따라서, SARS-CoV-2 감염을 치료하는데 효과적인 치료제의 개발이 필요하다.

발명의 내용

[0008] **요약**

[0009] 본원에는 ACE2의 향상된 폴딩 및 구조적 안정화, 글리칸 변형의 제거 또는 친화도 증가를 통해, SARS-CoV-2의 S 단백질에 대한 결합 향상을 나타내는 인간 ACE2 폴리펩티드가 기재되어 있다. 상기 변형된 폴리펩티드는 COVID-19, 또는 ACE2를 세포 수용체로서 사용하는 임의의 코로나바이러스로 인한 질병의 검출, 예방 (노출 전 또는 노출 후 예방), 또는 치료를 위한 진단제 또는 치료제로 사용될 수 있다.

[0010] 본원에는 ACE2 또는 이의 단편, 예컨대 세포외 단편을 포함하는 변형된 ACE2 폴리펩티드가 제공된다. 상기 폴리펩티드는 야생형 ACE2에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하고, 친화도의 변화로 인해 직접적으로 또는 (예를 들어, S-인식 구조의 안정화를 통해) 간접적으로 코로나바이러스 S에 결합하는 능력이 증가하였다. 특정 예에서, 상기 ACE2는 인간 ACE2이다. 일부 구체예에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 표 1, 표 2 및/또는 표 3에 제시된 치환들 중 임의의 치환으로부터 선택된다. 일부 예에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 ACE2 및 S의 계면에 위치한 잔기이다. 일부 예에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 N90-글리코실화 모티프 내에 위치한 잔기이다. 일부 예에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 계면으로부터 원위에 있고, S-인식 폴딩 구조의 제시를 향상시킨다. 일부 예에서, 변형된 ACE2 폴리펩티드는 이량체이다. 일례에서, 이량체 ACE2는 T27Y, L79T, 및 N330Y 아미노산 치환을 포함한다.

[0011] 또한, 본원에 개시된 변형된 ACE2 폴리펩티드 및 이종 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 이종 폴리펩티드는 예를 들어 이펙터 기능의 동원 및/또는 혈청 안정성 증가를 위한 Fc 단백질 또는 인간 혈청 알부민이다. 일부 구체예에서, 이종 폴리펩티드는 진단/검출 시약으로서 사용될 수 있는 단백질, 예컨대 형광 단백질 (예를 들어, GFP) 또는 효소 (예를 들어, HRP (horseradish peroxidase) 또는 알칼리 포스파타제)이다.

[0012] 또한, 바이러스를 본원에 개시된 변형된 ACE2 폴리펩티드 또는 융합 단백질과 접촉시킴으로써 코로나바이러스 세포 진입을 억제하는 방법이 제공된다. 대상체에서 코로나바이러스 복제 및/또는 확산을 억제하는 방법이 또한 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 본원에 개시된 변형된 ACE2 폴리펩티드 또는 융합 단백질의 치료적으로 유효한 양을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 상기 변형된 ACE2 폴리펩티드는 노출전 예방적 치료로서 감염 전에 (예: 감염 위험이 있는 대상체에서), 노출후 예방적 치료로서 감염 직후, 또는 대상체가 감염의 징후 또는 증상을 하나 이상 나타낸 후에 투여될 수 있다.

[0013] 또한, 본원에 개시된 변형된 ACE2 폴리펩티드 또는 융합 단백질의 치료적으로 유효한 양을 대상체에게 투여함으로써, 대상체에서 코로나바이러스 감염 (예: COVID-19)을 치료하는 방법이 제공된다. 코로나바이러스는 ACE2를 세포 진입 수용체로 이용하는 신종 코로나바이러스 균주를 포함하여, 임의의 인간 또는 인수공통 코로나바이러스일 수 있다. 일부 예에서, 변형된 ACE2 폴리펩티드는 정맥내, 기관내 또는 흡입을 통해 투여된다. 치료 방법

은 노출 전 예방적 치료 방법, 노출 후 예방적 치료 방법 또는 COVID-19의 치료 방법일 수 있다.

[0014] 또한, 본원에 개시된 변형된 ACE2 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자 및 벡터가 제공된다. 핵산 분자 또는 벡터를 투여함으로써 대상체에서 CoV 복제 및/또는 확산을 억제하는 (또는 CoV 감염을 치료하는) 방법이 추가로 제공된다. 일부 예에서, 핵산 분자 또는 벡터는 정맥내, 기관내 또는 흡입을 통해 투여된다.

[0015] 생물학적 샘플에서 CoV를 검출하는 방법이 추가로 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 생물학적 샘플을 본원에 개시된 변형된 폴리펩티드 또는 융합 단백질과 접촉시키는 단계; 및 상기 변형된 폴리펩티드 또는 융합 단백질의 생물학적 샘플에의 결합을 검출하는 단계를 포함한다.

[0016] 또한, 고체 지지체에 결합된 본원에 개시된 변형된 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 포함하는 키트가 제공된다.

[0017] 본 개시내용의 전술한 목적 및 다른 목적 및 특징은 하기 상세한 설명과 첨부 도면을 참조하여 더욱 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0018] **도 1A-1D: SARS-CoV-2 S의 RBD에 대한 높은 결합을 갖는 ACE2 변이체에 대한 선택 전략.** (도 1A) sfGFP에 융합된 SARS-CoV-2 S-RBD를 분비하는 Expi293F 세포로부터의 배지를 수집하고, myc-태그된 ACE2를 발현하는 Expi293F 세포와 상이한 희석도로 인큐베이션하였다. 결합된 S-RBD-sfGFP는 유세포 분석으로 측정하였다. FACS 선택에 사용되는 S-RBD-sfGFP-함유 배지의 희석은 화살표로 표시된다. (도 1B-1C) Expi293F 세포를 과량의 운반체 DNA로 희석된 야생형 ACE2 플라스미드로 일시적으로 형질감염시켰다. 이러한 조건하에, 세포는 전형적으로 하나 초과의 코딩 플라스미드를 획득하지 못하였고, 대부분의 세포는 음성이다. 세포를 S-RBD-sfGFP-함유 배지와 인큐베이션하고, 형광 항-myc로 공동-염색하여 유세포 분석으로 표면 ACE2를 검출하였다. 분석 중에, ACE2-양성 집단으로부터 상위 67%를 선택하였다 (도 1B). 결합된 S-RBD를 표면 ACE2 발현과 관련하여 후속적으로 측정하였다 (도 1C). (도 1D) Expi293F 세포를 ACE2 단일 부위-포화 돌연변이유발 라이브러리로 형질감염시키고, 도 1B에서와 같이 분석하였다. FACS 중에, ACE2 발현에 비해 S-RBD가 결합된 세포의 상위 15%를 수집하였고 (nCoV-S-High sort), 하위 20%는 별도로 수집하였다 (nCoV-S-Low sort).

도 2: SARS-CoV-2 S의 RBD에 대한 높은 결합 신호에 대한 ACE2의 돌연변이 영역 (mutational landscape). nCoV-S-High sorts로부터의 Log2 농축 비율은 ≤-3 (즉, 고갈/유해)으로부터 중립 내지 ≥+3 (즉, 농축)까지 플로팅하였다. ACE2 1차 구조는 세로축에 있고, 아미노산 치환은 가로축에 있다. *, 정지 코돈.

도 3A-3F: 독립적인 복제로부터의 데이터는 밀접한 일치를 보여준다. (도 3A-3B) nCoV-S-High sort (도 3A) 및 nCoV-S-Low sort (도 3B)에서 ACE2 돌연변이에 대한 Log_2 농축 비율은 2개의 독립적인 FACS 실험들 간에 밀접하게 일치한다. 복제 1은 S-RBD-sfGFP-함유 배지의 1/40 희석을 사용하고, 복제 2는 1/20 희석을 사용하였다. R^2 값은 비동의 돌연변이 (nonsynonymous mutation)에 대한 것이다. (도 3C) 평균 log_2 농축 비율은 nCoV-S-High sort 및 nCoV-S-Low sort 간에 반-상관관계 (anticorrelate)가 있는 경향이 있다. 넌센스 돌연변이 및 소수의 비동의 돌연변이는 원형질막에서 발현되지 않으며, 두 분류 집단들 모두에서 고갈된다 (즉, 사선 아래로 떨어짐). (도 3D-3F) 복제 nCoV-S-High sort (도 3D) 및 nCoV-S-Low sort (도 3E), 및 모든 nCoV-S-High sorts와 모든 nCoV-S-Low sorts의 비교 (도 3F)의 평균 데이터로부터의 잔기 보존 스코어의 상관관계 플롯. 보존 스코어는 각 잔기 위치에서 모든 아미노산 치환에 대한 log_2 농축 비율의 평균으로부터 산출된다.

도 4A-4C: SARS-CoV-2 S의 RBD에 대한 높은 결합에 대한 ACE2 잔기의 서열 선호도. (도 4A) nCoV-S-High sort의 보존 스코어는 S-RBD 결합 ACE2 (표면)의 cryo-EM 구조 (PDB 6M17)에 매핑된다. 좌측 도면은 기질-결합 캐비티를 조감하고, 명확성을 위해 단일 프로테아제 도메인만 표시된다. (도 4B) 평균 소수성-가중 농축 비율은 RBD-결합 ACE2 구조에 매핑된다. (도 4C) ACE2의 일부 확대도. 수반되는 히트맵은 ≤ -3 (고갈)에서 ≥ +3 (농축)까지 ACE2-T27, D30 및 K31의 치환에 대한 nCoV-S-High sort로부터의 log_2 농축 비율을 플로팅한다.

도 5A-5C: RBD 결합을 증가시키기 위해 심층 돌연변이 스캔으로부터 예측된 ACE2에서 단일 아미노산 치환은 효과가 작다. (도 5A) 전장 ACE2를 발현하는 Expi293F 세포를 RBD-sfGFP-함유 배지로 염색하고, 유세포 분석으로 분석하였다. 데이터는 야생형 ACE2 및 단일 돌연변이체 (L79T) 간에 비교한다. RBD 결합 증가는 낮은 수준의 ACE2 (더 작은 게이트)를 발현하는 세포에서 가장 식별 가능하다. 본 실험에서, ACE2는 표면 발현을 검출하는데 사용되는 잔기 S19의 상류에 세포외 N-말단 myc 태그를 갖는다. (도 5B) ACE2에서 30개의 아미노산 치환에 대해 RBD-sfGFP 결합을 측정하였다. 데이터는 배경 형광을 뺀 낮은 발현 게이트에서 GFP 평균 형광의 상대 변화이다.

n = 2의 평균, 오차 막대는 범위를 나타낸다. (도 5C) 전체 ACE2-양성 집단에 대해 측정된 상대 RBD-sfGFP 결합 (도 5A에서 더 큰 게이트)은 상단 그래프에 도시되어 있고, 하단 그래프는 세포외 myc 태그의 검출에 의해 측정된 상대 ACE2 발현을 플로팅한다. 전체 양성 집단에 대한 RBD-sfGFP 결합은 전체 ACE2 발현과 상관관계가 있으며, 그러므로 돌연변이체들 간의 결합 차이는 도 5B에서와 같이 발현 수준을 제어한 후에야 가장 명백하다.

도 6A-6B: S에 대한 결합이 향상된 조작된 sACE2. (도 6A) sACE2-sfGFP 돌연변이체의 발현을 형질감염된 세포 배양물의 형광에 의해 정성적으로 평가하였다. (도 6B) 전장 S를 발현하는 세포를 sACE2-sfGFP-함유 배지의 희석물로 염색하고, 결합을 유세포 분석으로 분석하였다.

도 7A-7D: 정제된 sACE2 단백질의 분석적 크기 배제 크로마토그래피 (SEC). (도 7A) 정제된 sACE2 단백질 (10 μg)을 4-20% SDS-폴리아크릴아미드 겔에서 분리하고, Coomassie로 염색하였다. (도 7B) IgG1-융합된 야생형 sACE2 및 sACE2.v2의 분석적 SEC. 표준물질의 분자량 (MW)은 피크 위에 kD로 표시된다. MW 표준의 흡광도는 명확성을 위해 스케일링된다. (도 7C) 8his-태그된 단백질의 분석적 SEC. 주요 피크는 단량체의 예상된 MW에 해당한다. 이량체 피크가 또한 관찰되지만, 이의 풍도 (abundance)는 독립적인 단백질 제제들 간에 상이하다 (도 9D와 비교). (도 7D) 가용성 ACE2-8h 단백질을 37℃에서 40시간 동안 인큐베이션하고, SEC로 분석하였다.

도 8A-8E: S에 대해 높은 친화도를 갖는 sACE2의 변이체. (도 8A) 전장 S를 발현하는 Expi293F 세포를 8his (실선) 또는 IgG1-Fc (파선)에 융합된 정제된 야생형 sACE2 또는 sACE2.v2와 인큐베이션하였다. 세척 후에, 유세포 분석으로 결합된 단백질을 검출하였다. (도 8B) 100 nM 야생형 sACE2-IgG1 (파선)의 결합은 야생형 sACE2-8h 또는 sACE2.v2-8h와 경쟁하였다. 경쟁 단백질을 전장 S를 발현하는 세포에 동시에 부가하고, 결합된 단백질을 유세포 분석으로 검출하였다. (도 8C) 고정된 RBD-IgG1과의 야생형 sACE2-8h 결합 (t = 0 내지 120초) 및 해리 (t > 120초)의 생물층 간섭계 (Biolayer interferometry: BLI) 키네틱스. (도 8D) BLI에 의해 측정된 고정된 RBD-IgG1에 대한 sACE2.v2-8h 결합의 키네틱스. (도 8E) 회복된 COVID-19 환자 유래의 혈청 IgG 대 야생형 sACE2-8h 또는 sACE2.v2-8h 간의 ELISA에서 고정된 RBD에의 결합에 대한 경쟁. 3명의 다른 환자들의 혈청을 테스트하였다 (명암 음영으로 P1 내지 P3).

도 9A-9G: 수율 개선을 위한 고친화도 sACE2 변이체의 최적화. (도 9A) sACE2-sfGFP-함유 배지의 희석물을 전장 S를 발현하는 Expi293F 세포와 인큐베이션하였다. 세척 후에, 결합된 sACE2-sfGFP를 유세포 분석으로 분석하였다. (도 9B) Coomassie-염색된 SDS-폴리아크릴아미드 겔은 단백질 A 수지에 의해 발현 배지로부터 정제된 sACE2-IgG1 변이체의 수율을 비교한다. (도 9C) 정제된 sACE2-8h 변이체의 Coomassie-염색 겔 (레인당 10 μg). (도 9D) 분석적 SEC에 의해, sACE2.v2.4-8h는 야생형 sACE2-8h와 구별할 수 없다. MW 표준의 흡광도는 명확성을 위해 스케일링되며, MW는 kD로 용출 피크 위에 표시된다. (도 9E) 60시간 동안 37℃에서 저장후 분석적 SEC. 변이체 sACE2.v2.2는 sACE2.v2.4와 비교하여 표면이 더 소수성이고 부분적으로 응집하는 경향이 더 높으므로, 부분 저장 불안정성은 본질적으로 소수성 증가와 관련이 있을 수 있다. (도 9F) BLI에 의해 측정된 고정된 RBD-IgG1과 야생형 sACE2-8h의 결합 (t = 0 내지 120초) 및 해리 (t > 120초). 데이터는 도 8C에 도시된 sACE2-8h의 제2 독립적인 제제에 필적한다. (도 9G) 고정된 RBD-IgG1을 갖는 sACE2.v2.4-8h의 BLI 키네틱스.

도 10A-10D: 바이러스 스파이크에 결합하는 특성이 개선된 이량체 sACE2 변이체. (도 10A) 37℃에서 62시간 동안 인큐베이션한 후에 야생형 $sACE2_2$-8h 및 $sACE2_2$.v2.4-8h의 분석적 SEC. (도 10B) RBD에 결합하는 회복된 환자 (명암 음영으로 P1 내지 P3) 유래의 혈청 IgG의 ELISA 분석. 이량체 $sACE2_2$(WT)-8h 또는 $sACE2_2$.v2.4-8h를 부가하여 수용체 결합 부위를 인식하는 항체와 경쟁한다. 농도는 단량체 서브유닛 (monomeric subunits)을 기반으로 한다. (도 10C) BLI에 의해 측정된 고정된 $sACE2_2$(WT)-IgG1과 RBD-8h의 결합 (t = 0 내지 120초) 및 해리 (t > 120초). (도 10D) 고정된 $sACE2_2$.v2.4-IgG1에 결합하는 RBD-8h의 BLI 키네틱스.

도 11: 조작된 수용체에 의한 SARS-CoV-2 및 SARS-CoV-1의 중화 증진. 미세중화 분석 (microneutralization assay)에서, 단량체 (실선) 또는 이량체 (파선) sACE2(WT)-8h 또는 sACE2.v2.4-8h를 VeroE6 세포에 부가하기 전에 바이러스와 사전-인큐베이션하였다. 농도는 단량체 서브유닛을 기반으로 한다. 데이터는 n = 4의 평균 ± SEM이다 (2회의 기술적 복제가 있는 2개의 독립적인 실험).

도 12A-12C: SARS-CoV-2의 RBD에 대한 sACE2 글리코실화 돌연변이체의 결합. (도 12A) 돌연변이 T92Q를 보유하는 가용성 ACE2의 프로테아제 도메인을 8his-태그된 융합체로서 정제하였다. 6 μg을 Coomassie-염색된 4-20% SDS-폴리아크릴아미드 겔에서 분리하여 순도를 평가하였다. (도 12B) 분석적 SEC는 단량체로서 용출되는 주요 피크를 보여주며, 여기서 이량체의 예상된 MW에서 용출되는 분획은 더 적다. (도 12C) 생물층 간섭계 (BLI) 실험에서, RBD-IgG1을 센서 표면에 고정하고, sACE2-T92Q-8h의 결합 및 해리를 측정하였다. 보고된 친화도 (80

nM)는 동등한 야생형 단백질의 친화도 (140-150 nM, 도 8C 및 9F)보다 더 치밀하다.

도 13A-13C: 원형질막에서 발현되는 myc-태그된 S에 결합하는 sACE2의 유세포 분석 측정. (도 13A) 태그되지 않은 (도 8A) 또는 세포외 myc 에피토프 태그가 있는, 전장 S를 발현하는 Expi293F 세포를 주요 세포 집단에 대한 전면-측면 산란 특성 (forward-side scattering properties)으로 게이팅하였다 (게이트 영역). (도 13B) 200 nM 야생형 sACE2-8h 또는 sACE2.v2와 인큐베이션된 myc-S-발현 세포의 유세포측정 분석으로부터의 대표적인 원시 데이터를 보여주는 히스토그램. 세척 후에, 결합된 단백질은 형광 항-HIS-FITC secondary로 검출하였다. sACE2 없이 처리한 myc-S-발현 세포의 형광은 검정색이다. (도 13C) myc-S를 발현하는 세포에 대한 8his (실선) 또는 IgG1-Fc (파선)에 융합된 정제된 야생형 sACE2 또는 sACE2.v2의 결합.

도 14A-14D: 이량체 $sACE2_2$는 RBD에 결합성으로 (avidly) 결합한다. (도 14A) 정제된 이량체 $sACE2_2$-8h 단백질의 SDS-PAGE (레인당 10 μg, Coomassie로 염색됨). (도 14B) $sACE2_2$-8h 단백질의 예비 SEC. NiNTA 친화도 크로마토그래피로부터의 용출물을 농축하고, 겔 여과 컬럼에 주입하였다. MW 표준의 흡광도를 스케일링하고, kD는 용출 피크 위에 표시된다. (도 14C) 전장 S를 발현하는 Expi293F 세포를 야생형 및 v2.4 $sACE2_2$-8h와 인큐베이션하고, 세척하고, 형광 항-his로 염색하였다. n = 2의 평균, 오차 막대는 범위를 나타낸다. 결합은 sACE2의 IgG1-융합체에 대해 관찰된 것과 유사하며 (도 8A 및 13C), 세포 표면에서 이량체 $sACE2_2$-8h 및 삼량체 스파이크 사이의 결합성 상호작용을 나타낸다. (도 14D) 센서 표면에 고정된 이량체 RBD-IgG1에 결합성으로 결합하는 이량체 $sACE2_2$(WT)-8h 및 $sACE2_2$.v2.4-8h에 대한 BLI 키네틱스.

도 15A-15B: 정제된 $sACE2_2$-IgG1은 이량체이다. (도 15A) 정제된 $sACE2_2$-IgG1 단백질의 Coomassie-염색된 겔 (레인당 10 μg). (도 15B) 정제된 $sACE2_2$-IgG1의 분석적 SEC, MW 표준의 스케일링된 흡광도 (kD는 용출 피크 위에 표시됨)와 중첩된다. 상이한 서브유닛들 간의 $sACE2_2$ 및 IgG1 이량체화에 의해 매개되는 연쇄체에 해당할 수 있는 높은 MW 피크가 부재하는 것에 유의한다.

도 16A-16D: 비인간 세포에서 발현된 태그되지 않은 $sACE2_2$.v2.4는 S에 치밀하게 결합한다. (도 16A) 비인간 ExpiCHO-S 라인에서 제조된 태그되지 않은 단백질 및 8h 태그를 가진 인간 Expi293F 세포로부터 정제된 $sACE2_2$.v2.4의 SDS-PAGE 비교. 레인당 10 μg. (도 16B) 146시간 동안 37℃에서 인큐베이션하기 전 및 후에 $sACE2_2$.v2.4의 분석적 SEC. MW 표준의 흡광도를 스케일링하고, kD로 표시한다. (도 16C) S-발현 Expi293F 세포를 100 nM 야생형 $sACE2_2$-IgG1 및 증가하는 농도의 인간 세포-유래 $sACE2_2$(WT)-8h, 인간 세포-유래 $sACE2_2$.v2.4-8h 또는 ExpiCHO-S-유래 $sACE2_2$.v2.4와 공동-인큐베이션하였다. 결합된 his-태그된 단백질 (실선) 및 $sACE2_2$(WT)-IgG1 (파선)을 유세포 분석으로 측정하였다. (도 16D) BLI에 의해 측정된 고정된 RBD-IgG1에 대한 태그되지 않은 $sACE2_2$.v2.4의 결합성 결합 (Avid binding).

도 17: 조작된 수용체는 감소된 촉매 활성을 갖는다. 인간 세포-유래 $sACE2_2$(WT)-8h (좌측), 인간 세포-유래 $sACE2_2$.v2.4-8h (중간) 및 ExpiCHO-S-유래 $sACE2_2$.v2.4 (우측)에 대해 펩티드 기질을 절단하여 형광 생성물의 방출을 측정하였다. 특이적 활성은 생성물 방출이 선형이었던 초기 시점에 대해 결정되었으며, 야생형 단백질의 최고 농도 (22 nM)에 대한 데이터는 제외하였다. 시간 = 0분은 형광 기록이 시작된 때를 나타낸다.

도 18: SARS-관련 코로나바이러스는 ACE2-결합 부위에서 서열 다양성이 높다. SARS-CoV-2 (PDB 6M17)의 RBD는 7개의 SARS-관련 CoV 균주들 간의 다양성에 의해 착색된다.

도 19: SARS-관련 베타코로나바이러스의 ACE2-결합 부위는 서열 다양성이 높은 영역이다. 진입 수용체로서 ACE2를 사용하는 2개의 인간 및 5개의 박쥐 베타코로나바이러스 유래의 RBD 서열을 정렬한다 (서열번호: 3-9). 넘버링은 SARS-CoV-2 단백질 S를 기반으로 한다. 별표는 PDB 6M17에서 ACE2의 6.0Å 내에 있는 SARS-CoV-2 RBD의 잔기를 나타낸다.

도 20A-20C: ACE2에 대한 결합 신호가 높거나 또는 낮은 S 변이체에 대한 FACS 선택. (도 20A) N-말단 c-myc 태그를 가진 SARS-CoV-2의 전장 S를 발현하는 Expi293F 세포의 유세포 측정 분석. myc-에피토프에 대한 염색은 x축에 있고, 결합된 $sACE2_2$-8h (2.5 nM)의 검출은 y축에 있다. S 플라스미드는 세포가 전형적으로 1개 초과의 코딩 변이체를 발현하지 않도록 캐리어 DNA로 중량 기준으로 1500배 희석하였고; 이러한 조건에서 대부분의 세포는 음성이다. (도 20B) RBD 단일 부위-포화 돌연변이유발 (single site-saturation mutagenesis: SSM) 라이

브러리로 형질감염된 세포의 유세포 분석은 $sACE2_2$-8h 결합이 감소된 S 변이체를 발현하는 세포를 보여준다. (도 20C) FACS에 대한 게이팅 전략. c-myc 에피토프에 대해 양성인 S-발현 세포를 게이트하고, myc-S 발현에 비해 $sACE2_2$-8h가 결합된 세포의 최고 ("ACE2-High") 및 최저 ("ACE2-Low") 20%를 수집하였다.

도 21: 가용성 $ACE2_2$에의 결합에 대한 SARS-CoV-2 유래의 전장 S의 RBD에 대한 돌연변이 영역. 전장 S에서 RBD의 심층 돌연변이 스캔으로부터 Log_2 농축 비율을 ≤ -3 (고갈/유해)에서 0 (중립) 내지 ≥ +3 (농축)까지 플로팅하였다. 야생형 아미노산은 검정색이다. RBD 서열은 수직축에 있고, 아미노산 치환은 수평축에 있다. *, 정지 코돈.

도 22A-22D: 심층 돌연변이유발은 SARS-CoV-2의 ACE2-결합 부위가 많은 돌연변이를 허용하는 것을 보여준다. (도 22A) 표면 발현에 대한 위치 스코어는 SARS-CoV-2 RBD의 구조에 매핑된다 (PDB 6M17, 도 18에서와 같이 배향됨). 단백질 코어의 몇몇 잔기는 표면 S 발현에 대한 FACS 선택에서 고도로 보존된 반면에 (ACE2-High 및 ACE2-Low 게이트로부터 돌연변이의 고갈로 판단), 일부 표면 잔기는 돌연변이를 허용한다. (도 22B) 전장 S의 인간 세포에서 돌연변이체 선택으로부터의 발현 스코어 (x-축) 대 효모 디스플레이 (yeast display)에 의해 단리된 RBD에서 돌연변이체 선택으로부터의 보존 스코어 (잔기 위치에서 log_2 농축 비율의 평균) (y-축)의 상관관계 플롯. 주목할만한 이상치 (outliers)가 표시된다. (도 22C) ACE2-High 게이트된 세포 집단으로부터의 보존 스코어를 RBD 구조에 매핑한다. (도 22D) 인간 세포에서 S의 심층 돌연변이유발 (x-축) 대 효모 표면에서 RBD의 심층 돌연변이유발 ($\Delta K_{D\ app}$의 평균; y-축)로부터의 높은 ACE2 결합에 대한 RBD 보존 스코어들의 상관관계 플롯.

도 23A-23C: RBD에서 디설파이드-결합된 시스테인의 알라닌 치환은 인간 세포에서 S 표면 발현을 감소시킨다. (도 23A) 심층 돌연변이유발 (보존 또는 돌연변이 내성)의 발현 스코어로 착색된 RBD는 연속 소수성 코어와 나머지 S1 서브유닛을 폐쇄 입체형태 (PDB 6VSB 사슬 B)로 형성한다. (도 23B) 표면 면역-염색 및 유세포 분석에 기반하여, myc-S 시스테인 돌연변이체로 형질감염된 Expi293F 세포는 myc-양성 세포의 퍼센트 (게이트 영역) 및 양성 집단의 평균 형광 모두에서 감소를 나타내었다. 단일 숫자로 효과들 모두를 캡처하기 위해, 벡터-형질감염된 대조군 세포와 비교한 평균 형광 단위의 변화 (ΔMFU)를 생존 세포에 대한 산란에 의한 제1 게이팅 후에, 전체 세포 집단에 대해 산출하였다. (도 23C) 야생형 myc-S에 대한 myc-S 시스테인 돌연변이체의 표면 발현. 데이터는 평균 ± 범위, n = 2의 독립적인 복제이다.

도 24A-24G: 야생형 또는 조작된 ACE2 수용체에 우선적으로 결합하는 SARS-CoV-2의 S 내에 RBD 돌연변이를 확인하기 위한 경쟁-기반 선택. (도 24A) Expi293F 세포를 야생형 myc-S로 형질감염시키고, 경쟁하는 $sACE2_2$(WT)-IgG1 (25 nM) 및 $sACE2_2$.v2.4-8h (20 nM)와 인큐베이션하였다. 결합된 단백질은 각 에피토프 태그에 대한 면역-염색 후에 유세포 분석으로 검출하였다. (도 24B) 세포가 RBD SSM 라이브러리로 형질감염된 것을 제외하고는, 도 24A에 도시된 바와 같다. $sACE2_2$.v2.4에 대해 특이성이 증가된 S 변이체를 발현하는 세포 집단이 명백하다 (세포는 주요 집단의 좌측 상단으로 이동함). (도 24C) RBD SSM 라이브러리를 발현하는 세포의 FACS에 사용되는 게이트. 단백질이 결합되지 않은 세포를 제외한 후에, 결합된 $sACE2_2$.v2.4-8h (상부 게이트) 및 결합된 $sACE2_2$(WT)-IgG1 (하부 게이트)에 대한 세포의 상위 20%를 수집하였다. (도 24D-24E) $sACE2_2$(WT) (도 24D) 또는 $sACE2_2$.v2.4 (도 24E)에 대해 특이성이 증가된 S 변이체를 발현하는 세포에 대한 2개의 독립적인 FACS 선택으로부터 log_2 농축 비율들 간의 일치. R^2 값은 비동의 돌연변이에 대해 산출된다. (도 24F-24G) 보존 스코어는 주어진 잔기 위치에서 모든 비동의 치환에 대한 log_2 농축 비율들의 평균으로부터 산출된다. 상관관계 플롯은 $sACE2_2$(WT) (도 24D) 또는 $sACE2_2$.v2.4 (도 24E) 특이적 게이트 내의 세포들에 대한 2개의 독립적인 선택에 대한 보존 스코어들 간의 일치를 보여준다.

도 25A-25C: 야생형 ACE2에 대한 특이성을 부여하는 RBD 내의 돌연변이는 희귀하다. (도 25A) SARS-CoV-2 RBD는 특이성 스코어 ($sACE2_2$(WT) 및 $sACE2_2$.v2.4 특이적 게이트에서 수집된 세포들에 대한 보존 스코어들 간의 차이)로 착색된다. 일부 잔기는 $sACE2_2$(WT) 또는 $sACE2_2$.v2.4에 대한 특이성이 증가된 돌연변이에 대한 핫스팟이다. ACE2의 접촉 표면은 리본으로 표시되며, $sACE2_2$.v2.4의 돌연변이 부위가 표지되고, 구형으로 표시된다. (도 25B) $sACE2_2$(WT) (x-축) 및 $sACE2_2$.v2.4 (y-축) 특이적 게이트에서 수집된 세포 집단에 의해 발현되는 S의 돌연변이에 대한 Log_2 농축 비율. 데이터는 2개의 독립적인 정렬 실험들의 평균이다. $sACE2_2$(WT)에 대해

특이성이 증가한 것으로 예측된 S 돌연변이체를 도 26에서 표적화된 돌연변이유발에 의해 테스트하였다. $sACE2_2$.v2.4에 대해 특이성이 증가한 것으로 예측된 S 돌연변이체를 도 27에서 표적화된 돌연변이유발에 의해 테스트하였다. (도 25C) 야생형 myc-S 및 2개의 변이체, N501W 및 N501Y는 Expi293F 세포에서 발현되었고, $sACE2_2$(WT)-8h (점선) 또는 $sACE2_2$.v2.4-8h (실선)에의 결합에 대해 유세포 분석으로 테스트하였다. 야생형 $sACE2_2$에 대한 특이적 결합은 약간의 증가가 관찰된다.

도 26A-26B: 심층 돌연변이유발에 의해 예측된 SARS-CoV-2 S의 돌연변이 스크리닝에서 $sACE2_2$.v2.4에 비해 야생형 $sACE2_2$에 대한 특이성이 증진되었다. (도 26A) 도 23에 기재된 바와 같이 결정된, myc-S 돌연변이체의 상대 표면 발현. 데이터는 평균 ± 범위, n = 2 독립적인 복제이다. (도 26B) 표시된 myc-태그된 S 단백질을 발현하는 Expi293F 세포에서 $sACE2_2$(WT)-IgG1 (x-축) 및 $sACE2_2$.v2.4-8h (y-축) 사이의 경쟁 결합. 야생형 수용체에 대한 특이성이 증가된 S 변이체를 발현하는 세포는 우측 하단으로 이동할 것이며; 약간의 작은 이동만이 관찰된다. 감소된 표면 발현 및/또는 ACE2 친화도를 갖는 S 변이체를 발현하는 세포는 게이트 영역에서 더 낮은 퍼센트를 갖는다. 결과는 2개의 복제를 나타낸다.

도 27A-27B: 심층 돌연변이유발에 의해 예측된 SARS-CoV-2 S의 돌연변이 스크리닝에서 야생형 $sACE2_2$에 비해 $sACE2_2$.v2.4에 대한 특이성이 증진되었다. (도 27A) 유세포 분석에 의해 측정된 myc-S 돌연변이체의 상대 표면 발현. 데이터는 평균 ± 범위, n = 2이다. (도 28B) 경쟁하는 $sACE2_2$(WT)-IgG1 (x-축) 및 $sACE2_2$.v2.4-8h (y-축)에 결합된 myc-S 변이체를 발현하는 세포의 유세포측정 분석. $sACE2_2$.v2.4에 대해 특이성이 증가된 S를 발현하는 세포는 좌측 상단으로 이동할 것이다. 결과는 2개의 복제를 나타낸다.

도 28A-28B: IV 투여 후 sACE2 펩티드의 혈청 반감기. 비융합된 $sACE2_2$.v2.4를 마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다 (시점당 수컷 3마리 및 암컷 3마리; 0.5 mg/kg). 혈청을 수집하고, ACE2 ELISA (도 28A) 및 형광발생 기질에 대한 단백질분해 활성 (도 28B)으로 분석하였다. 데이터는 평균 ± S.E.이다.

도 29: IV 투여 후 인간 IgG1 Fc에 융합된 sACE2의 약동학. 시점당 3마리의 수컷 마우스에게 2.0 mg/kg 야생형 $sACE2_2$-IgG1 (개방 원형) 또는 $sACE2_2$.v2.4-IgG1 (폐쇄 원형)의 IV 투여. 혈청내 단백질은 인간 IgG1 ELISA로 정량화하였다. 데이터는 평균 ± S.E.이다.

도 30A-30D: IV 투여 후 혈청 중 $sACE2_2$.v2.4-IgG1의 약동학. $sACE2_2$.v2.4-IgG1을 마우스에게 IV 투여하였다 (시점당 수컷 3마리 및 암컷 3마리; 2.0 mg/kg). 혈청을 수집하고, 인간 IgG1 ELISA (도 30A), ACE2 ELISA (도 30B), 및 ACE2 촉매 활성 (도 30C)으로 분석하였다. 데이터는 평균 ± S.E.이다. (도 30D) 대표적인 수컷 마우스의 혈청 샘플을 비-환원 SDS 전기영동 겔에서 분리하고, 항-인간 IgG1로 프로브하였다. 표준은 정제된 $sACE2_2$.v2.4-IgG1 10 ng이다. 예상되는 분자량 (글리칸 제외)은 216 kD이다.

도 31A-31F: 폐로 직접 전달되는 ACE2 단백질의 PK. (도 31A 및 31B) 야생형 $sACE2_2$-IgG1 (개방 원형) 및 $sACE2_2$.v2.4-IgG1 (폐쇄 원형)을 1.0 mg/kg의 용량으로 IT 투여하였다. 폐 조직을 수집하고, 단백질을 추출하고, 인간 IgG1 ELISA (도 31A) 및 ACE2 ELISA (도 31B)로 분석하였다. 데이터는 평균 ± S.E., 시점당 n = 3 수컷이다. (도 31C) $sACE2_2$.v2.4-IgG1이 IT 투여된 대표적인 마우스로부터의 폐 추출물을 항-인간 IgG1 면역블롯에 의해 비-환원 조건하에 분석하였다. (도 31D 및 31E) 마우스는 네뷸라이즈된 $sACE2_2$.v2.4-IgG1을 흡입하였다. 폐 조직으로부터의 추출물을 ACE2 ELISA (도 31D) 및 인간 IgG1 ELISA (도 31E)로 분석하였다. 데이터는 평균 ± S.E., 시점당 n = 3 수컷이다. (도 31F) 네뷸라이즈된 $sACE2_2$.v2.4-IgG1을 투여받은 마우스의 폐 조직으로부터의 대표적인 추출물을 항-인간 IgG1 면역블롯으로 분석하였다.

도 32: $sACE2_2$-IgG1에 의한 슈도바이러스의 인간 폐 세포로의 진입의 중화. ACE2 수용체를 과발현하는 인간 A549 폐 상피 세포, 인간 A549 폐 상피 세포, 및 인간 폐 내피 세포를 VSV-SARS-CoV-2-루시퍼라제-슈도타입 바이러스 및 야생형 $sACE2_2$-IgG1 또는 조작된 $sACE2_2$.v2.4-IgG1과 표시된 농도로 인큐베이션하였다. 각 실험에는 바이러스가 없는 대조군을 포함하였으며 (각 그래프에서 가장 왼쪽 막대), 다른 모든 샘플에는 표시된 MOI로 바이러스 용량을 포함하였다. 바이러스 진입 정도는 루시퍼라제 활성을 기반으로 정량화하였다.

도 33: 인 비보 감염 모델에서 슈도바이러스의 폐 및 간으로의 진입을 억제하는 $sACE2_2$-IgG1의 효능. 상피 세포에서 인간 ACE2 수용체를 발현하는 K18-hACE2 마우스에게 $sACE2_2$-IgG1 (야생형, 중간 막대; 조작된 v2.4, 우측 막대)을 IV 주사하고, VSV-SARS-CoV-2-루시퍼라제-슈도타입 바이러스를 복강내 주사하였다. 폐 및 간을 24시간째에 수확하고, 루시퍼라제 발현에 기반하여 바이러스 진입 정도를 정량화하였다.

서열 목록

첨부된 서열 목록에 열거된 핵산 및 아미노산 서열은 37 C.F.R. 1.822에 정의된 바와 같이 뉴클레오티드 염기에 대한 표준 문자 약어 및 아미노산에 대한 3문자 코드를 사용하여 표시된다. 각 핵산 서열의 한 가닥만이 표시되며, 상보적 가닥은 표시된 가닥에 대한 참조로 포함되는 것으로 이해된다. 서열 목록은 2021년 3월 11일에 생성된 43.7 KB의 ASCII 텍스트 파일로 제출되었으며, 이는 본원에 참조로 통합된다. 첨부된 서열 목록에서:

서열번호: 1은 인간 ACE2 (또한, 펩티딜-디펩티다제 A라고 함; GenBank Accession No. NP_068576.1로 기탁됨)의 아미노산 서열이다:

MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEE
NVQNMNNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSEDK
SKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWR
SEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLI
EDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYS
LTVPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTD
PGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVTMDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQP
FLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLKQALTIVG
TLPFTYMLEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPAS
LFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEALCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLR
LGKSEPWTLALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYA
DQSIKVRISLKSALGDKAYEWNDNEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEEDV
RVANLKPRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPT
LGPPNQPPVSIWLIVFGVVMGVIVVGIVILIFTGIRDRKKKNKARSGENPYASIDISKGE
NNPGFQNTDDVQTSF

서열번호: 2는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2 (GenBank Accession No. YP_009724390.1로 기탁됨)의 표면 당단백질 (단백질 S)의 아미노산 서열이다:

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPF
FSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQS
LLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVS
QPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLP
IGINITRFQTLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDA
VDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRF
ASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRG
DEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSN
LKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELL
HAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTD
AVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPT
WRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVAS
QSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTEC
SNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILP
DPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLT
DEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLI
ANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDIL
SRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSK
RVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGV
FVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEEL
DKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYI
KWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLKG
VKLHYT

서열번호: 3-9는 인간 및 박쥐 베타코로나바이러스로부터의 RBD 서열의 아미노산 서열이다 (도 19 참조).

서열번호: 10은 인간 ACE2에 대해 3개의 아미노산 치환: T27Y, L79T 및 N330Y를 갖는 인간 ACE2 (프로테아제 및 이량체화 도메인 포함)의 잔기 19-732로 구성된, $sACE2_2.v2.4$의 아미노산 서열이다.

STIEEQAKYFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNNAGDKWSAFLK
EQSTTAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGK
VCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLK
NEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHA
YVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMV
DQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWEYSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLG
KGDFRILMCTKVTMDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEI
MSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLKQALTIVGTLPFTYMLEKWRWMVF
KGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTL
YQFQFQEALCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGA
KNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGDKA
YEWNDNEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEEDVRVANLKPRISFNFFVTAP
KNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLG

서열번호: 11은 인간 IgG1 Fc에 융합된 $sACE2_2.v2.4$로 구성된, $sACE2_2.v2.4$-IgG1의 아미노산 서열이다.

STIEEQAKYFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNNAGDKWSAFLK
EQSTTAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGK
VCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLK
NEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHA
YVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMV
DQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWEYSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLG
KGDFRILMCTKVTMDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEI
MSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLKQALTIVGTLPFTYMLEKWRWMVF
KGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTL
YQFQFQEALCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGA
KNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGDKA
YEWNDNEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEEDVRVANLKPRISFNFFVTAP
KNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGSDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] **상세한 설명**

[0020] **Ⅰ. 약어**

[0021] ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) 안지오텐신-전환 효소 2

[0022] BLI (biolayer interferometry) 생물층 간섭계

[0023] CoV (coronavirus) 코로나바이러스

[0024] COVID-19 (coronavirus disease 2019) 코로나바이러스 질병 2019

[0025] IT (intratracheal) 기관내

[0026] IV (intravenous) 정맥내

[0027] MOI (multiplicity of infection) 감염 다중도

[0028] RBD (receptor binding domain) 수용체 결합 도메인

[0029] sACE2 (soluble angiotensin-converting enzyme 2) 가용성 안지오텐신-전환 효소 2

[0030] SARS (severe acute respiratory syndrome) 중증 급성 호흡기 증후군

[0031] SARS-CoV-2 (SARS coronavirus 2) SARS 코로나바이러스 2

[0032] SEC (size exclusion chromatography) 크기 배제 크로마토그래피

[0033] sfGFP (superfolder green fluorescent protein) 슈퍼폴더 녹색 형광 단백질

[0034] **Ⅱ. 용어 및 방법**

[0035] 달리 언급하지 않는 한, 기술 용어는 관례에 따라 사용된다. 분자 생물학에서 일반적인 용어의 정의는 Benjamin Lewin, *Genes X*, published by Jones & Bartlett Publishers, 2009; 및 Meyers *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Cell Biology and Molecular Medicine*, published by Wiley-VCH in 16 volumes, 2008; 및 기

타 유사한 참고문헌에서 찾을 수 있다.

[0036] 본원에서 사용된, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 명백하게 달리 나타내지 않는 한, 단수 및 복수 모두를 지칭한다. 예를 들어, 용어 "항원 (an antigen)"은 단일 또는 복수의 항원을 포함하고, 문구 "적어도 하나의 항원"과 동등한 것으로 간주될 수 있다. 본원에서 사용된, 용어 "포함한다 (comprises)"는 "포괄한다 (includes)"를 의미한다. 핵산 또는 폴리펩티드의 경우 주어진 임의의 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기, 및 모든 분자량 또는 분자량 값은 근사치이며, 달리 지시하지 않는 한 설명 목적으로 제공되는 것으로 추가로 이해해야 한다. 본원에 기재된 방법 및 물질과 유사하거나 또는 동등한 많은 방법 및 물질이 사용될 수 있지만, 특히 적합한 방법 및 물질이 본원에 기재되어 있다. 상충하는 경우, 용어 설명을 포함하는 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 물질, 방법 및 실시예는 예시일 뿐이며, 제한하려는 의도가 아니다. 다양한 구체예의 검토를 용이하게 하기 위해, 하기 용어 설명이 제공된다:

[0037] **에어로졸:** 기체 (예: 공기)에 있는 미세한 고체 입자 또는 액적의 현탁액.

[0038] **투여:** 임의의 효과적인 경로를 통해 변형된 인간 ACE2 폴리펩티드와 같은 물질을 대상체에게 제공하거나 또는 주는 것이다. 예시되는 투여 경로는 주사 (예: 피하, 근육내, 피부내, 복강내, 종양내 및 정맥내), 경피, 비강내, 기관내 및 흡입 경로를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0039] **생물학적 샘플:** 대상체 (예: 인간 또는 동물 대상체)로부터 수득된 샘플. 생물학적 샘플에는 예를 들어 체액, 세포 및/또는 조직 샘플을 포함한다. 본원의 일부 구체예에서, 생물학적 샘플은 체액 샘플이다. 체액 샘플에는 혈청, 혈액, 혈장, 소변, 대변, 타액, 뇌척수액 (CSF), 기관지폐포 세척액 (BAL), 비강 면봉 (nasal swab), 또는 기타 체액을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 생물학적 샘플은 또한 세포 또는 조직 샘플, 예컨대 생검 샘플 또는 조직 절편을 지칭할 수 있다.

[0040] **접촉:** 직접적인 물리적 결합으로 배치; 고체 및 액체 형태를 모두 포함한다.

[0041] **코로나바이러스:** 인간 및 비-인간 동물을 감염시킬 수 있는 포지티브-센스, 단일가닥 RNA 바이러스의 대규모 패밀리이다. 코로나바이러스의 명칭은 이의 표면에 있는 왕관 모양의 스파이크로부터 유래되었다. 바이러스 외피는 바이러스 막 (M), 외피 (E) 및 스파이크 (S) 단백질을 함유하는 지질 이중층으로 이루어진다. 대부분의 코로나바이러스는 경증에서 중등도의 상부 호흡기 질병, 예컨대 감기를 유발한다. 그러나, 인간에게 더 심각한 질병 및 사망을 유발할 수 있는 3가지 코로나바이러스, 즉 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 (SARS-CoV), SARS-CoV-2, 및 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스 (MERS-CoV)가 출현하였다. 인간을 감염시키는 다른 코로나바이러스에는 인간 코로나바이러스 HKU1 (HKU1-CoV), 인간 코로나바이러스 OC43 (OC43-CoV), 인간 코로나바이러스 229E (229E-CoV), 인간 코로나바이러스 NL63 (NL63-CoV)이 있다. 본 개시내용의 일부 구체예에서, "코로나바이러스"는 코로나바이러스로 알려져 있는 균주 및 신규 균주를 포함하여, 세포 수용체로서 ACE2를 이용하는 인수공통 코로나바이러스 또는 임의의 인간 코로나바이러스를 포함한다. 인수공통 코로나바이러스에는 박쥐 및 설치류 코로나바이러스를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0042] **융합 단백질:** 2개의 상이한 (이종) 단백질의 적어도 일부를 포함하는 단백질. 일부 구체예에서, 융합체는 변형된 ACE2 폴리펩티드 및 Fc 단백질, 예컨대 인간 IgG1 유래의 Fc로 이루어진다.

[0043] **이종:** 별도의 유전자 공급원 또는 종으로부터 기원함.

[0044] **단리된:** 핵산 또는 단백질과 같은 "단리된" 생물학적 성분은 상기 성분이 자연적으로 발생하는 환경 (예: 세포)에서 다른 생물학적 성분, 예를 들어 다른 염색체 및 염색체외 (extra-chromosomal) DNA 및 RNA, 단백질 및 소기관 (organelles)으로부터 실질적으로 분리되거나 또는 정제된다. "단리된" 핵산 및 단백질에는 표준 정제 방법에 의해 정제된 핵산 및 단백질을 포함한다. 상기 용어는 또한 화학적으로 합성된 핵산 뿐만 아니라, 숙주 세포에서 재조합 발현에 의해 제조된 핵산 및 단백질을 포함한다.

[0045] **네뷸라이저:** 액체 형태의 치료제 (예: 폴리펩티드)를 폐와 같은 호흡기계로 흡입될 수 있는 미스트 또는 미세 스프레이 (에어로졸)로 전환하는 장치. 네뷸라이저는 또한 "분무기 (atomizer)"로서 알려져 있다.

[0046] **약학적으로 허용 가능한 담체:** 사용되는 약학적으로 허용 가능한 담체는 통상적이다. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21st Edition (2005)은 본원에 개시된 폴리펩티드 및 다른 조성물의 약학적 전달에 적합한 조성물 및 제제를 서술한다. 일반적으로, 담체의 특성은 사용되는 특정 투여 방식에 따라 다를 것이다. 예를 들어, 비경구 제제는 통상 비히클로서 물, 생리 식염수, 균형 염 용액, 수성 덱스트로스, 글

리세롤 등과 같은 약학적으로 및 생리학적으로 허용 가능한 유체를 포함하는 주사 가능한 유체를 포함한다. 고체 조성물 (예: 분말, 환제, 정제 또는 캡슐 형태)의 경우, 통상적인 무독성 고체 담체는 예를 들어 의약품 등급의 만니톨, 락토스, 전분 또는 마그네슘 스테아레이트를 포함할 수 있다. 생물학적으로 중성인 담체에 추가하여, 투여될 약학적 조성물은 소량의 무-독성 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 보존제, 및 pH 완충제 등, 예를 들어 소듐 아세테이트 또는 소르비탄 모노라우레이트를 함유할 수 있다.

[0047] **폴리펩티드, 펩티드 및 단백질:** 임의의 길이의 아미노산의 폴리머를 지칭한다. 폴리머는 선형 또는 분지형일 수 있고, 이는 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 이는 비-아미노산에 의해 중단될 수 있다. 상기 용어는 또한 변형된, 예를 들어 디설파이드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작, 예컨대 표지 성분과의 접합된 아미노산 폴리머를 포함한다. 본원에서 사용된, 용어 "아미노산"은 글리신 및 D 또는 L 광학 이성질체 모두를 포함하는 천연 및/또는 비천연 또는 합성 아미노산, 및 아미노산 유사체 및 펩티드 모방체를 포함한다.

[0048] **질병의 예방, 치료 또는 개선:** 질병의 "예방"은 질병의 완전한 발병을 억제하는 것을 지칭한다. "치료"는 발병하기 시작한 질병 또는 병리학적 병태의 징후 또는 증상을 개선하는 치료적 개입을 지칭한다. "개선"은 질병의 징후 또는 증상의 수 또는 중증도의 감소를 지칭한다. "예방적" 치료는 병증 발생 위험을 감소시킬 목적으로 질병의 징후를 나타내지 않거나 또는 초기 징후만을 나타내는 대상체에게 투여되는 치료이다. 예방적 치료는 노출 전 또는 노출 후 치료일 수 있다.

[0049] **예방:** 질병 또는 감염, 예컨대 CoV 감염 또는 COVID-19를 예방 (또는 발병 위험 감소)하기 위한 의학적 치료의 사용. 바이러스 감염과 관련하여, **노출 전 예방**은 대상체가 바이러스에 노출되기 전에 투여되는 치료를 지칭하는 반면에, **노출 후 예방**은 바이러스에 노출된 직후 또는 노출 후 단시간 내에, 하지만 감염의 징후 또는 증상이 나타나기 전에 투여되는 치료를 지칭한다.

[0050] **정제된:** 용어 정제된은 절대 순도를 요구하지 않으며; 오히려, 상대적인 용어로서 의도된다. 따라서, 예를 들어, 정제된 폴리펩티드 제제는 폴리펩티드가 이의 천연 환경, 예컨대 세포내에 존재하는 것보다 폴리펩티드가 더 풍부한 제제이다. 일 구체예에서, 폴리펩티드가 제제 중 전체 펩티드 또는 단백질 함량의 적어도 50%를 나타내도록 제제를 정제한다. 실질적인 정제는 다른 단백질 또는 세포 성분으로부터의 정제를 의미한다. 실질적으로 정제된 단백질은 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98%의 순도이다. 따라서, 구체적이고 비-제한적인 일례에서, 실질적으로 정제된 단백질에는 다른 단백질 또는 세포 성분이 90% 존재하지 않는다.

[0051] **서열 동일성:** 아미노산 또는 핵산 서열들 간의 유사성은 서열들 간의 유사성의 측면에서 표시되며, 달리 서열 동일성으로 지칭된다. 서열 동일성은 종종 동일성 (또는 유사성 또는 상동성) 퍼센트의 측면에서 측정되며; 퍼센트가 더 높을수록, 2개의 서열들은 더 유사하다. 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 상동체 또는 변이체는 표준 방법을 사용하여 정렬될 때 비교적 높은 정도의 서열 동일성을 가질 것이다.

[0052] 비교를 위한 서열들의 정렬 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 다양한 프로그램 및 정렬 알고리즘이 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, *Gene* 73:237, 1988; Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151, 1989; Corpet *et al.*, *Nucleic Acids Research* 16:10881, 1988; and Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988. Altschul *et al.*, *Nature Genet.* 6:119, 1994에 기재되어 있으며, 서열 정렬 방법 및 상동성 산출에 대한 상세한 고려 사항을 제시한다.

[0053] NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990)는 서열 분석 프로그램인 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 연결하여 사용하기 위해, NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) 및 인터넷을 포함한 여러 출처로부터 이용 가능하다. 이러한 프로그램을 사용하여 서열 동일성을 결정하는 방법에 대한 설명은 인터넷의 NCBI 웹사이트에서 입수 가능하다.

[0054] 폴리펩티드의 상동체 및 변이체, 예컨대 변형된 인간 ACE2 폴리펩티드는 전형적으로 NCBI Blast 2.0, 디폴트 파라미터로 설정된 갭 blastp (gapped blastp)를 사용하여 항체의 아미노산 서열과의 전장 정렬에 대해 계수된 서열 동일성을 적어도 약 75%, 예를 들어 적어도 약 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 포함하는 것을 특징으로 한다. 약 30개 초과의 아미노산들의 아미노산 서열 비교의 경우, 디폴트 파라미터로 설정된 디폴트 BLOSUM62 매트릭스를 사용하는 Blast 2 서열 기능을 이용한다 (갭 존재 비용 (gap existence cost) 11 및 잔기당 갭 비용 (per residue gap cost) 1). 짧은 펩티드들 (약 30개 미만의 아미노산)을 정렬하는 경우, 디폴트 파

라미터 (오픈 갭 (open gap) 9, 연장 갭 (extension gap) 1 패널티)로 설정된 PAM30 매트릭스를 이용하는, Blast 2 서열 기능을 사용하여 정렬을 수행해야 한다. 참조 서열에 대해 훨씬 더 큰 유사성을 가진 단백질은 이러한 방법으로 평가하는 경우 동일성 퍼센트가 증가하는, 예컨대 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보여줄 것이다. 전체 서열보다 적은 서열을 서열 동일성에 대해 비교하는 경우, 상동체 및 변이체는 전형적으로 10-20개 아미노산의 쇼트 윈도우 (short windows)에 걸쳐 적어도 80%의 서열 동일성을 보유할 것이며, 참조 서열과의 유사성에 따라 적어도 85% 또는 적어도 90% 또는 95%의 서열 동일성을 보유할 수 있다. 이러한 쇼트 윈도우에 대해 서열 동일성을 결정하는 방법은 인터넷 NCBI 웹사이트에서 이용할 수 있다. 당업자는 이들 서열 동일성 범위가 안내를 위해서만 제공됨을 이해할 것이며; 제공된 범위를 벗어나는 매우 유의미한 상동체가 수득될 수 있다는 것이 전적으로 가능하다.

[0055] **대상체:** 인간 및 비-인간 포유동물을 포함하여, 인간 및 동물 대상체를 모두 포함하는 카테고리인, 살아있는 다세포 척추동물 유기체.

[0056] **치료적으로 유효한 양:** 치료 대상체에서 원하는 효과를 달성하기에 충분한 특정 물질 (예: 변형된 인간 ACE2 폴리펩티드)의 양. 예를 들어, 이는 대상체에서 CoV 복제를 억제하거나 또는 CoV 역가를 감소시키는데 필요한 양일 수 있다. 일 구체예에서, 치료적으로 유효한 양은 CoV 복제를 (치료 부재와 비교하여) 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%까지 억제하는데 필요한 양이다. 다른 구체예에서, 치료적으로 유효한 양은 대상체에서 CoV 역가를 (치료 부재와 비교하여) 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%까지 감소시키는데 필요한 양이다. 치료적으로 유효한 양은 또한 CoV 감염의 하나 이상의 증상을 감소시키거나 또는 제거하는데 필요한 양, 예컨대 발열, 기침 또는 숨가쁨을 감소시키거나 또는 제거하는데 필요한 양일 수 있다. 유사하게, 일부 구체예에서, **예방적으로 유효한 양**은 CoV에 감염되거나 또는 COVID-19와 같은 질병이 발병할 위험을 (치료 부재와 비교하여) 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%까지 감소시키는데 필요한 양이다.

[0057] **벡터:** 숙주 세포에 도입되어, 형질전환된 숙주 세포를 생성하는 핵산 분자. 벡터는 복제 기점과 같은 숙주 세포에서 이의 복제를 허용하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 또한 하나 이상의 선택 가능한 마커 유전자 및 당해 기술 분야에 알려진 다른 유전자 요소를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 벡터는 바이러스 벡터, 예컨대 렌티바이러스 벡터이다.

[0058] ## III. 변형된 ACE2 폴리펩티드 및 사용 방법

[0059] SARS-CoV-2의 스파이크 (S) 당단백질은 숙주 세포에서 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2)에 결합한다. S는 삼량체 클래스 I 바이러스 융합 단백질로, 이는 융합전 상태 (prefusion state)에서 비공유적으로 결합된 상태로 유지되는 S1 및 S2 서브유닛으로 단백질분해로 처리된다 (Walls et al., Cell. 2020 Mar 6; 181(2):281-292.e6; Hoffmann et al., Cell. 2020 Mar 4; 181(2)271-280.e8; Tortorici and Veesler, Adv Virus Res. Elsevier; 2019;105:93-116). S1에서 수용체 결합 도메인 (RBD)에 의한 ACE2의 결합 시에 (Wong et al., J Biol Chem; 2004 Jan 30;279(5):3197-3201), S1 쉐딩 (shedding), 숙주 프로테아제에 의한 S2의 절단, 및 S2' 단백질분해 부위에 인접한 융합 펩티드의 노출을 유발하는 입체형태적 재배열 (conformational rearrangements)이 발생한다 (Tortorici and Veesler, Adv Virus Res. Elsevier; 2019;105:93-116; Madu et al., J Virol; 2009 Aug;83(15):7411-7421; Walls et al., Proc Natl Acad Sci USA; 2017 Oct 17;114(42):11157-11162; Millet and Whittaker, Proc Natl Acad Sci USA; 2014 Oct 21;111(42):15214-15219). 융합후 입체형태에 대한 S의 유리한 폴딩은 숙주 세포/바이러스 막 융합 및 바이러스 RNA의 세포질 방출과 결부된다. RBD와의 원자적 접촉 (Atomic contacts)은 ACE2의 프로테아제 도메인으로 제한되며 (Yan et al., Science. 2020 Mar 4;:eabb2762; Li et al., Science. 2005 Sep 16;309(5742):1864-1868), 넥 (neck) 및 막횡단 도메인이 제거된 가용성 ACE2 (sACE2)는 S에의 결합 및 감염 중화에 충분하다 (Li et al., Nature. 2003 Nov 27;426(6965):450-454; Hofmann et al., Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jul 9;319(4):1216-1221; Lei et al., bioRxiv. 2020 Jan 1;:2020.02.01.929976; Moore et al., J Virol; 2004 Oct;78(19):10628-10635). 원칙적으로, 바이러스는 네이티브 ACE2 수용체에 대한 친화도를 감소시키지 않으면서 sACE2-매개 중화를 피할 수 있는 가능성을 제한하여 독성을 약화시킨다. 또한, 인간 면역글로불린의 Fc 영역에 sACE2의 융합은 예방을 위해 의도된 경우 특히 바람직한 품질인 면역 이펙터 기능을 모집하고 혈청 안정성을 증가시키면서 결합력 향상을 제공할 수 있으며 (Moore et al., J Virol; 2004 Oct;78(19):10628-10635; Liu et al., Kidney Int. 2018 Jul;94(1):114-125), 재조합 sACE2는 건강한 인간 대상체 (Haschke et al., Clin Pharmacokinet. 2013 Sep;52(9):783-792) 및 폐 질환 환자

(Khan et al., Crit Care. 2017 Sep 7;21(1):234)에서 안전한 것으로 입증되었다.

[0060] SARS 코로나바이러스 2 (SARS-CoV-2)의 급속하고 확대되는 확산은 즉각적인 공중 보건 비상 사태를 초래하고, 현재 승인된 치료제 또는 백신은 없다. 바이러스 스파이크 단백질 S는 폐의 숙주 세포에 있는 막-연결된 ACE2에 결합하여 분자 이벤트를 시작하고, 이는 궁극적으로 바이러스 게놈을 세포내로 방출한다. ACE2의 세포외 프로테아제 도메인은 S의 수용체 결합 부위에 대한 가용성 유인인자로 작용하여 SARS 및 SARS-2 코로나바이러스 모두의 세포 진입을 억제하므로, 치료제 및 예방제 개발을 위한 주요 후보이다. ACE2 효능 및 제조 가능성은 폴딩된 기능성 단백질의 친화도 및 발현을 증가시키는 돌연변이에 의해 개선될 수 있다. 본 개시내용은 심층 돌연변이 유발 및 인 비트로 선택을 사용하여 이러한 과제를 해결하고, 이에 의해 ACE2의 변이체는 세포 표면에서 S의 수용체 결합 도메인에 대한 결합이 증가하는 것으로 확인된다. 단백질-단백질 계면 및 상호작용 에피토프의 제시 및 폴딩을 증진시킬 수 있는 매립된 부위 (buried sites)에서도 돌연변이가 발견된다. 본원의 일부 구체예에서, ACE2 상의 N90-글리칸은 S와의 결합을 방해하기 때문에 제거된다. 돌연변이 영역은 이러한 전례 없는 과제를 해결하기 위해 고친화성 ACE2 수용체를 조작하기 위한 청사진을 제공한다. 개시된 ACE2 폴리펩티드는 SARS-CoV-2, 또는 ACE2에 결합하는 임의의 다른 코로나바이러스가 이러한 수용체 유인인자에 대한 저항성을 발달시킬 위험이 매우 적기 때문에 유익하다.

[0061] 본원에는 CoV S 단백질 결합에 대해 개선된 특성을 갖는 ACE2 폴리펩티드 (예: 인간 ACE2 폴리펩티드)가 기재된다. 구체적으로, 본원에는 인간 ACE2 또는 이의 단편, 예컨대 이의 세포외 단편을 포함하는 변형된 ACE2 폴리펩티드가 제공된다. 폴리펩티드는 야생형 인간 ACE2 (서열번호: 1)에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0062] 일부 구체예에서, 적어도 하나 (예: 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 초과)의 아미노산 치환이 표 1에 나타낸 치환들 중 어느 것으로부터 선택된다.

[0063] 일부 구체예에서, 적어도 하나 (예: 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 초과)의 아미노산 치환이 표 2에 나타낸 치환들 중 어느 것으로부터 선택된다.

[0064] 일부 구체예에서, 적어도 하나 (예: 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 초과)의 아미노산 치환이 표 3에 나타낸 치환들 중 어느 것으로부터 선택된다.

[0065] 일부 구체예에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 서열번호: 1의 인간 ACE2의 잔기 19, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 41, 42, 65, 69, 72, 75, 76, 79, 82, 89, 90, 91, 92, 324, 325, 330, 351, 386, 389, 393 및/또는 518에 존재한다.

[0066] 일부 구체예에서, 상기 변형된 폴리펩티드는 야생형 인간 ACE2 (서열번호: 1)에 비해 단일 아미노산 치환, 예컨대 표 1에 열거된 하나의 아미노산 치환만을 함유한다. 다른 예에서, 상기 변형된 폴리펩티드는 2, 3, 4, 5개 또는 초과의 아미노산 치환, 예컨대 표 1에 열거된 2, 3, 4, 5개 또는 초과의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 예에서, 상기 변형된 폴리펩티드는 서열번호: 1의 인간 ACE2의 잔기 19, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 41, 42, 65, 69, 72, 75, 76, 79, 82, 89, 90, 91, 92, 324, 325, 330, 351, 386, 389, 393 또는 518에 있는 단일 치환만을 포함한다. 다른 특정 예에서, 상기 변형된 폴리펩티드는 서열번호: 1의 인간 ACE2의 잔기 19, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 41, 42, 65, 69, 72, 75, 76, 79, 82, 89, 90, 91, 92, 324, 325, 330, 351, 386, 389, 393 또는 518로 구성된 그룹으로부터 선택된 잔기에 있는 2, 3, 4, 5개 또는 초과의 아미노산 치환을 포함한다. 다른 예에서, 상기 변형된 폴리펩티드는 표 4에 열거된 치환들의 조합을 포함한다.

[0067] 일부 구체예에서, 상기 변형된 폴리펩티드는 전장 인간 ACE2 폴리펩티드이다. 일부 예에서, 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열번호: 1에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.1%, 적어도 99.2%, 적어도 99.3%, 적어도 99.4%, 적어도 99.5%, 적어도 99.6%, 적어도 99.7%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9% 동일하고, 본원에 개시된 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0068] 다른 구체예에서, 상기 변형된 폴리펩티드는 인간 ACE2의 세포외 단편으로 구성된다. 예를 들어, 상기 변형된 폴리펩티드는 인간 ACE2의 완전한 세포외 프로테아제 도메인, 예를 들어 서열번호: 1의 아미노산 잔기 19-615로 구성될 수 있거나, 또는 상기 변형된 폴리펩티드는 세포외 도메인의 일부, 예컨대 세포외 도메인의 약 50개의 아미노산, 약 75개의 아미노산, 약 100개의 아미노산, 약 150개의 아미노산, 약 200개의 아미노산, 약 250개의 아미노산, 약 300개의 아미노산, 약 350개의 아미노산, 약 400개의 아미노산, 약 450개의 아미노산, 약 500개의 아미노산, 약 550개의 아미노산 또는 약 590개의 아미노산으로 구성될 수 있다. 일부 예에서, 상기 세포외 단편

의 아미노산 서열은 서열번호: 1의 잔기 19 내지 615에 대해 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.1%, 적어도 99.2%, 적어도 99.3%, 적어도 99.4%, 적어도 99.5%, 적어도 99.6%, 적어도 99.7%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9% 동일하고, 본원에 개시된 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0069] 일부 구체예에서, 상기 변형된 폴리펩티드는 인간 ACE2의 단편으로 구성된다. 일부 예에서, 상기 변형된 폴리펩티드는 서열번호: 1의 약 50개의 아미노산, 약 75개의 아미노산, 약 100개의 아미노산, 약 150개의 아미노산, 약 200개의 아미노산, 약 250개의 아미노산, 약 300개의 아미노산, 약 350개의 아미노산, 약 400개의 아미노산, 약 450개의 아미노산, 약 500개의 아미노산, 약 550개의 아미노산, 약 590개의 아미노산, 약 596개의 아미노산, 약 600개의 아미노산, 약 650개의 아미노산, 약 700개의 아미노산, 약 714개의 아미노산, 약 722개의 아미노산, 약 732개의 아미노산, 약 740개의 아미노산, 약 750개의 아미노산, 또는 약 800개의 아미노산이고, 본원에 개시된 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 비-제한적인 예에서, 상기 폴리펩티드의 아미노산 서열은 인간 ACE2의 단편, 예컨대 서열번호: 1의 잔기 1-732, 19-732 또는 19-740에 대해 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.1%, 적어도 99.2%, 적어도 99.3%, 적어도 99.4%, 적어도 99.5%, 적어도 99.6%, 적어도 99.7%, 적어도 99.8% 또는 적어도 99.9% 동일하고, 본원에 개시된 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 예에서, 상기 변형된 폴리펩티드는 서열번호: 1의 아미노산 잔기 1-732, 19-732 또는 19-740으로 구성되고, 본원에 개시된 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0070] 일부 예에서, 상기 변형된 폴리펩티드는 T27Y, L79T, 및 N330Y 아미노산 치환; H34A, T92Q, Q325P, 및 A386L 아미노산 치환; T27Y, L79T, N330Y, 및 A386L 아미노산 치환; L79T, N330Y, 및 A386L 아미노산 치환; T27Y, N330Y, 및 A386L 아미노산 치환; T27Y, L79T, 및 A386L 아미노산 치환; A25V, T27Y, T92Q, Q325P, 및 A386L 아미노산 치환; H34A, L79T, N330Y, 및 A386L 아미노산 치환; A25V, T92Q, 및 A386L 아미노산 치환; 또는 T27Y, Q42L, L79T, T92Q, Q325P, N330Y, 및 A386L 아미노산 치환을 포함하고, 상기 아미노산 치환은 서열번호: 1을 참조한다.

[0071] 본원에 개시된 변형된 폴리펩티드의 이량체가 또한 제공된다. 일부 구체예에서, 이량체 폴리펩티드는 서열번호: 1의 잔기 1-732 또는 19-732, 및 본원에 개시된 적어도 하나의 아미노산 치환, 예컨대 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 예에서, 상기 이량체는 서열번호: 10의 아미노산 서열을 갖는 sACE2v.2.4 변이체의 이량체이다.

[0072] 또한, 본원에 개시된 변형된 ACE2 폴리펩티드 및 이종 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질이 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 이종 폴리펩티드는 Fc 단백질, 예컨대 인간 Fc 단백질, 예를 들어 인간 IgG1 유래의 Fc이다. 특정한 비-제한적인 예에서, 상기 융합 단백질은 서열번호: 11의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다. 다른 구체예에서, 상기 이종 폴리펩티드는 진단/검출 시약, 예컨대 형광 단백질 (예: GFP) 또는 효소 (예: 알칼리 포스파타제, HRP 또는 루시퍼라제)로서 사용될 수 있는 단백질이다. 일부 구체예에서, 상기 이종 폴리펩티드는 제2 CoV 항원에 대한 결합성 결합을 위한 항체 또는 항원-결합 단백질이다. 일부 구체예에서, 이종 폴리펩티드는 (예를 들어, 면역 세포를 동원하기 위해) 세포 또는 세포 환경에 테더링하기 위한 항체 또는 항원-결합 단백질이다. 일부 구체예에서, 이종 폴리펩티드는 생물학적 반응을 유발하기 위한 사이토카인, 리간드 또는 수용체이다. 일부 구체예에서, 이종 폴리펩티드는 혈청 반감기를 증가시키는 단백질 (예: 항체 Fc 또는 혈청 알부민)이다.

[0073] 변형된 ACE2 폴리펩티드 또는 이의 융합 단백질 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 또한 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 변형된 ACE2 폴리펩티드 또는 융합 단백질은 기관내 또는 흡입 투여를 위해 제제화된다. 기관내 또는 흡입 제제는 액체 (예: 용액 또는 현탁액)일 수 있으며, 미스트, 스프레이, 에어로졸 등을 포함한다. 특정 예에서, 조성물은 내뷸라이저를 사용한 투여를 위해 제제화된다. 다른 구체예에서, 상기 변형된 ACE2 폴리펩티드 또는 융합 단백질은 정맥내 투여를 위해 제제화된다.

[0074] CoV를 본원에 개시된 변형된 ACE2 폴리펩티드 또는 융합 단백질과 접촉시킴으로써 CoV 복제를 억제하는 인 비트로 방법이 추가로 제공된다. 일부 예에서, CoV-감염된 세포 (예: 배양된 세포주 또는 1차 세포)는 CoV 복제에 대한 변형된 폴리펩티드의 효과를 테스트하기 위해, 변형된 ACE2 폴리펩티드와 접촉된다.

[0075] 대상체에서 CoV 복제 및/또는 확산을 억제하는 방법이 또한 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 본원에 개시된 변형된 ACE2 폴리펩티드, 융합 단백질 또는 조성물의 치료적으로 유효한 양을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 또한, 대상체에서 CoV 감염 (예: COVID-19 또는 SARS)을 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 본

원에 개시된 변형된 ACE2 폴리펩티드, 융합 단백질 또는 조성물의 치료적으로 유효한 양을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 예에서, 상기 대상체는 노인이거나, 또는 기저 의학적 병태 (예: 심장 질환, 폐 질환, 비만 또는 당뇨병)를 갖는다. 일부 예에서, 상기 대상체는 COVID-19를 가지고 있다. 일부 예에서, 상기 대상체는 의료 종사자이다. 일부 예에서, 상기 변형된 ACE 폴리펩티드는 정맥내 투여된다. 다른 예에서, 상기 변형된 ACE 폴리펩티드는 기관내 (IT) 또는 흡입을 통해 (예: 네뷸라이저를 사용하여) 투여된다. 특정한 비-제한적인 예에서, 상기 변형된 ACE2 폴리펩티드, 융합 단백질 또는 조성물은 적어도 2가지 경로, 예컨대 IV 및 IT, 또는 IV 및 흡입을 통해 투여된다. 폐 또는 기도로의 다른 투여 경로는 기관지, 비강내 또는 기타 흡입 경로, 예컨대 삽관된 환자의 비기관지 튜브 또는 기관내 튜브로 직접 주입 (direct instillation)하는 경로를 포함한다. 특정한 비-제한적인 예에서, 상기 변형된 ACE2 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열번호: 10을 포함하거나 또는 이로 구성되거나, 또는 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호: 11을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0076] 또한, 대상체에서 CoV 감염을 예방적으로 치료 (예: 예방)하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 본원에 개시된 변형된 ACE2 폴리펩티드, 융합 단백질 또는 조성물의 예방적으로 유효한 양을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 예방적 치료는 노출 전 예방 및 노출 후 예방을 모두 포함한다. 일부 예에서, 상기 대상체는 노인이거나, 또는 기저 의약적 병태를 갖는다. 일부 예에서, 상기 기저 병태는 심장 질환, 폐 질환, 비만 또는 당뇨병이다. 일부 예에서, 상기 대상체는 COVID-19 환자에게 노출되었다. 일부 예에서, 상기 대상체는 의료 종사자이다. 일부 예에서, 상기 변형된 ACE 폴리펩티드는 정맥내 투여된다. 다른 예에서, 상기 변형된 ACE 폴리펩티드는 기관내로 또는 흡입을 통해 (예: 네뷸라이저를 사용하여) 투여된다. 폐 또는 기도로의 다른 투여 경로는 기관지, 비강내 또는 기타 흡입 경로, 예를 들어 삽관된 환자의 비기관지 튜브 또는 기관내 튜브에 직접 주입하는 경로를 포함한다. 특정한 비-제한적인 예에서, 상기 변형된 ACE2 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열번호: 10을 포함하거나 또는 이로 구성되거나, 또는 융합 단백질의 아미노산 서열은 서열번호: 11을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0077] 예방적 치료의 일부 예에서, 상기 치료는 노출 전 예방을 포함한다. 예를 들어, 의료 종사자 또는 필수 종사자와 같은 고위험 환경에 노출된 대상체에게 SARS-CoV-2 감염 및/또는 COVID-19의 발병 위험을 감소시키기 위해 변형된 ACE 폴리펩티드, 융합 단백질 또는 이의 조성물을 투여할 수 있다. 특정한 비-제한적인 예에서, 노출 전 예방적 치료는 폴리펩티드, 융합 단백질 또는 조성물을 기관내로 또는 흡입을 통한 (예: 네뷸라이저를 사용한) 투여를 포함한다.

[0078] 예방적 치료의 일부 예에서, 상기 치료는 노출 후 예방을 포함한다. 이러한 타입의 방법에서, 대상체에게 SARS-CoV-2에 노출된 직후 또는 더 짧은 시간 내에, 예컨대 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 16시간, 20시간 또는 24시간 내에 상기 변형된 ACE 폴리펩티드, 융합 단백질 또는 이의 조성물을 투여한다. 특정한 비-제한적인 예에서, 노출 후 예방적 치료는 폴리펩티드, 융합 단백질 또는 조성물을 기관내로 또는 흡입을 통한 (예: 네뷸라이저를 사용한) 투여를 포함한다.

[0079] 또한, 본원에 개시된 변형된 ACE2 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자 및 벡터가 제공된다. 일부 예에서, 핵산 분자 및 벡터는 상이한 코돈 사용을 갖거나, 또는 특정 세포 타입, 예컨대 포유동물 세포에서의 발현을 위해 최적화된 코돈일 수 있다. 일부 예에서, 상기 핵산 분자 및 벡터는 천연 인간 다형성을 갖는다.

[0080] 본원에 개시된 핵산 분자 또는 벡터 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물이 추가로 제공된다.

[0081] 본원에 개시된 핵산 분자, 벡터 또는 조성물의 치료적으로 유효한 양 (또는 노출 전 또는 노출 후 예방적 방법에 대한 예방적으로 유효한 양)을 투여함으로써, 대상체에서 CoV 복제 및/또는 확산을 억제하는 방법이 추가로 제공된다. 본원에 개시된 핵산 분자, 벡터 또는 조성물의 치료적으로 유효한 양을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CoV 감염을 치료하는 방법이 추가로 제공된다. 일부 예에서, 핵산 또는 벡터는 정맥내로 투여된다. 다른 예에서, 핵산 또는 벡터는 기관내로 또는 흡입을 통해 (예: 네뷸라이저를 사용하여) 투여된다. 특정 비-제한적인 구체예에서, 상기 핵산 또는 벡터는 적어도 2가지 경로, 예컨대 IV 및 IT, 또는 IV 및 흡입을 사용하여 투여된다. 폐 또는 기도로의 다른 투여 경로는 기관지, 비강내 또는 기타 흡입 경로, 예를 들어 삽관된 환자의 비기관지 튜브 또는 기관내 튜브에 직접 주입하는 경로를 포함한다. 일부 예에서, 상기 대상체는 노인이거나, 또는 기저 의학적 병태 (예컨대, 심장 질환, 폐 질환, 비만 또는 당뇨병)를 갖는다. 일부 예에서, 상기 대상체는 COVID-19를 갖는다. 일부 예에서, 상기 대상체는 의료 종사자이다.

[0082] 일부 구체예에서, 상기 대상체에게 본원에 개시된 변형된 ACE2 폴리펩티드, 융합 단백질, 핵산, 또는 조성물의 1회 이상의 용량을 투여한다. 예를 들어, 상기 대상체에게 1회 이상, 2회 이상, 3회 이상, 4회 이상, 또는 5회 이상의 용량, 예컨대 1일 2회, 1일 1회, 격일, 1주 2회, 1주 1회, 또는 매월 투여할 수 있다. 당업자는 치료되

는 대상체, 대상체의 병태, 및 기저 병태와 같은 요인에 기반하여 적절한 투여 횟수 및 투여 시기를 선택할 수 있다.

[0083] 또한, 본원에는 생물학적 샘플에서 CoV를 검출하는 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 생물학적 샘플을 본원에 개시된 변형된 폴리펩티드 또는 융합 단백질과 접촉시키는 단계; 및 생물학적 샘플에 대한 변형된 폴리펩티드 또는 융합 단백질의 결합을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 예에서, 상기 생물학적 샘플은 혈액, 타액, 객담, 비강 면봉 또는 기관지폐포 세척액 샘플이다.

[0084] 본원에 개시된 방법의 일부 구체예에서, 코로나바이러스는 신규 코로나바이러스 균주를 포함하는, 진입 수용체로서 ACE2를 이용하는 임의의 인간 또는 동물 코로나바이러스이다. 일부 예에서, 코로나바이러스는 인간 코로나바이러스이다. 특정 예에서, 인간 코로나바이러스는 SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, 인간 코로나바이러스 HKU1 (HKU1-CoV), 인간 코로나바이러스 OC43 (OC43-CoV), 인간 코로나바이러스 229E (229E-CoV), 또는 인간 코로나바이러스 NL63 (NL63-CoV)이다. 다른 예에서, 코로나바이러스는 인수공통 코로나바이러스, 예컨대 인간을 감염시키기 위해 교차할 잠재력을 갖는 인수공통 코로나바이러스이다. 특정 예에서, 코로나바이러스는 박쥐 코로나바이러스 또는 설치류 코로나바이러스이다. 특정 비-제한적인 예에서, 박쥐 코로나바이러스는 LYRa11, Rs4231, Rs7327, Rs4084 또는 RsSHC014이다.

[0085] 고체 지지체에 결합된 본원에 개시된 변형된 폴리펩티드 또는 융합 단백질을 포함하는 키트가 추가로 제공된다.

[0086] 하기 실시예는 소정의 특정한 특징 및/또는 구체예를 예시하기 위해 제공된다. 이들 실시예는 본 개시내용을 설명된 특정한 특징 또는 구체예로 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0087] **실시예 1**

[0088] 인간 ACE2는 SARS-CoV-2 S를 인식하도록 진화하지 않았기 때문에, 치료 및 진단 적용에 대한 친화도를 증가시키는 돌연변이가 발견될 수 있다는 가설을 세웠다. N-말단 c-myc 에피토프 태그가 있는 전장 ACE2의 코딩 서열은 S와의 전체 계면에 걸쳐 있고 기질-결합 캐비티를 라이닝하는 117개 부위에서 가능한 모든 단일 아미노산 치환을 포함하는 라이브러리를 형성하기 위해 축퇴 코돈의 도입에 의해 다양화하였다. S 결합은 ACE2 촉매 활성과 무관하며 (Moore et al., J Virol; 2004 Oct;78(19):10628-10635), ACE2의 외부면에서 발생하고 (Yan et al., Science. 2020 Mar 4;:eabb2762; Li et al., Science. 2005 Sep 16;309(5742):1864-1868), 안지오텐신 기질은 활성 부위를 수용하는 깊은 틈 (cleft) 내에서 결합한다 (Towler et al., J Biol Chem; 2004 Apr 23;279(17):17996-18007). 그러므로, ACE2의 기질-결합 틈 내에서의 치환은 S 상호작용에 최소한의 영향을 미칠 것으로 예상되므로 대조군으로서 작용하며, 인 비보 안전성을 증진시키기 위해 기질 친화성을 조작하는데 유용할 수 있다. 그러나, COVID-19 치료를 위한 촉매 불활성 sACE2의 이점에 대해서는 의문이 제기되었다 (Kruse, F1000Res; 2020;9(72):72).

[0089] ACE2 라이브러리는 전형적으로 세포당 1개 초과의 코딩 변이체를 생성하지 않는 조건에서 인간 Expi293F 세포에서 일시적으로 발현되어, 유전자형 및 표현형 사이에 긴밀한 관계를 제공한다 (Heredia et al., J Immunol; 2018 Apr 20;200(11):ji1800343-3839; Park et al., J Biol Chem; 2019;294(13):4759-4774). 그 다음 세포를 슈퍼폴더 GFP (superfolder GFP: sfGFP: : (Pedelacq et al., Nat Biotechnol. 2006 Jan;24(1):79-88))에 대해 C-말단 융합된 SARS-CoV-2의 RBD (서열번호: 2의 a.a. 333-529)를 함유하는 배지의 아포화 희석물 (subsaturating dilution)과 인큐베이션하였다 (도 1A). 결합된 S-RBD-sfGFP의 수준은 이중 색상 유세포 분석에 의해 측정된 myc-태그된 ACE2의 표면 발현 수준과 상관관계가 있다. 야생형 ACE2를 발현하는 세포와 비교하여 (도 1C), ACE2 라이브러리의 많은 변이체가 S-RBD에 결합하지 못한 반면에, 더 높은 결합 신호를 갖는 ACE2 변이체의 수가 더 적은 것으로 나타났다 (도 1D). S-RBD에 대한 결합이 높거나 또는 낮은 ACE2 변이체를 발현하는 세포는 형광-활성화 세포 분류 (FACS)에 의해 수집되었고, 각각 "nCoV-S-High" 및 "nCoV-S-Low" 분류 집단으로 지칭된다. FACS 중에, 결합된 S-RBD-sfGFP에 대한 형광 신호가 지속적으로 감소하여, 수집 게이트를 관련 집단을 '추적 (chase)'하기 위해 규칙적으로 업데이트되어야 한다. 이는 실험 중 경시적으로 해리되는 S-RBD와 일치한다. ACE2에 대한 S-RBD의 보고된 친화도는 1 내지 15 nM 범위이다 (Walls et al., Cell. 2020 Mar 6; 181(2):281-292.e6; Wrapp et al., Science. 2020 Feb 19;:eabb2507).

[0090] 분류된 집단의 전사체를 심층 시퀀싱하고, 변이체의 빈도를 나이브 플라스미드 라이브러리 (naive plasmid library)와 비교하여, 라이브러리의 모두 2,340개의 코딩 돌연변이의 농축 또는 고갈을 산출하였다 (도 2). 심층 시퀀싱에 의해 인 비트로 선택 또는 진화를 추적하는 이러한 접근법은 심층 돌연변이유발로 알려져 있다 (Fowler and Fields, Nat Methods. 2014 Aug;11(8):801-807). 농축 비율 (도 3A 및 3B) 및 잔기 보존 스코어

(도 3D 및 3E)는 2개의 독립적인 분류 실험들 간에 밀접하게 일치하여, 데이터에 대한 신뢰성을 제공한다. 대부분의 경우, nCoV-S-High sort의 농축 비율 (도 3C) 및 보존 스코어 (도 3F)는 nCoV-S-Low sort와 반상관관계가 있었으며, 단 양쪽 게이트로부터 적절하게 고갈된 넌센스 돌연변이는 예외이다. 이는 ACE2의 (전부는 아니지만) 대부분의 비동의 돌연변이가 표면 발현을 제거하지 않았음을 나타낸다. 상기 라이브러리는 용매-노출된 잔기에 대해 편향되었으며, 원형질막 트래피킹 (trafficking)에 더 큰 영향을 미칠 수 있는 매립된 소수성의 치환은 거의 없다 (Park et al., J Biol Chem; 2019;294(13):4759-4774).

[0091] nCoV-S-High sort의 실험적 보존 스코어를 S-RBD-결합 ACE2의 구조에 매핑하면 (Yan et al., Science. 2020 Mar 4;:eabb2762) 계면에 매립된 잔기는 보존되는 경향이 있는 반면에, 계면 주변 또는 기질-결합 틈에 있는 잔기는 돌연변이 내성이 있음을 보여주었다 (도 4A). ACE2 α1 나선 및 β3-β4 가닥의 C-말단 단부를 둘러싸고 있는 ACE2의 영역은 극성 잔기에 대한 내성이 약한 반면에, α1의 N-말단 및 α2의 C-말단에 있는 아미노산은 소수성을 선호하므로 (도 4B), α1-α2 사이의 소수성 패킹을 부분적으로 보존할 가능성이 있다. 이러한 개별 패치들은 각각 구형 RBD 폴드 및 RBD의 긴 돌출 루프와 접촉한다.

[0092] 함께 컨센서스 N-글리코실화 모티프를 형성하는 2개의 ACE2 잔기인, N90 및 T92는 풍부한 돌연변이에 대한 주목할만한 핫스팟이다 (도 2 및 4A). 실제로, N-글리칸을 유지하는 T92S를 제외하고, N90 및 T92의 모든 치환은 S-RBD 결합에 매우 유리하며, 따라서 N90-글리칸은 S/ACE2 상호작용을 부분적으로 방해할 것으로 예측된다.

[0093] 데이터를 마이닝 (mining)하여, S-RBD 결합이 강화된 많은 ACE2 돌연변이를 확인하였다. 예를 들어, nCoV-S-High sort에서 $\log_2$ 농축 비율이 >1.5인 라이브러리에서 35개 위치에 대한 122개의 돌연변이가 있었다. 표 1은 이러한 돌연변이를 열거한다. 표 2는 $\log_2$ 농축 비율이 >2.0인 돌연변이를 열거한다. 표 3은 $\log_2$ 농축 비율이 >2.5인 돌연변이를 열거한다.

[0094] 구조적으로 특성화된 계면에서 적어도 12개의 ACE2 돌연변이가 S-RBD 결합을 증진시키고, 특히 현장 진료 진단 (point-of-care diagnostics)을 위해, SARS-CoV-2 S의 매우 특이적이고 치밀한 결합체를 조작하는데 유용할 수 있다. 이러한 돌연변이들 중 일부가 S-RBD 결합을 증진시키는 방법에 대한 분자적 기초는 S-RBD-결합된 cryo-EM 구조로부터 합리화될 수 있으며 (도 4C): ACE2-T27의 소수성 치환은 S-RBD의 방향족 잔기로 소수성 패킹을 증가시키고, ACE2-D30E는 산성 측쇄를 연장하여 S-RBD-K417에 도달하고, ACE2-K31의 방향족 치환은 방향족화물의 계면 클러스터에 기여한다. 그러나, 계면에 돌연변이가 있는 조작된 ACE2 수용체는 네이티브 ACE2와 충분히 다른 결합 에피토프를 제시하여 바이러스 이탈 돌연변이가 나타날 수 있거나, 또는 균주 특이적일 수 있고 폭 (breadth)이 부족할 수 있다. 대신에, S-RBD와 직접 접촉하지 않고 대신에 추정 구조적 역할을 하는 제2 쉘 (shell) 및 더 멀리 있는 쉘에 있는 돌연변이에 주의를 기울였다. 예를 들어, 프롤린 치환은 나선의 제1 회전을 엔트로피적으로 안정화할 수 있는 5개의 라이브러리 위치 (S19, L91, T92, T324 및 Q325)에서 농축되었다. 프롤린은 또한 H34에서 농축되었고, 여기서 α1에서 중앙 팽창 (central bulge)을 시행할 수 있다. 다중 돌연변이는 또한 국소 패킹을 변경하는 매립된 위치에서 풍부하였다 (예: A25V, L29F, W69V, F72Y 및 L351F). 그러므로, 높은 결합 신호에 대한 ACE2 변이체의 선택은 친화도에 대해 보고할 뿐만 아니라, SARS-CoV-2 S에 의해 인식되는 폴딩된 구조의 막에서의 제시에 대해서도 보고하였다. 서열 영역에서 풍부한 구조적 돌연변이의 존재는 ACE2 라이브러리가 용매-노출된 위치로 편향되었다는 점을 고려할 때 특히 주목할 만하다.

표 1

SARS-CoV-2 S에 대한 결합 신호가 증진된 ACE2 돌연변이.

선택에서 Log_2 농축 비율 **> 1.5**

S19P	H34A	E75T	N90I	T92Q	R393K
E23F	H34S	E75K	N90V	T92D	R518G
Q24T	H34P	E75R	N90A	T92E	
A25V	E35V	E75W	N90S	T92K	
K26I	E35C	E75G	N90T	T92R	
K26A	L39K	Q76M	N90Q	T92H	
K26D	L39R	Q76I	N90D	T92W	
T27M	F40D	Q76V	N90E	T92Y	
T27L	F40R	Q76T	N90K	T92F	
T27A	Y41R	Q76R	N90R	T92P	
T27D	Q42M	Q76Y	N90H	T92G	
T27K	Q42L	L79I	N90W	T92C	
T27H	Q42I	L79V	N90Y	T324E	
T27W	Q42V	L79T	N90F	T324P	
T27Y	Q42K	L79W	N90P	Q325P	
T27F	Q42C	L79Y	N90G	N330L	
T27C	A65W	L79F	N90C	N330H	
L29F	W69I	L79P	L91P	N330W	
D30I	W69V	M82C	T92M	N330Y	
D30E	I69T	Q89I	T92L	N330F	
K31W	I69K	Q89D	T92I	L351F	
K31Y	F72Y	Q89P	T92V	A386L	
N33D	E75A	N90M	T92A	A386I	
H34V	E75S	N90L	T92N	P389D	

[0095]

표 2

SARS-CoV-2 S에 대한 결합 신호가 증진된 ACE2 돌연변이. 선택에서 Log_2 농축 비율 > 2.0				
S19P	L39K	L79F	N90G	T92Y
A25V	L39R	Q89P	N90C	T92F
T27M	Q42M	N90M	L91P	T92P
T27L	Q42L	N90L	T92M	T92G
T27A	Q42C	N90I	T92L	T92C
T27D	W69V	N90V	T92I	T324E
T27H	F72Y	N90A	T92V	T324P
T27W	E75K	N90S	T92A	Q325P
T27Y	E75R	N90T	T92N	N330L
T27F	Q76V	N90Q	T92Q	N330H
T27C	Q76T	N90D	T92D	N330W
D30E	L79I	N90E	T92E	N330Y
K31W	L79V	N90K	T92K	N330F
H34V	L79T	N90R	T92R	L351F
H34A	L79W	N90H	T92H	A386L
H34P	L79Y	N90P	T92W	

[0096]

표 3

SARS-CoV-2 S에 대한 결합 신호가 증진된 ACE2 돌연변이. 선택에서 Log_2 농축 비율 > 2.5				
A25V	L79I	N90E	T92E	N330H
T27M	L79V	N90H	T92R	N330W
T27L	L79T	L91P	T92H	N330Y
T27Y	L79W	T92M	T92W	N330F
K31W	L79Y	T92L	T92Y	A386L
H34V	L79F	T92I	T92F	
H34A	N90A	T92V	T92G	
H34P	N90S	T92N	T92C	
Q42L	N90T	T92Q	T324P	
Q42C	N90Q	T92D	Q325P	

[0097]

[0098] **실시예 2**

[0099] nCoV-S-High sort에서 고도로 농축된 30개의 단일 치환을 표적화된 돌연변이유발에 의해 검증하였다 (도 5). 전장 ACE2 돌연변이체에 대한 RBD-sfGFP의 결합은 야생형과 비교하여 증가하였지만, 개선은 작았고, 낮은 ACE2 수

준을 발현하는 세포에서 가장 명백하였다 (도 5A). 돌연변이체들 사이의 ACE2 발현의 차이는 또한 결합된 RBD-sfGFP의 전체 수준과 상관관계가 있었으며 (도 5C), 이는 돌연변이가 활성 및 발현 모두에 영향을 미칠 수 있으므로 심층 돌연변이 스캔 데이터를 해석할 때 주의해야 함을 나타낸다. 치료제 개발과 더 관련이 있는 형식으로 돌연변이를 신속하게 평가하기 위해, 가용성 ACE2 프로테아제 도메인을 sfGFP에 융합하였다. sACE2-sfGFP의 발현 수준은 형질감염된 배양물의 형광에 의해 정성적으로 평가하였고 (도 6A), 원형질막에서 발현된 전장 S에 대한 sACE2-sfGFP의 결합은 유세포 분석에 의해 측정하였다 (도 6B). N90 글리칸을 제거하는 단일 치환 (T92Q)은 결합 신호 (도 6B)의 약간의 증가를 제공하였고, 이는 정제된 단백질의 분석에 의해 확인하였다 (도 12). 음성 우위성 (negative epistasis)을 최소화하기 위해 공간적으로 분리된 S 결합에 대한 선택에서 가장 고도로 풍부한 치환에 중점을 두면 (Heredia *et al.*, *J Virol* 93(11):e00219-19, 2019), sACE2에서 돌연변이들의 조합은 S 결합에서 크게 증가하였다 (표 4 및 도 6B). 이러한 분석은 상대적인 차이만을 제공하며, 조합 돌연변이체는 적어도 한 차수만큼 결합이 증진되었다. 탐색되지 않은 돌연변이들의 조합은 훨씬 더 큰 효과를 가질 수 있다.

표 4

sACE2 의 조합 돌연변이체

변이체	돌연변이
sACE2.v1	H34A, T92Q, Q325P, A386L
sACE2.v2	T27Y, L79T, N330Y, A386L
sACE2.v2.1	L79T, N330Y, A386L
sACE2.v2.2	T27Y, N330Y, A386L
sACE2.v2.3	T27Y, L79T, A386L
sACE2.v2.4	T27Y, L79T, N330Y
sACE2.v3	A25V, T27Y, T92Q, Q325P, A386L
sACE2.v4	H34A, L79T, N330Y, A386L
sACE2.v5	A25V, T92Q, A386L
sACE2.v6	T27Y, Q42L, L79T, T92Q, Q325P, N330Y, A386L

[0100]

[0101] 단일 변이체인 sACE2.v2를 정제 및 추가 특성규명을 위해 선택하였다 (도 7). 이러한 변이체는 sfGFP에 융합되어 잘 발현되고, N90-글리칸을 유지하므로 선택되었으며, 그러므로 면역원성을 최소화하기 위해 네이티브 sACE2와 더 밀접하게 일치하는 표면을 나타낼 것이다. sACE2.v2의 수율은 8his-태그된 단백질로서 (20% 더 낮음) 또는 IgG1-Fc 융합으로서 (60% 더 낮음) 정제하는 경우 야생형 단백질보다 더 낮았고, 분석적 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해, sACE2.v2의 작은 분획이 37℃에서 40시간 동안 인큐베이션 후에 응집되는 것으로 밝혀졌다 (도 7D). 그 외에는, sACE2.v2는 SEC에 의해 야생형과 구별할 수 없었다 (도 7C).

[0102] 정제된 8his-태그된 sACE2를 사용한 유세포 분석 실험에서, sACE2.v2-8h 만이 세포 표면에서 전장 S에 강하게 결합하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 야생형 sACE2가 샘플 세척 중에 해리를 야기하는 오프율 (off-rate)이 높다는 것을 시사한다 (도 8A 및 도 13). 야생형 및 변이체 사이의 차이는 IgG1-Fc 융합과 관련하여 덜 두드러졌으며 (도 8A 및 도 13), 이는 결합력이 돌연변이체의 결합에서 이득 (gains)을 차단하는 것을 나타내며, 다시 한 번 야생형 및 변이체 sACE2 사이에 오프율 차이가 존재하는 것을 시사한다. 가용성 ACE2.v2-8h는 S-발현 세포에의 결합에 대해 야생형 sACE2-IgG1을 능가하지만, 야생형 sACE2-8h는 10배 더 높은 농도에서도 sACE2-IgG1을 능가하지 않는다 (도 8B). 더욱이, 조작된 sACE2.v2-8h 만이 ELISA에 의해 테스트되는 경우 3명의 회복된 COVID-19 환자의 혈청에서 항-RBD IgG와 효과적으로 경쟁하였다 (도 8E). 이는 sACE2가 세포주 및 오르가노이드 (organoids)에서 SARS-CoV-2 복제를 억제하는데 매우 효과적이지만, 매우 높은 농도가 필요하다는 것을 보여주는 연구와 일치한다 (Monteil *et al.*, *Cell* DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.004:1-28, 2020). 생물층 간섭계 (BLI)를 사용하여, sACE2.v2는 고정된 RBD에 대해 야생형 단백질보다 65배 더 치밀한 친화도를 갖는 것으로 밝혀졌으며, 이는 거의 전적으로 더 느린 오프율로 인한 것이다 (표 5 및 도 8C 및 8D).

표 5

BLI 키네틱스 데이터의 요약

가용성 분석물	고정된 리간드	k_a (M^{-1} s^{-1})	k_d (s^{-1})	K_D
sACE2(WT)-8h	RBD-IgG1	$7.1/8.1 \times 10^4$	$1.1/1.1 \times 10^{-2}$	140/150 nM
sACE2-T92Q-8h	RBD-IgG1	1.0×10^5	8.2×10^{-3}	80 nM
sACE2.v2-8h	RBD-IgG1	1.5×10^5	3.3×10^{-4}	2.3 nM
sACE2.v2.2-8h	RBD-IgG1	1.3×10^5	8.3×10^{-4}	6.2 nM
sACE2.v2.4-8h	RBD-IgG1	1.4×10^5	5.4×10^{-4}	3.8 nM
$sACE2_2$(WT)-8h	RBD-IgG1	9.5×10^4	ND	ND
$sACE2_2$.v2.4-8h	RBD-IgG1	1.5×10^5	ND	ND
$sACE2_2$.v2.4 (CHO-S)	RBD-IgG1	2.0×10^5	ND	ND
RBD-8h	$sACE2_2$(WT)-IgG1	2.8×10^5	6.0×10^{-3}	22 nM
RBD-8h	$sACE2_2$.v2-IgG1	5.8×10^5	1.4×10^{-4}	0.2 nM
RBD-8h	$sACE2_2$.v2.4-IgG1	5.7×10^5	3.5×10^{-4}	0.6 nM

[0103]

[0104] 모든 측정은 항-인간 IgG Fc 바이오센서 표면에 대한 IgG1(Fc)-융합 단백질의 포획을 사용하여 수행하였다.

[0105] 분석물 농도 3-4개를 각 실험에 사용하였다.

[0106] ND, 결정되지 않음.

[0107] 모든 실험에 걸쳐, ACE2가 8his-태그된 단백질로 정제되었는지 또는 발현 배지에서 sfGFP-융합체로서 사용되었는지 여부, 및 전장 S가 원형질막에서 발현되었는지 또는 단리된 RBD가 바이오센서 표면에 고정되었는지 여부에 대해, 특성 규명된 sACE2.v2 변이체는 1 내지 2 차수 더 긴밀한 결합을 일관되게 보여주었다. 이러한 실험들은 SARS-CoV-2의 S에 대한 결합을 증가시키는 인간 ACE2의 돌연변이가 존재한다는 심층 돌연변이유발의 핵심 발견을 뒷받침한다.

[0108] sACE2.v2의 발현 감소를 해결하기 위해, 돌연변이 부하가 너무 높다는 가설을 세웠다. 2세대 디자인에서, sACE2.v2의 4가지 돌연변이 각각은 야생형 동일성으로 되돌아갔고 (표 4), 세포 표면에서 전장 S에 대한 결합은 치밀하게 유지되는 것으로 밝혀졌다 (도 9A). 변이체들 중 하나 (돌연변이 T27Y, L79T 및 N330Y를 갖는 sACE2.v2.4)는 야생형보다 훨씬 더 높은 수율로 정제되었고, RBD에 대한 치밀한 나노몰 결합을 나타내었다 (도 9).

[0109] ACE2 구조체는 넥 (neck)/이량체화 도메인 (dimerization domain)을 포함하도록 연장되어, 여기에서 $sACE2_2$로 지칭되는 안정한 이량체 (도 10A)를 생성하며, 이는 세포 표면의 S 또는 바이오센서의 고정된 RBD에 치밀한 결합력으로 결합한다 (도 14). 야생형과 비교하여, 이량체 $sACE2_2$.v2.4는 회복된 환자의 혈청에 존재하는 IgG 항체와 더 효과적으로 경쟁한다 (도 10B). $sACE2_2$-IgG1 (도 15)을 바이오센서 표면에 고정시키고, 분석물로서 단량체 RBD-8h와 인큐베이션함으로써, 야생형 $sACE2_2$에 대한 RBD의 K_D는 이전 보고서와 밀접하게 일치하는 22 nM인 것으로 결정되었고 (도 10C) (Wrapp *et al.*, *Science*, eabb2507, 2020; Shang *et al.*, *Nature*. 382, 1199, 2020), 반면 $sACE2_2$.v2.4는 600 pM 친화도로 결합하였다 (도 10D). 이는 최근 단리된 모노클로날 항체와 유리하게 비교된다 (Pinto *et al.*, *Nature* doi:10.1038/s41586-020-2349-y, 2020; Hansen *et al.*, *Science*, eabd0827, 2020; Brouwer *et al.*, *Science*, eabc5902, 2020; Wec *et al.*, *Science*, eabc7424, 2020; Wang *et al.*, *Nat Commun*. 11, 2251, 2020; Wu *et al.*, *Science*. 368, 1274, 2020; Rogers *et al.*, *Science*,

eabc7520, 2020).

[0110] 배양된 VeroE6 세포의 SARS-CoV-2 감염을 중화하기 위한 단량체 sACE2.v2.4의 효능은 거의 2차수 만큼 야생형 단백질을 초과하였고 (도 11), 이는 생화학적 결합 데이터와 일치한다. 야생형, 이량체 $sACE2_2$는 그 자체가 단량체보다 2차수 만큼 강력하며, 이는 비리온 표면의 스파이크와 강한 결합성 상호작용을 나타내며, 이량체 $sACE2_2$.v2.4는 서브나노몰 IC_{50}으로 다시 한 번 더 강력하였다 (도 11). 이량체 $sACE2_2$.v2.4는 또한 조작 과정 중에 SARS-CoV-1 S 구조 또는 서열을 고려하지 않았음에도 불구하고, SARS-CoV-1을 강력하게 중화하며 (도 11), 유인 수용체가 인간에게 아직 교차되지 않은 다양한 ACE2-이용 코로나바이러스를 중화시킬 가능성이 있다.

[0111] 안전성을 개선하기 위해, 태그되지 않은 $sACE2_2$.v2.4가 ExpiCHO-S 세포에서 제조되었고 (도 16A), 37℃에서 6일 동안 인큐베이션한 후 안정한 것으로 밝혀졌다 (도 16B). 단백질은 세포-발현된 S에 대해 야생형 $sACE2_2$-IgG1과 경쟁하고 (도 16C), 고정된 RBD에 강한 결합력으로 결합한다 (도 16D). 바이러스 진입을 억제하는 것에 추가하여, 재조합 sACE2는 제2 치료 기전: 호흡 곤란 증상을 완화하기 위한 안지오텐신 II (혈관 수축성 펩티드 호르몬)의 단백질 분해를 가질 수 있다 (Imai *et al.*, *Nature*. 436, 112-116, 2005; Treml *et al.*, *Crit. Care Med.* 38, 596-601, 2010). 가용성 $ACE2_2$.v2.4는 활성이 감소되기는 하지만 촉매적으로 활성인 것으로 밝혀졌다 (도 17).

[0112] 바이러스 복제 시에 바이러스 단백질의 심층 돌연변이유발은 약물 및 항체로부터의 이탈 기전을 이해하기 위해 광범위하게 추적되었지만, 본원에서의 연구는 선택 방법이 바이러스 복제로부터 분리되고 숙주 요인에 중점을 두는 경우 심층 돌연변이유발이 치료제 디자인에 직접 적용될 수 있는 방법을 보여준다. 놀라운 속도로, 과학계는 COVID-19 치료를 위한 여러 후보, 특히 단백질 S에 대해 탁월한 친화도를 갖는 모노클로날 항체를 확인하였다. 본원에 개시된 연구는 초기 바이러스-숙주 상호작용에 대한 분자적 기반에 대한 통찰력을 제공하면서, 바이러스의 천연 수용체로 유사한 친화도가 조작될 수 있는 방법을 보여준다.

[0113] **실시예 3**

[0114] **물질 및 방법**

[0115] **플라스미드.** 인간 ACE2 (GenBank NM_021804.1)의 성숙한 폴리펩티드 (a.a. 19-805)를 N-말단 HA 리더 (MKTIIALSYIFCLVFA), myc-태그, 및 링커 (GSPGGA)를 가진 pCEP4 (Invitrogen)의 NheI-XhoI 부위로 클로닝하였다. 슈퍼폴더 GFP (Pedelacq et al., *Nat. Biotechnol.* 24, 79-88, 2006)에 융합된 가용성 ACE2는 ACE2의 프로테아제 도메인 (a.a. 1-615)을 sfGFP (GenBank ASL68970)에 gly/ser-풍부 링커 (GSGGSGSGG)를 통해 유전자 결합시키고, pcDNA3.1(+) (Invitrogen)의 NheI-XhoI 부위들 간에 페이스트하여 제작하였다. 동등한 sACE2 구조체는 GSG 링커 및 8개의 히스티딘 태그 또는 GS 링커 및 IgG1의 Fc 영역 (a.a. D221-K447)으로 클로닝한 반면에, 이량체 $sACE2_2$ 구조체는 a.a. 1-732이고, 그 외에는 동일하다. SARS-CoV-2 S (GenBank YP_009724390.1)의 RBD (a.a. 333-529)에 대한 합성 인간 코돈-최적화된 유전자 단편 (Integrated DNA Technologies)은 HA 리더에 N-말단 융합되고, 슈퍼폴더 GFP, IgG1의 Fc 영역 또는 8개의 히스티딘 태그에 C-말단에 융합되었다. 조립된 DNA 단편을 pcDNA3.1(+)의 NheI-XhoI 부위에 결찰하였다. 인간 코돈-최적화된 전장 S는 태그되지 않은 (a.a. 1-1273) 및 N-말단 HA 리더 (MKTIIALSYIFCLVFA), myc-태그 및 성숙한 폴리펩티드 (a.a. 16-1273) 상류의 링커 (GSPGGA)를 가진 pUC57-2019-nCoV-S (인간) (Molecular Cloud)로부터 서브클로닝하였다.

[0116] **조직 배양.** Expi293F 세포 (ThermoFisher)를 Expi293 발현 배지 (ThermoFisher)에서 125 rpm, 8% CO_2, 37℃에서 배양하였다. RBD-sfGFP, RBD-IgG1, sACE2-8h 및 sACE2-IgG1의 생성을 위해, 세포를 2×10^6/ml로 준비하였다. 배양액 1 ml당, 500 ng의 플라스미드 및 3 μg의 폴리에틸렌이민 (MW 25,000; Polysciences)을 100 μl의 OptiMEM (Gibco)에 혼합하고, 실온에서 20분간 인큐베이션한 후에, 세포에 부가하였다. 형질감염 인핸서 (ThermoFisher)를 형질감염 후 18-23시간째에 부가하고, 세포를 4-5일 동안 배양하였다. 800×g로 5분 동안 원심분리하여 세포를 제거하고, 배지를 -20℃에서 저장하였다. 해동 후 사용 직전에, 남아 있는 세포 데브리스 및 침전물을 20,000×g로 20분 동안 원심분리하여 제거하였다. sACE2-sfGFP 단백질의 발현을 위한 플라스미드를 제조사의 지시에 따라 Expifectamine (ThermoFisher)을 사용하여 Expi293F 세포에 형질감염시켰고, 형질감염 후 22-½시간째에 형질감염 인핸서를 부가하고, 60시간 후에 배지 상등액을 수확하였다.

[0117] **심층 돌연변이유발.** ACE2의 프로테아제 도메인내 117개의 잔기는 NNK 코돈이 축퇴된 프라이머를 사용하여 중첩 연장 PCR에 의해 다양화하였다 (Procko *et al.*, *J. Mol. Biol.* 425, 3563-3575, 2013). 플라스미드 라이브러리

는 전형적으로 세포당 하나 초과의 코딩 변이체를 제공하지 않는 것으로 이전에 밝혀진 조건하에 Expifectamine을 사용하여 Expi293F 세포로 형질감염하였고 (Heredia *et al.*, *J. Immunol.* 200, ji1800343-3839, 2018; Park *et al.*, *J Biol Chem* 294, 4759-4774, 2019); 1 ng의 코딩 플라스미드를 2×10^6/ml에서 세포 배양물 1 ml당 1,500 ng의 pCEP4-ΔCMV 운반체 플라스미드로 희석하고, 배지를 형질감염 2시간 후에 교체하였다. 24시간 후에 세포를 수집하고, 0.2% 소 혈청 알부민 (PBS-BSA)이 보충된 빙냉한 PBS로 세척하고, PBS-BSA로의 RBD-sfGFP를 함유하는 배지의 1/20 (replicate 1) 또는 1/40 (replicate 2)과 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 항-myc Alexa 647 (clone 9B11, 1/250 dilution; Cell Signaling Technology)로 공동-염색하였다. 세포를 PBS-BSA로 2회 세척하고, Roy J. Carver Biotechnology Center의 BD FACS Aria II에 분류하였다. 주요 세포 집단은 데브리스 및 이중선을 제거하기 위해 전면/측면 산란에 의해 게이트하였고, DAPI를 샘플에 부가하여 사멸한 세포를 제외하였다. myc-양성 (Alexa 647) 집단 중, 상위 67%가 게이트되었다 (도 1B). 이들 중, 최고 GFP 형광을 갖는 세포의 15% 및 최저 GFP 형광을 갖는 세포의 20%를 우태아 혈청으로 밤새 코팅하고 Expi293 발현 배지를 함유하는 튜브에 수집하였다 (도 1D). GeneJET RNA 정제 키트 (Thermo Scientific)를 사용하여 수집된 세포에서 전체 RNA를 추출하고, 유전자-특이적 올리고뉴클레오티드로 프라이밍된 고충실도 Accuscript (Agilent)로 cDNA를 역전사하였다. ACE2의 다양한 영역은 5개의 단편으로 PCR 증폭하였다. 프라이머 상의 플랭킹 (flanking) 서열은 Illumina 시퀀싱 프라이머에 대한 어닐링, 고유 바코딩 (barcoding) 및 유세포 결합을 위해 생성물에 말단에 어댑터를 부가하였다. 앰플리콘은 2×250 nt paired 말단 프로토콜을 사용하여 Illumina NovaSeq 6000에서 시퀀싱하였다. 데이터는 Enrich를 사용하여 분석하였고 (Fowler et al., *Bioinformatics*. 27, 3430-3431, 2011), commands는 GEO 기탁에 제공된다. 간단히 말해서, 분류된 집단의 전사체에서 ACE2 변이체의 빈도를 나이브 플라스미드 라이브러리의 빈도와 비교하여, $\log_2$ 농축 비율을 산출한 다음에, 야생형에 대해 동일한 산출로 정규화하였다. 야생형 서열은 실질적으로 풍부하거나 또는 고갈되지 않았으며, $\log_2$ 농축 비율은 -0.2 내지 +0.2를 가졌다.

[0118] **ACE2-S 결합의 유세포 분석.** Expi293F 세포를 Expifectamine (ThermoFisher)을 사용하여 pcDNA3-myc-ACE2, pcDNA3-myc-S 또는 pcDNA3-S 플라스미드 (2×10^6 / ml의 배양물 1 ml당 DNA 500 ng)로 형질감염하였다. 세포를 형질감염 24시간 후에 유세포 분석에 의해 분석하였다. 전장 myc-ACE2에 대한 RBD-sfGFP의 결합을 분석하기 위해, 세포를 빙냉한 PBS-BSA로 세척하고, RBD-sfGFP를 함유하는 배지의 1/30 희석액 및 항-myc Alexa 647 (clone 9B11, Cell Signaling Technology)의 1/240 희석액을 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 PBS-BSA로 2회 세척하고, BD LSR II에서 분석하였다. 전장 myc-S에 대한 sACE2-sfGFP의 결합을 분석하기 위해, 세포를 PBS-BSA로 세척하고, sACE2-sfGFP를 함유하는 배지의 계열 희석액 및 항-myc Alexa 647 (clone 9B11, Cell Signaling Technology)의 1/240 희석액을 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 PBS-BSA로 2회 세척하고, BD Accuri C6에서 분석하였으며, 전체 Alexa 647-양성 집단은 분석을 위해 게이트하였다. sACE2-IgG1 또는 sACE2-8h의 결합을 측정하기 위해, myc-S 또는 S 형질감염된 세포를 PBS-BSA로 세척하고, PBS-BSA 중 표시된 농도의 정제된 sACE2와 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 2회 세척하고, 얼음 위에서 30분 동안 2차 항체 (1/100 dilution of chicken anti-HIS-FITC polyclonal from Immunology Consultants Laboratory; or 1/250 anti-human IgG-APC clone HP6017 from BioLegend)와 인큐베이션하고, 다시 2회 세척하였고, FSC-SSC에 의한 게이팅 후에 데브리스를 배제하기 위해 전체 집단의 형광을 BD Accuri C6에서 측정하였다. 데이터는 FCS Express (De Novo Software) 또는 BD Accuri C6 소프트웨어로 처리하였다.

[0119] **IgG1-Fc 융합 단백질의 정제.** 제거된 발현 배지를 KANEKA KanCapA 3G Affinity 흡착제 (Pall; equilibrated in PBS)와 4℃에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 수지를 크로마토그래피 컬럼에서 수집하고, 12 컬럼 부피 (CV) PBS로 세척하고, 단백질을 5 CV 60 mM 아세테이트 pH 3.7로 용출시켰다. 용출액은 1 CV의 1 M Tris pH 9.0으로 즉시 중화하였고, 100 kD MWCO 원심분리 장치 (Sartorius)로 농축하였다. PBS를 실행 버퍼로 사용하여 Superdex 200 Increase 10/300 GL 컬럼 (GE Healthcare Life Sciences)에서 단백질을 분리하였다. 피크 분획을 풀링 (pooling)하고, 용해도가 우수한 ~10 mg/ml로 농축하고, 액체 질소에서 급속 동결한 후에 -80℃에서 저장하였다. 단백질 농도는 단량체, 성숙 폴리펩티드 서열에 대해 산출된 흡광 계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 결정하였다.

[0120] **8his-태그된 단백질의 정제.** PBS에서 평형화된 HisPur Ni-NTA 수지 (Thermo Scientific)를 투명 발현 배지와 4℃에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 상기 수지를 크로마토그래피 컬럼에서 수집하고, 12 컬럼 부피 (CV) PBS로 세척하고, 20 mM, 50 mM 및 250 mM 이미다졸 pH 8 (각 분획의 6 CV)이 보충된 PBS의 단계 용출로 단백질을 용출하였다. 50 mM 및 250 mM 이미다졸 분획을 30 kD MWCO 원심분리 장치 (MilliporeSigma)로 농축하였다. PBS를

실행 버퍼로 사용하여 Superdex 200 Increase 10/300 GL column (GE Healthcare Life Sciences)에서 단백질을 분리하였다. 피크 분획을 풀링하고, 용해도가 우수한 ~5 mg/ml로 농축하고, 액체 질소에서 급속 동결한 후에 -80℃에서 저장하였다.

[0121] **기타 단백질.** ExpiCHO-S 세포 (ThermoFisher)에서 발현되는 태그되지 않은 sACE22.v2.4를 Orthogonal Biologics, Inc.에서 제조 및 제공하였다.

[0122] **분석적 크기 배제 크로마토그래피 (SEC).** 단백질 (2 μM에서 200 μl)을 PBS에서 평형화된 Superdex 200 Increase 10/300 GL 컬럼 (GE Healthcare Life Sciences)에서 분리하였다. MW 표준은 Bio-Rad로부터 입수하였다.

[0123] **생물층 간섭계.** 수화된 항-인간 IgG Fc 바이오센서 (Molecular Devices)를 RBD-IgG1을 함유하는 발현 배지에 60초 동안 침지하였다. RBD가 캡처된 바이오센서를 분석 버퍼에서 세척하고, 표시된 농도의 sACE2-8h 단백질에 침지하고, 분석 버퍼로 복귀시켜서 해리를 측정하였다. BLItz 기기에서 데이터를 수집하고, BLItz Pro Data Analysis Software (Molecular Devices)를 사용하여 1:1 결합 모델로 분석하였다. 분석 버퍼는 10 mM HEPES pH 7.6, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% 폴리소르베이트 20, 0.5% 무-지방 분유 (Bio-Rad)이었다.

[0124] **시약 및 데이터 이용 가능성.** 플라스미드는 Addgene에 ID 141183-5, 145145-78, 149268-71, 149663-8 및 154098-106로 기탁된다. 원시 및 처리된 심층 시퀀싱 데이터는 NCBI의 GEO (Gene Expression Omnibus)에 시리즈 등록 번호 GSE147194로 기탁된다.

[0125] **ACE2 촉매 활성 분석.** 활성은 분석 버퍼에서 22, 7.4 및 2.5 nM의 최종 농도로 희석된 단백질로 형광측정 ACE2 Activity Assay Kit (BioVision)를 사용하여 측정하였다. 비활성 (Specific activity)은 효소 1 pmol당 1 분당 (mU) 생성된 MCA pmol로서 보고된다. Analyst HT (Molecular Devices)에서 형광을 판독하였다.

[0126] **ELISA.** 항-RBD IgG 역가는 Amant et al. (*Nat. Med.* 5, 562, 2020)에 기재된 바와 같이 간접 ELISA에 의해 인간 혈청 샘플에서 측정하였다. 96-웰 플레이트의 웰을 4℃에서 밤새 2 μg/ml RBD-8h 단백질로 코팅하였다. 세척 후에, 상기 웰은 3% 무-지방 우유를 함유한 PBS로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 다음으로, 열-불활성화된 혈청의 다양한 희석액 (56℃, 1시간)을 차단된 웰에 부가하였다. 실온에서 2시간 후에, 웰을 세척한 다음에, 염소 항-인간 IgG-HRP (ThermoFisher)와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 결합되지 않은 HRP-접합된 항체는 세척으로 제거하고, HRP에 대한 TMB 기질을 부가하였다. 비색 반응을 10분 동안 전개한 후에, 2N 황산을 부가하여 반응을 정지시켰다. 생성물의 흡광도는 450 nm에서 측정하였다. 경쟁 분석을 위해, 혈청 희석액 (이들의 역가와 동일함: P1의 경우 1:5000, P2의 경우 1:2000 및 P3의 경우 1:1000)을 다양한 농도의 sACE2와 사전-혼합하였다. 혈청-sACE2 혼합물을 차단된 플레이트에 부가하고, 프로토콜을 상기 설명한 바와 같이 계속하였다.

[0127] **NHSR (Not Human Subjects Research) 결정.** 회복된 COVID-19 환자의 익명화된 혈청 샘플은 University of Chicago (patients P2 and P3) 및 상업적 공급업체 (patient P1; RayBiotech)에서 제공하였다. University of Illinois의 Office for the Protection of Research Subjects는 ELISA 연구의 샘플 사용이 45CFR46(d)(f) 또는 21CFR56.102(c)(e)에 정의된 Human Subjects Research에 대한 기준을 충족하지 않는다고 결정하였고, IRB 승인을 요청하지 않았다.

[0128] **바이러스 미세중화 분석.** Vero E6 세포를 배양하고, 진정한 (authentic) SARS-CoV-2에 의한 감염을 Wec et al. (*Science*, eabc7424, 2020)에 설명된 바와 같이 분석하였다. 간단히 말해서, 가용성 ACE2 단백질을 배양 배지에서 계열 희석하고, SARS-CoV-2 (virus isolate 2019-nCoV/USA-WA1-A12/2020; GenBank Acc. No. MT020880.1)와 1시간 동안 인큐베이션하였다. 혼합물을 MOI 0.2로 VeroE6 세포에 부가하고, 24시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 고정하고, 항-SARS-CoV-2 뉴클레오캡시드 항체 (Sino Biological) 및 Alexa Fluor 488-접합된 염소 항-토끼 2차 항체로 면역염색하였다. 플레이트를 Operetta (PerkinElmer)에서 이미지화하여, 감염된 세포의 수를 결정하고, 바이러스 단독 대조군 웰과 비교하여 상대 감염의 퍼센트를 산출하였다.

[0129] **실시예 4**

[0130] 인수공통 코로나바이러스는 지난 20년 동안 동물 병원소 (animal reservoirs)에서 여러 번 교차하였으며, 야생 동물이 계속해서 파괴적인 발병의 원인이라는 것이 거의 확실하다. 통상적인 호흡기 질환을 일으키는 편재하는 인간 코로나바이러스와 달리, 범유행 가능성이 있는 이러한 인수공통 코로나바이러스들은 부분적으로 수용체 사용으로 인한 조직 친화성 (tissue tropisms)으로 인해, 심각하고 복잡한 질병을 유발한다. 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 1 (SARS-CoV-1) 및 2 (SARS-CoV-2)는 세포 부착 및 진입을 위해 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2)에 진입한다 (Zhou *et al.*, *Nature*. 579, 270-273, 2020; Walls *et al.*, *Cell*, 2020),

doi:10.1016/j.cell.2020.02.058; Wan et al., SARS. *J. Virol.*, 2020), doi:10.1128/JVI.00127-20; Wrapp *et al.*, *Science*, eabb2507, 2020; Hoffmann *et al.*, *Cell*, 2020), doi:10.1016/j.cell.2020.02.052; Li *et al.*, *Nature*. 426, 450-454, 2003; Letko et al., *Nat Microbiol*. 11, 1860, 2020). ACE2는 다른 조직 중에서 폐, 심장 및 위장관의 세포 표면에서 발현되는 혈액량 및 혈압 조절을 담당하는 프로테아제이다 (Samavati, B. D. Uhal, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 752, 2020; Jiang *et al.*, *Nat Rev Cardiol*. 11, 413-426, 2014). SARS-CoV-2의 지속적인 확산 및 이로 인한 질병인 COVID-19는 전 세계 보건 시스템 및 경제에 심각한 타격을 가했으며, 효과적인 치료법 및 백신이 시급히 필요하다.

[0131] SARS-CoV-2가 인간 집단에서 풍토병이 됨에 따라, 돌연변이를 일으켜 유전자 변이 (genetic drift)를 겪을 가능성이 있다. 감염된 사람의 수가 증가하고 면역 반응이 증가함에 따라 이것이 어느 정도로 발생할 것인지는 알 수 없지만, 이미 바이러스 스파이크 단백질 S (D614G)의 변이체가 여러 독립적인 이벤트로부터 대두되었고, S 단백질 안정성 및 역학에 영향을 주었다 (Zhang *et al.*, *bioRxiv*, 2020.06.12.148726, 2020; Korber *et al.*, *Cell*. 182, 812-827.e19, 2020). 또 다른 S 변이체 (D839Y)가 포르투갈에서 널리 퍼졌으며, 아마도 시조 효과 (founder effect) 때문일 수 있다 (Borges *et al.*, *medRxiv*, 2020.08.10.20171884, 2020). 코로나바이러스는 중등도에서 높은 돌연변이율을 가지며 (HCoV-NL63에서 부위당 연간 10^{-4}개의 치환으로 측정됨 (Pyrc *et al.*, *J. Mol. Biol.* 364, 964-973, 2006), SARS-관련 베타코로나바이러스의 RBD와 부분적으로만 공유되는 더 작은 계면을 통해서, ACE2에도 결합하는 알파코로나바이러스 (Wu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19970-19974, 2009)), 특히 공동-감염 수준이 높을 수 있는 박쥐에서, 재조합 이벤트로 인해 코로나바이러스 게놈의 큰 변화가 빈번하게 발생하였다 (Su *et al.*, *Trends Microbiol.* 24, 490-502, 2016; Boni *et al.*, *Nat Microbiol* 5, 1408-1417, 2020). MERS-CoV의 재조합은 낙타에서도 기록되었다 (Sabir *et al.*, *Science*. 351, 81-84, 2016). 이는 모두 현재 범유행의 궤적, 미래 코로나바이러스 범유행의 가능성, 및 SARS-CoV-2의 약물 저항성이 만연할지 여부에 대해 중대한 영향을 미칠 것이다.

[0132] 바이러스 스파이크는 임상으로 진행 중인 모노클로날 항체를 중화하기 위한 취약한 표적이지만, 조직 배양에서 스파이크의 이탈 돌연변이가 테스트된 모든 항체에 빠르게 나타난다 (Baum *et al.*, *Science*, eabd0831, 2020). 효모 표면 디스플레이에 의한 단리된 수용체-결합 도메인 (RBD)의 심층 돌연변이유발로, 높은 발현 및 ACE2 친화도를 유지하지만 더 이상 모노클로날 항체에 결합하지 않고 저항성을 부여하는 S의 돌연변이를 용이하게 확인하였다 (Greaney *et al.*, *bioRxiv*, 2020.09.10.292078, 2020). 이는 HIV-1 및 에볼라 (Ebola) 치료로부터 얻은 교훈에서 영감을 받아 비-경쟁 모노클로날 항체 칵테일의 개발에 동기를 부여하여 (Baum *et al.*, *Science*, eabd0831, 2020; Tortorici *et al.*, *Science*, eabe3354, 2020), 바이러스가 이탈할 가능성을 제한한다. 이는 항원으로 구별될 수 있는 야생 동물로부터 미래의 코로나바이러스 유출을 다루지 않는다. 실제로, SARS-CoV-2와 교차 반응하는 회복된 SARS-CoV-1 환자로부터 항체를 찾기 위해 대규모 스크리닝 노력이 필요하며 (Pinto *et al.*, *Nature*, 2020), doi:10.1038/s41586-020-2349-y), 이는 항체가 스파이크 표면의 다양한 에피토프와 상호작용하는 능력을 제한하였으며, 모든 SARS-관련 바이러스에 대해 광범위하고 범-특이적일 가능성이 없음을 나타낸다.

[0133] 모노클로날 항체에 대한 대체 단백질-기반 항바이러스제는 바이러스 스파이크 상의 수용체-결합 부위에 대해 경쟁하기 위한 유인인자로서 가용성 ACE2 (sACE2)를 사용하는 것이다 (Li *et al.*, *Nature*. 426, 450-454, 2003; Hofmann *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 1216-1221, 2004; Lei *et al.*, *Nat Commun*. 11, 2070, 2020; Monteil *et al.*, *Cell*, 2020, doi:10.1016/j.cell.2020.04.004; Chan *et al.*, *Science*. 4, eabc0870, 2020). 원칙적으로, 바이러스는 네이티브 ACE2 수용체에 대한 친화도를 감소시키지 않으면서 sACE2-매개 중화를 피할 수 있는 잠재력이 제한되어 바이러스를 덜 독성으로 만든다. 여러 그룹이 현재 sACE2를 조작하여, 성숙한 모노클로날 항체와 경쟁하고 감염을 강력하게 중화시키는 SARS-CoV-2에 대한 고친화성 유인인자를 형성하였다 (Chan *et al.*, *Science*. 4, eabc0870, 2020; Glasgow *et al.*, *bioRxiv*, 2020.07.31.231746, 2020; Higuchi *et al.*, *bioRxiv*, 2020.09.16.299891, 2020). 본원에 개시된 연구에서, S에 대한 친화도를 증가시키는 ACE2의 다수의 돌연변이를 확인하기 위해 심층 돌연변이유발을 사용하였다 (Chan *et al.*, *Science*. 4, eabc0870, 2020). 이러한 돌연변이들은 계면 및 바이러스-인식 입체형태의 폴딩을 증진시킬 것으로 예상되는 원위 부위에도 분산되었다. $sACE2_2$.v2.4라고 하는 3가지 돌연변이들의 조합은 친화도를 35배 증가시키고, SARS-CoV-2 S (K_D 600 pM)에 최고의 모노클로날 항체와 유사한 친화도로 결합한다 (Chan *et al.*, *Science*. 4, eabc0870, 2020). 막에 발현된 삼량체 스파이크에 대한 결합성 결합을 통해 훨씬 더 치밀한 겉보기 친화도에 도달한다. 조작이 SARS-CoV-2 친화도에 독점적으로 중점을 두었음에도 불구하고, $sACE2_2$.v2.4는 조직 배양에서 진정한 SARS-CoV-1 및 -2 감염을 강력하게 중화시켰으며, 이는 야생형 수용체와 매우 유사하여 일반적으로 ACE2-이용 베타코로나바이

러스에 대한 광범위한 활성을 부여함을 시사한다. 가용성 $ACE2_2$.v2.4는 이량체이고, 응집이 없는 단분산성이며, 촉매 활성, 고용해성, 37℃에서 며칠 동안 보관한 후에 안정하고, 야생형 단백질보다 더 높은 수준으로 잘 발현된다. 높은 활성 및 바람직한 제조 특성의 유리한 조합으로 인해, $sACE2_2$.v2.4는 전임상 개발을 위한 진정한 약물 후보이다.

[0134] 조작된 고친화도 유인 수용체는 천연 ACE2와 매우 유사하지만, 상호작용 표면에서 또는 그 부근에 돌연변이가 존재한다. 그러므로 바이러스 스파이크 변이체가 조작된 유인인자와 야생형 수용체를 구별하여 저항성을 향한 경로를 제공할 기회가 있다. 조작된 유인인자 $sACE2_2$.v2.4는 진입을 위해 ACE2를 사용하는 다양한 SARS-관련 베타코로나바이러스의 RBD에 광범위하고 치밀하게 결합한다는 것이 본원에 개시되어 있다. ACE2와 직접 접촉하고 이탈 돌연변이가 존재할 가능성이 있는 RBD 내에서 돌연변이가 발견되지 않았으며, 이 돌연변이는 야생형 수용체로 특이성을 재유도하지만, 경쟁 결합 분석에서 조작된 유인인자의 결합을 선호하는 많은 돌연변이가 발견되었다. 결과는 조작된 유인 수용체에 대한 저항성이 드물고, $sACE2_2$.v2.4가 SARS-관련 바이러스의 S에 대한 친화도에 대한 공통 속성을 표적으로 한다는 것을 보여준다.

[0135] **결과**

[0136] **조작된 유인 수용체는 SARS-관련 CoV의 RBD에 치밀한 친화력으로 광범위하게 결합한다.**

[0137] 유인 수용체 $sACE2_2$.v2.4의 친화도는 *리놀로푸스* (*Rhinolophus*) 박쥐 종 유래의 5개의 코로나바이러스 (단리물 LYRa11, Rs4231, Rs7327, Rs4084 및 RsSHC014) 및 2개의 인간 코로나바이러스인 SARS-CoV-1 및 SARS-CoV-2의 S 단백질로부터 정제된 RBD에 대해 결정하였다. 이러한 바이러스들은 ACE2를 진입 수용체로 사용하는 베타코로나바이러스의 공통 분기군에 속한다 (Letko et al., *Nat Microbiol*. 11, 1860, 2020). 이들은 RBD 코어 내에서 근연 서열 동일성을 공유하는 반면에, 변이는 기능적 ACE2 결합 부위 내에서 가장 높으며 (도 18 및 19), 아마도 생태학적으로 다양한 박쥐 종에서 다형성 ACE2 서열을 갖는 공진화적 (co-evolutionary) '확장 경쟁 (arms race)' 때문일 수 있다 (Frank et al., *bioRxiv*. 5, 562, 2020). 친화도는 C-말단에서 융합된 $sACE2_2$ (a.a. S19-G732) 및 센서 표면에 고정된 인간 IgG1의 Fc 모이어티 및 가용성 분석물로 사용된 단량체 8his-태그된 RBD를 사용하여, 생물층 간섭계 (BLI)로 측정하였다. 이러한 배열은 용액 중 이량체 $sACE2_2$가 상호작용 표면을 장식하는 고정된 RBD에 결합될 때마다 인위적으로 치밀한 (picomolar) 겉보기 친화도를 유발하는 결합력 효과 (avidity effects)를 제외한다. 야생형 $sACE2_2$는 SARS-CoV-2에 대해 16 nM에서 LYRa11에 대해 91 nM 범위의 친화도로 모든 RBD에 결합하였으며, 친화도 중앙값은 60 nM이었다 (표 6). SARS-CoV-1 및 SARS-CoV-2의 RBD에 대해 측정된 친화도는 발표된 데이터와 유사하다 (Wrapp *et al.*, *Science*, eabb2507, 2020; Chan *et al.*, *Science*. 4, eabc0870, 2020; Shang *et al.*, *Nature*. 382, 1199, 2020; Kirchdoerfer *et al.*, *Sci Rep*. 8, 15701, 2018; Li *et al.*, *EMBO J*. 24, 1634-1643, 2005). 조작된 $sACE2_2$.v2.4는 SARS-CoV-2에 대해 0.4 nM에서 단리주 Rs4231에 대해 3.5 nM 범위의 K_D와 함께, 모든 RBD에 대한 친화도에서 큰 증가를 나타내었으며, 친화도 중앙값은 2 nM 미만이었다 (표 6). 조작된 유인인자의 약 35배 친화도 증가는 테스트 패널의 코로나바이러스에 보편적으로 적용되며, 친화도 증진을 위한 분자적 기반은 RBD/ACE2 인식의 공통 속성에 기반해야 한다.

표 6

코로나바이러스 RBD에 대한 고정된 $sACE2_2$-IgG1 결합에 대한 BLI 키네틱스								
CoV 균주[a]	야생형 $sACE2_2$-IgG1[b]				$sACE2_2$.v2.4-IgG1			
	k_{on} (M^{-1} s^{-1})	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)	χ^2[c]	k_{on} (M^{-1} s^{-1})	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)	χ^2
LYRa11	8.7×10^5	7.9×10^{-2}	91	0.12	1.4×10^6	2.5×10^{-3}	1.8	0.10
Rs7327	6.4×10^5	4.0×10^{-2}	63	0.25	9.8×10^5	1.8×10^{-3}	1.9	0.11
Rs4231	3.2×10^5	2.2×10^{-2}	69	0.04	4.5×10^5	1.6×10^{-3}	3.5	0.10
Rs4084	2.9×10^5	2.5×10^{-2}	85	0.24	4.8×10^5	1.5×10^{-3}	3.1	0.10
RsSHC014	8.8×10^5	2.6×10^{-2}	29	0.20	1.6×10^6	2.0×10^{-3}	1.3	0.29
SARS-1	6.6×10^3	1.2×10^{-4}	58	0.03	3.0×10^3	5.6×10^{-6}	2.1	0.03
SARS-2	1.4×10^6	8.1×10^{-3}	16	0.25	6.6×10^5	2.8×10^{-4}	0.4	0.09
SARS-2 (Y449K)	2.0×10^6	9.0×10^{-2}	46	0.67	4.3×10^6	4.0×10^{-3}	0.9	0.71
SARS-2 (N501W)	2.4×10^6	5.4×10^{-3}	2.3	0.43	3.3×10^6	2.8×10^{-4}	0.1	0.23
SARS-2 (N501Y)	2.2×10^6	1.8×10^{-3}	0.8	0.15	3.6×10^5	1.1×10^{-4}	< 0.1	0.24

[a] 5 내지 7 농도의 정제된 RBD를 가용성 분석물로 사용하였다.

[b] IgG1-Fc 융합된 $sACE2_2$는 항-인간 IgG Fc 캡처 바이오센서에 고정하였다.

[c] χ^2 값은 곡선 적합도를 나타낸다. 허용 가능한 값은 3 미만인 것으로 고려되었다.

[0138]

[0139] **전장 S와 관련하여 RBD의 심층 돌연변이 스캔은 ACE2 결합 부위의 잔기가 돌연변이에 내성이 있음을 보여준다.**

[0140] 약물 저항성에 대한 '병원소 (reservoir)'로 작용할 수 있는 SARS-CoV-2의 S에서 잠재적인 서열 다양성을 조사하기 위해, RBD의 돌연변이 내성을 심층 돌연변이유발로 평가하였다 (Fowler and Fields, *Nat. Methods*. 11, 801-807, 2014). 포화 돌연변이유발은 표면 발현의 검출을 위한 c-myc 에피토프로 세포외 N-말단에 태그된 전장 S의 RBD (a.a. C336-L517)에 중점을 두었다. 3,640개의 단일 아미노산 치환을 포함하는 스파이크 라이브러리는 세포가 전형적으로 하나 초과의 서열 변이체를 획득하지 못하는 조건하에 인간 Expi293F 세포에서 형질감염되었다 (Heredia *et al.*, *J. Immunol.* 200, ji1800343-3839, 2018; Park *et al.*, *J Biol Chem*. 294, 4759-4774, 2019). 배양물을 하위-포화 농도 (2.5 nM)에서 야생형 8his-태그된 이량체 $sACE2_2$와 인큐베이션하였다. 결합된 $sACE2_2$-8h 및 표면-발현된 S는 유세포 분석을 위해 형광 항체로 염색하였다 (도 20A). 야생형 S를 발현하는 세포와 비교하여, 라이브러리는 제대로 발현되지 않았으며, 이는 많은 돌연변이가 폴딩 및 발현이 떨어지는 것을 나타낸다. 세포 집단은 ACE2에 감소된 친화도로 결합하는 S 변이체를 발현하는 것으로 명확하게 식별 가능하였다 (도 20B). S를 발현하는 c-myc-양성 세포에 대한 게이팅 후에, 결합된 $sACE2_2$의 높은 수준 및 낮은 수준을 갖는 세포를 각각 ACE2-High 및 ACE2-Low 집단이라고 하며, 이는 형광-활성화 세포 분류 (FACS)에 의해 수집하였다 (도 20C). 발현 및 $sACE2_2$ 결합 신호는 분류하는 동안 몇 분에서 몇 시간에 걸쳐 감소하였으며, 이는 아마도 S1 서브유닛의 방출로 인한 것일 수 있다. 그러므로 조합된 8시간 분류 시간 동안 3개의 개별 FACS 실험들로부터 세포를 수집하고, 풀링하였다.

[0141] 분류된 세포의 전사체를 Illumina 시퀀싱하고, 나이브 플라스미드 라이브러리와 비교하여 각 아미노산 치환에 대한 농축 비율을 결정하였다 (Fowler et al., *Bioinformatics*. 27, 3430-3431, 2011). ACE2를 발현하고 치밀하게 결합하는 S의 돌연변이는 ACE2-High sort에서 선택적으로 농축되며 (도 21); ACE2를 발현하지만 ACE2 결합이 감소된 돌연변이는 ACE2-Low sort에서 선택적으로 농축되고; 잘 발현되지 않은 돌연변이는 분류된 집단 모두에서 고갈된다. 위치 보존 스코어는 잔기 위치에서 각각의 가능한 아미노산에 대한 $\log_2$ 농축 비율을 평균화하여 산출하였다. ACE2-High 및 ACE2-Low sort들 모두에 대한 보존 스코어를 추가함으로써, 표면 발현에 대한 스코어

가 도출되었으며, 이는 소수성 RBD 코어가 바이러스 스파이크의 폴딩 및 트래피킹에 대해 치밀하게 보존되었음을 보여준다 (도 22A). 이를 비교함으로써, 노출된 RBD 표면의 잔기는 S 표면 발현에 대해 돌연변이가 허용된다. 이는 일반적으로 단백질의 돌연변이 내성과 일치한다.

[0142] 치밀한 ACE2 결합 (예: ACE2-High 집단의 S 변이체)의 경우, ACE2 계면에서 RBD 잔기에 대한 보존이 증가하지만, 돌연변이 내성은 높게 유지된다 (도 22C). 그러므로 ACE2 결합 부위에서 높은 다양성을 나타내는 천연 베타코로나바이러스에서 관찰된 서열 다양성은 심층 돌연변이 스캔에서 복제되며, 이는 SARS-CoV-2 스파이크가 기능에 대한 수용체-결합 부위에서 상당한 유전자 다양성을 허용할 것으로 예측된다. 이러한 접근 가능한 서열 다양성으로부터 SARS-CoV-2는 ACE2-결합 부위를 표적으로 하는 모노클로날 항체 또는 조작된 유인 수용체에 대한 저항성을 획득하기 위해 가능한 돌연변이를 일으킬 수 있다.

[0143] **효모 표면 디스플레이에 의한 단리된 RBD의 심층 돌연변이 스캔과의 비교**

[0144] 효모의 표면에 표시된 단리된 RBD에 대해 두 가지 심층 돌연변이 스캔이 보고되었다 (Starr *et al.*, *bioRxiv*, 2020.06.17.157982, 2020; Linsky *et al.*, *bioRxiv*, 2020.08.03.231340, 2020). 인간 세포에서 발현된 전장 S의 선택으로부터 본원에 기재된 데이터는 공개적으로 접근 가능한 Starr 등의 데이터 세트와 비교하였다. 인간 세포에서 전장 스파이크의 표면 발현을 위한 RBD내 중요한 잔기는 주목할만한 영역을 제외하고 단리된 RBD의 효모 표면 디스플레이로부터의 데이터와 밀접한 상관 관계가 있다 (도 22B). ACE2-결합 부위 (예: V362, Y365 및 C391)에 대향하는 RBD의 표면은 효모 표면 디스플레이를 위해 자유롭게 돌연변이되지만, 이의 서열은 본 실험에서 제한되며; RBD의 이 영역은 닫힌 입체형태로 S 서브유닛의 전체 폴딩에 구조적 요소를 연결하여 매립된다 (이는 S 서브유닛의 지배적인 입체형태이며, 수용체 결합에 접근할 수 없음) (Walls *et al.*, *Cell*, 2020), doi:10.1016/j.cell.2020.02.058; Wrapp *et al.*, *Science*, eabb2507, 2020; Cai *et al.*, *Science*. 369, 1586, 2020; Yao *et al.*, *Cell* 183(3), 730-738.e13, 2020). 표적 돌연변이유발을 사용하여 RBD의 모든 시스테인에 대한 알라닌 치환을 개별적으로 테스트하였다 (도 23). 모든 시스테인-대-알라닌 돌연변이는 효모 디스플레이 스캔에서 중성이었던 RBD '후면 (backside)'에 C391A 및 C525A를 포함하여, Expi293F 세포에서 S 표면 발현을 심각하게 감소시켰다. 이러한 차이점은 인간 세포막에서 발현된 전체 스파이크와 관련하여 RBD에 대한 더 치밀한 서열 제약이 있음을 보여주지만, 전반적으로 두 데이터 세트는 밀접하게 일치한다.

[0145] 이량체 $sACE2_2$에 대한 결합을 위해, 계면 잔기는 Starr 등의 데이터 세트에서 더 치밀하게 보존되었으며 (도 22D), 아마도 심층 돌연변이유발 실험들 간에 세 가지 차이점의 결과일 수 있다. 첫째, 원형질막에서 S 변이체의 ACE2 결합에 대한 선택은 주로 인간 세포에서 더 엄격한 표면 발현에 대한 돌연변이 효과를 반영하는 것으로 보인다. 효모는 잘못 폴딩된 많은 단백질이 세포 표면으로 누출되도록 한다 (Rocklin *et al.*, *Science*. 357, 168-175, 2017). 둘째, 효모 선택은 겉보기 K_D 변화가 계산된 다중 sACE2 농도에서 수행하였으며; 이와 관련하여 Starr 등의 데이터는 매우 포괄적이다. 소수의 세포만이 스파이크를 발현하는 인간 세포 라이브러리에 필요한 긴 정렬 시간으로 인해, 다양한 결합 친화도의 범위를 정량적으로 정확하게 캡쳐할 수 없는 단일 $sACE2_2$ 농도에서 정렬을 수행하였다. 셋째, 이량체 $sACE2_2$는 결합력이 친화도-감소 돌연변이의 효과를 차단할 수 있도록 인간 세포막에 조밀하게 패킹된 삼량체 S를 기하학적으로 보완할 수 있다. 그럼에도 불구하고, ACE2 결합은 RBD 표면에 대한 돌연변이 후에도 종종 지속된다는데 전반적으로 동의하며, 이러한 데이터는 단순히 돌연변이 내성이 Starr 등에 의해 이미 관찰된 것보다 훨씬 더 클 수 있음을 시사한다.

[0146] **조작된 유인인자보다 야생형 ACE2에 우선적으로 결합하는 S 변이체에 대한 스크리닝**

[0147] SARS-CoV-2 단백질 S의 ACE2-결합 부위가 많은 돌연변이에 내성이 있음을 보여주므로, 조작된 유인 $sACE2_2$.v2.4에 저항성을 부여하는 돌연변이가 발견될 수 있는지 여부를 조사하였다. 저항성 돌연변이는 야생형 수용체에 대한 결합을 유지하면서 $sACE2_2$.v2.4에 대한 친화성을 손실할 것으로 예상되며, 물리적 접촉이 이루어지는 RBD에 존재할 가능성이 가장 높다. 유사한 추론은 모노클로날 항체에 대한 이탈 돌연변이를 찾기 위해 효모 표면 디스플레이에 의해 단리된 RBD의 심층 돌연변이유발-기반 선택의 기초를 형성하였으며, 그 결과는 슈도바이러스 성장 선택에서 이탈 돌연변이를 예측하였다 (Greaney *et al.*, *bioRxiv*, 2020.09.10.292078, 2020).

[0148] 조작된 유인인자의 이탈 돌연변이가 RBD에서 발견될 수 있는지 여부를 해결하기 위해, S 단백질 라이브러리는 특이성 선택을 위해 목적을 수정하였다. RBD에서 가능한 모든 치환을 코딩하는 라이브러리를 발현하는 세포는 두 단백질이 경쟁적으로 결합하는 농도에서 IgG1의 Fc 영역에 융합된 야생형 $sACE2_2$ 및 8his-태그된 $sACE2_2$.v2.4와 공동-인큐베이션하였다 (Chan *et al.*, *Science*. 4, eabc0870, 2020). S 라이브러리를 발현하는

Expi293F 배양물의 유세포 분석으로부터 $sACE2_2$.v2.4에 대한 우선적 결합으로 이동된 S 변이체를 발현하는 세포는 존재하지만, 야생형 수용체에 대한 우선적 결합을 갖는 유의미한 집단은 존재하지 않는다는 것이 명백하였다 (도 24A- 24B). $sACE2_2$(WT)-IgG1 또는 $sACE2_2$.v2.4에 우선적으로 결합할 수 있는 S 변이체를 발현하는 세포를 게이팅하고, FACS에 의해 수집한 다음 (도 24C), 농축 비율을 결정하기 위해 S 전사체의 심층 시퀀싱을 수행하였다. 2개의 독립적인 반복 실험 사이에 밀접한 일치가 있었다 (도 24D-24G). 대부분의 RBD 돌연변이는 분류 후에 고갈되었으며, 이는 S 폴딩 및 발현에 대한 유해한 효과와 일치한다.

[0149] 가용성 $ACE2_2$.v2.4는 야생형 ACE2로부터 3개의 돌연변이를 갖는다: RBD 계면 내에 매립된 T27Y, 및 계면 주변부에 L79T 및 N330Y (도 25A). S의 RBD에서 상당한 수의 돌연변이가 $sACE2_2$.v2.4에 대한 우선적 결합을 위해 선택적으로 농축되었다 (도 25B, 좌측 상단 사분면). $sACE2_2$.v2.4-특이성 돌연변이는 ACE2의 조작된 돌연변이 (구체적으로 ACE2-L79에 인접한 S-F486 및 ACE2-N330에 인접한 S-T500에 대한 돌연변이)의 부위에 바로 인접하여 발견될 수 있지만, $sACE2_2$.v2.4-특이성 돌연변이에 대한 주요 핫스팟을 또한 ACE2-α1 나선이 β-헤어핀 모티프에 대해 패킹되는 영역과 접촉하는 RBD 루프 498-506에 매핑하였다 (도 25A). 이에 비해, RBD에는 $sACE2_2$(WT)-특이성 돌연변이에 대한 핫스팟이 없었다. 실제로, 소수의 돌연변이만이 야생형 수용체에 대한 우선적 결합을 위해 선택적으로 농축되었고 (도 25B), 이러한 추정되는 야생형-특이적 돌연변이의 풍도는 심층 돌연변이유발 데이터에서 예상되는 노이즈 수준 이상으로 거의 상승하지 않았다. 그러므로, 이러한 경쟁 분석에서, 야생형 $sACE2_2$에 대한 S 결합은 조작된 $sACE2_2$.v2.4에 대한 S 결합보다 RBD 돌연변이에 더 감수성이 있다.

[0150] 심층 돌연변이유발에 의해 발견된 잠재적인 야생형 ACE2-특이적 돌연변이가 데이터 노이즈로 인한 거짓 예측과 반대로 실제인지 여부를 결정하기 위해, 표적 돌연변이유발에 의해 야생형-특이적 게이트가 선택적으로 풍부한 S의 24개의 돌연변이체를 테스트하였다 (도 25B의 청색 데이터 포인트). 결합하는 야생형 $sACE2_2$에 대한 약간의 이동만이 관찰되었다 (도 26). $sACE2_2$ 적정 실험에서 2개의 S 돌연변이체인 N501W 및 N501Y를 추가로 조사하였으며, 이들 모두는 높은 수용체 결합을 유지하고, 경쟁 실험에서 야생형 $sACE2_2$에 대한 작은 이동을 나타내었다. S의 N501은 498-506 루프에 위치하며, 큰 방향족 측쇄로의 치환은 루프 입체형태를 변경하여 $sACE2_2$.v2.4에서 부근 ACE2 돌연변이 N330Y와 입체 변형을 유발할 수 있다. 8his-태그된 $sACE2_2$(WT) 및 $sACE2_2$.v2.4의 농도를 적정하고, 유세포 분석에 의해 S-발현 세포에 결합된 단백질을 측정한 후에, S-N501W 및 S-N501Y가 야생형 $sACE2_2$에 대해 향상된 특이성을 나타내는 것으로 밝혀졌으며, 그러나 상기 효과는 작고, $sACE2_2$.v2.4는 더 강한 결합제로 남아있으며 (도 25C); 그러므로 이러한 돌연변이는 조작된 유인인자에 대한 바이러스의 저항성을 부여하지 않을 것이다.

[0151] 이량체 $sACE2_2$는 막 표면의 S 단백질에 결합성으로 결합하며; 결합력 상호작용은 또한 감염 분석에서 진정한 SARS-CoV-2의 스파이크 및 $sACE2_2$ 사이에서 관찰된다 (Chan *et al.*, *Science*. 4, eabc0870, 2020). 고정된 $sACE2_2$-IgG1이 단량체 RBD와 상호작용하는 BLI 키네틱스 측정을 사용하여, S-발현 세포에 대한 결합성 $sACE2_2$ 결합의 관찰된 변화가 1가 친화도의 변화로 해석되는 지를 결정하였다. SARS-CoV-2 RBD의 N501W 및 N501Y 돌연변이체는 모두 야생형 ACE2 및 조작된 ACE2.v2.4에 대해 친화도 증가를 나타내었고, 야생형 수용체에 유리한 더 큰 친화도 증가를 보였다 (표 6). 이는 야생형 ACE2에 대한 특이성의 작은 변화를 나타내는 유세포 분석 데이터와 일치하지만, 조작된 유인인자를 피하기에는 충분하지 않다. 이에 비해, SARS-CoV-2의 S에서 여러 개의 독립적인 이탈 돌연변이가 쉽게 발견되어, 모노클로날 항체의 효능을 수십 차수 만큼 감소시킨다 (Baum *et al.*, *Science*, eabd0831, 2020; Greaney *et al.*, *bioRxiv*, 2020.09.10.292078, 2020).

[0152] 마지막으로, $sACE2_2$.v2.4에 대한 특이성을 증가시키기 위해 심층 돌연변이 스캔으로부터 예측된 S에 대한 8개의 대표적인 돌연변이 (도 25B)를 클로닝하였고, 7개는 경쟁 분석에서 우선적인 $sACE2_2$.v2.4 결합을 향해 큰 이동이 있는 것으로 밝혀졌다 (도 27). 이러한 S 돌연변이는 Y449K/Q/S, L455G/R/Y 및 G504K이었다. 돌연변이가 조작된 $sACE2_2$.v2.4에 대한 특이성을 증가시키는 이유에 대한 근거는 모호하며, 이는 RBD 잔기 Y449, L455 및 G504가 수용체의 조작된 부위와 직접 접촉하지 않기 때문이다. 고정된 $sACE2_2$-IgG1과 분석물로서의 단량체 RBD 사이의 BLI 키네틱스는 대표적인 돌연변이체인 RBD-Y449K의 야생형 및 조작된 $sACE2_2$ 모두에 대한 친화도 감소

를 보여주었다 (표 6). 그러나, $sACE2_2$.v2.4에 대한 피코몰 범위의 친화도 변화는 세포 표면에서 전장 S-Y449K에 대한 결합성 결합 동안 숨겨져 있는 반면에, S-Y449K에 대한 야생형 $sACE2_2$의 결합성 결합 (친화도는 적당한 나노몰 범위로 BLI에 의해 측정됨)이 상당히 감소한다. 이러한 발견은 친화도의 작은 감소를 일으키는 돌연변이가 더 약하게 결합된 야생형 수용체의 결합성 결합에 더 큰 영향을 미칠 수 있기 때문에 경쟁 선택이 조작된 $sACE2_2$.v2.4에 대해 특이성을 이동시키는 많은 돌연변이를 발견한 이유를 설명할 수 있다.

[0153] 전반적으로, 표적 돌연변이유발에 의한 검증으로 선택은 특이성이 변경된 S에서 돌연변이를 성공적으로 찾을 수 있음을 확인하였다. 야생형 수용체에 대한 높은 특이성을 부여하는 돌연변이를 RBD에서 찾을 수 없다는 것은 이러한 돌연변이가 적어도 수용체와의 직접적인 물리적 접촉이 일어나는 수용체-결합 도메인 내에서 드물거나 또는 존재하지 않을 수도 있음을 의미한다. 길이-범위 입체형태 영향을 미치는 다른 곳의 돌연변이는 배제될 수 없다. 그러므로 조작된 가용성 유인 수용체는 바이러스가 쉽게 이탈할 수 없는 광범위한 치료 후보로서의 전망에 부응한다.

[0154] **토의**

[0155] 가용성 유인 수용체의 매력은 바이러스가 중화를 피하기 위해 쉽게 돌연변이될 수 없다는 것이다. 가용성 유인 인자의 친화도를 감소시키는 돌연변이는 또한 숙주 세포의 야생형 수용체에 대한 친화도를 감소시키고, 이에 의해 감염력 및 독성이 감소하게 될 것이다. 그러나, 이러한 가설은 엄격하게 테스트되지 않았으며, 조작된 유인 수용체가 야생형 수용체와 다르기 때문에, 적은 수의 돌연변이만 있어도 바이러스가 진화하여 이들 둘을 구별할 수 있다. 본원에서, SARS-CoV-2에 대한 조작된 유인 수용체는 ACE2-결합 부위 내의 높은 서열 다양성에도 불구하고, 진입을 위해 ACE2를 사용하는 SARS-관련 베타코로나바이러스의 스파이크와 낮은 나노몰 K_D로 광범위하게 결합한다는 것이 입증되었다. 야생형 ACE2에 대한 높은 특이성을 부여하는 S의 돌연변이는 RBD 내의 모든 치환에 대한 포괄적인 스크린에서 발견되지 않았다. 그러므로 조작된 유인 수용체는 동물 병원소에서 유출될 수 있는 인수공통 ACE2-이용 코로나바이러스와 현재 COVID-19 범유행이 지속되면서 발생할 수 있는 SARS-CoV-2 변이체에 대해 광범위하다. 저항성의 급격한 출현을 방지하기 위해 모노클로날 항체 또는 디자인된 미니단백질 결합제가 필요한 바와 같이, 유인 수용체가 칵테일 제제에 조합될 필요는 없을 것이다 (Baum *et al.*, *Science*, eabd0831, 2020; Cao *et al.*, *Science*, eabd9909, 2020).

[0156] 가용성 유인 수용체는 특히 면역 반응을 조절하는데 임상에서 효과적인 것으로 입증되었다. 에타네르셉트 (Etanercept) (상표명 Enbrel®; 가용성 TNF 수용체), 아플리베르셉트 (aflibercept) (Eylea®; VEGF 수용체 1 및 2의 가용성 키메라) 및 아바타셉트 (abatacept) (Orencia®; 가용성 CTLA-4)는 인간 질병의 치료에 중대한 영향을 미치는 가용성 수용체의 3가지 예에 불과하지만 (Usmani *et al.*, *PLoS ONE*. 12, e0181748, 2017), 아직까지 바이러스 병원체에 대한 가용성 수용체는 승인된 약물이 아니다. 여기에는 두 가지 주요 이유가 있다. 첫째, 바이러스 당단백질에 대한 진입 수용체의 친화도는 종종 중등도 이하이기 때문에, 친화도-성숙 모노클로날 항체에 비해 중화 효능이 감소한다. SARS-CoV-2의 경우, 이러한 문제는 바이러스 S에 대한 피코몰 친화도를 갖도록 ACE2를 조작함으로써 해결되었다 (Chan *et al.*, *Science*. 4, eabc0870, 2020; Glasgow *et al.*, *bioRxiv*, 2020.07.31.231746, 2020; Higuchi *et al.*, *bioRxiv*, 2020.09.16.299891, 2020). 둘째, 바이러스 진입 수용체는 정상적인 생리학에 대한 내인성 기능을 가지고 있으며, 이들의 가용성 대응물은 이러한 정상적인 생리학에 영향을 주어서 허용할 수 없는 독성을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 인간 사이토메갈로바이러스에 대한 진입 수용체는 성장 인자 수용체이고, 인 비보 투여에 적합한 바이러스-특이적 유인인자를 만들기 위해서는 성장 인자 상호작용을 녹아웃시켜야 하였다 (Park *et al.*, *PLoS Pathog.* 16, e1008647, 2020). 그러나, 이와 관련하여 ACE2는 상이하며, 이의 내인성 활성인 레닌-안지오텐신 및 키닌 시스템의 혈관 수축 및 염증성 펩티드의 촉매 전환은 COVID-19 증상을 해결하는데 직접적인 이점이 있을 수 있다. 감염 중에, ACE2 활성이 하향 조절되고, 레닌-안지오텐신 시스템이 불균형해져서, 환자가 기계 환기를 필요로 하는 급성-호흡 곤란 증후군 (ARDS)의 양상을 유발할 수 있다 (Imai *et al.*, *Nature*. 436, 112-116, 2005; Treml *et al.*, *Crit. Care Med.* 38, 596-601, 2010; Verdecchia et al., *Eur J Intern Med*. 76, 14-20, 2020). 재조합 가용성 ACE2의 투여는 손실된 생화학적 활성을 구제하며, 여기서 폐 및 심혈관계에 대한 잠재적인 보호 특성은 폐 탄력성 감소, 혈액 산소화 증가, 고혈압 감소, 및 안지오텐신 및 브라디키닌 (bradykinin) 펩티드의 단백질분해 전환으로 인한 폐의 체액 축적 감소를 포함한다 (Imai *et al.*, *Nature*. 436, 112-116, 2005; Treml *et al.*, *Crit. Care Med.* 38, 596-601, 2010; Wang *et al.*, *Pulm Pharmacol Ther*. 58, 101833, 2019; Chung *et al.*, *EBioMedicine*. 58, 102907-102907, 2020; Johnson et al., *PLoS ONE*. 6, e20828, 2011; Liu *et al.*, *Kidney Int.* 94, 114-125, 2018; Garvin *et al.*, *Elife*. 9, e59177, 2020). 가용성, 야생형 $ACE2_2$는 인간에서 허용 가능한 안전성 프로파일을 갖

는 ARDS용 약물로서 개발되었고 (Haschke *et al.*, *Clin Pharmacokinet*. 52, 783-792, 2013; Khan *et al.*, *Crit Care*. 21, 234, 2017), 현재 Apeiron에서 임상 시험 평가 중에 있다. 혈청 안정성 증가를 위한 면역글로불린 Fc와의 융합으로 가장 가능성이 높은, 조작된 고친화성 $sACE2_2$ 유인인자 (Lei *et al.*, *Nat Commun*. 11, 2070, 2020; Liu *et al.*, *Kidney Int*. 94, 114-125, 2018; Iwanaga *et al.*, *bioRxiv*, 2020.06.15.152157, 2020)는 (i) 바이러스 스파이크의 높은 친화도 차단으로 인한 강력한 바이러스 중화 및 (ii) COVID-19 증상의 직접적인 완화를 위한 펩티드 호르몬의 단백질분해 전환이라는 이중 작용 기전을 가진 차세대 치료제를 나타낸다.

[0157] **실시예 5**

[0158] 본 실시예는 마우스에서 $sACE_2$.v2.4의 약동학 (PK)을 평가한다. 결과는 IV 투여 후 $sACE_2$.v2.4의 혈청 반감기가 인간 IgG1의 Fc 모이어티에 대한 융합에 의해 증가되는 것을 나타낸다. 융합 단백질은 7일 이상 지속되는 수명이 긴 IgG1 단편을 생성하도록 단백질 분해되는 반면에, ACE2 모이어티는 몇 시간 내에 빠르게 사라진다. 기관내 (IT) 투여 또는 네뷸라이저를 통해 $sACE2_2$.v2.4-IgG1을 폐에 직접 전달함으로써, 단백질은 최소한의 단백질 분해로 적어도 4시간 동안 폐 조직에서 높은 수준으로 유지된다. 이러한 결과는 고친화성 sACE2 유도체의 직접적인 폐 전달이 IV 주입에 대한 실행 가능한 대안이며, 외래 환자 임상 치료에 가능한 이점을 제공하는 것을 보여준다.

[0159] 야생형 인간 $sACE2_2$를 마우스에 복강내 투여하면, 혈청 반감기가 8.5시간이지만 (Wysocki *et al.*, *Hypertension* 55, 90-98, 2010), 이는 혈액으로의 재흡수 키네틱스에 의해 영향을 받으며, 거대분자의 경우 전형적으로 몇 시간 지연된다 (Shoyaib *et al.*, *Pharmaceut Res*. 37, 12, 2020). 융합 파트너가 없는 $sACE2_2$.v2.4 (0.5 mg/kg)를 수컷 및 암컷 마우스의 꼬리 정맥에 주사한 경우, ACE2 ELISA로 측정 (도 28A) 및 혈청내 ACE2 촉매 활성 (도 28B)으로, 추정되는 혈청 반감기는 10분 미만으로 단백질이 빠르게 제거되었다. 이는 인간에서 야생형 $sACE2_2$의 혈청 반감기 (2 내지 3시간)보다 훨씬 더 짧다 (Haschke *et al.*, *Clin Pharmacokinet* 52, 783-792, 2013). $sACE2_2$.v2.4를 5일 (0, 1, 2, 3 및 4일) 동안 0.5 mg/kg으로 1일 2회 IV 투여한 경우 독성이 관찰되지 않았다. 마우스를 7일째에 안락사시켰고, 혈액 화학, 혈액학 및 조직 병리학은 모의 처리된 마우스와 차이를 나타내지 않았다.

[0160] 혈청 반감기를 증가시키기 위해, $sACE2_2$와 IgG1 Fc의 융합을 테스트하였다. 다른 그룹은 염증유발 FcγR과의 상호작용을 약화시키기 위해 $sACE2_2$의 IgG1 돌연변이체 (Iwanaga *et al.*, *Biorxiv*, in press, doi:10.1101/2020.06.15.152157) 또는 IgG4 Fc (Svilenov *et al.*, *Biorxiv*, in press, doi:10.1101/2020.12.06.413443)에 대한 융합을 탐구하였고, 본 연구는 항-SARS-CoV-2 mAb에서 최적의 보호에 필요한 것으로 나타난 이펙터 기능을 동원하기 위해 비변형 IgG1 (isoallotype nG1m1)을 사용하였다 (Schaefer *et al.*, *J Exp Med*. 218 (2020), doi:10.1084/jem.20201993). $sACE2_2$의 IgG1 융합에 대한 공개된 PK 데이터는 혼합되어 있다. 뮤린 $sACE2_2$-IgG1 융합이 마우스에서 수일 동안 지속된다는 명백한 증거가 있지만 (Liu *et al.*, *Kidney Int*. 94, 114-125, 2018), 인간 $sACE2_2$-IgG1 융합에 대한 결과는 모순된다. 인간 IgG1 모이어티를 검출하기 위해 ELISA를 사용한 2개의 보고서는 $sACE2_2$-IgG1의 혈청 반감기가 수일임을 나타내었으며 (Iwanaga *et al.*, *Biorxiv*, in press, doi:10.1101/2020.06.15.152157; Lei *et al.*, *Nat Commun*. 11, 2070, 2020), 그러나 ACE2 모이어티를 검출하기 위해 ELISA를 사용한 또 다른 연구에서는 몇 시간 내에 빠른 제거를 보고하였다 (Higuchi *et al.*, *Biorxiv*, in press, doi:10.1101/2020.09.16.299891). 하나의 발표된 보고서만이 항-ACE2 포획 항체와 항-IgG1 검출 항체를 사용하여 마우스에서 인간 융합 단백질의 긴 혈청 반감기를 측정하여 융합 단백질의 두 부분을 모두 검출하였다 (Liu *et al.*, *Int J Biol Macromol*. 165, 1626-1633, 2020). 불일치의 이유는 불분명하지만, 융합 단백질이 절단되어 혈청 안정성이 상이한 단편을 생성할 수 있음을 나타낸다.

[0161] 인간 IgG1에 대한 ELISA를 사용하여, 야생형 $sACE2_2$-IgG1 및 $sACE2_2$.v2.4-IgG1 (서열번호: 11)은 모두 수컷 마우스에서 IV 투여 (2.0 mg/kg) 후 동등한 혈청 PK를 나타내었고, 단백질은 7일 이상 동안 지속되었다 (도 29). 그러므로 고친화성 $sACE2_2$.v2.4 변이체 (T27Y, L79T 및 N330Y)에서의 3가지 돌연변이가 다른 변형된 sACE2 유도체에 대한 이전 연구와 일치하여 PK를 실질적으로 변화시키지 않는 것으로 결론지었다 (Higuchi *et al.*, *Biorxiv*, in press, doi:10.1101/2020.09.16.299891). 혈청 성분은 충분하지 않은 물질로 인해 추가로 특성화할 수 없었고, 결과적으로 $sACE2_2$.v2.4-IgG1이 시간에 따라 혈청에서 어떻게 변화하는지 더 철저히 추적하기 위

해 수컷 및 암컷 마우스 모두에서 또 다른 PK 연구를 수행하였다. 다시, 인간 IgG1 단백질은 혈청에서 수일 동안 지속되었지만 (도 30A), ACE2 모이어티는 ACE2 ELISA에 기반하여 24시간 이내에 빠르게 제거되었다 (도 30B). ACE2 촉매 활성의 측정은 훨씬 더 빠른 붕괴를 나타내었다 (도 30C). 인간 IgG1에 대한 면역블롯은 융합 단백질이 마우스 혈액에서 단백질 분해되어 수명이 긴 IgG1 단편을 유리시키는 것을 확인하였다 (도 30D). 전반적으로, $sACE2_2$.v2.4의 IgG1 Fc에의 융합은 혈청 안정성에서 약간의 증가만을 제공하였다. $sACE2_2$.v2.4-IgG1 (2.0 mg/kg)을 IV 투여한 마우스에서는 독성이 관찰되지 않았으며, 7일 후에 혈액 화학, 혈액학 및 조직 병리학 분석을 수행하였다.

[0162] IV 투여 후에 관찰된 혈청 PK를 개선하기 위해, SARS-CoV-2 감염의 주요 부위인 기도에 단백질을 직접 전달하는 연구를 수행하였다. IT 전달 (1.0 mg/kg) 후에, $sACE2_2$.v2.4-IgG1은 ACE2 ELISA, 인간 IgG1 ELISA 및 항-인간 IgG1 면역블롯에 의해 폐에서 적어도 4시간 동안 높은 수준으로 지속되는 것으로 밝혀졌다 (도 31A-31C). 혈액에 흡수된 $sACE2_2$.v2.4-IgG1의 수준은 검출하기에 너무 낮았다. IV 투여에 대해 관찰된 바와 같이, 야생형 $sACE2_2$-IgG1 및 $sACE2_2$.v2.4-IgG1은 IT 전달 후에 폐에서 동등한 PK를 가졌다 (실험 오차 이내). 흡입에 의한 $sACE2_2$.v2.4-IgG1의 투여를 추가로 조사하였다. 본 연구에서, 단백질을 마우스가 있는 방에 30분 동안 분무하였다. 네뷸라이저-보유 챔버의 용량은 IT 투여를 통해 달성된 것보다 낮았지만, 그럼에도 불구하고 ACE2 ELISA, 인간 IgG1 ELISA 및 면역블롯으로 측정 시에, $sACE2_2$.v2.4-IgG1이 4시간 동안 높고 비교적 일정하게 유지되는 것으로 관찰되었다 (도 31D-31F). 기도로의 직접 전달은 4시간 이상 동안 최소한의 분해로 폐 조직에서 높은 수준의 단백질을 달성하였다. 투여 경로를 기반으로 한 다양한 PK 프로파일 (예: 폐에 직접 전달된 단백질은 몇 시간 동안 지속되지만, 혈장에서 검출 가능한 수준에 도달하지 않는 반면에, IV 전달 단백질은 높지만, 수명이 짧은 혈장 농도를 달성함)은 다양한 방식으로 환자를 치료할 수 있는 임상 기회를 제공하며, 이는 질병이 얼마나 진행되었는지 또는 감염이 전신성인지 여부에 따라, 또는 IV 및 IT 또는 흡입 투여 경로를 모두 사용하여 환자를 치료할 수 있는지에 기반한다.

[0163] **실시예 6**

[0164] 본 실시예는 변형된 ACE2 폴리펩티드가 세포로의 바이러스 진입을 차단할 수 있는지 여부를 평가하기 위해 SARS-CoV-2 슈도바이러스를 사용하여 수행된 실험을 설명한다.

[0165] ACE2 수용체를 과발현하는 인간 A549 폐 상피 세포, 인간 A549 폐 상피 세포, 및 인간 폐 내피 세포를 VSV-SARS-CoV-2-루시퍼라제-슈도타입 바이러스 및 야생형 $sACE2_2$-IgG1 또는 조작된 $sACE2_2$.v2.4-IgG1 펩티드와 0, 5 또는 25 μg/ml 농도로 인큐베이션하였다. 각 실험에는 바이러스가 없는 대조군을 포함하였고; 다른 모든 샘플은 MOI 0.01로 바이러스를 함유하였다. 세포를 수확하고, 루시퍼라제 리포터의 발현에 기반하여 바이러스 진입 정도를 정량화하였다 (도 32). 조작된 $sACE2_2$.v.2.4-IgG1은 SARS-CoV-2 슈도바이러스의 인간 폐 상피 세포 및 인간 내피 세포로의 진입에 대해 보호가 우수하였다.

[0166] 제2 연구에서, 상피 세포에서 인간 ACE2 수용체를 발현하는 K18-hACE2 유전자이식 마우스에 야생형 $sACE2_2$-IgG1 또는 $sACE2_2$.v2.4-IgG1을 정맥내 주사하고, VSV-SARS-CoV-2-루시퍼라제-슈도타입 바이러스를 복강내 주사하였다. 폐 및 간을 24시간째에 수확하고, 바이러스 진입 정도를 루시퍼라제 활성에 의해 정량화하였다 (도 33). 조작된 $sACE2_2$.v.2.4-IgG1은 인간 ACE2-발현 마우스에서 SARS-CoV-2 슈도타입 바이러스의 폐 및 간으로의 진입에 대한 탁월한 보호를 달성하였다.

[0167] 종합하면, 이러한 결과는 가용성 ACE2의 v2.4 유도체가 조직 배양 및 동물 모델 모두에서 인간 ACE2를 발현하는 세포로 SARS-CoV-2 슈도바이러스 진입을 보다 효과적으로 차단하는 것을 나타낸다.

[0168] **실시예 7**

[0169] 본 실시예는 $sACE2_2$.v2.4-IgG1이 COVID-19의 마우스 모델에서 SARS-CoV-2-유발 폐 혈관 누출에 대해 보호 및/또는 치료 유익을 나타내는지 여부를 조사하기 위한 연구를 설명한다. 특정 방법이 제공되지만, 당업자는 하나 이상의 단계의 추가 또는 생략을 포함하여, 이러한 특정 방법에서 벗어나는 방법이 또한 사용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0170] 본 연구의 판독값은 폐의 혈관 누출 및 폐의 부종 형성이다. 본 연구에 사용된 동물 그룹은 하기와 같다:

[0171] • **그룹 1** (대조군), 4마리의 마우스 (수컷 2마리 및 암컷 2마리, 2개월령).

[0172] • **그룹 2** (SARS-CoV-2, 7일 동안 5 x 10^4 pfu/마우스), 4마리의 마우스 (수컷 2마리 및 암컷 2마리, 2개월령).

[0173] • **그룹 3** (SARS-CoV-2 감염, 7일 동안 5 x 10^4 pfu/마우스 몇시간 전에, $sACE2_2$.v2.4-IgG1 IV (10 mg/kg) 또는 IT (2 mg/kg) 투여 또는 흡입에 의한 투여), 4마리의 마우스 (수컷 2마리 및 암컷 2마리, 2개월령). 이 그룹은 노출전 예방을 평가하였다.

[0174] • **그룹 4** (SARS-CoV-2 감염, 7일 동안 5 x 10^4 pfu/마우스 후에, $sACE2_2$.v2.4-IgG1 IV (10 mg/kg) 또는 IT (2 mg/kg) 투여 또는 흡입에 의한 투여), 4마리의 마우스 (수컷 2마리 및 암컷 2마리, 2개월령). 이 그룹은 감염 후 치료를 평가하였다.

[0175] 마우스에게 여러 방법 (예: IV, IT, 흡입) 중 하나로 $sACE2_2$.v2.4-IgG1 폴리펩티드를 투여하고, 기도를 통해 SARS-CoV-2로 감염시켜서 인간 폐 감염을 모방하였다.

[0176] $sACE2_2$.v2.4-IgG1은 COVID-19 환자의 호흡부전 및 사망의 주요 원인인, SARS-CoV-2로 인한 폐혈관 누출을 줄이고 부종 형성을 감소시킬 것으로 기대된다.

[0177] **실시예 8**

[0178] 본 실시예는 $sACE2_2$.v2.4-IgG1이 COVID-19의 마우스 모델에서 SARS-CoV-2로 인한 폐 혈관 손상 및 장기간 섬유증에 대한 보호 및/또는 치료 유익을 나타내는지 여부를 조사하기 위한 연구를 설명한다. 특정 방법이 제공되지만, 당업자는 하나 이상의 단계의 추가 또는 생략을 포함하여, 이러한 특정 방법에서 벗어나는 방법이 또한 사용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0179] 본 연구의 판독값은 H&E 염색, Masson trichrome and Sirius red 염색, MPO 분석, 및 신호전달 변화 및 염증병리를 평가하기 위한 단백질 용해물이다. 본 연구에 사용된 동물 그룹은 하기와 같다:

[0180] • **그룹 1** (대조군), 4마리의 마우스 (수컷 2마리 및 암컷 2마리, 2개월령).

[0181] • **그룹 2** (SARS-CoV-2, 7일 동안 5 x 10^4 pfu/마우스), 4마리의 마우스 (수컷 2마리 및 암컷 2마리, 2개월령).

[0182] • **그룹 3** (SARS-CoV-2 감염, 7일 동안 5 x 10^4 pfu/마우스 전에, $sACE2_2$.v2.4-IgG1 IV (10 mg/kg) 또는 IT (2 mg/kg) 투여 또는 흡입에 의한 투여), 4마리의 마우스 (수컷 2마리 및 암컷 2마리, 2개월령). 이 그룹은 노출전 예방을 평가하였다.

[0183] • **그룹 4** (SARS-CoV-2 감염, 7일 동안 5 x 10^4 pfu/마우스 후에, $sACE2_2$.v2.4-IgG1 IV (10 mg/kg) 또는 IT (2 mg/kg) 투여 또는 흡입에 의한 투여), 4마리의 마우스 (수컷 2마리 및 암컷 2마리, 2개월령). 이 그룹은 감염 후 치료를 평가하였다.

[0184] $sACE2_2$.v2.4-IgG1은 COVID-19의 마우스 모델에서 염증성 손상 및 섬유증을 감소시킬 것으로 기대된다.

[0185] **실시예 9**

[0186] 본 실시예는 $sACE2_2$.v2.4 (IgG1 Fc에 융합되거나 또는 융합되지 않음)가 전염성이 높은 SARS-CoV-2 변이체의 스파이크 단백질을 차단하는지 여부를 조사하기 위한 연구를 설명한다. SARS-CoV-2의 돌연변이가 출현하여 전염성이 증가하고 독성이 증가할 수 있는 것을 보여준다. 2021년 3월 현재 우려되는 바이러스 변이체는 남아프리카 유래의 B.1.351 (Tegally et al., *medRxiv*, in press, doi:10.1101/2020.12.21.20248640), 브라질 유래의 P.1, 및 영국 유래의 B.1.1.7이 있다 (Leung et al., *Eurosurveillance* 26, 2021, doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106; Volz et al., *medRxiv*, in press, doi:10.1101/2020.12.30.20249034). 3가지 바이러스 변이체는 모두 S에서 N501Y 돌연변이를 공유하며, 이는 야생형 ACE2에 대한 1가 친화도를 20배 만큼 증가시킨다 (실시예 4 - 표 6). 고친화성 v2.4 ACE2 유도체는 또한 증가된 친화도로 결합한다 (실시예 4 - 표 6).

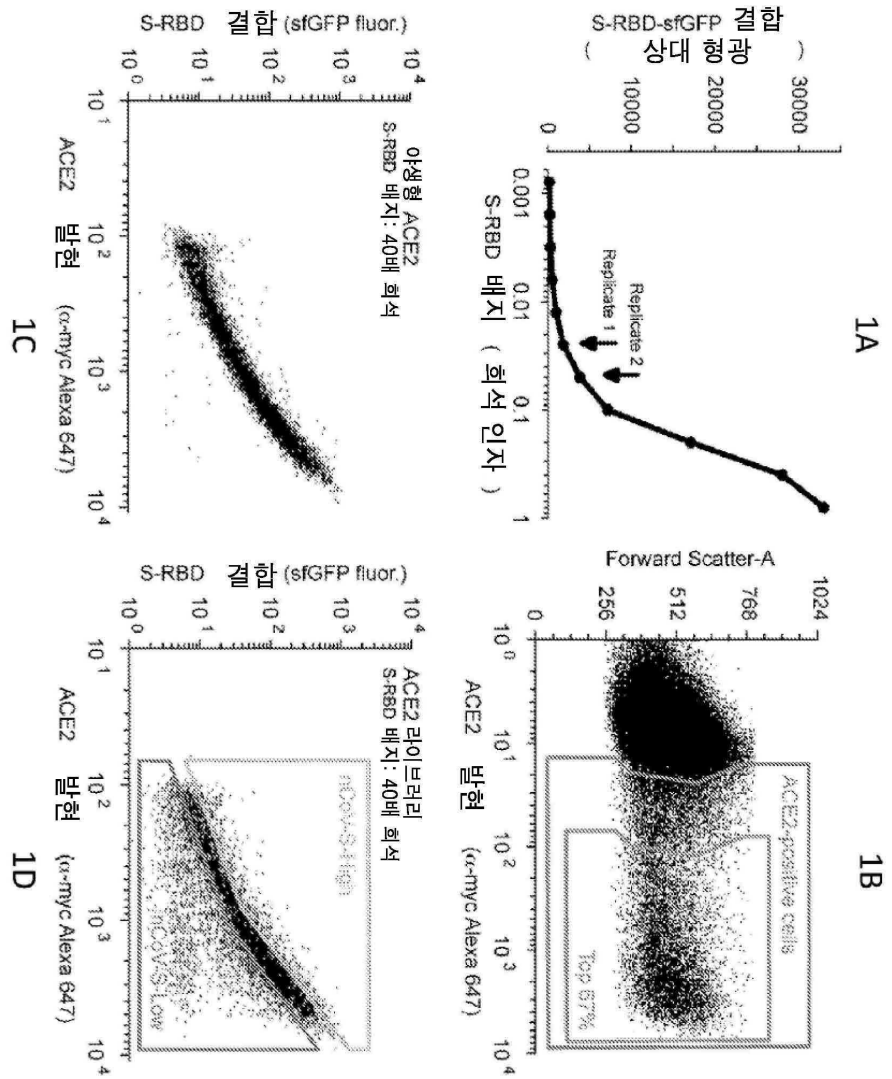
본 연구는 이량체 $sACE2_2$-IgG1 (야생형 및 v2.4)과, P.1, B.1.1.7 및 B.1.351 계통의 전장 S 변이체의 명백한 1가 친화도 및 결합성 결합을 테스트한다.

[0187] S 단백질은 형광 항-myc 항체 및 유세포 분석으로 표면 발현을 측정하기 위해 N-말단 c-myc 태그가 있는 인간 Expi293F 세포에서 발현된다. 세포를 sACE2-8his 및 sACE2.v2.4-8his (단량체: ACE2 잔기 19-615)의 희석 시리즈와 인큐베이션하고, 세척하고, 결합된 단백질을 항-his 형광 항체 염색을 사용하여 유세포 분석으로 측정한다. 세포는 또한 $sACE2_2$-IgG1 및 $sACE2_2$.v2.4-IgG1 (이량체: ACE2 잔기 19-732)의 희석 시리즈와 인큐베이션하고, 세척하고, 결합된 단백질은 항-인간 IgG1 형광 항체를 사용하여 유세포 분석으로 측정한다. 이전에 서술된 심층 돌연변이유발 (실시예 4)에 기반하여, 결과는 전염성이 높은 바이러스 변이체가 sACE2의 조작된 v2.4 유도체에 의한 치밀한 결합에 취약하게 남아 있는 것을 확인할 것으로 기대된다.

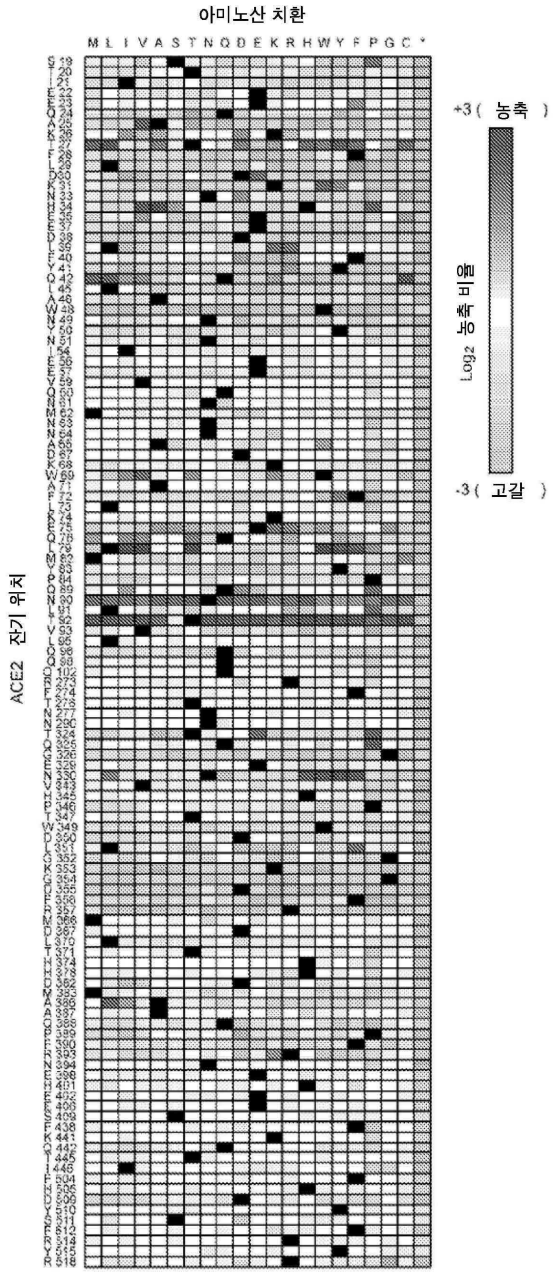
[0188] 개시된 주제의 원리가 적용될 수 있는 많은 가능한 구체예의 관점에서, 예시되는 구체예는 본 개시내용의 바람직한 예일 뿐이며, 본 개시내용의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 오히려, 본 개시내용의 범위는 하기 청구범위에 의해 정의된다. 그러므로, 본 발명자들은 이러한 청구항들의 범위 및 정신 내에 있는 모든 것을 청구한다.

도면

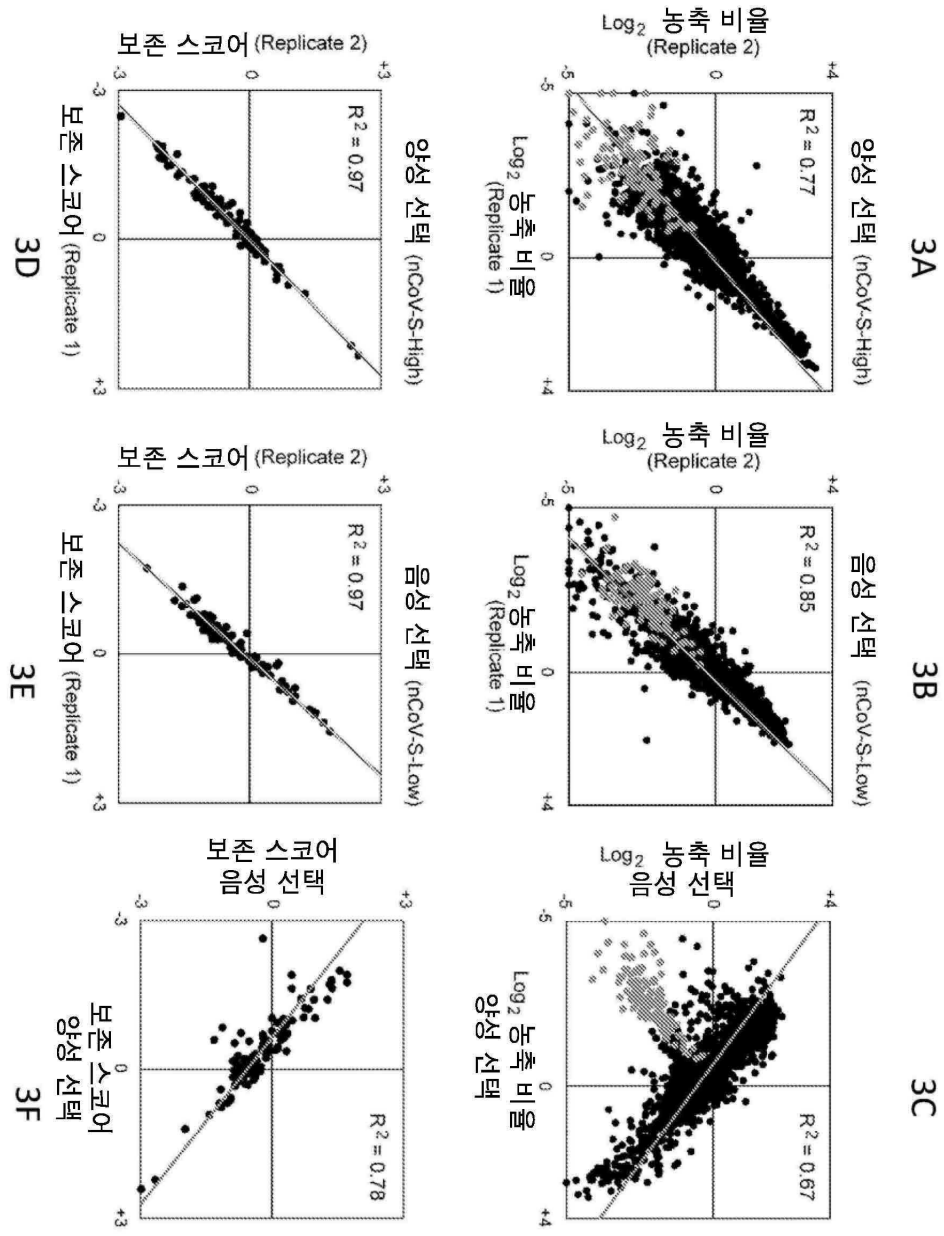
도면1



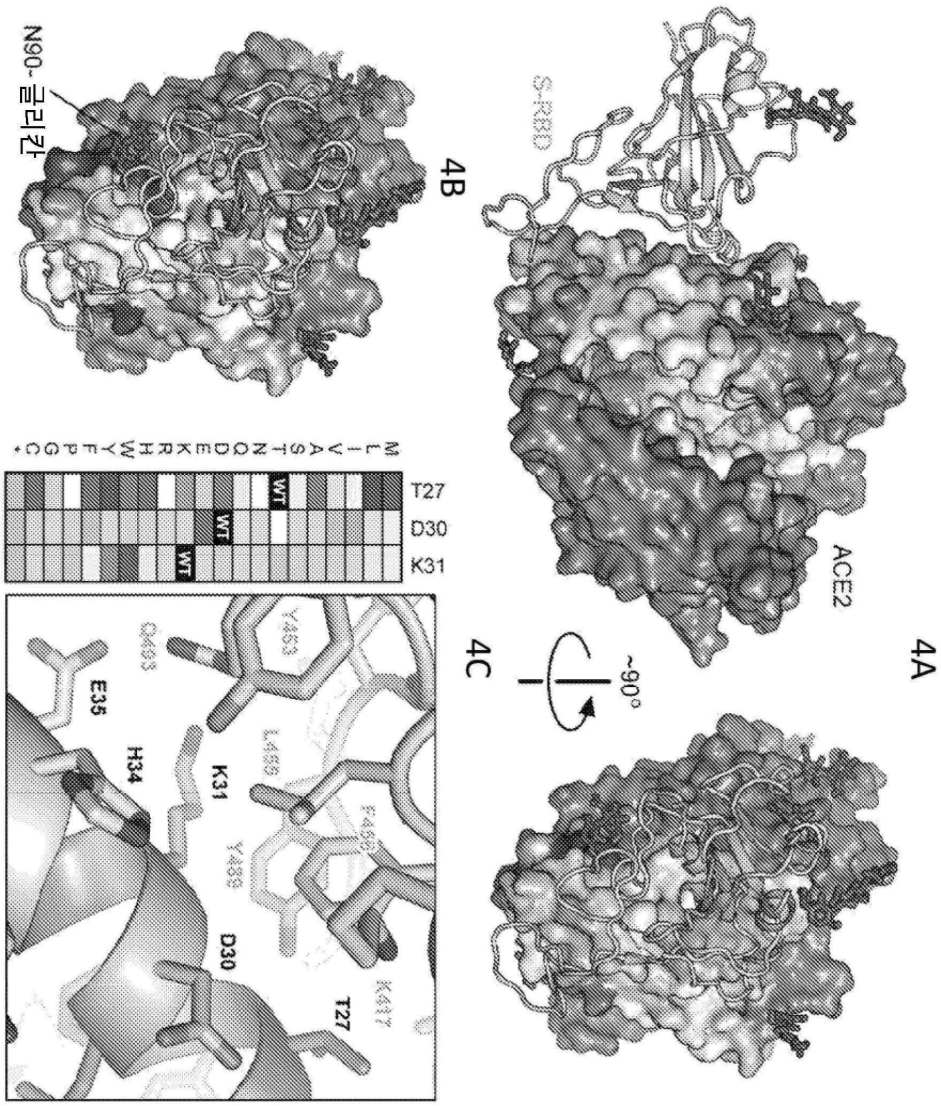
도면2



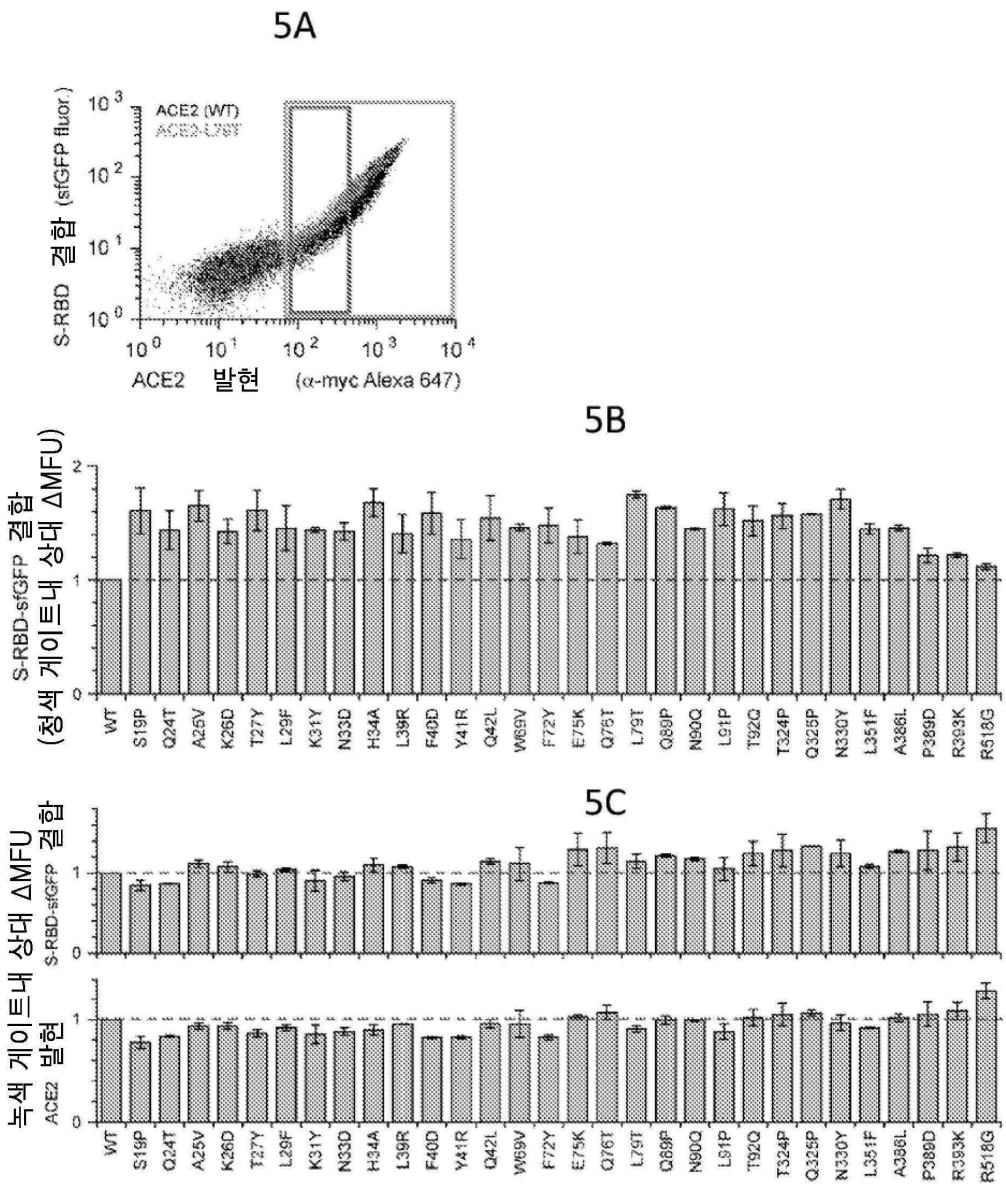
도면3


3A
Log2 농축 비율 (Replicate 2)
Log2 농축 비율 (Replicate 1)
양성 선택 (nCoV-S-High)
R2 = 0.77
3B
Log2 농축 비율 (Replicate 2)
Log2 농축 비율 (Replicate 1)
음성 선택 (nCoV-S-Low)
R2 = 0.85
3C
Log2 농축 비율 음성 선택
Log2 농축 비율 양성 선택
R2 = 0.67
3D
보존 스코어 (Replicate 2)
보존 스코어 (Replicate 1)
양성 선택 (nCoV-S-High)
R2 = 0.97
3E
보존 스코어 (Replicate 2)
보존 스코어 (Replicate 1)
음성 선택 (nCoV-S-Low)
R2 = 0.97
3F
보존 스코어 음성 선택
보존 스코어 양성 선택
R2 = 0.78

도면4

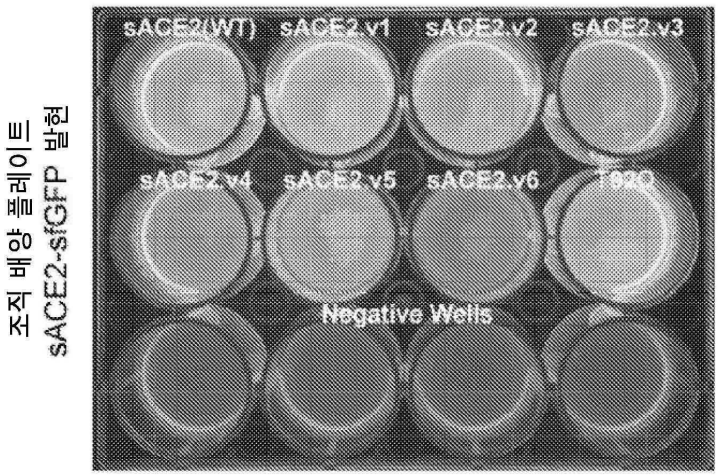

4A
S-RBD
ACE2
~90°
4C
4B
N90-글리칸
T27
D30
K31
WT
WT
WT
Y453
Q493
E35
H34
K31
L455
F456
Y489
D30
K417
T27

도면5

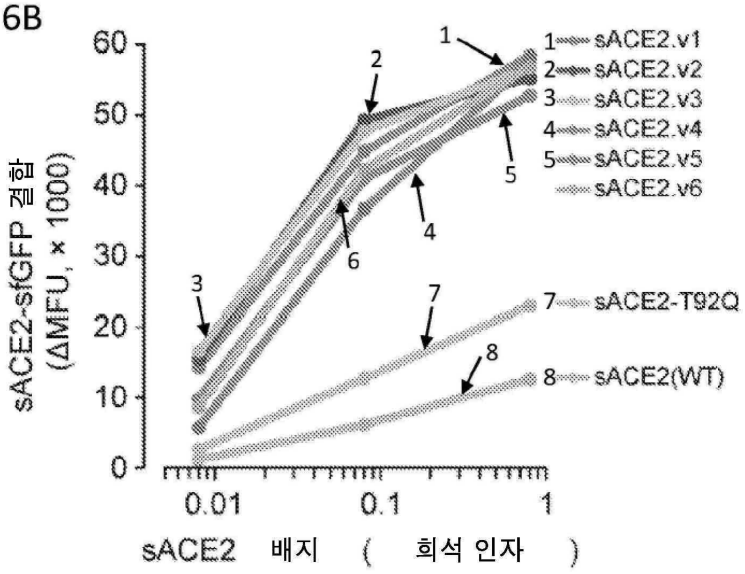

5A
ACE2 (WT)
S-RBD 결합 (sfGFP fluor.)
ACE2 발현 (α-myc Alexa 647)
5B
S-RBD-sfGFP 결합
(청색 게이트내 상대 ΔMFU)
5C
녹색 게이트내 상대 ΔMFU
S-RBD-sfGFP 결합
ACE2 발현
WT
S19P
Q24T
A25V
K26D
T27Y
L29F
K31Y
N33D
H34A
L39R
F40D
Y41R
Q42L
W69V
F72Y
E75K
Q76T
L79T
Q89P
N90Q
L91P
T92Q
T324P
Q325P
N330Y
L351F
A386L
P389D
R393K
R518G

도면6

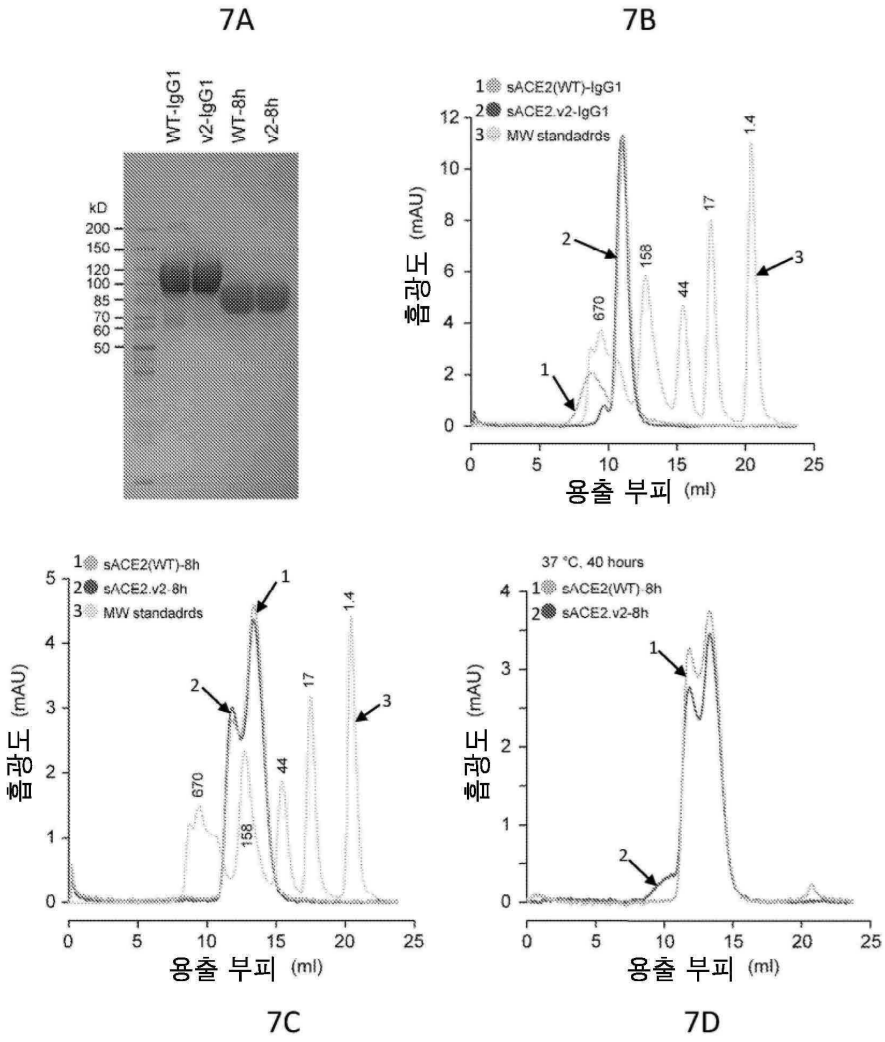
6A


조직 배양 플레이트
sACE2-sfGFP 발현
sACE2(WT)
sACE2.v1
sACE2.v2
sACE2.v3
sACE2.v4
sACE2.v5
sACE2.v6
T92Q
Negative Wells

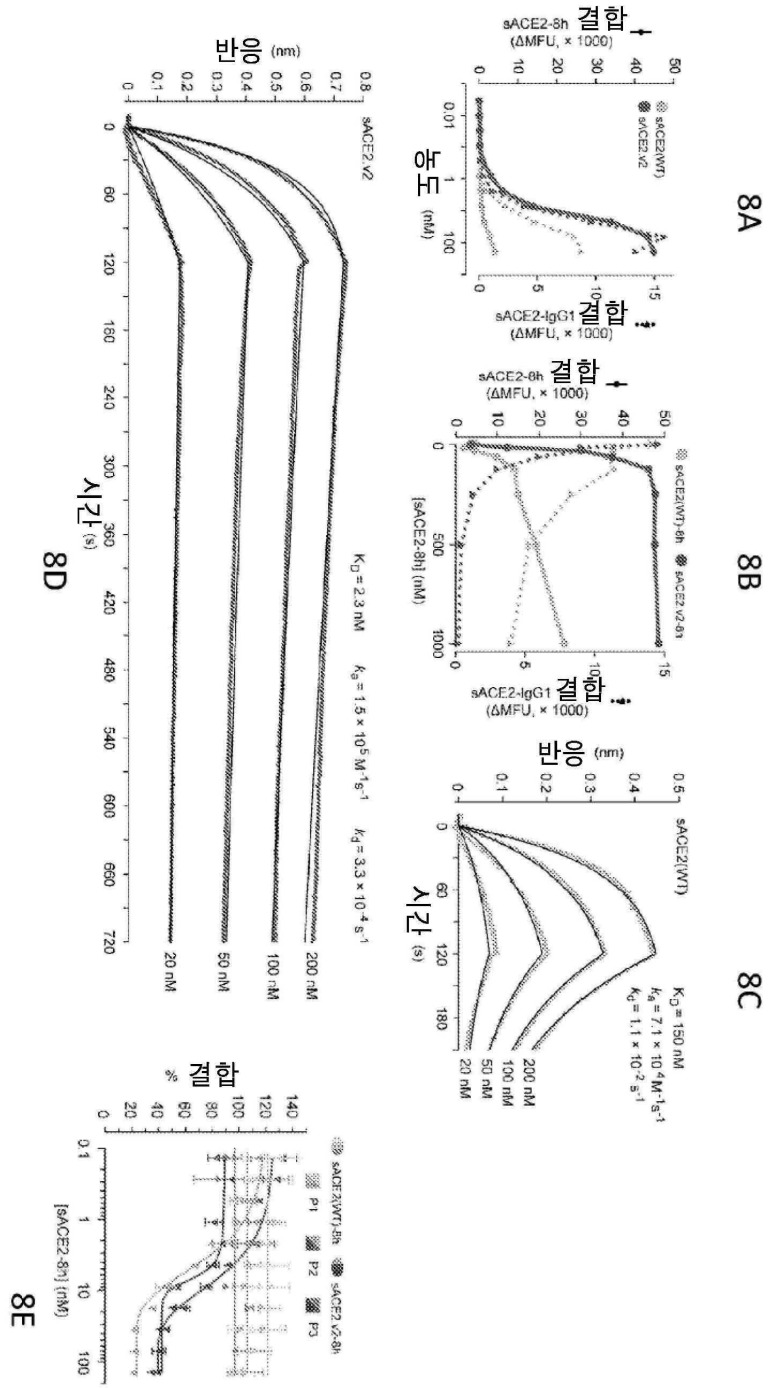
6B


sACE2-sfGFP 결합
(ΔMFU, × 1000)
60
50
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
sACE2 배지 (희석 인자)
1 sACE2.v1
2 sACE2.v2
3 sACE2.v3
4 sACE2.v4
5 sACE2.v5
sACE2.v6
7 sACE2-T92Q
8 sACE2(WT)

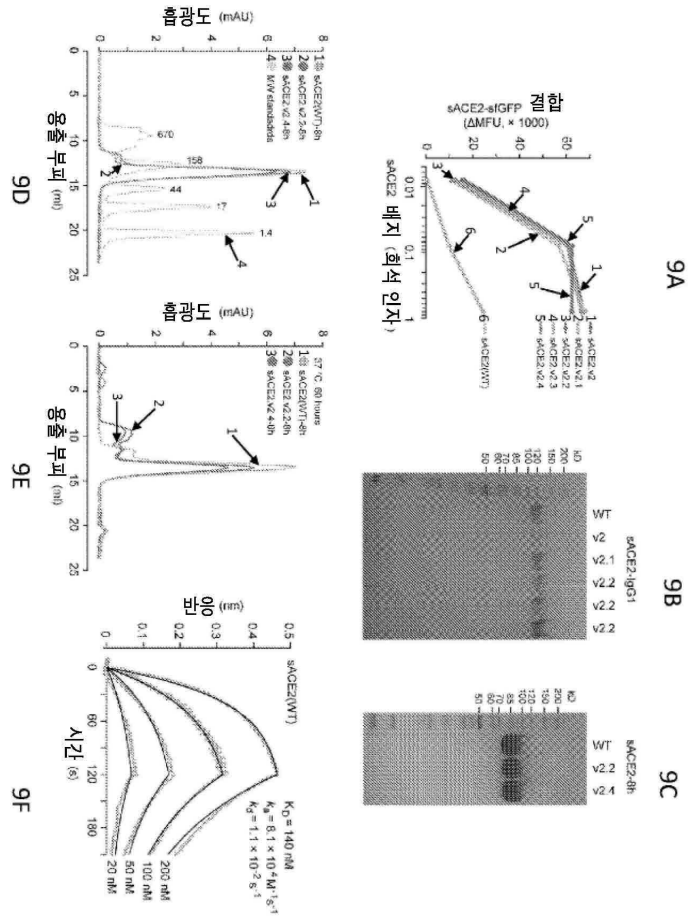
도면7


7A
WT-IgG1
v2-IgG1
WT-8h
v2-8h
kD
200
150
120
100
85
70
60
50
7B
1 sACE2(WT)-IgG1
2 sACE2.v2-IgG1
3 MW standadrds
흡광도 (mAU)
용출 부피 (ml)
670
158
44
17
1.4
7C
1 sACE2(WT)-8h
2 sACE2.v2-8h
3 MW standadrds
흡광도 (mAU)
용출 부피 (ml)
7D
37 °C, 40 hours
1 sACE2(WT)-8h
2 sACE2.v2-8h
흡광도 (mAU)
용출 부피 (ml)

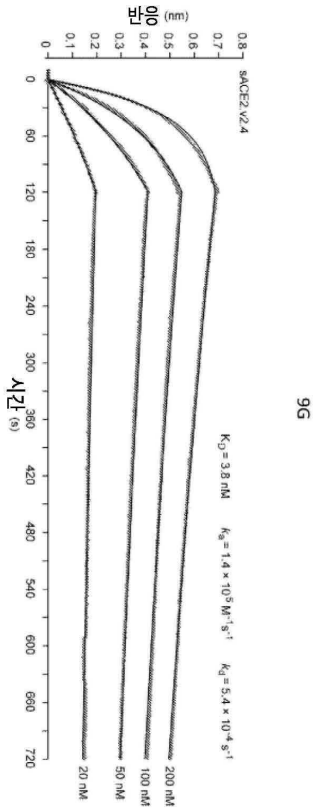
도면8


8A
8B
8C
8D
8E
sACE2-8h 결합
(ΔMFU, × 1000)
sACE2-IgG1 결합
(ΔMFU, × 1000)
농도
(nM)
sACE2(WT)
sACE2.v2
반응 (nm)
시간 (s)
KD = 2.3 nM
ka = 1.5 × 10^5 M^-1 s^-1
kd = 3.3 × 10^-4 s^-1
200 nM
100 nM
50 nM
20 nM
KD = 150 nM
ka = 7.1 × 10^4 M^-1 s^-1
kd = 1.1 × 10^-2 s^-1
결합 %
P1
P2
P3
[sACE2-8h] (nM)

도면9a

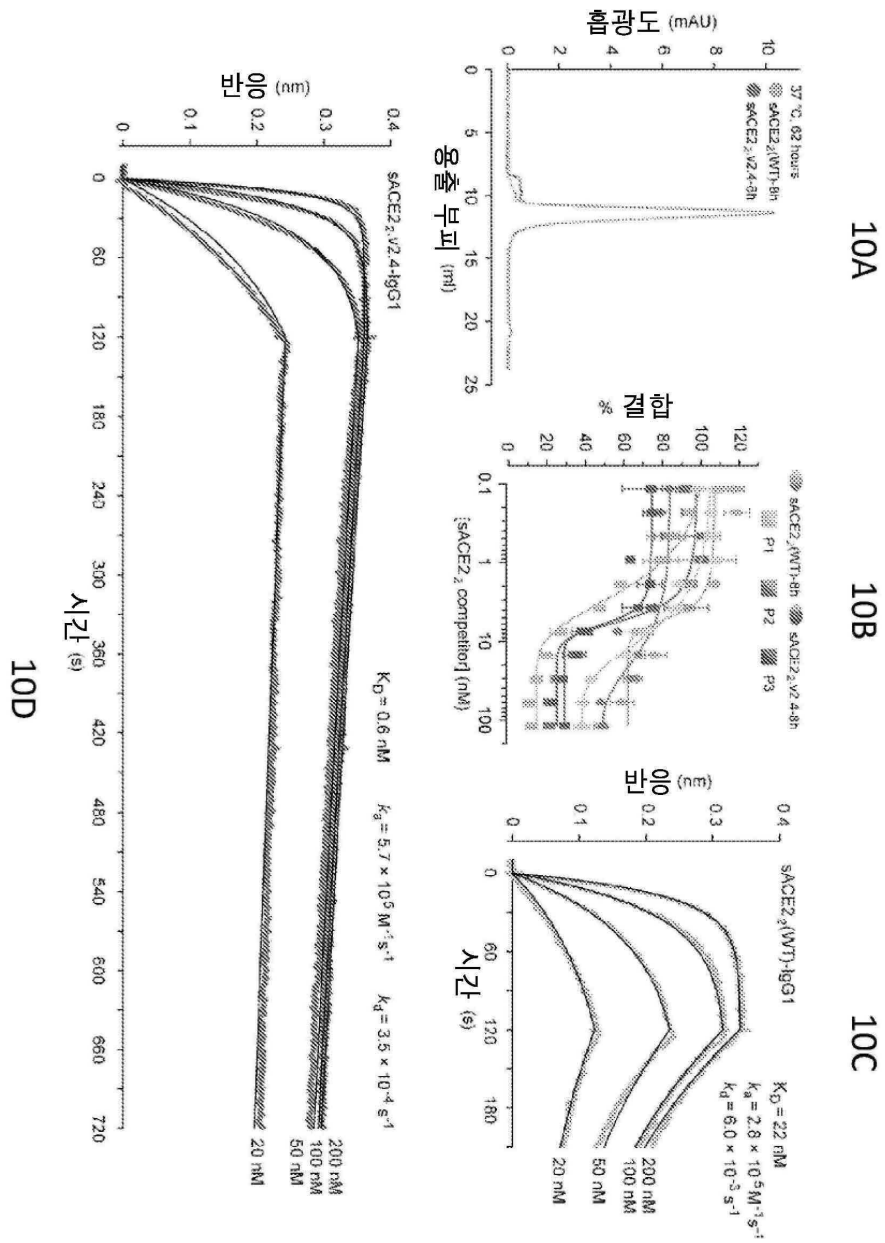

9A
sACE2-sfGFP 결합
(ΔMFU, × 1000)
sACE2 베지 (회석 인자)
9B
sACE2-IgG1
WT
v2
v2.1
v2.2
v2.2
v2.2
9C
sACE2-8h
WT
v2.2
v2.4
9D
흡광도 (mAU)
용출 부피 (ml)
670
158
44
17
1.4
9E
흡광도 (mAU)
용출 부피 (ml)
9F
반응 (nm)
시간 (s)
sACE2(WT)
KD = 140 nM
200 nM
100 nM
50 nM
20 nM

도면9b

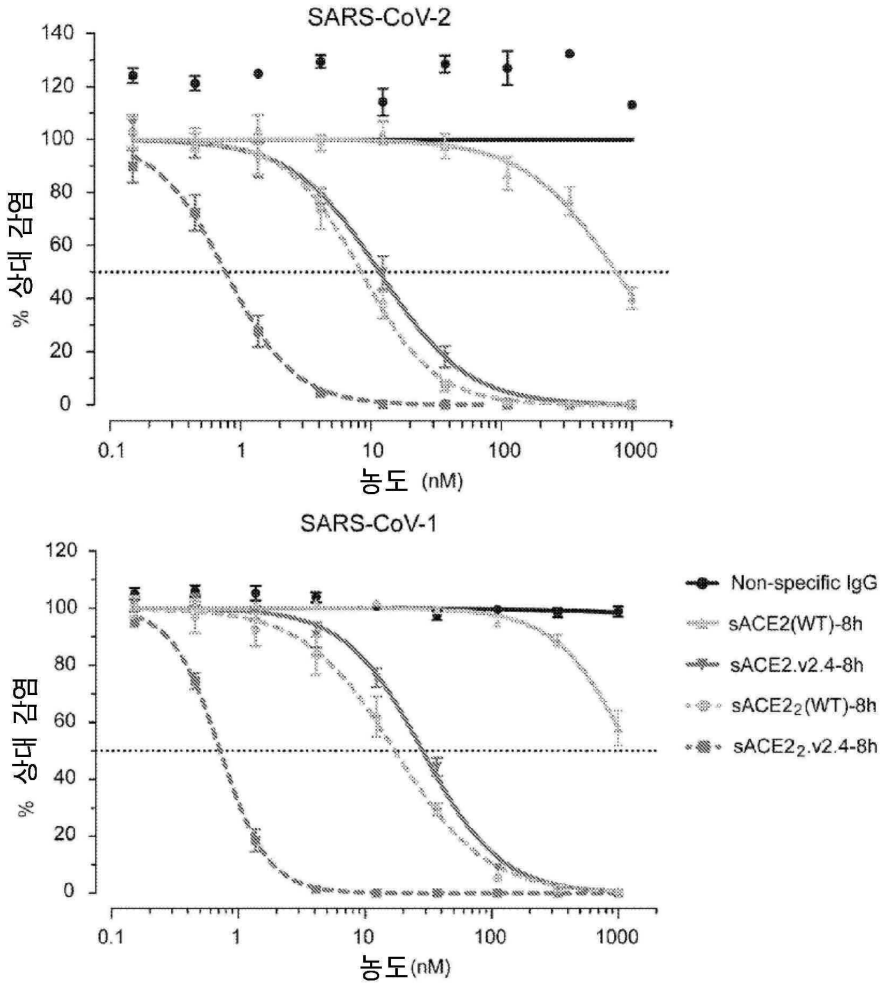

반응 (nm)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
sACE2.v2.4
0
60
120
180
240
300
360
420
480
540
600
660
720
시간 (s)
K_D = 3.8 nM
k_a = 1.4 × 10^5 M^{-1}s^{-1}
k_d = 5.4 × 10^{-4} s^{-1}
200 nM
100 nM
50 nM
20 nM

9G

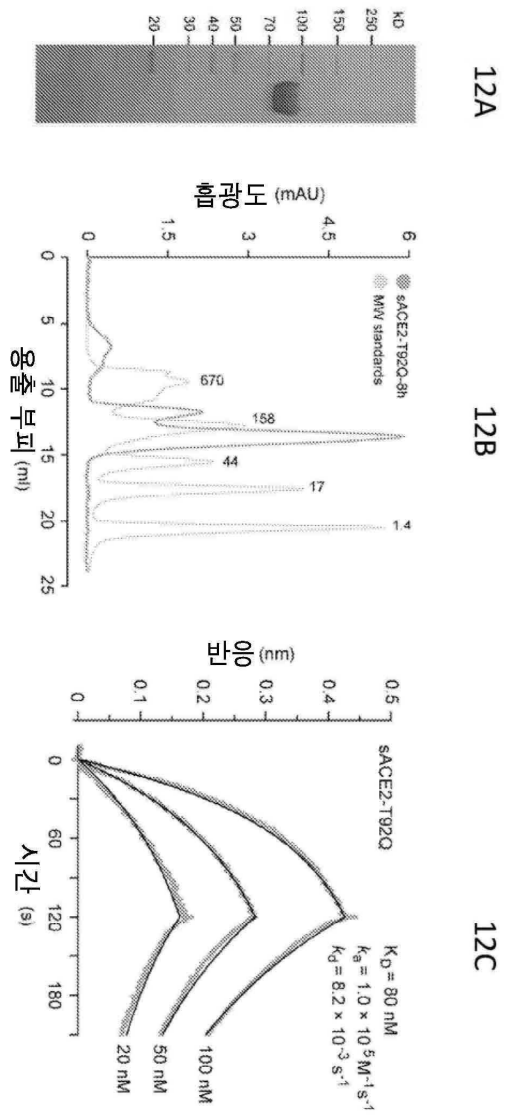
도면10


10A
흡광도 (mAU)
용출 부피 (ml)
37 °C, 62 hours
sACE2₂(WT)-8h
sACE2₂.v2.4-8h
10B
결합 %
sACE2₂(WT)-8h
sACE2₂.v2.4-8h
P1
P2
P3
[sACE2₂ competitor] (nM)
10C
반응 (nm)
시간 (s)
sACE2₂(WT)-IgG1
KD = 22 nM
ka = 2.8 × 10⁵ M⁻¹s⁻¹
kd = 6.0 × 10⁻³ s⁻¹
200 nM
100 nM
50 nM
20 nM
10D
반응 (nm)
시간 (s)
sACE2₂.v2.4-IgG1
KD = 0.6 nM
ka = 5.7 × 10⁵ M⁻¹s⁻¹
kd = 3.5 × 10⁻⁴ s⁻¹
200 nM
100 nM
50 nM
20 nM

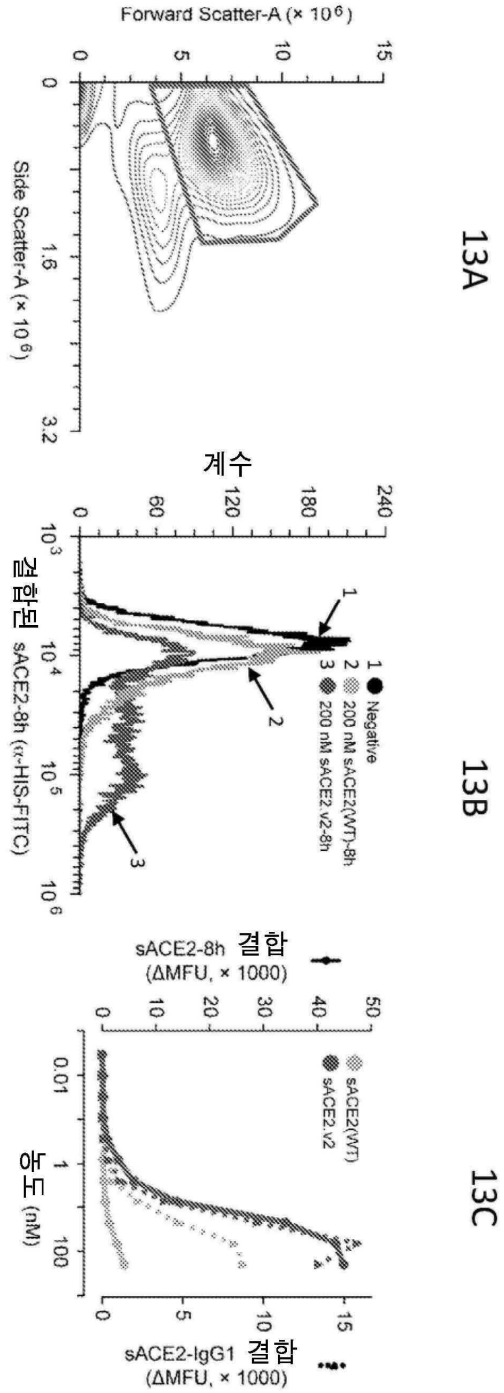
도면11


SARS-CoV-2
% 상대 감염
농도 (nM)
SARS-CoV-1
% 상대 감염
농도(nM)
Non-specific IgG
sACE2(WT)-8h
sACE2.v2.4-8h
sACE2$_2$(WT)-8h
sACE2$_2$.v2.4-8h

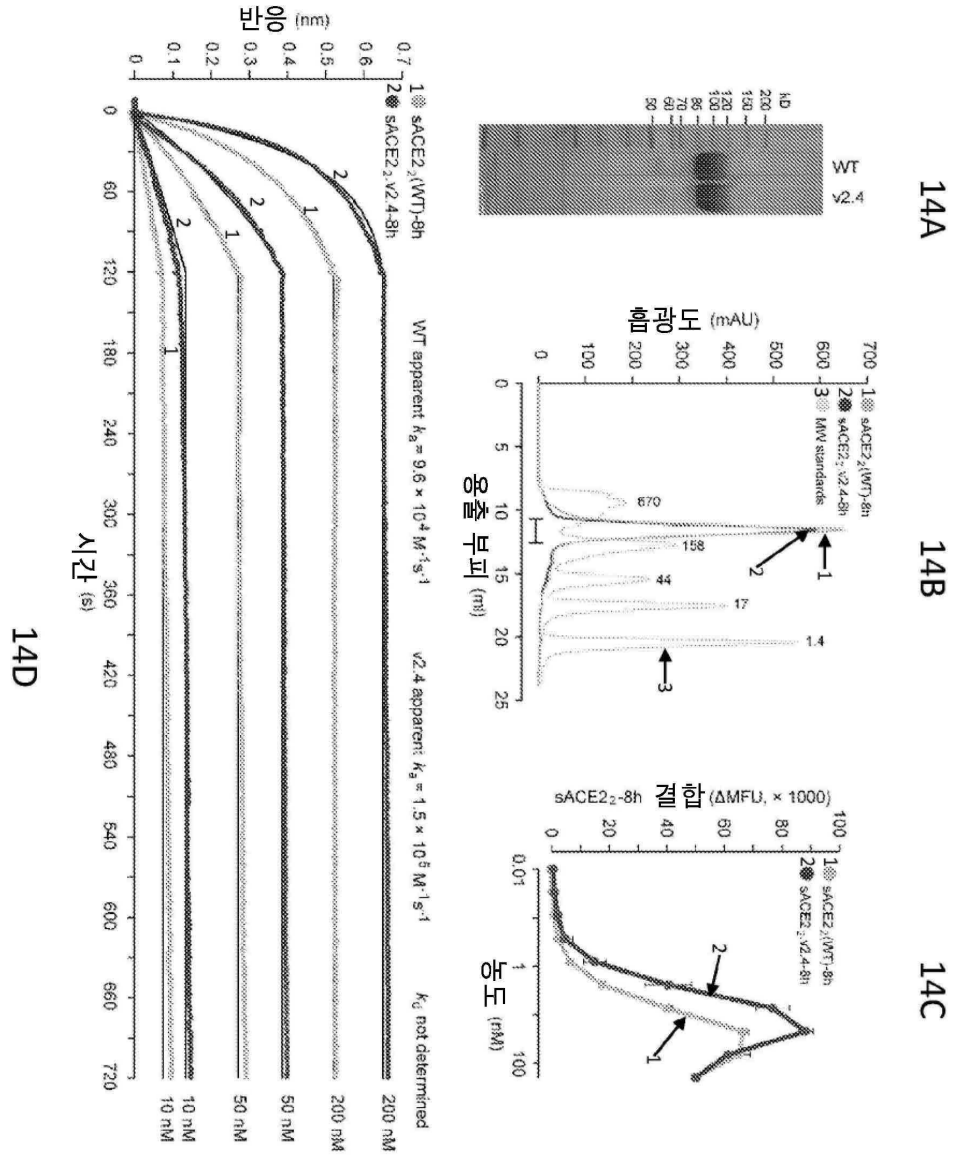
도면12


12A
kD
250
150
100
70
50
40
30
20
12B
흡광도 (mAU)
sACE2-T92Q-8h
MW standards
670
158
44
17
1.4
용출 부피 (ml)
12C
반응 (nm)
sACE2-T92Q
K_D = 80 nM
k_a = 1.0 × 10^5 M^{-1}s^{-1}
k_d = 8.2 × 10^{-3} s^{-1}
100 nM
50 nM
20 nM
시간 (s)

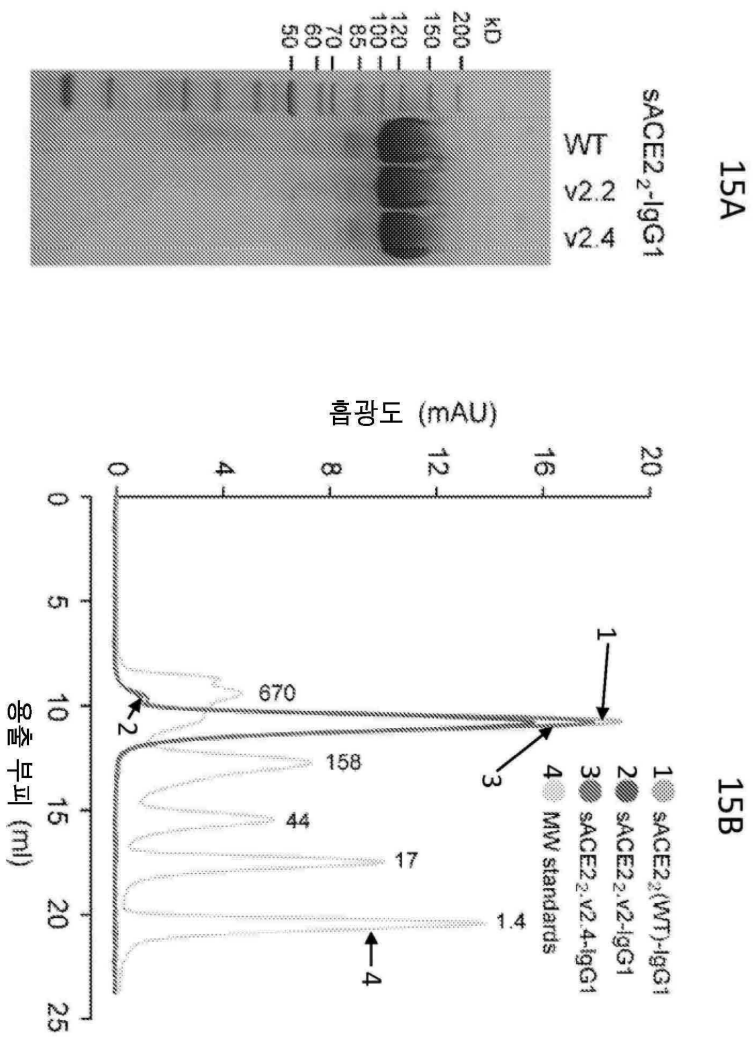
도면13


Forward Scatter-A (× 10⁶)
Side Scatter-A (× 10⁶)
13A
계수
결합된 sACE2-8h (α-HIS-FITC)
1 Negative
2 200 nM sACE2(WT)-8h
3 200 nM sACE2.v2-8h
13B
sACE2-8h 결합 (ΔMFU, × 1000)
sACE2(WT)
sACE2.v2
농도 (nM)
sACE2-IgG1 결합 (ΔMFU, × 1000)
13C

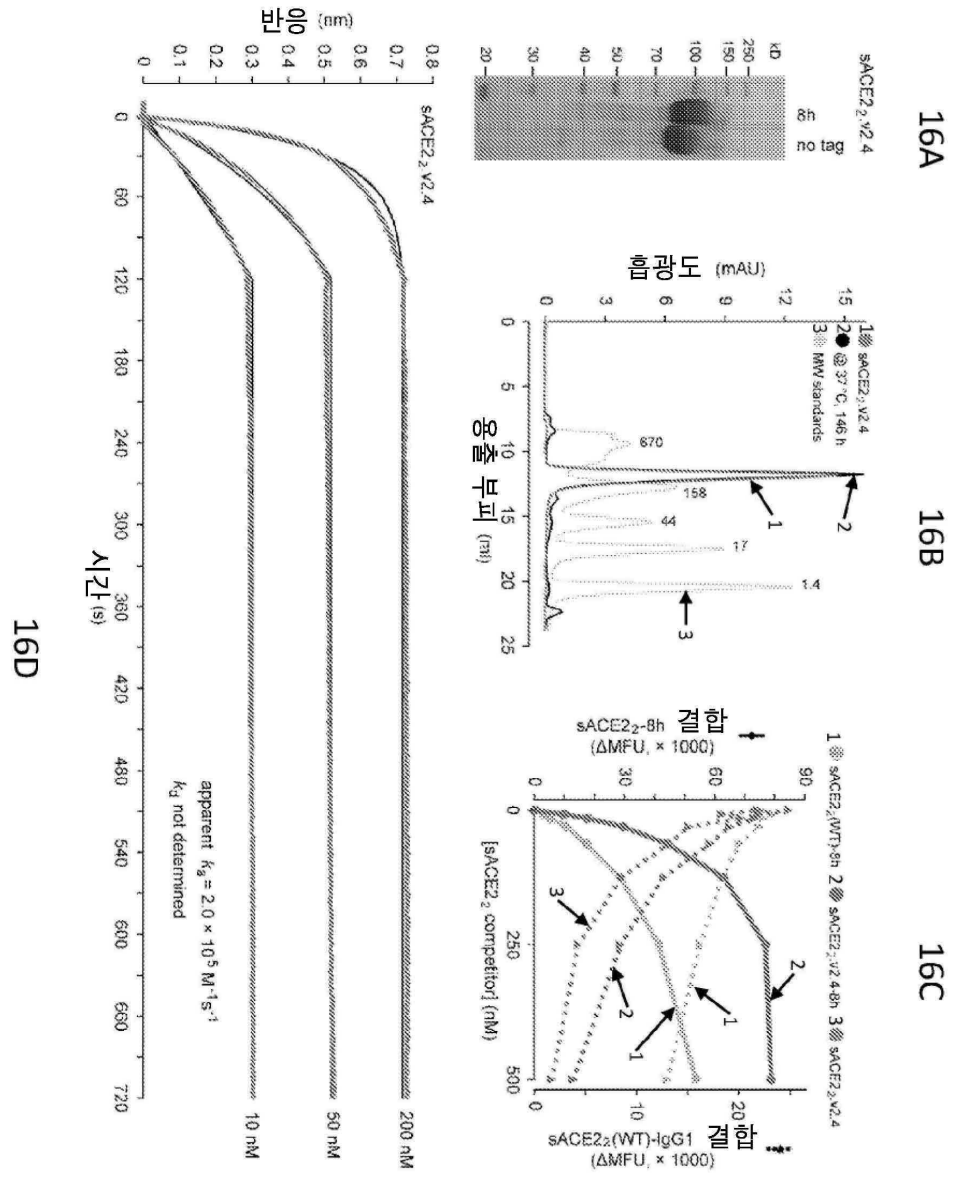
도면14


14A
kD
230
150
120
100
80
70
60
50
WT
v2.4
14B
흡광도 (mAU)
용출 부피 (ml)
1 sACE2₂(WT)-8h
2 sACE2₂-v2.4-8h
3 MW standards
670
158
44
17
1.4
14C
sACE2₂-8h 결합 (ΔMFU, × 1000)
농도 (nM)
1 sACE2₂(WT)-8h
2 sACE2₂-v2.4-8h
14D
반응 (nm)
시간 (s)
1 sACE2₂(WT)-8h
2 sACE2₂-v2.4-8h
WT apparent k_a = 9.6 × 10⁴ M⁻¹s⁻¹
v2.4 apparent k_a = 1.5 × 10⁵ M⁻¹s⁻¹
k_d not determined
200 nM
200 nM
50 nM
50 nM
10 nM
10 nM

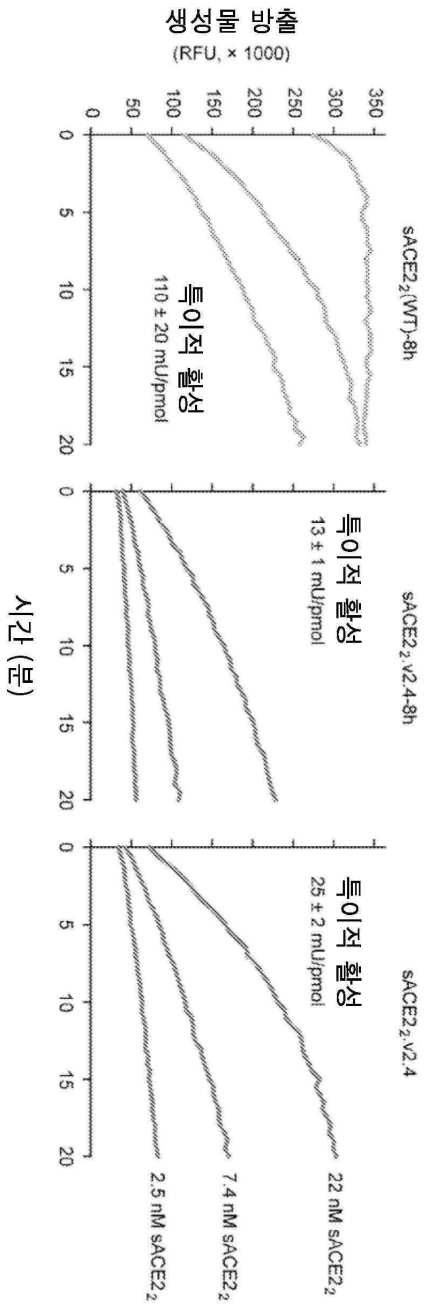
도면15


15A
sACE2₂-IgG1
WT
v2.2
v2.4
kD
200
150
120
100
85
70
60
50
15B
흡광도 (mAU)
용출 부피 (ml)
670
158
44
17
1.4
1 sACE2₂(WT)-IgG1
2 sACE2₂.v2-IgG1
3 sACE2₂.v2.4-IgG1
4 MW standards

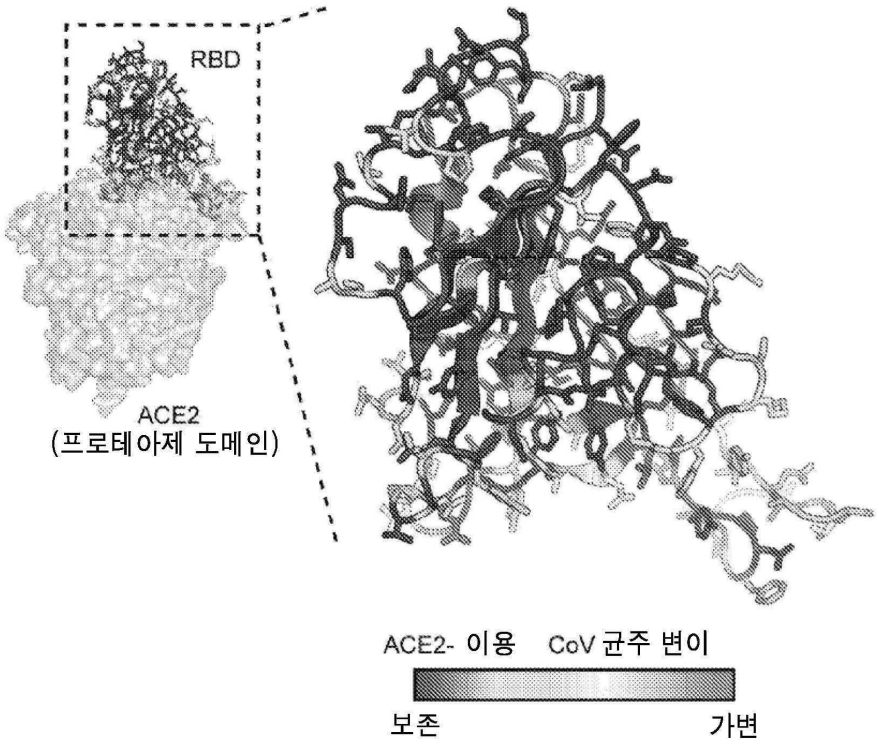
도면16


16A
16B
16C
16D
kD
sACE2₂.v2.4
8h
no tag
흡광도 (mAU)
용출 부피 (ml)
1 sACE2₂.v2.4
2 @ 37°C, 146 h
3 MW standards
670
158
44
17
1.4
sACE2₂-8h 결합
(ΔMFU, × 1000)
sACE2₂(WT)-IgG1 결합
(ΔMFU, × 1000)
[sACE2₂ competitor] (nM)
1 sACE2₂(WT)-8h
2 sACE2₂.v2.4-8h
3 sACE2₂.v2.4
반응 (nm)
시간 (s)
sACE2₂.v2.4
200 nM
50 nM
10 nM
apparent k_a = 2.0 × 10⁵ M⁻¹s⁻¹
k_d not determined

도면17


생성물 방출
(RFU, × 1000)
0
50
100
150
200
250
300
350
0
5
10
15
20
시간 (분)
sACE2₂(WT)-8h
특이적 활성
110 ± 20 mU/pmol
sACE2₂.v2.4-8h
특이적 활성
13 ± 1 mU/pmol
sACE2₂.v2.4
특이적 활성
25 ± 2 mU/pmol
22 nM sACE2₂
7.4 nM sACE2₂
2.5 nM sACE2₂

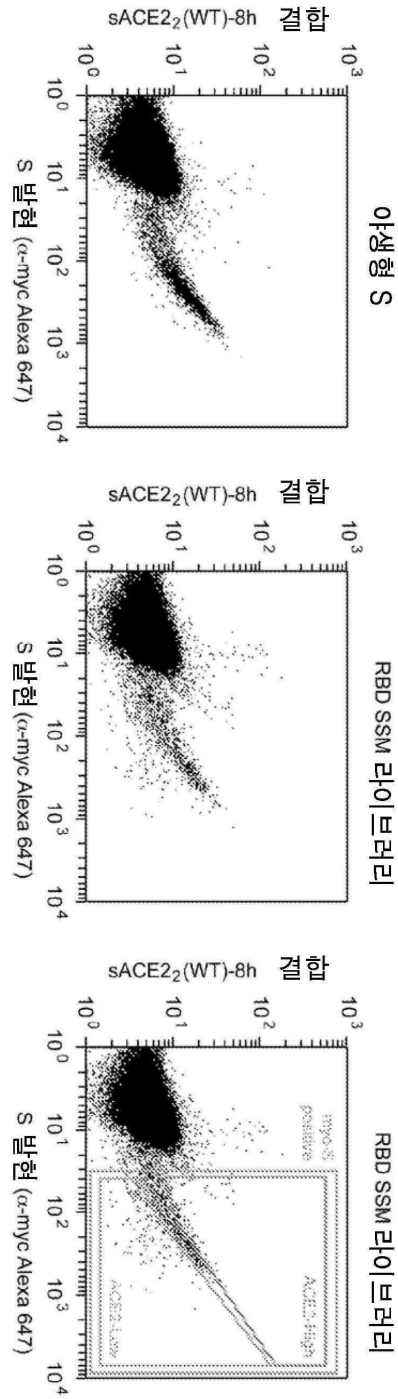
도면18



도면19

340 350 360 370 380 390 400 410 420 430
SARS-2
SARS-1
Rs4084
RsSHC014
Rs4231
LYRa11
Rs7327
440 450 460 470 480 490 500 510 520
SARS-2
SARS-1
Rs4084
RsSHC014
Rs4231
LYRa11
Rs7327

도면20



야생형 S

20A

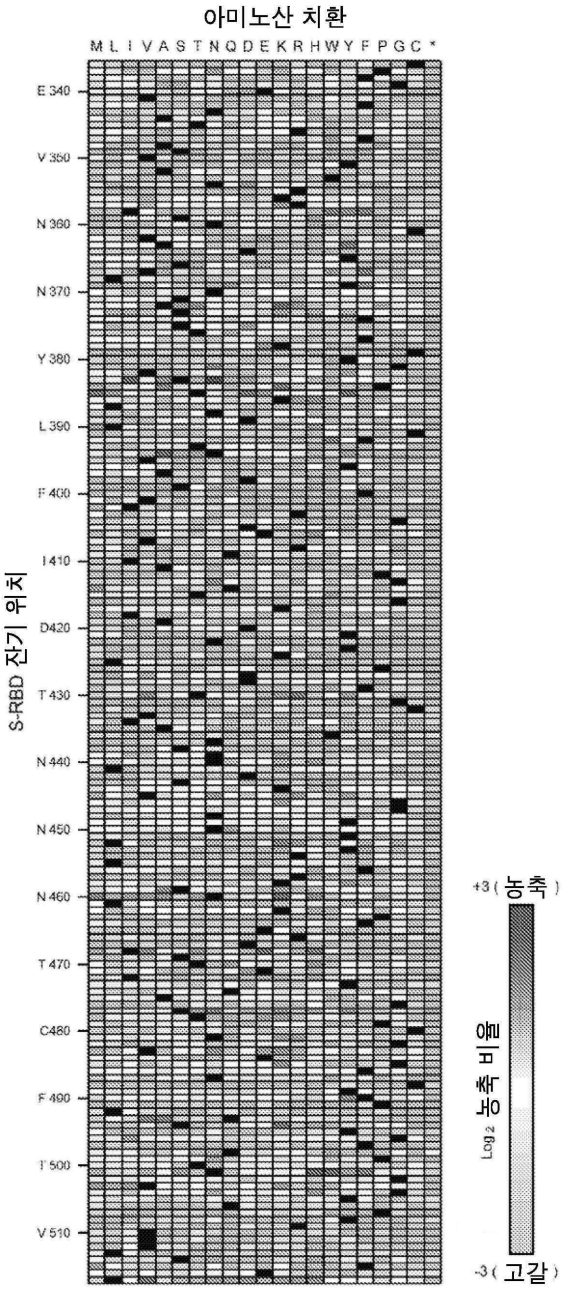
RBD SSM 라이브러리

20B

RBD SSM 라이브러리

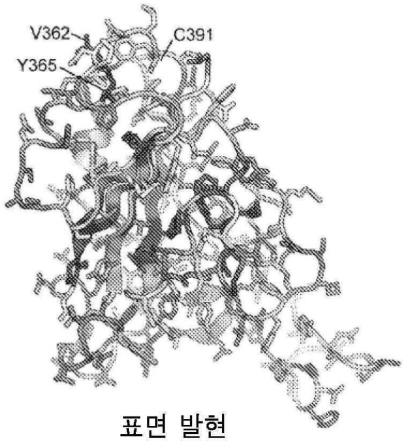
20C

도면21

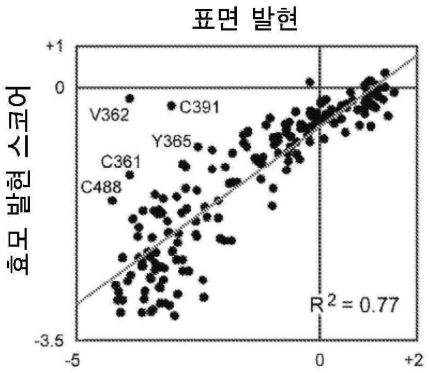

아미노산 치환
M L I V A S T N Q D E K R H W Y F P G C *
S-RBD 잔기 위치
E 340
V 350
N 360
N 370
Y 380
L 390
F 400
I 410
D420
T 430
N 440
N 450
N 460
T 470
C480
F 490
T 500
V 510
+3 (농축)
농축 비율
Log 2
-3 (고갈)

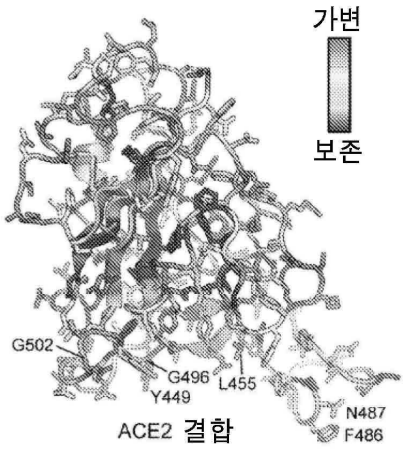
도면22

22A

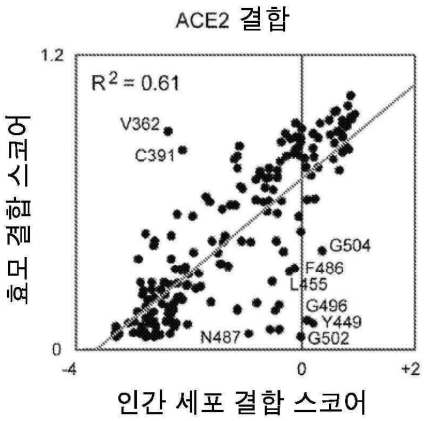


22B



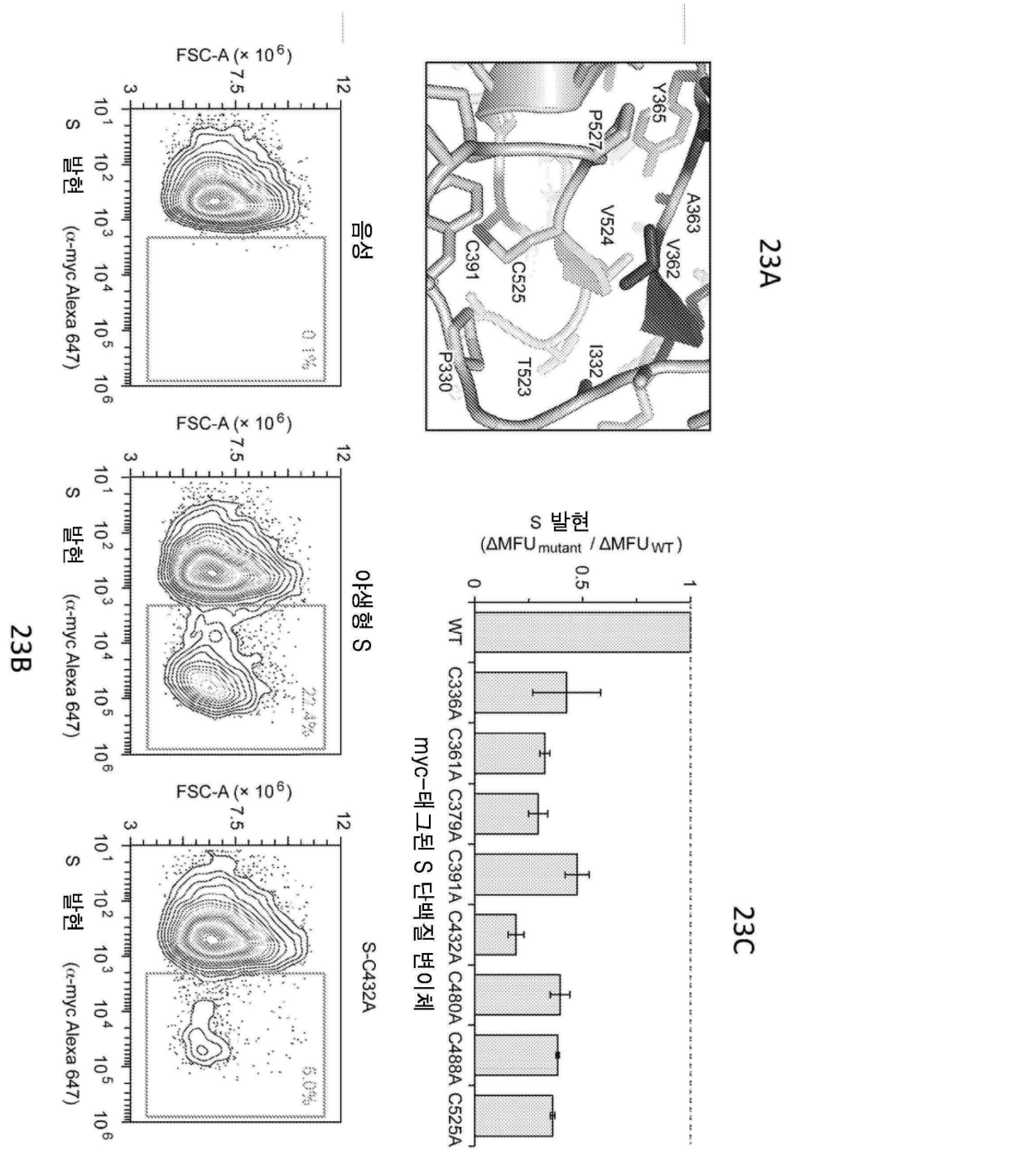


22C

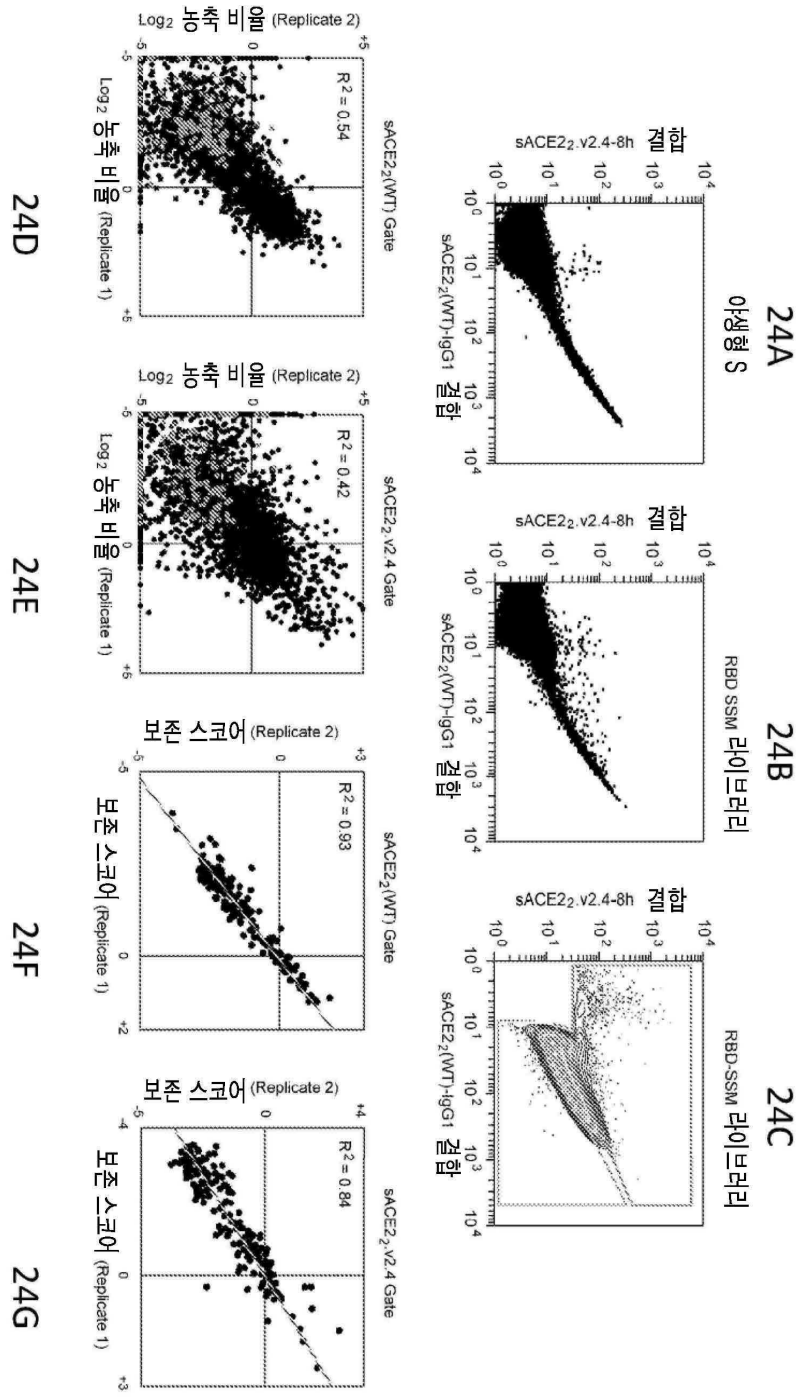


22D

도면23

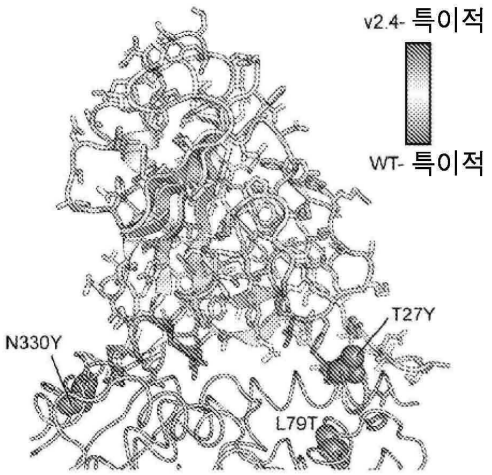

23A
Y365
P527
A363
V362
V524
C391
C525
I332
T523
P330
23C
S 발현
(ΔMFU mutant / ΔMFU WT)
0
0.5
1
WT
C336A
C361A
C379A
C391A
C432A
C480A
C488A
C525A
myc-태그된 S 단백질 변이체
23B
음성
야생형 S
S-C432A
FSC-A (× 10^6)
S 발현 (α-myc Alexa 647)
0.1%
22.4%
6.0%

도면24

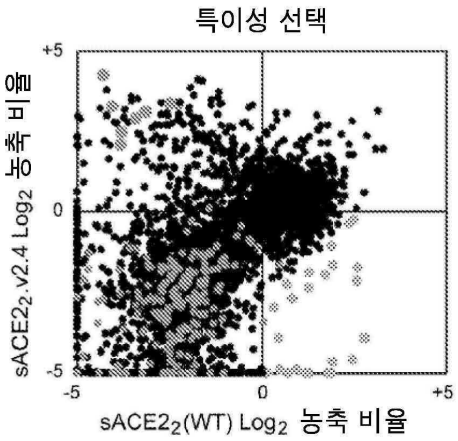

24A
야생형 S
sACE2₂.v2.4-8h 결합
sACE2₂(WT)-IgG1 결합
24B
RBD SSM 라이브러리
24C
RBD-SSM 라이브러리
24D
Log₂ 농축 비율 (Replicate 2)
Log₂ 농축 비율 (Replicate 1)
R² = 0.54
sACE2₂(WT) Gate
24E
R² = 0.42
sACE2₂.v2.4 Gate
24F
보존 스코어 (Replicate 2)
보존 스코어 (Replicate 1)
R² = 0.93
24G
R² = 0.84

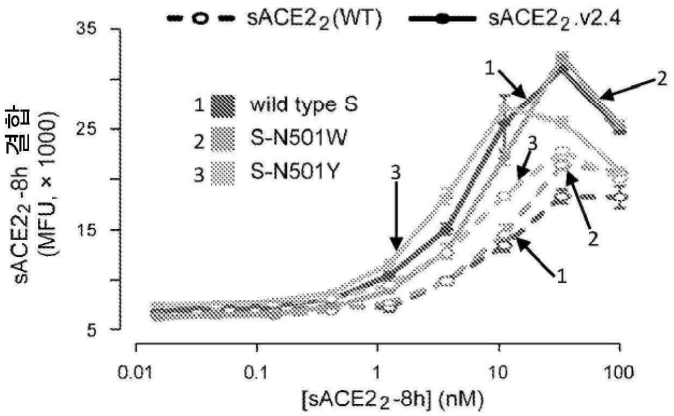
도면25

25A



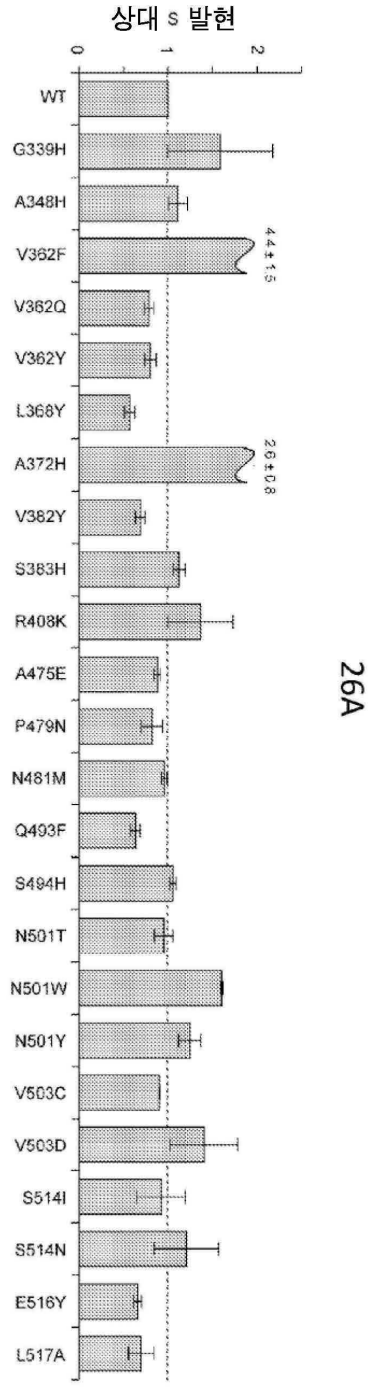
25B





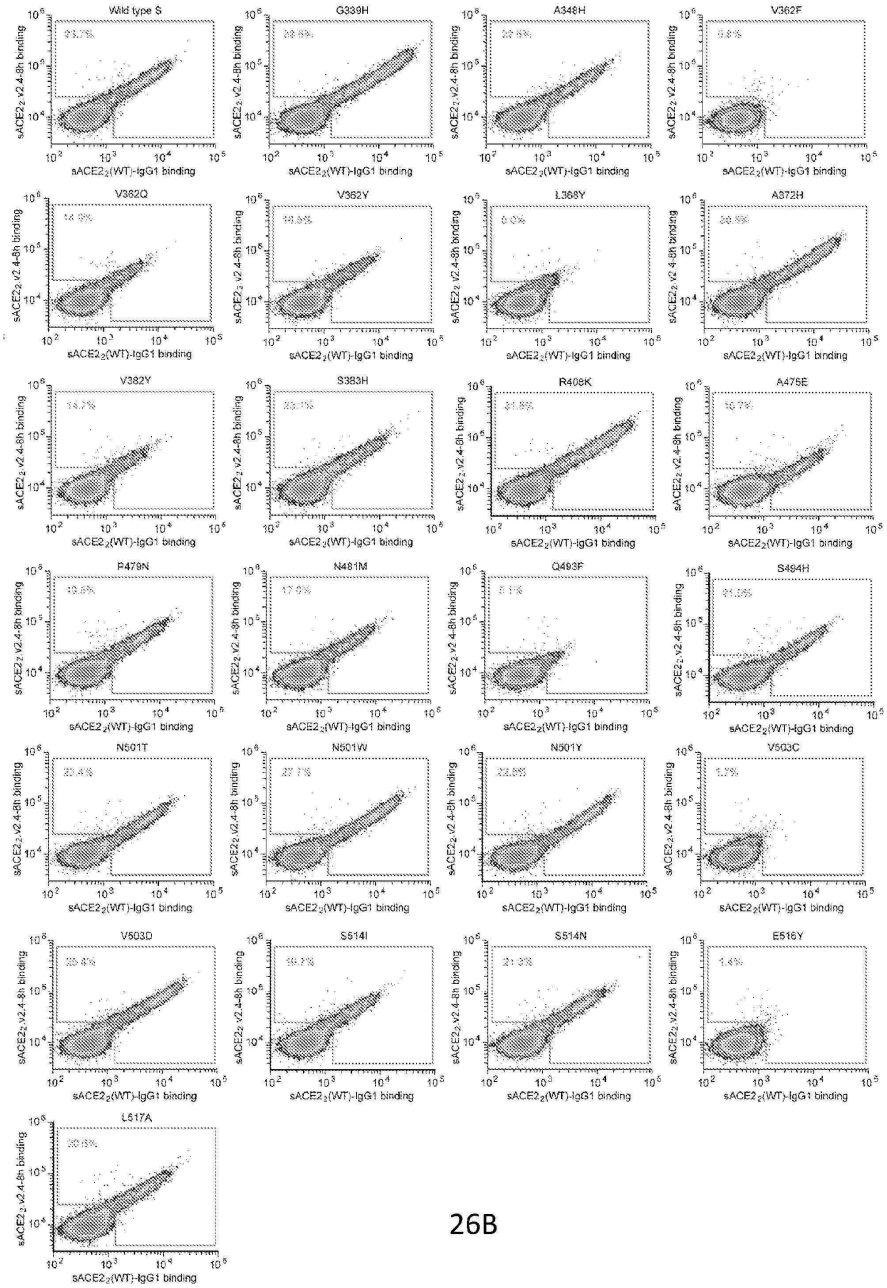
25C

도면26a


상대 S 발현
0
1
2
WT
G339H
A348H
V362F
4.4±1.5
V362Q
V362Y
L368Y
A372H
2.6±0.8
V382Y
S383H
R408K
A475E
P479N
N481M
Q493F
S494H
N501T
N501W
N501Y
V503C
V503D
S514I
S514N
E516Y
L517A

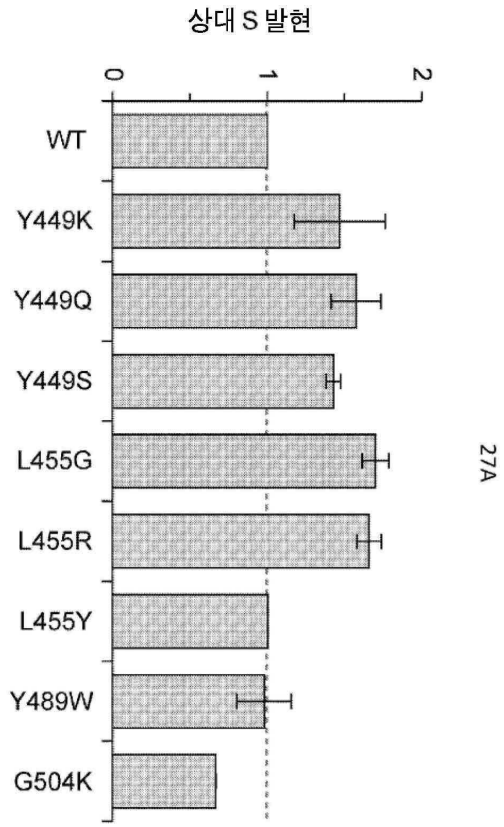
26A

도면26b

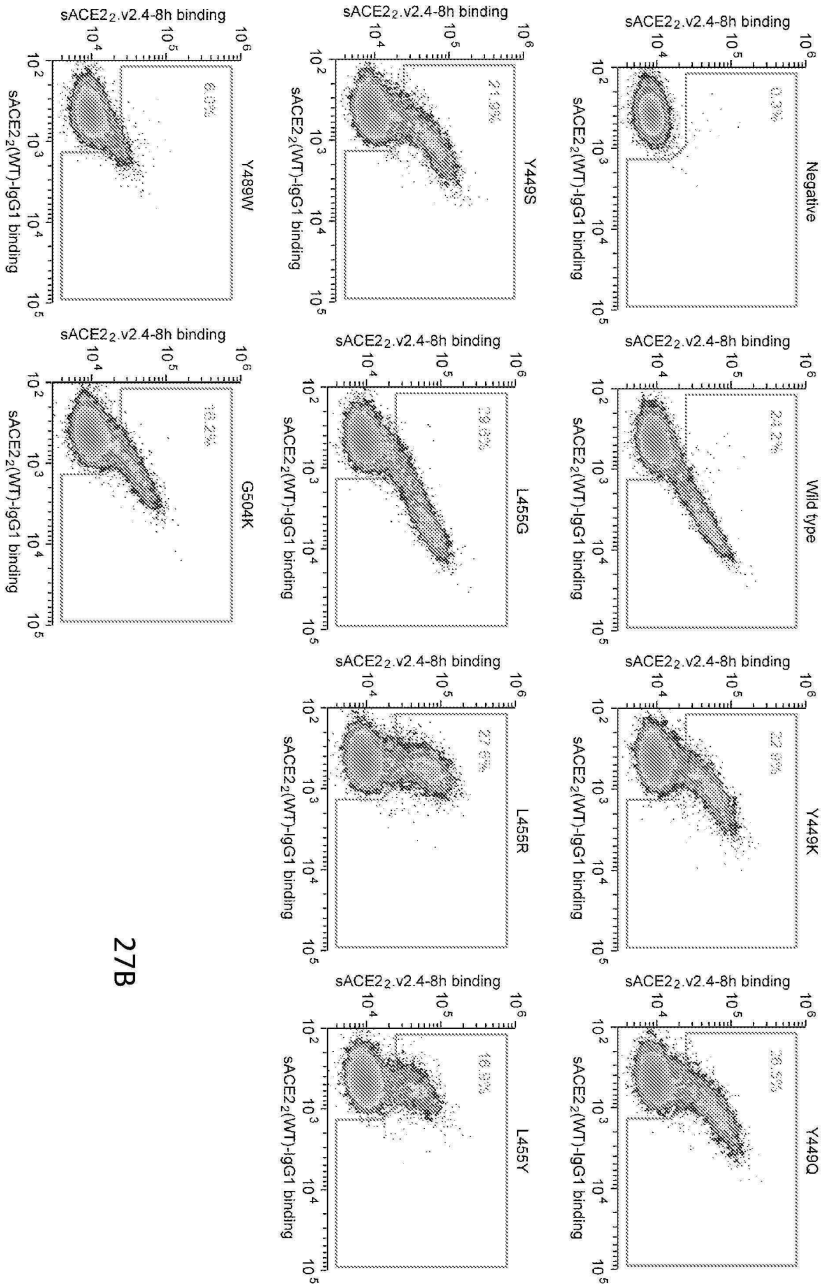

Wild type S
G339H
A348H
V362F
V362Q
V362Y
L368Y
A372H
V382Y
S383H
R408K
A476E
P479N
N481M
Q493F
S494H
N501T
N501W
N501Y
V503C
V503D
S514I
S514N
E516Y
L517A
sACE2₂ v2.4-8h binding
sACE2₂(WT)-IgG1 binding

26B

도면27a

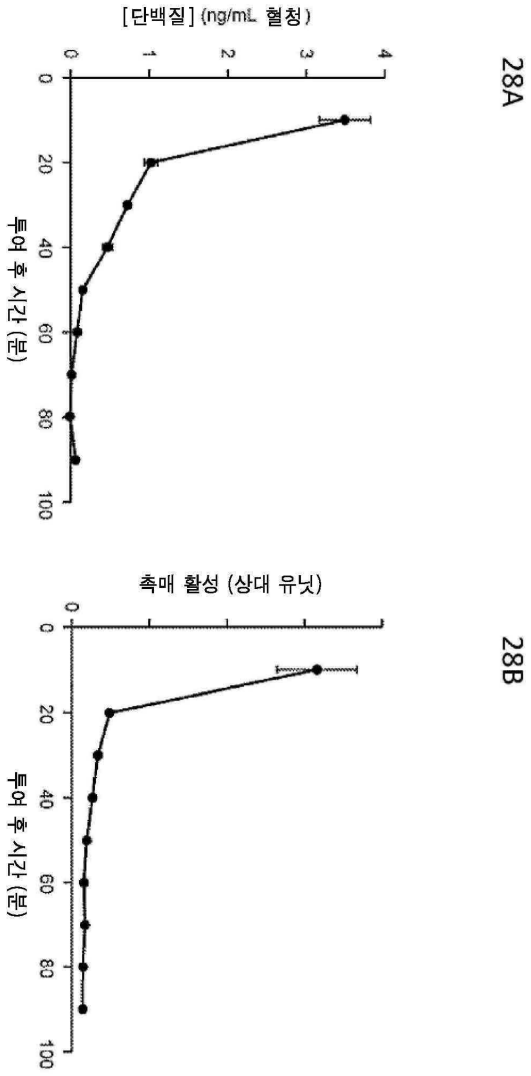

상대 S 발현
0
1
2
WT
Y449K
Y449Q
Y449S
L455G
L455R
L455Y
Y489W
G504K
27A

도면27b

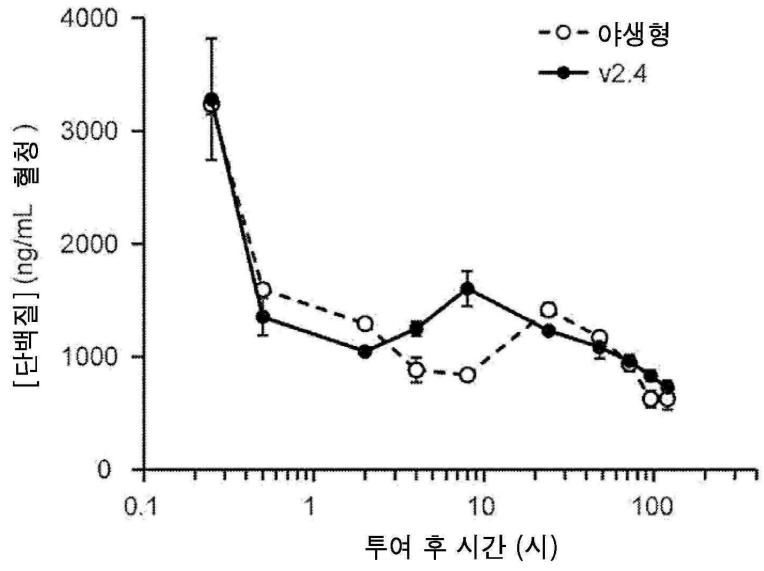

sACE2₂.v2.4-8h binding
sACE2₂(WT)-IgG1 binding
Negative
Wild type
Y449K
Y449Q
Y449S
L455G
L455R
L455Y
Y489W
G504K

27B

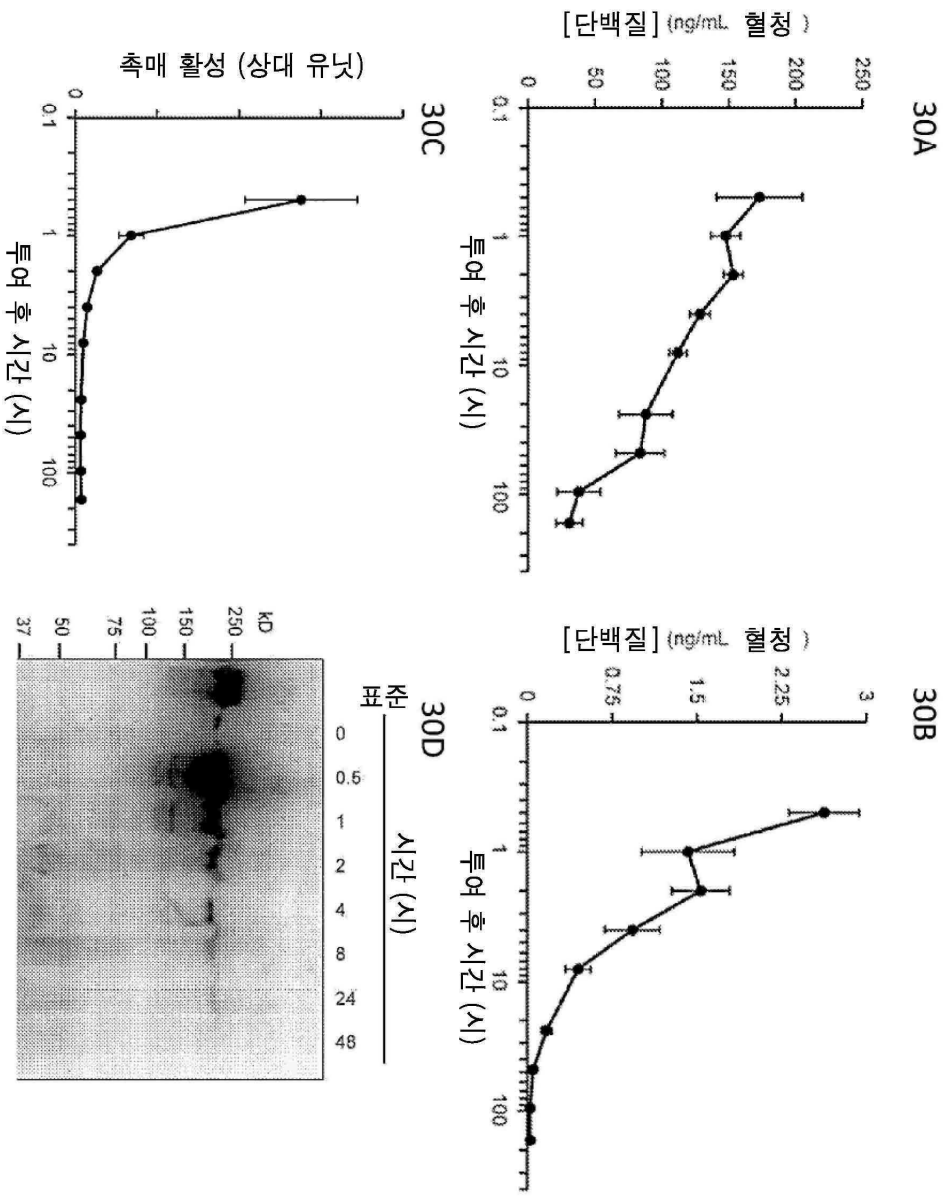
도면28


[단백질] (ng/mL 혈청)
0
1
2
3
4
0
20
40
60
80
100
투여 후 시간 (분)
28A
촉매 활성 (상대 유닛)
0
20
40
60
80
100
투여 후 시간 (분)
28B

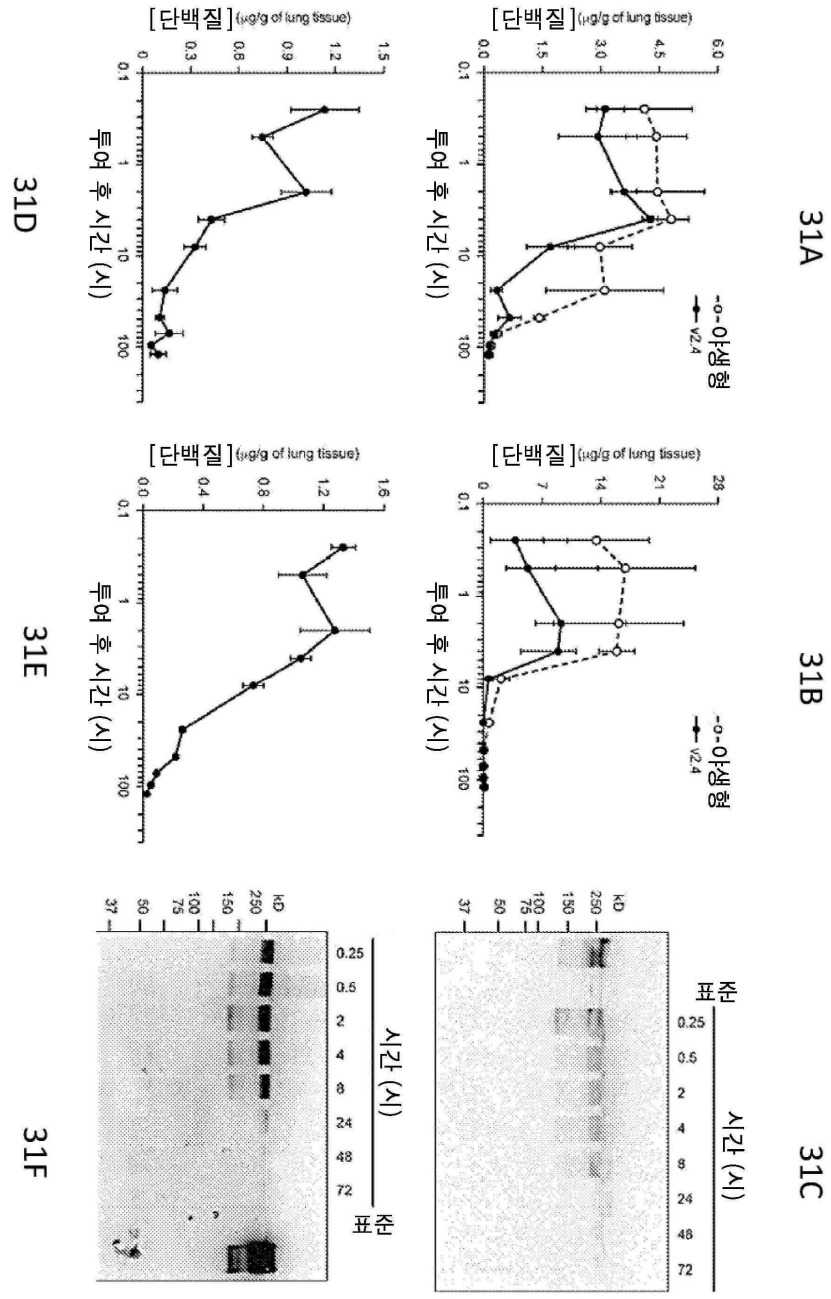
도면29


4000
3000
2000
1000
0
[단백질] (ng/mL 혈청)
0.1
1
10
100
투여 후 시간 (시)
야생형
v2.4

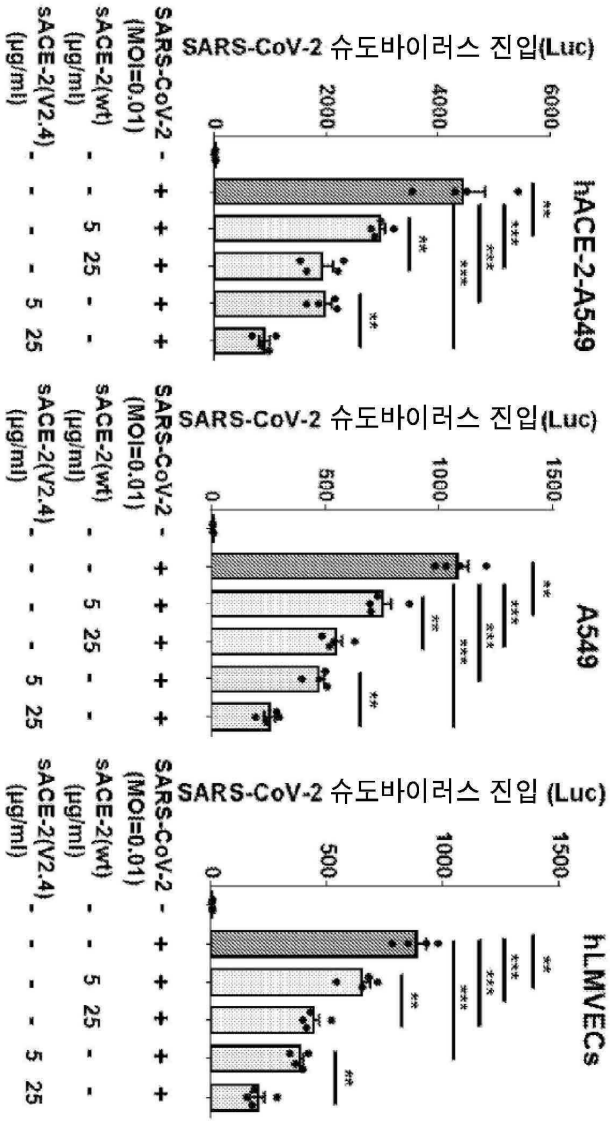
도면30


30A
[단백질] (ng/mL 혈청)
투여 후 시간 (시)
30B
[단백질] (ng/mL 혈청)
투여 후 시간 (시)
30C
촉매 활성 (상대 유닛)
투여 후 시간 (시)
30D
kD
250
150
100
75
50
37
표준
시간 (시)
0
0.5
1
2
4
8
24
48

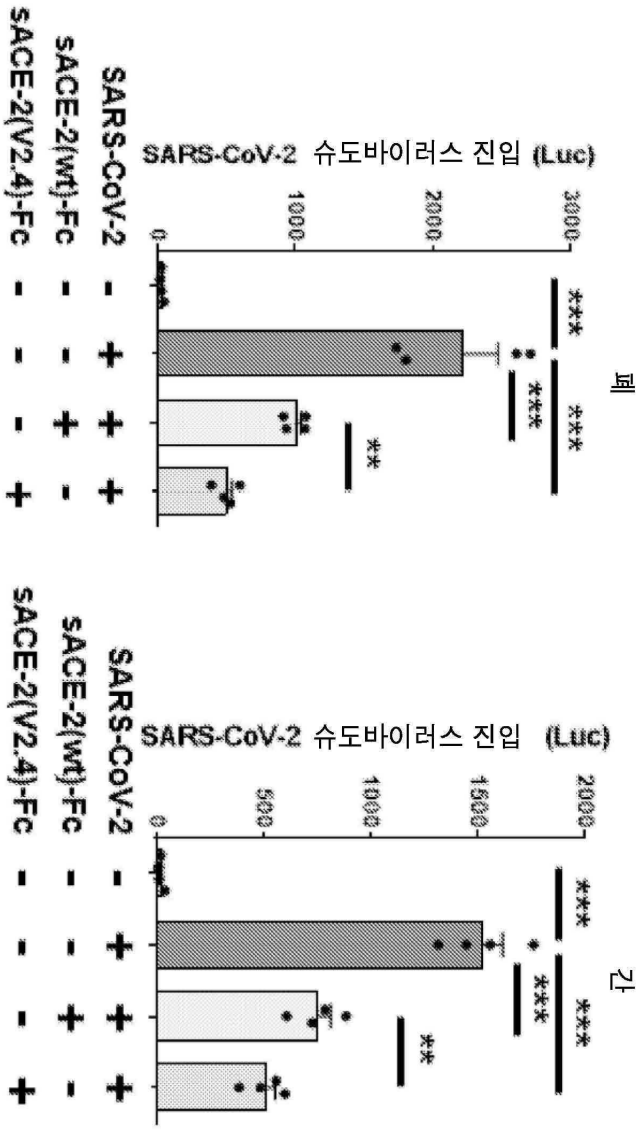
도면31


31A
31B
31C
31D
31E
31F
[단백질] (μg/g of lung tissue)
투여 후 시간 (시)
-o- 야생형
V2.4
시간 (시)
표준
0.25
0.5
2
4
8
24
48
72
kD
250
150
100
75
50
37

도면32


SARS-CoV-2 슈도바이러스 진입(Luc)
hACE-2-A549
A549
hLMVECs
SARS-CoV-2 (MOI=0.01)
sACE-2(wt) (μg/ml)
sACE-2(V2.4) (μg/ml)
0
500
1000
1500
2000
4000
6000

도면33



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS

<120> ENGINEERED RECEPTORS FOR CORONAVIRUSES AND USES THEREOF

<130> 7950-104344-05

<150> US 62/989,976

<151> 2020-03-16

<150> US 63/022,151

<151> 2020-05-08

<150> US 63/042,907

<151> 2020-06-23

<150> US 63/089,895

<151> 2020-10-09

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 805

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Ser Ser Ser Trp Leu Leu Leu Ser Leu Val Ala Val Thr Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Lys Arg Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser

115 120 125

Thr Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu

130 135 140

Glu Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu

145 150 155 160

Arg Leu Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu

165 170 175

Arg Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg

180 185 190

Ala Asn His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu

195 200 205

Val Asn Gly Val Asp Gly Tyr Asp Tyr Ser Arg Gly Gln Leu Ile Glu

210 215 220

Asp Val Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu

225 230 235 240

His Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile

245 250 255

Ser Pro Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly

260 265 270

Arg Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys

275 280 285

Pro Asn Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Val Asp Gln Ala Trp Asp Ala

290 295 300

Gln Arg Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu

305 310 315 320

Pro Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Pro

325 330 335

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

340 345 350

Lys Gly Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp

355 360 365

Phe Leu Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala

370 375 380

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

385 390 395 400

His Glu Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys

405 410 415

His Leu Lys Ser Ile Gly Leu Leu Ser Pro Asp Phe Gln Glu Asp Asn

420 425 430

Glu Thr Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly
435 440 445
Thr Leu Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe

450 455 460
Lys Gly Glu Ile Pro Lys Asp Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met
465 470 475 480
Lys Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr
485 490 495
Tyr Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe
500 505 510
Ile Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala

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

580 585 590
Thr Trp Leu Lys Asp Gln Asn Lys Asn Ser Phe Val Gly Trp Ser Thr
595 600 605
Asp Trp Ser Pro Tyr Ala Asp Gln Ser Ile Lys Val Arg Ile Ser Leu
610 615 620
Lys Ser Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Glu Trp Asn Asp Asn Glu Met
625 630 635 640
Tyr Leu Phe Arg Ser Ser Val Ala Tyr Ala Met Arg Gln Tyr Phe Leu

645 650 655
Lys Val Lys Asn Gln Met Ile Leu Phe Gly Glu Glu Asp Val Arg Val
660 665 670
Ala Asn Leu Lys Pro Arg Ile Ser Phe Asn Phe Phe Val Thr Ala Pro

675 680 685

Lys Asn Val Ser Asp Ile Ile Pro Arg Thr Glu Val Glu Lys Ala Ile

690 695 700

Arg Met Ser Arg Ser Arg Ile Asn Asp Ala Phe Arg Leu Asn Asp Asn

705 710 715 720

Ser Leu Glu Phe Leu Gly Ile Gln Pro Thr Leu Gly Pro Pro Asn Gln

725 730 735

Pro Pro Val Ser Ile Trp Leu Ile Val Phe Gly Val Val Met Gly Val

740 745 750

Ile Val Val Gly Ile Val Ile Leu Ile Phe Thr Gly Ile Arg Asp Arg

755 760 765

Lys Lys Lys Asn Lys Ala Arg Ser Gly Glu Asn Pro Tyr Ala Ser Ile

770 775 780

Asp Ile Ser Lys Gly Glu Asn Asn Pro Gly Phe Gln Asn Thr Asp Asp

785 790 795 800

Val Gln Thr Ser Phe

805

<210> 2

<211> 1273

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2

<400> 2

Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val

1 5 10 15

Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr Asn Ser Phe

20 25 30

Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Lys Val Phe Arg Ser Ser Val Leu

35 40 45

His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn Val Thr Trp

50 55 60

Phe His Ala Ile His Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Lys Arg Phe Asp

65 70 75 80

Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn Asp Gly Val Tyr Phe Ala Ser Thr Glu
85 90 95

Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe Gly Thr Thr Leu Asp Ser
100 105 110
Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val Ile
115 120 125
Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp Pro Phe Leu Gly Val Tyr
130 135 140
Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu Ser Glu Phe Arg Val Tyr
145 150 155 160

Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Val Ser Gln Pro Phe Leu
165 170 175
Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn Leu Arg Glu Phe
180 185 190
Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys Ile Tyr Ser Lys His Thr
195 200 205
Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln Gly Phe Ser Ala Leu Glu
210 215 220

Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr Arg Phe Gln Thr
225 230 235 240
Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ser Ser
245 250 255
Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln Pro
260 265 270
Arg Thr Phe Leu Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile Thr Asp Ala
275 280 285

Val Asp Cys Ala Leu Asp Pro Leu Ser Glu Thr Lys Cys Thr Leu Lys
290 295 300
Ser Phe Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val
305 310 315 320
Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys

325 330 335

Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala

340 345 350

Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu

355 360 365

Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro

370 375 380

Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe

385 390 395 400

Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly

405 410 415

Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys

420 425 430

Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn

435 440 445

Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe

450 455 460

Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys

465 470 475 480

Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly

485 490 495

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

500 505 510

Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys

515 520 525

Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn

530 535 540

Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe Leu

545 550 555 560

Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala Val

565 570 575

Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser Phe
580 585 590
Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln Val
595 600 605

Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala Ile
610 615 620
His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly Ser
625 630 635 640
Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His Val
645 650 655
Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala
660 665 670

Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg Arg Ala Arg Ser Val Ala
675 680 685
Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn Ser
690 695 700
Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Thr Ile
705 710 715 720
Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys Thr Ser Val
725 730 735

Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ser Asn Leu
740 745 750
Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Thr
755 760 765
Gly Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Val Phe Ala Gln
770 775 780
Val Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp Phe Gly Gly Phe
785 790 795 800

Asn Phe Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro Ser Lys Arg Ser
805 810 815
Phe Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly

820 825 830

Phe Ile Lys Gln Tyr Gly Asp Cys Leu Gly Asp Ile Ala Ala Arg Asp

835 840 845

Leu Ile Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu

850 855 860

Leu Thr Asp Glu Met Ile Ala Gln Tyr Thr Ser Ala Leu Leu Ala Gly

865 870 875 880

Thr Ile Thr Ser Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile

885 890 895

Pro Phe Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr

900 905 910

Gln Asn Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Leu Ile Ala Asn Gln Phe Asn

915 920 925

Ser Ala Ile Gly Lys Ile Gln Asp Ser Leu Ser Ser Thr Ala Ser Ala

930 935 940

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

945 950 955 960

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

965 970 975

Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln

980 985 990

Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val

995 1000 1005

Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn

1010 1015 1020

Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys

1025 1030 1035

Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro

1040 1045 1050

Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val

1055 1060 1065

Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His
1070 1075 1080

Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn
1085 1090 1095

Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln
1100 1105 1110

Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val
1115 1120 1125

Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro
1130 1135 1140

Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn
1145 1150 1155

His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn
1160 1165 1170

Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu
1175 1180 1185

Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu
1190 1195 1200

Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Ile Trp Leu
1205 1210 1215

Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Met
1220 1225 1230

Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Cys Cys
1235 1240 1245

Ser Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro
1250 1255 1260

Val Leu Lys Gly Val Lys Leu His Tyr Thr
1265 1270

<210> 3

<211> 196

<212> PRT

<213> SARS-CoV-2 Wuhan

<400> 3

Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala
1 5 10 15

Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp
20 25 30

Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr
35 40 45

Gly Val Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro
65 70 75 80

Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp
85 90 95

Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys
100 105 110

Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn
115 120 125

Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly
130 135 140

Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu
145 150 155 160

Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr
165 170 175

Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val
180 185 190

Cys Gly Pro Lys
195

<210> 4

<211> 195

<212> PRT

<213> SARS-CoV-1 Urbani

<400> 4

Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro

1 5 10 15

Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp

20 25 30

Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr

35 40 45

Gly Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr

50 55 60

Ala Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro

65 70 75 80

Gly Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp

85 90 95

Phe Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr

100 105 110

Ser Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys

115 120 125

Leu Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp

130 135 140

Gly Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn

145 150 155 160

Asp Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg

165 170 175

Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys

180 185 190

Gly Pro Lys

195

<210> 5

<211> 195

<212> PRT

<213> Rs4084-CoV

<400> 5

Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Thr Phe Pro
1 5 10 15
Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp
20 25 30
Tyr Ser Ile Leu Tyr Asn Ser Thr Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr
35 40 45
Gly Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro
65 70 75 80
Gly Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp
85 90 95
Phe Leu Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Asn Ser Lys Asp Ser Ser
100 105 110
Thr Ser Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Trp Val Arg Arg Ser Lys
115 120 125

Leu Asn Pro Tyr Glu Arg Asp Leu Ser Asn Asp Ile Tyr Ser Pro Gly
130 135 140
Gly Gln Ser Cys Ser Ala Val Gly Pro Asn Cys Tyr Asn Pro Leu Arg
145 150 155 160
Pro Tyr Gly Phe Phe Thr Thr Ala Gly Val Gly His Gln Pro Tyr Arg
165 170 175
Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys
180 185 190

Gly Pro Lys
195

<210> 6
<211> 195
<212> PRT
<213> RsSHC014-CoV
<400> 6
Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Thr Phe Pro

1 5 10 15

Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp

20 25 30

Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr

35 40 45

Gly Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr

50 55 60

Ala Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro

65 70 75 80

Gly Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp

85 90 95

Phe Leu Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Asn Ser Lys Asp Ser Ser

100 105 110

Thr Ser Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Trp Val Arg Arg Ser Lys

115 120 125

Leu Asn Pro Tyr Glu Arg Asp Leu Ser Asn Asp Ile Tyr Ser Pro Gly

130 135 140

Gly Gln Ser Cys Ser Ala Val Gly Pro Asn Cys Tyr Asn Pro Leu Arg

145 150 155 160

Pro Tyr Gly Phe Phe Thr Thr Ala Gly Val Gly His Gln Pro Tyr Arg

165 170 175

Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys

180 185 190

Gly Pro Lys

195

<210> 7

<211> 195

<212> PRT

<213> Rs4231-CoV

<400> 7

Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Thr Phe Pro

1 5 10 15

Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp
20 25 30
Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr
35 40 45

Gly Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro
65 70 75 80
Gly Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp
85 90 95
Phe Leu Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Asn Ser Lys Asp Ser Ser
100 105 110

Thr Ser Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Trp Val Arg Arg Ser Lys
115 120 125
Leu Asn Pro Tyr Glu Arg Asp Leu Ser Asn Asp Ile Tyr Ser Pro Gly
130 135 140
Gly Gln Ser Cys Ser Ala Ile Gly Pro Asn Cys Tyr Asn Pro Leu Arg
145 150 155 160
Pro Tyr Gly Phe Phe Thr Thr Ala Gly Val Gly His Gln Pro Tyr Arg
165 170 175

Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys
180 185 190
Gly Pro Lys
195

<210> 8
<211> 195
<212> PRT
<213> LYRa11-CoV
<400> 8
Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Thr Phe Pro
1 5 10 15
Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp

20 25 30

Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr

35 40 45

Gly Val Ser Ala Ile Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr

50 55 60

Ala Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro

65 70 75 80

Gly Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp

85 90 95

Phe Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr

100 105 110

Ser Ser Gly Asn Phe Asn Tyr Lys Tyr Arg Ser Leu Arg His Gly Lys

115 120 125

Leu Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp

130 135 140

Gly Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Phe Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn

145 150 155 160

Asp Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Asn Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg

165 170 175

Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys

180 185 190

Gly Pro Lys

195

<210> 9

<211> 195

<212> PRT

<213> Rs7327-CoV

<400> 9

Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Thr Phe Pro

1 5 10 15

Ser Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp

20 25 30

Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr
35 40 45
Gly Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro
65 70 75 80
Gly Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp
85 90 95

Phe Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr
100 105 110
Ser Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Ser Leu Arg His Gly Lys
115 120 125
Leu Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp
130 135 140
Gly Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Phe Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn
145 150 155 160

Asp Tyr Gly Phe Phe Thr Thr Asn Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg
165 170 175
Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys
180 185 190
Gly Pro Lys
195

<210> 10
<211> 714
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 10

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

Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp Asn Tyr
20 25 30
Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn Ala Gly
35 40 45
Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Thr Ala Gln Met
50 55 60
Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln Leu Gln
65 70 75 80

Ala Leu Gln Gln Asn Gly Ser Ser Val Leu Ser Glu Asp Lys Ser Lys
85 90 95
Arg Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser Thr Gly
100 105 110
Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu Glu Pro
115 120 125
Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu Arg Leu
130 135 140

Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu Arg Pro
145 150 155 160
Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg Ala Asn
165 170 175
His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu Val Asn
180 185 190
Gly Val Asp Gly Tyr Asp Tyr Ser Arg Gly Gln Leu Ile Glu Asp Val
195 200 205

Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu His Ala
210 215 220
Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile Ser Pro
225 230 235 240
Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly Arg Phe
245 250 255
Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys Pro Asn

260 265 270

Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Val Asp Gln Ala Trp Asp Ala Gln Arg
275 280 285
Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu Pro Asn
290 295 300
Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Tyr Ser Met Leu Thr Asp Pro Gly Asn
305 310 315 320
Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly Lys Gly
325 330 335

Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp Phe Leu
340 345 350
Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala Tyr Ala
355 360 365
Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn Gly Ala Asn Glu Gly Phe His Glu
370 375 380
Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys His Leu
385 390 395 400

Lys Ser Ile Gly Leu Leu Ser Pro Asp Phe Gln Glu Asp Asn Glu Thr
405 410 415
Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly Thr Leu
420 425 430
Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe Lys Gly
435 440 445
Glu Ile Pro Lys Asp Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met Lys Arg
450 455 460

Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr Tyr Cys
465 470 475 480
Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe Ile Arg
485 490 495
Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala Leu Cys
500 505 510

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

Ser Thr Glu Ala Gly Gln Lys Leu Phe Asn Met Leu Arg Leu Gly Lys
530 535 540
Ser Glu Pro Trp Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Val Gly Ala Lys Asn
545 550 555 560
Met Asn Val Arg Pro Leu Leu Asn Tyr Phe Glu Pro Leu Phe Thr Trp
565 570 575
Leu Lys Asp Gln Asn Lys Asn Ser Phe Val Gly Trp Ser Thr Asp Trp
580 585 590

Ser Pro Tyr Ala Asp Gln Ser Ile Lys Val Arg Ile Ser Leu Lys Ser
595 600 605
Ala Leu Gly Asp Lys Ala Tyr Glu Trp Asn Asp Asn Glu Met Tyr Leu
610 615 620
Phe Arg Ser Ser Val Ala Tyr Ala Met Arg Gln Tyr Phe Leu Lys Val
625 630 635 640
Lys Asn Gln Met Ile Leu Phe Gly Glu Glu Asp Val Arg Val Ala Asn
645 650 655

Leu Lys Pro Arg Ile Ser Phe Asn Phe Phe Val Thr Ala Pro Lys Asn
660 665 670
Val Ser Asp Ile Ile Pro Arg Thr Glu Val Glu Lys Ala Ile Arg Met
675 680 685
Ser Arg Ser Arg Ile Asn Asp Ala Phe Arg Leu Asn Asp Asn Ser Leu
690 695 700
Glu Phe Leu Gly Ile Gln Pro Thr Leu Gly
705 710

<210> 11

<211> 942

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 11

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

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

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

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

50 55 60

Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln Leu Gln
65 70 75 80

Ala Leu Gln Gln Asn Gly Ser Ser Val Leu Ser Glu Asp Lys Ser Lys
85 90 95

Arg Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser Thr Gly
100 105 110

Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu Glu Pro

115 120 125

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

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

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

His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu Val Asn

180 185 190

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

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

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

Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly Arg Phe

245 250 255

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

260 265 270

Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Val Asp Gln Ala Trp Asp Ala Gln Arg

275 280 285

Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu Pro Asn

290 295 300

Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Tyr Ser Met Leu Thr Asp Pro Gly Asn

305 310 315 320

Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly Lys Gly

325 330 335

Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp Phe Leu

340 345 350

Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala Tyr Ala

355 360 365

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

370 375 380

Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys His Leu

385 390 395 400

Lys Ser Ile Gly Leu Leu Ser Pro Asp Phe Gln Glu Asp Asn Glu Thr

405 410 415

Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly Thr Leu

420 425 430

Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe Lys Gly

435 440 445

Glu Ile Pro Lys Asp Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met Lys Arg

450 455 460

Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr Tyr Cys

465 470 475 480

Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe Ile Arg

485 490 495

Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala Leu Cys

500 505 510

Gln Ala Ala Lys His Glu Gly Pro Leu His Lys Cys Asp Ile Ser Asn

515 520 525

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

530 535 540

Ser Glu Pro Trp Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Val Gly Ala Lys Asn

545 550 555 560

Met Asn Val Arg Pro Leu Leu Asn Tyr Phe Glu Pro Leu Phe Thr Trp

565 570 575

Leu Lys Asp Gln Asn Lys Asn Ser Phe Val Gly Trp Ser Thr Asp Trp

580 585 590

Ser Pro Tyr Ala Asp Gln Ser Ile Lys Val Arg Ile Ser Leu Lys Ser

595 600 605

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

610 615 620

Phe Arg Ser Ser Val Ala Tyr Ala Met Arg Gln Tyr Phe Leu Lys Val

625 630 635 640

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

645 650 655

Leu Lys Pro Arg Ile Ser Phe Asn Phe Phe Val Thr Ala Pro Lys Asn

660 665 670

Val Ser Asp Ile Ile Pro Arg Thr Glu Val Glu Lys Ala Ile Arg Met

675 680 685

Ser Arg Ser Arg Ile Asn Asp Ala Phe Arg Leu Asn Asp Asn Ser Leu

690 695 700

Glu Phe Leu Gly Ile Gln Pro Thr Leu Gly Ser Asp Lys Thr His Thr

705 710 715 720

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

725 730 735

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
740 745 750
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

755 760 765
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
770 775 780
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
785 790 795 800
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
805 810 815
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

820 825 830
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
835 840 845
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
850 855 860
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
865 870 875 880
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

885 890 895
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
900 905 910
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
915 920 925
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
930 935 940