



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0166574
(43) 공개일자 2024년11월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/4723 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7036397
(22) 출원일자(국제) 2023년03월31일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년10월30일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/058432
(87) 국제공개번호 WO 2023/187142
국제공개일자 2023년10월05일
- (30) 우선권주장
22166380.0 2022년04월01일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
프라이 유니베르시타트 베를린
독일 14195 베를린 카이저스버터 스트라트 16-18
포숨스베어분드 베를린 에.베
독일 12489 베를린 루도비 카우세 17
- (72) 발명자
라우스터 다니엘
독일 10179 베를린 마르키세스 우퍼 50
디엔 로빈
독일 21442 토펜슈테트 우베크 22
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
유미특허법인

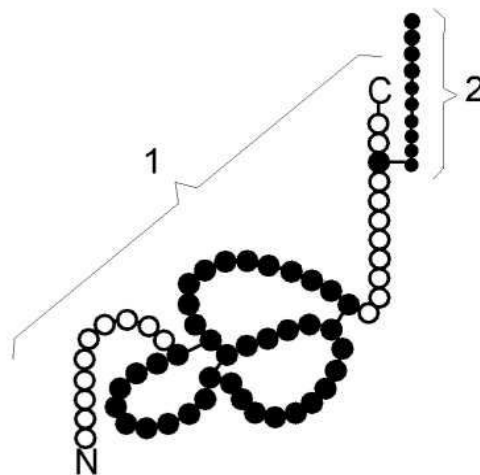
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 점액점착 및 바이러스 결합 특성을 가진 2중 기능성 펩타이드

(57) 요약

본 발명은 바이러스 결합 모이어티 (2) 및 바이러스 결합 모이어티 (2)에 공유 결합된 뮤신 결합 모이어티 (1)를 포함하는 2중 기능성 펩타이드에 관한 것이다. 바이러스 결합 모이어티는 SARS-CoV-2, 인플루엔자 A, 인플루엔자 B, 리노바이러스 및 기타 엔테로바이러스, 인간 파라인플루엔자 바이러스, 및/또는 메타뉴모바이러스에 결합하는 펩타이드로부터 선택된다. 뮤신 결합 모이어티는 트레포일 인자 3와 같은 렉틴으로부터 선택된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 9/0043 (2013.01)

A61K 9/0073 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

C07K 14/575 (2013.01)

(72) 발명자

포블로츠키 타티아나

독일 12524 베를린 루도어 슈트라쎈 34

바르두아 마르쿠스

독일 10439 베를린 비허트슈트라쎈 3

헤켄베르거 크리스티안

독일 10777 베를린 빈터펠트슈트라쎈 86

플로레스 세바스티안

독일 10407 베를린 단치거 슈트라쎈 128

말리 안

체코 25166 흐루시체 나베스 156

허먼 안드레아스

독일 14467 포츠담 헬름홀츠슈트라쎈 21

명세서

청구범위

청구항 1

바이러스 결합 모이어티 (2); 및 상기 바이러스 결합 모이어티 (2)에 공유 결합된 뮤신 결합 모이어티 (1)를 포함하는 펩타이드로서,

상기 바이러스 결합 모이어티 (2)가 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62 또는 서열번호 63에 대해 적어도 95% 동일한 펩타이드이거나 또는 이러한 펩타이드를 포함하고; 및

상기 뮤신 결합 모이어티 (1)가 서열번호 1, 서열번호 14, 서열번호 20, 서열번호 21 또는 서열번호 22에 대해 적어도 95% 동일한 펩타이드이거나 또는 이러한 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 뮤신 결합 모이어티 (1)가 서열번호 1에 대해 적어도 95% 동일한 트레포일 인자 3 펩타이드이거나 또는 이러한 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 펩타이드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 펩타이드가 바이러스 결합 모이어티 (2)를 적어도 2개 포함하고, 상기 뮤신 결합 모이어티 (1)가 적어도 2개의 바이러스 결합 모이어티 (2) 중 하나 이상에 공유 결합된 것을 특징으로 하는, 펩타이드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 결합 모이어티 (2)가 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42 또는 서열번호 43에 대해 적어도 95% 동일한 펩타이드이거나 또는 이러한 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 펩타이드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 결합 모이어티 (2)가 서열번호 2에 대해 적어도 95% 동일한 펩타이드이고, 상기 뮤신 결합 모이어티 (1)가 서열번호 1에 대해 적어도 95% 동일한 트레포일 인자 3 펩타이드인 것을 특징으로 하는, 펩타이드.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 결합 모이어티 (2)가 서열번호 3에 대해 적어도 95% 동일한 펩타이드이고, 상기 뮤신 결합 모이어티 (1)가 서열번호 1에 대해 적어도 95% 동일한 트레포일 인자 3 펩타이드인 것을 특징으로 하는, 펩타이드.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드가 서열번호 18에 대해 적어도 95% 동일한 것을 특징

으로 하는, 펩타이드.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 펩타이드가 서열번호 19에 대해 적어도 95% 동일한 것을 특징으로 하는, 펩타이드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 감염을 치료 또는 예방하는데 이용하기 위한 것인, 펩타이드.

청구항 10

제1항 내지 제7항 또는 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 감염이 SARS-CoV-2 감염인 것을 특징으로 하는, 펩타이드.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 약제학적 활성 성분으로 포함하는 의약제.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 의약제가 코 스프레이 또는 흡입 스프레이로서 투여하도록 설계 및 구성되는 것을 특징으로 하는, 의약제.

청구항 13

하기 단계를 포함하는, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드의 제조 방법:

- a) 바이러스 결합 모이어티 전구체를 제1 뮤신 결합 모이어티 전구체와 반응시켜 펩타이드 전구체를 수득하는 단계로서, 상기 제1 뮤신 결합 모이어티 전구체가 뮤신 결합 모이어티 (1)의 제1 파트를 포함하는, 단계; 및
- b) 상기 펩타이드 전구체를 제2 뮤신 결합 모이어티 전구체와 반응시키는 단계로서, 상기 제2 뮤신 결합 모이어티 전구체가 뮤신 결합 모이어티 (1)의 제2 파트를 포함하는, 단계.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 바이러스 결합 모이어티 전구체가 바이러스 결합 모이어티 (2)에 공유 결합된 4-펜티노익 모이어티를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 제1 뮤신 결합 모이어티 전구체가 뮤신 결합 모이어티 (1)의 전체 아미노산들 중 절반 미만을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 제1항의 서문에 따른 2중 기능성 펩타이드, 제9항의 서문에 따른 이러한 펩타이드의 의학적 용도, 제11항의 서문에 따른 이러한 펩타이드를 포함하는 의약제, 및 제13항의 서문에 따른 이러한 펩타이드의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 진행 중인 SARS-CoV-2 대유행은 신생 바이러스 병원체와 재발성 바이러스 병원체가 인간 집단에 계속 위협이 되어, 광범위한 바이러스 전파를 억제하기 위한 신속하고 특별한 대응이 필요하다는 것을, 보여주었다. 바이러스 전파를 늦추기 위한 위생 개념을 빠르게 시행하였지만, 감염성 질환에 대한 주요 조치는 백신 및 항-바이러스 요법이다. 그러나, 백신을 개발 및 검사하는 데에는 대개 수년이 걸린다. 항-바이러스 요법은 이미 감염된 개체

를 치료하는 빠른 해법을 제공한다. 항-바이러스 군에는 단백질 또는 펩타이드와 같이 더 큰 분자와는 대조적으로 소형 유기 화합물들이 지배적이다. 그러나, 새로운 소분자 약물은 흔히 이의 복잡한 화학적 특성으로 인해 개발하기 까다롭고, 따라서 매우 다양한 여러 화합물 유사체들로 스크리닝을 준비하기 어렵다. 아울러, 오셀타미비르 (oseltamivir) 또는 아만타딘 (amantadine)과 같이 인플루엔자에 대한 항-바이러스제에서 입증된 바와 같이 내성 출현도 심각해지는 문제이다.

[0003] SARS-CoV-2 대유행에 대한 추가적인 조치로서 예방학적 치료는 현재 사용되지 않아, 여러 이점을 달성할 수 있는 기회를 놓치고 있다.

[0004] 베르너 호프만은 트레포일 인자 (trefoil factor, TFF3) 및 IgG-Fc-결합 단백질 (FCGBP)로부터 유래한 이중이량체를 언급하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Bhatia, Sumati, et al. "Linear polysialoside outperforms dendritic analogs for inhibition of influenza virus infection in vitro and in vivo." *Biomaterials* 138 (2017): 22-34.

(비특허문헌 0002) Braga Emidio, Nayara, et al. "Chemical Synthesis of TFF3 Reveals Novel Mechanistic Insights and a Gut-Stable Metabolite." *Journal of Medicinal Chemistry* 64.13 (2021): 9484-9495.

(비특허문헌 0003) Bui, Vuong N., et al. "Pathogenicity of an H5N1 avian influenza virus isolated in Vietnam in 2012 and reliability of conjunctival samples for diagnosis of infection." *Virus Research* 179 (2014): 125-132.

(비특허문헌 0004) Caban, Madelyn, et al. "Cross-protective antibodies against common endemic respiratory viruses." *Nature Communications* 14.1 (2023): 798.

(비특허문헌 0005) Han, Dong P., Adam Penn-Nicholson, and Michael W. Cho. "Identification of critical determinants on ACE2 for SARS-CoV entry and development of a potent entry inhibitor." *Virology* 350.1 (2006): 15-25.

(비특허문헌 0006) Hoffmann, Markus, et al. "SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor." *Cell* 181.2 (2020): 271-280.

(비특허문헌 0007) Hoffmann, Miriam, Nicole L. Snyder, and Laura Hartmann. "Polymers Inspired by Heparin and Heparan Sulfate for Viral Targeting." *Macromolecules* 55.18 (2022): 7957-7973.

(비특허문헌 0008) Hoffmann, Werner. "Trefoil factor family (TFF) peptides and their different roles in the mucosal innate immune defense and more: An update." *Current Medicinal Chemistry* 28.36 (2021): 7387-7399.

(비특허문헌 0009) Hrebik, Dominik, et al. "ICAM-1 induced rearrangements of capsid and genome prime rhinovirus 14 for activation and uncoating." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118.19 (2021): e2024251118.

(비특허문헌 0010) Issmail, Leila, et al. "Prefusion-specific antibody-derived peptides trivalently presented on DNA-nanoscaffolds as an innovative strategy against RSV entry." *Frontiers in Virology* 2 (2022).

(비특허문헌 0011) Jarva, Michael A., et al. "Trefoil factors share a lectin activity that defines their role in mucus." *Nature Communications* 11.1 (2020): 1-9.

(비특허문헌 0012) Jerabek-Willemsen M., et al. "MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond." *Journal of Molecular Structure* 1077 (2014): 101-113.

(비특허문헌 0013) Khan, Abdul Ghafoor, et al. "Human rhinovirus type 54 infection via heparan sulfate is less efficient and strictly dependent on low endosomal pH." *Journal of Virology* 81.9

(2007): 4625-4632.

(비특허문헌 0014) Madsen, Anders, et al. "Human antibodies targeting influenza B virus neuraminidase active site are broadly protective." *Immunity* 53.4 (2020): 852-863.

(비특허문헌 0015) McLellan, Jason S., et al. "Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus." *science* 342.6158 (2013): 592-598.

(비특허문헌 0016) Memczak, Henry, et al. "Anti-hemagglutinin antibody derived lead peptides for inhibitors of influenza virus binding." *PLoS One* 11.7 (2016): e0159074.

(비특허문헌 0017) Sarto, Carolina, et al. "Atomistic insight into the essential binding event of ACE2-derived peptides to the SARS-CoV-2 spike protein." *Biological Chemistry* 403.5-6 (2022): 615-624.

(비특허문헌 0018) Smith, Thomas J., et al. "Neutralizing antibody to human rhinovirus 14 penetrates the receptor-binding canyon." *Nature* 383.6598 (1996): 350-354.

(비특허문헌 0019) Thim, L., F. Madsen, and S. S. Poulsen. "Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels." *European Journal of Clinical Investigation* 32.7 (2002): 519-527.

(비특허문헌 0020) Zhu, Qing, et al. "A highly potent extended half-life antibody as a potential RSV vaccine surrogate for all infants." *Science Translational Medicine* 9.388 (2017): eaaj1928.

(비특허문헌 0021) Zuo, Teng, et al. "Comprehensive analysis of antibody recognition in convalescent humans from highly pathogenic avian influenza H5N1 infection." *Nature Communications* 6.1 (2015): 8855.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 과제는 바이러스 질환을 예방학적으로 치료하는데 이용가능하고, 이상적으로는 바이러스 감염을 회피하는, 새로운 물질을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 이러한 과제는 제1항의 청구항 요소들을 가진 펩타이드를 이용해 달성된다. 이러한 펩타이드는 바이러스 결합 모이어티와 바이러스 결합 모이어티에 공유 결합된 뮤신 결합 모이어티를 포함하는 2중 기능성 펩타이드이다. 바이러스 결합 모이어티와 뮤신 결합 모이어티 간의 결합은 직접 공유 결합이거나 또는 링커를 경유한 결합일 수 있다.

[0008] 바이러스 결합 모이어티는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42, 서열번호 43, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 58, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 62 또는 서열번호 63에 대해 적어도 95%, 특히 적어도 96%, 특히 적어도 97%, 특히 적어도 98%, 특히 적어도 99%, 특히 100%로 동일한 펩타이드이거나 또는 이러한 펩타이드를 포함한다.

[0009] 서열번호 2-13 및 23-43은 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2 (SARS-CoV-2)에 결합하는데 특히 적절한 바이러스 결합 모이어티에 대한 것이다. 서열번호 2, 3 및 23-41은 선형 바이러스 결합 펩타이드에 대한 것이고, 서열번호 4-13, 42 및 43은 부분 고리화된 펩타이드, 소위 스테이플드 펩타이드 (stapled peptide)에 대한 것이다. 이들은 바로 뒤에 있진 않지만 (그러나 가까이 있는) 아미노산 2개 사이에 하나 이상의 브릿지를 포함한다. 이 브릿지는 스테이플 (staple)처럼 작용하며, 해당 펩타이드의 안정화에 기여한다. 브릿지는 해당 아미노산 잔기들의 측쇄 2개에 의해 또는 이의 일반적인 측쇄 이외에 해당 아미노산 잔기에 공유 결합된 화학적 모이어티에 의해 확립될 수 있다. 서열번호 42 및 43의 경우, 브릿지는 시스테인 잔기 2개 간에 형성된 이황화

브릿지이다.

- [0010] 서열번호 48은 인플루엔자 A 바이러스 (특히, 군주 H1, H3, H7)에 결합하기에 특히 적절한 펩타이드를 기술한다. 이 펩타이드는 인플루엔자 A 바이러스의 헤마글루티닌 (HA 단백질)을 표적으로 하며, Memczak 등 및 Miriam Hoffmann 등에 의해 언급된 바 있다.
- [0011] 서열번호 49 및 50은 인플루엔자 A 바이러스 (특히, 군주 H5N1 clade 2.3.4, 조류 군주)에 결합하기에 특히 적절한 펩타이드를 기술한다. 이들 펩타이드는 인플루엔자 A 바이러스의 헤마글루티닌 (HA 단백질)을 표적으로 하며, Zuo 등에 의해 언급된 항체 65C6의 서열로부터 유래한다.
- [0012] 서열번호 51 및 52는 인플루엔자 A 바이러스 (특히, 군주 H5N1 clade 2.3.2.1, 조류 군주)에 결합하기에 특히 적절한 펩타이드를 기술한다. 이들 펩타이드는 일반적으로 이 군주의 변종에서 HA 단백질에서 발견되는 헤마글루티닌 (HA 단백질)의 특이적인 서열, 예를 들어 Bui 등에 의해 언급된 HA 단백질의 서열을 표적으로 한다.
- [0013] 서열번호 53 및 54는 인플루엔자 B 바이러스에 결합하기에 특히 적절한 펩타이드를 기술한다. 이들 펩타이드는 인플루엔자 B 바이러스의 뉴라미다제를 표적으로 하고, Madsen 등에 의해 언급된 바 있다.
- [0014] 서열번호 55 및 56은 리노바이러스 (RV) 및 기타 엔테로바이러스 (EV)에 결합하기에 특히 적절한 펩타이드를 기술한다. 이들 펩타이드는 Hrebik 등, Khan 등, 및 Smith 등에 의해 언급된 항-RV 항체로부터 유래한다.
- [0015] 서열번호 57은 인간 파라인플루엔자 바이러스 (HPIV)(특히, 군주 HIPV1 및 HIPV3)에 결합하기에 특히 적절한 펩타이드를 기술한다. 이 펩타이드는 HPIV의 융합 단백질 (F 단백질)을 표적으로 하며, Caban 등에 의해 언급된 항-HPIV 항체로부터 유래한다.
- [0016] 서열번호 58, 59 및 60은 메타뉴모바이러스 (MPV) 및 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV)(특히, 서브타입 A 및/또는 서브타입 B)에 결합하기에 특히 적절한 펩타이드를 기술한다. 이들 펩타이드는 RSV 및 MPV의 융합 단백질 (F 단백질)을 표적으로 한다. 이들은 항-HPIV 항체로부터 유래하고, Caban 등에 의해 언급된 바 있다.
- [0017] 서열번호 61, 62 및 63은 RSV (특히, 서브타입 A 및/또는 서브타입 B)에 결합하기에 특히 적절한 펩타이드를 기술한다. 이들 펩타이드는 또한 RSV의 융합 단백질 (F 단백질)을 표적으로 하고, Issmail 등, Zhu 등 및 McLellan 등에 의해 언급된 바 있다.
- [0018] 뮤신 결합 모이어티는 서열번호 1 (변형된 트레포일 인자 3, TFF3 (C57K)), 서열번호 14 (네이티브 TFF3), 서열번호 20 (네이티브 TFF1), 서열번호 21 (네이티브 TFF2) 또는 서열번호 22 (자칼린 (jacalin))에 대해 적어도 95%, 특히 적어도 96%, 특히 적어도 97%, 특히 적어도 98%, 특히 적어도 99%, 특히 100%로 동일한 펩타이드를 포함하거나 또는 이러한 펩타이드이다. 이들 펩타이드는 특히 환자의 장 점막을 표적화 하는데 특히 적절하다. TFF3는 기도에서 천연적으로 만들어지는 단백질이다 (Thim et al. 2002).
- [0019] 본 발명에서 청구하는 펩타이드는 호흡기 점액의 자연 장벽 기능을 강화할 수 있다. 호흡기 점액은 호흡기 상피의 표적 세포에 접근하는 호흡기 병원체가 직면하는 일차 물리적 장벽이다. 점액은 높은 점성 및 미생물-결합 특성으로 인해, 신체의 항-미생물 방어 시스템에 중요한 일부이고, 섬모 운동을 통해 흡착된 병원체를 효율적으로 제거한다. 본 발명에서 청구하는 펩타이드는 바이러스 병원체에 대한 결합 부위가 통합되어 항-미생물 특성을 증가시킴으로써 점액을 보강 (점액 증대)하는데 이용할 수 있다. 체류 병원체는 상피 세포층에 도달하기 전 제거될 수 있으며, 그래서 감염을 예방할 수 있다. 이러한 접근방식은 따라서 모듈식 생체모방 펩타이드를 이용해 점액의 항-바이러스 효능을 증가시키고 뒷받침하는 것이다.
- [0020] 점액 증대는 사람을 호흡기 감염으로부터 보호하는 새로운 개념이다. 이런 접근 방식은 다른 (비)-약리학적 조치와 병용해, 비-감염 개체에서 감염 위험과 이미 감염된 경우에는 전파 및 중증 질환의 위험을 낮출 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 청구하는 펩타이드는 기도 뮤신에 부착해 바이러스를 특이적으로 흡착할 수 있는 분자를 이용해 조정가능한 펩타이드-기반의 시스템의 핵심을 이룬다. 펩타이드의 양쪽 파트는 빨리 변화되는 상황에 대응하도록 조정할 수 있다. 이러한 생체 모방적인 접근방식은 점액의 자연 항-바이러스 특성을 보강하고, 펩타이드 성분이 인간 단백질로부터 유래하므로 부작용이 낮은 것으로 여겨진다. 감염 세포에서 방출된 바이러스를 또한 포획해 바이러스 역가와 환경으로의 발산을 낮출 것이므로, 2중 기능성 펩타이드는 또한 감염된 환자에 치료학적으로 이용할 수 있다. 마지막으로, 본 접근 방식은 확립된 항-바이러스 조치와 병용해, 감염 위험 저하를 보조하고 질환 위험을 최소화할 수 있다.
- [0022] 청구하는 펩타이드의 모듈식 구성으로 인해, 펩타이드의 양쪽 기능성 모이어티를 원하는 용도에 맞게 조정할 수

있다.

- [0023] 뮤신 결합 모이어티와 바이러스 결합 모이어티 간에 공유 결합을 확립하는데 적절한 링커는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커이거나, 또는 아미노산 1-20개, 특히 아미노산 2-19, 특히 아미노산 3-18, 특히 아미노산 4-17, 특히 아미노산 5-16, 특히 아미노산 6-15, 특히 아미노산 7-14, 특히 아미노산 8-13, 특히 아미노산 9-12, 특히 아미노산 10-11개를 포함하는 아미노산 링커이다. GT 다이펩타이드와 같은 다이펩타이드가 특히 적절한 링커이다. 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 46 또는 서열번호 47에 대해 적어도 95%, 특히 적어도 96%, 특히 적어도 97%, 특히 적어도 98%, 특히 적어도 99%, 특히 100%로 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이러한 것으로 구성되는 링커가 또한 특히 적절한 링커이다. 서열번호 44는 유연한 링커에 대한 일 예이다. 서열번호 45는 강성 (rigid) 링커의 일 예이다. 서열번호 46은 소르타제 A (Sortase A)를 통한 화학-효소적 커플링 반응으로부터 만들어지는 연결성 펩타이드이다. 서열번호 47은 트랜스글루타미나제를 통한 화학-효소적 커플링 반응으로부터 만들어지는 연결성 펩타이드이다. 바이러스 결합 모이어티 또는 뮤신 결합 모이어티 펩타이드는 γ -글루타밀- ϵ -리실 이소펩타이드 결합을 통해 글루타밀 잔기 (Q7)에 커플링된다.
- [0024] 일 구현예에서, 뮤신 결합 모이어티는 글리코토프 (glycotope) 결합 도메인을 포함하며, N-아세틸글루코사민- α -1,4-갈락토스 (GlcNAc- α -1,4-Gal) 이당류에 적어도 150 μ M, 특히 적어도 100 μ M, 특히 적어도 75 μ M, 특히 적어도 50 μ M, 특히 적어도 25 μ M의 친화성으로, 특히 25 μ M 내지 150 μ M, 특히 50 μ M 내지 125 μ M, 특히 75 μ M 내지 100 μ M 범위의 친화성으로 결합한다. GlcNAc- α -1,4-Gal 이당류는 뮤신 2 (Muc2), 뮤신 5AC (Muc5AC) 및 뮤신 6 (Muc6)과 같은 뮤신에 특이적으로 존재하는 글리코토프이다. 예를 들어, 천연 트레포일 인자 3 (TFF3)는 GlcNAc- α -1,4-Gal 이당류에 대해 56 μ M의 결합 친화성을 가진다 (Jarva et al 2020).
- [0025] 일 구현예에서, 바이러스 결합 모이어티는 뮤신 결합 모이어티의 57번 아미노산에서 뮤신 결합 모이어티와 공유 결합한다. 일 구현예에서, 57번 아미노산은 시스테인 잔기이다. 일 구현예에서, 57번 아미노산은 라이신 잔기이다. 일 구현예에서, 바이러스 결합 모이어티는 뮤신 결합 모이어티의 C-말단에서 뮤신 결합 모이어티와 공유 결합한다. 특히 후자의 경우, 뮤신 결합 모이어티의 57번 위치 (또는 임의의 다른 위치)에 어떤 아미노산이 존재하는지는 바이러스 결합 모이어티의 결합력에 특별히 중요하진 않다.
- [0026] 일 구현예에서, 펩타이드는 바이러스 결합 모이어티를 적어도 2개 포함한다. 이러한 맥락에서, 뮤신 결합 모이어티는 적어도 2종의 바이러스 결합 모이어티들 중 하나 이상에 직접 결합하거나 또는 공유 결합된 링커를 통해 결합된다. 뮤신 결합 모이어티는 또한 하나 보다 더 많은 수의 바이러스 결합 모이어티에 결합할 수도 있다. 이러한 목적에서, 2-분기형 (bifurcated) 링커가 일 구현예에서 특히 유용하다. 이러한 2-분기형 링커는 단일한 뮤신 결합 모이어티를, 커플링한 후 뮤신 결합 모이어티로부터 다소 동일한 거리에 배열된 복수의 바이러스 결합 모이어티들에 커플링하는데 이용할 수 있다.
- [0027] 일 구현예에서, 바이러스 결합 모이어티는 바이러스 스파이크 단백질에 결합하도록 조정된 모이어티이다.
- [0028] 일 구현예에서, 바이러스 결합 모이어티는 펩타이드이다. 일 구현예에서, 바이러스 결합 모이어티는 디펜신 (defensin)과 같은 항-미생물 펩타이드이다. 레트로사이클린 (retrocyclin)이 특히 적절한 디펜신이다. 다른 구현예에서, 바이러스 결합 모이어티는 비-펩타이드성 항-바이러스 잔기, 예를 들어 덴드라이트형 (dendritic) 또는 선형 폴리카보하이드레이트 (polycarbohydrate)이다.
- [0029] 일 구현예에서, 바이러스 결합 모이어티는 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 23, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 35, 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38, 서열번호 39, 서열번호 40, 서열번호 41, 서열번호 42 또는 서열번호 43에 대해 적어도 95%, 특히 적어도 96%, 특히 적어도 97%, 특히 적어도 98%, 특히 적어도 99%, 특히 100%로 동일한 펩타이드를 포함하거나 또는 이러한 펩타이드이다. 이들 서열은 종종 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2 (SARS-CoV-2)에 결합하는데 특히 적절한 바이러스 결합 모이어티에 대한 것이다.
- [0030] 일 구현예에서, 바이러스 결합 모이어티는 펩타이드 잔기 하나 이상에 치환을 가진 펩타이드이다. 일 구현예에서, 펩타이드의 C 말단이 아미노기로 치환된다. 일 구현예에서, 펩타이드의 N 말단이 아세틸기로 치환된다. 일 구현예에서, 펩타이드의 C 말단이 아미노기로 치환되고, 펩타이드의 N 말단이 아세틸기로 치환된다.
- [0031] 일 구현예에서, 바이러스 결합 모이어티는 서열번호 2에 대해 적어도 95%, 특히 적어도 96%, 특히 적어도 97%, 특히 적어도 98%, 특히 적어도 99%, 특히 100%로 동일한 펩타이드이고, 뮤신 결합 모이어티 (1)는 서열번호 1에

대해 적어도 95%, 특히 적어도 96%, 특히 적어도 97%, 특히 적어도 98%, 특히 적어도 99%, 특히 100%로 동일한 트레포일 인자 3 펩타이드이다. 서열번호 2는 과거에 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 1 (SARS-CoV-1)에 높은 친화성으로 결합하는 것으로 이미 밝혀진 (Han et al., 2006), p4로 언급된 펩타이드를 기술한다. SARS-CoV-1과 SARS-CoV-2 간의 구조 차이에도 불구하고, 놀랍게도 p4 펩타이드가 SARS-CoV-2에 결합하는데 매우 적절한 것으로 확인되었다.

[0032] 일 구현예에서, 바이러스 결합 모이어티는 서열번호 3에 대해 적어도 95%, 특히 적어도 96%, 특히 적어도 97%, 특히 적어도 98%, 특히 적어도 99%, 특히 100%로 동일한 펩타이드이고, 무신 결합 모이어티 (1)는 서열번호 1에 대해 적어도 95%, 특히 적어도 96%, 특히 적어도 97%, 특히 적어도 98%, 특히 적어도 99%, 특히 100%로 동일한 트레포일 인자 3 펩타이드이다. 서열번호 3는 과거에 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 1 (SARS-CoV-1)에 높은 친화성으로 결합하는 것으로 이미 밝혀진 (Han et al., 2006), p6으로 언급된 펩타이드를 기술한다. SARS-CoV-1과 SARS-CoV-2 간의 구조 차이에도 불구하고, 놀랍게도 p6 펩타이드가 SARS-CoV-2에 결합하기에 매우 적절한 것으로 확인되었다. 이에, SARS-CoV-2에 대한 p6 펩타이드의 결합 친화성은 p4 펩타이드의 친화성보다 약 2배 높다. 흥미롭게도, p6는 또한 SARS-CoV-2 변종 α 및 δ 에, SARS-CoV-2 우한 야생형 보다 훨씬 더 높은 친화성으로 결합할 수 있다 (표 1 참조).

[0033] 선형 p6 펩타이드에 비해 훨씬 더 높은 SARS-CoV-2에 대한 친화성이 p6 펩타이드의 스테이플드 변이체 (stapled variant)에서 관찰되었다. 일 구현예에서, 바이러스 결합 모이어티는 서열번호 10에 대해 적어도 95%, 특히 적어도 96%, 특히 적어도 97%, 특히 적어도 98%, 특히 적어도 99%, 특히 100%로 동일한 펩타이드이다. 이 펩타이드는 p6 펩타이드의 스테이플드 변이체이다. 이하, 이것은 또한 p6-cyc 또는 p6 (R8)₁₅(S5)₂₂라고도 한다.

[0034] SARS-CoV-2에 대한 여러가지 바이러스 결합 모이어티의 결합 친화성 (해리 상수 Kd로 표시)을 아래 표 1에 요약 기술한다. 이는 마이크로 규모의 열 이동 (microscale thermophoresis, MST)에 의해 결정하였다. p4 및 p6 펩타이드 (후자는 선형 및 고리 형태 둘다)는 현재 유행하는 SARS-CoV-2 변종의 수용체 결합 도메인 수중에 나노 몰 결합 상수로 결합함을 잘 알 수 있다.

[0035] 표 1: 여러가지 바이러스 결합 모이어티들의 특성.

표 1

펩타이드 명칭	서열 ^{*1}	서열번호	SARS-CoV-2 표적 균주	Kd/ μ M	PBS/% ^{*2} 에 서의 나선도	PBS:TFE, 1:1 ^{*3} 에서의 나선도
p4	EEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSS	2	2019-nCov	0.93 $\pm$ 0.21	0	100
p6	EEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSGLGKGDFR	3	2019-nCov	0.45 $\pm$ 0.10	0	39
p6-cyc	EEQAKTFLDKFNHEXEDLFYQXSGLGKGDFR	10	2019-nCov	0.27 $\pm$ 0.14	25	43
p6	상기 참조	3	B.1.1.7 (alpha)	0.32 $\pm$ 0.06	0	39
p6	상기 참조	3	B.1.617.2 (delta)	0.19 $\pm$ 0.09	0	39
p6	상기 참조	3	B.1.1.529 (omicron)	0.28	0	39
^{*1} p6-cyc의 15번 위치에 존재하는 X (X ₁₅)는 알케닐화된 (R)-Ala 잔기이고; p6-cyc의 22번 위치에 존재하는 X (X ₂₂)는 알케닐화된 (S)-Ala 잔기이고; 펩타이드는 X ₁₅ 에서 X ₂₂ 까지 7-운데세닐 잔기를 통해 고리화된다. ^{*2} PBS = 포스페이트-완충 염수 ^{*3} TFE = 트리플루오로에탄올						

[0037] 일 구현예에서, 펩타이드는 서열번호 18 또는 서열번호 19에 대해 적어도 95%, 특히 적어도 96%, 특히 적어도 97%, 특히 적어도 98%, 특히 적어도 99%, 특히 100%로 동일하다. 이들 서열번호는 본 과제를 해결하는데 매우 적절한 특성을 가진 것으로 밝혀진, 합성 및 재조합 TFF-3-p6 펩타이드에 대한 것이다.

[0038] 일 측면에서, 본 발명은 의약제로서 전술한 설명에 따른 펩타이드의 용도에 관한 것이다.

[0039] 일 측면에서, 본 발명은 바이러스 감염의 예방 또는 치료에서 전술한 설명에 따른 펩타이드의 의학적 용도에 관

한 것이다.

- [0040] 일 구현예에서, 치료 또는 예방하고자 하는 바이러스 감염은 SARS-CoV-2 감염이다.
- [0041] 일 측면에서, 본 발명은 치료가 필요한 환자에서 바이러스 감염을 치료 또는 예방하는 의학적 방법에 관한 것이다. 용어 "환자"는 본원에 사용된 바와 같이 인간 또는 동물 환자에 대한 것이다. 포유류가 특히 적절한 환자이다. 본 방법은 전술한 설명에 따른 펩타이드를 환자에게 (예를 들어, 이 펩타이드를 포함하는 의약제 형태로) 투여하는 단계를 포함한다. 투여는, 일 구현예에서, 펩타이드를 환자의 코 또는 입으로 제공함으로써 이루어진다. 이는 특히 펩타이드를 스프레이 투약 형태로 제공함으로써 특히 쉽게 달성할 수 있다. 그래서, 펩타이드는 예를 들어 코 스프레이 또는 흡입 스프레이와 같은 에어로졸로서 투여할 수 있다. 투여시, 환자의 점막과 접촉하게 될 것이고, 펩타이드는 뮤신 결합 모이어티를 통해 점막에 결합 가능해질 것이다. 이후, 펩타이드는 환자의 점막에 결합된 형태로 체류할 것이고, 이의 바이러스 결합 모이어티로 인해 환자가 흡입한 공기로부터 바이러스를 "여과"할 수 있을 것이다.
- [0042] 일 측면에서, 본 발명은 필요한 환자에서 점액을 증가시키는 의학적 방법에 관한 것이다. 이 방법은 전술한 설명에 따른 펩타이드를 환자에게 (예를 들어, 이 펩타이드를 포함하는 의약제 형태로) 투여하는 단계를 포함한다.
- [0043] 일 측면에서, 본 발명은 전술한 설명에 따른 펩타이드를 약제학적 활성 성분으로 포함하는 의약제에 관한 것이다. 이 의약제는 다른 약제학적 활성 성분을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 펩타이드가 유일한 약제학적 활성 성분이다.
- [0044] 일 구현예에서, 의약제는 코 스프레이 또는 흡입 스프레이와 같은 에어로졸로서 투여할 수 있도록 제형화된다. 그래서, 의약제 (그리고 약제학적 활성 성분으로서 펩타이드)는 이를 투여하면 비인두 영역에서 점막과 직접 접촉한다. 이후, 이는 전술한 바와 같이 점액 증가로 이어진다. 그 결과, 환자의 점액은, (환경으로부터 이를 흡입하거나 또는 환자 신체의 바이러스-감염된 세포로부터 이를 내뿜으로써) 환자가 직면한 바이러스에 결합해 이를 제거하도록 잘 준비된다.
- [0045] 일 측면에서, 본 발명은 전술한 설명에 따른 펩타이드의 제조 방법에 관한 것이다. 이 방법은 다음과 같이 설명되는 단계들을 포함한다. 첫째, 바이러스 결합 모이어티 전구체를 제1 뮤신 결합 모이어티 전구체와 반응시킨다. 이 맥락에서, 제1 뮤신 결합 모이어티 전구체는 최종 뮤신 결합 모이어티의 제1 파트를 포함한다. 이 반응으로 펩타이드 전구체가 만들어진다.
- [0046] 다음으로, 펩타이드 전구체를 제2 뮤신 결합 모이어티 전구체와 반응시킨다. 제2 뮤신 결합 모이어티 전구체는 뮤신 결합 모이어티의 제2 파트를 포함한다. 이러한 제2 반응 단계의 결과로 최종 펩타이드가 만들어진다. 물론, 기타 중간 반응 단계 역시 수행될 수 있다. 예를 들어, 뮤신 결합 모이어티를 뮤신 결합 모이어티 전구체 2개 이상으로 분할하는 것도 가능하다. 그래서 개개 뮤신 결합 모이어티 전구체를 이미 형성된 펩타이드 전구체와 차례로 반응시켜, 최종적으로 펩타이드를 제조한다.
- [0047] 일 구현예에서, 바이러스 결합 모이어티 전구체는 최종 펩타이드의 뮤신 결합 모이어티에의 공유 결합을 확립하는 4-펜티노익 모이어티 (4-pentynoic moiety)를 포함한다. 이 4-펜티노익 모이어티는 최종 펩타이드에 여전히 (완전히 또는 일부) 존재할 수 있다. 이는 일 구현예에서 바이러스 결합 모이어티와 뮤신 결합 모이어티 사이의 링커로 작용할 수 있다.
- [0048] 일 구현예에서, 펩타이드는 바이러스 결합 모이어티와 뮤신 결합 모이어티 사이의 링커로 작용하는 트리아졸 잔기를 포함한다. 일 구현예에서, 펩타이드는 바이러스 결합 모이어티와 뮤신 결합 모이어티 사이에 링커로 작용하는 폴리에틸렌 글리콜 잔기를 포함한다. 이러한 폴리에틸렌 글리콜 잔기는 일 구현예에서 트리아졸 잔기와 조합해 링커를 형성한다.
- [0049] 일 구현예에서, 제1 뮤신 결합 모이어티 전구체는 뮤신 결합 모이어티의 전체 아미노산들 중 절반 미만을 포함한다. 만일 뮤신 결합 모이어티 전구체 단 2종만 사용된다면, 제2 뮤신 결합 모이어티 전구체가 뮤신 결합 모이어티의 전체 아미노산들 중 절반보다 많이 포함한다. 구체적인 예로, 제1 뮤신 결합 모이어티 전구체는 뮤신 결합 모이어티의 아미노산 36-59를 포함하고, 이것은 이러한 구현예에서 트레포일 인자 3 펩타이드이다. 아울러, 제2 뮤신 결합 모이어티 전구체는 뮤신 결합 모이어티의 아미노산 1-35를 포함한다. (뮤신 결합 모이어티의 C-말단 파트에 해당하는) 제1 뮤신 결합 모이어티 전구체를 바이러스 결합 모이어티와 반응시킨 후, (뮤신 결합 모이어티의 N-말단 파트에 해당하는) 제2 뮤신 결합 모이어티 전구체를 제1 뮤신 결합 모이어티 전구체와 바이러스 결합 모이어티로 된 이미 형성된 작제물 (즉, 펩타이드 전구체)과 반응시킨다. 그 결과, 최종 펩타이드가

만들어진다.

[0050] 펩타이드에 대한 모든 구현예들은 임의의 요망하는 방식으로 조합될 수 있으며, 개별적으로 또는 임의의 방식으로 용도, 의약제 및 여러가지 방법으로 이행될 수 있다. 여러가지 용도에 대한 모든 구현예들은 임의의 요망하는 방식으로 조합될 수 있으며, 개별적으로 또는 임의의 방식으로 펩타이드, 각각의 다른 용도로, 의약제로 또는 여러가지 방법으로 이행될 수 있다. 마찬가지로, 의약제에 대한 모든 구현예들은 임의의 요망하는 방식으로 조합될 수 있으며, 개별적으로 또는 임의의 방식으로 펩타이드, 각각의 다른 용도로, 및 여러가지 방법으로 이행될 수 있다. 아울러, 여러가지 방법에 대한 모든 구현예는 임의의 요망하는 방식으로 조합될 수 있으며, 개별적으로 또는 임의의 방식으로 펩타이드, 여러 용도로 및 각각의 기타 방법으로 이행될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 본 발명의 측면들에 대한 추가적인 상세 내용이 예시적인 구현예와 첨부된 도면을 참조하여 아래에서 설명될 것이다. 도에서:

도 1A는 2중 기능성 펩타이드에 대한 제1 구현예의 구조를 개략적으로 도시한다;

도 1B는 2중 기능성 펩타이드에 대한 제2 구현예의 구조를 개략적으로 도시한다;

도 2A는 서열번호 15에 해당하는 제1 묶임 결합 모이어티 전구체에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 2B는 서열번호 17에 해당하는 제2 묶임 결합 모이어티 전구체에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 2C는 서열번호 17에 해당하는 바이러스 결합 모이어티에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 3은 도 2A 및 2B의 제1 묶임 결합 모이어티 전구체 및 제2 묶임 결합 모이어티 전구체로부터 제조된 묶임 결합 모이어티와 도 2C의 바이러스 결합 모이어티로부터 제조된 바이러스 결합 모이어티를 포함하는 서열번호 18에 해당하는 펩타이드에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 4는 서열번호 4에 해당하는 바이러스 결합 모이어티에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 5는 서열번호 5에 해당하는 바이러스 결합 모이어티에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 6은 서열번호 6에 해당하는 바이러스 결합 모이어티에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 7은 서열번호 7에 해당하는 바이러스 결합 모이어티에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 8은 서열번호 8에 해당하는 바이러스 결합 모이어티에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 9는 서열번호 9에 해당하는 바이러스 결합 모이어티에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 10은 서열번호 10에 해당하는 바이러스 결합 모이어티에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 11은 서열번호 11에 해당하는 바이러스 결합 모이어티에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 12는 서열번호 12에 해당하는 바이러스 결합 모이어티에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 13은 서열번호 13에 해당하는 바이러스 결합 모이어티에 대한 일 구현예로서 1차 구조를 도시한다;

도 14는 p6 펩타이드와 여러가지 SARS-CoV-2 변종 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 15는 서열번호 18에 해당하는 2중 기능성 합성 TFF3-p6 펩타이드와 여러가지 SARS-CoV-2 변종 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 16은 서열번호 23에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 17은 서열번호 24에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 18은 서열번호 25에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 19는 서열번호 26에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 20은 서열번호 28에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 21은 서열번호 29에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 22는 서열번호 30에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 23은 서열번호 31에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 24는 서열번호 32에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 25는 서열번호 33에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 26은 서열번호 34에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 27은 서열번호 35에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 28은 서열번호 36에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 29는 서열번호 37에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 30은 서열번호 38에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 31은 서열번호 39에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 32는 서열번호 40에 해당하는 p4 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 33은 서열번호 41에 해당하는 p6 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 34는 서열번호 42에 해당하는 p6 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 35는 서열번호 43에 해당하는 p6 펩타이드와 SARS-CoV-2 (2019-nCoV)의 수용체 결합 도메인 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다;

도 36은 서열번호 19에 해당하는 2중 기능성 재조합 TFF3-p6 펩타이드와 여러가지 SARS-CoV-2 변종 간의 결합 친화성을 나타낸 도표를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052]

도 1A는 2중 기능성 펩타이드의 제1 구현예, 즉 TFF3-p6의 구조를 개략적으로 도시한 것이다. 이것은 트레포일 인자 3 (TFF3) 펩타이드 1이 뮤신 결합 모이어티이고 p6 펩타이드 2가 바이러스 결합 모이어티인, 펩타이드이다. TFF3 펩타이드 1은 서열번호 1에 해당하는 1차 구조를 가진다. p6 펩타이드 2는 서열번호 3에 해당하는 1차 구조를 가진다. p6 펩타이드 2는 TFF3 펩타이드의 라이신 57에 공유 결합한다.

[0053]

도 1A는 2중 기능성 펩타이드에 대한 대안적인 구현예를 도시한다. 본 도와 이하 모든 도에서, 비슷한 요소들은 동일한 숫자를 참조하여 표시될 것이다. 본원에서, p6 펩타이드 2는 TFF3 펩타이드 1의 C 말단에 공유 결합된다.

- [0054] TFF3-p6의 합성은 아래에서 더 상세히 설명될 것이다.
- [0055] TFF3의 제조에서 Braga Emidio et al. 2021의 프로토콜은 다음과 같다. Braga Emidio 등에 의해 발표된 합성 경로와는 대조적으로, 57번 위치에 시스테인을 치환함으로써 아지도 라이신을 TFF3에 도입하였다.
- [0056] 제1 바이러스 결합 모이어티 전구체에 대한 구현예로서 **TFF3(36-59)(C57AzK)**는 Rink 아미드 수지에서 57번 위치에 아지도 라이신 (AzK)에 상응하는 빌딩 블록을 사용해 SPPS에 의해 전체 제조하였다. $\text{TFF3}_{(36-59)}\text{C57AzK} [\text{M}+\text{H}]^+ = 2825.31 \text{ g/mol}$, $[\text{M}+2\text{H}]^{3+}/3 = 943.7 \text{ g/mol}$. 1차 구조를 도 2A에 예시한다.
- [0057] 제2 바이러스 결합 모이어티 전구체에 대한 구현예로서 **TFF3(1-35)-Nbz**는 Rink 아미드 수지에서 합성하였으며, 먼저 일반적인 커플링 방법 (다이메틸포름아미드 (DMF) 중의 5 당량 (eq)의 Fmoc-Dbz, 4.9 eq 헥사플루오로포스페이트 아자벤조트리아졸 테트라메틸 우로늄 (HATU), 10 eq N,N-다이이소프로필에틸아민 (Dipea))을 통해 3-Fmoc-4-다이아미노벤조산 (Fmoc-Dbz)의 0.2M 용액을 제조하기에 충분한 3-플루오레닐메톡시카르보닐-4-다이아미노벤조산 (Fmoc-Dbz)으로 관능화하였다. 그 후, 일반적인 고상 펩타이드 합성 (SPPS)을 수행하였다. 마지막 잔기는 Boc 보호된 아미노산으로 첨가하였다. 수지에서 펩타이드 조립을 완료한 후, p-니트로페닐클로로포르메이트 (5 eq, CH_2Cl_2 , 45분)를 이용해 아실화하여 C-말단을 활성화한 다음 염기 (Dipea, 0.5 M / DMF 20분)를 첨가해 아닐리드의 분자내 공격을 촉진해 수지-결합된 벤즈이미다졸리논을 제조하였다. 트리플루오로아세트산 (TFA):1,2-에탄다이티올 (EDT): H_2O : 트리이소프로필실란 (TIPS)을 94:2.5:2.5:1.0으로 이용해 수지로부터 절단하고, 조산물을 0.1% TFA 첨가된 30% 아세토니트릴 (MeCN)/ H_2O 3 ml에 용해한 다음 여과하고, 정제하기 위해 분취용 고 성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 시스템에 주입하였다. TFF3(1-35)-Nbz . 3980.4: M^+ , 996.1: $(\text{M}+4\text{H})^{4+}/4$. 1차 구조를 도 2B에 예시한다.
- [0058] 바이러스 결합 모이어티의 일 구현예로서 **펜티노익-(PEG)₂-p6**는 Rink 아미드 수지 상에서 2개의 PEG 단위까지 SPPS에 의해 제조하였다. 그 후, 4--펜티논산을 수동으로 커플링하였다 (0.2 M 4-펜티논산 용액을 만들기 위해 충분한 DMF 중의 5 eq 4-펜티논산, 4.9 eq HATU, 10 eq Dipea). 커플링은 1.5시간 동안 2번 수행하였다. 그런 후, 펩타이드를 95:2.5:2.5의 TFA: H_2O :TIPS를 이용해 절단한 다음 분취용 HPLC에 의해 정제하였다. $\text{Penty-p6} [\text{M}+\text{H}]^+ = 3975.90 \text{ g/mol}$, $[\text{M}+2\text{H}]^{3+}/3 = 994.9 \text{ g/mol}$. 1차 구조를 도 2C에 예시한다.
- [0059] 소형 바이얼에서, CuSO_4 (10 eq)를 1 mM 용액으로부터 첨가하여 THPTA (50 eq)와 혼합하였다. 기타 시약과 혼합하면서 유기금속 복합체를 형성시켰다.
- [0060] 펩타이드 전구체를 아지도 라이신 57과 펜티노익-(PEG)₂-p6의 알킨 기 간에 클릭 화학을 통해 형성하기 위해, 1.5 ml 에펜도르프 튜브에서 **펜티노익-(PEG)₂-p6** (1.5 eq) 및 **TFF3(36-59)(C57AzK)** (1.0 eq)를 반응 완충제 (10 mM NH_4HCO_3)에 용해하였다. 다음으로, 200 mM 원액으로부터 아미노구아니딘 (100 eq)을 첨가하였다. 그 후, CuSO_4 와 THPTA의 혼합물을 반응 혼합물에 첨가하였다. 마지막으로, 소듐 아스코르베이트 (100 eq)를 반응물에 첨가하고, HCl/KOH에 의해 pH 8.0으로 적정하였다. 질소를 반응 튜브로 유입하였다. 그런 후, 반응 튜브를 바로 밀봉하였다. 12시간 동안 37°C에서 교반하면서 인큐베이션하였다. 30% MeCN/ H_2O 20 μl 에 반응 조산물 1 μl 를 용해한 다음 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 (TCEP)을 30 mM 농도가 되게 첨가해, 대조군을 준비하였다. 37°C에서 5분간 인큐베이션한 다음 샘플을 HPLC-질량 분광 측정 (HPLC-MS)에 의해 분석하였다.
- [0061] **TFF3(1-35)-Nbz**와 **TFF3(36-59)(C57K-Pentyp6)** 간의 네이티브 화학 라이게이션을 위해, TFF3(1-35)-Nbz (1.0 eq) 및 $\text{TFF3(36-59)(C57K-Pentyp6)}$ (0.8 eq)을 반응 완충제 (6M 구아니디늄 하이드로클로라이드, 100 mM Na_2HPO_4 및 30 mM TCEP, HCl/NaOH로 pH 7.0으로 적정)에 용해하였다. 그 후, 2-머캅토에탄설토네이트 (메스나 (mesna))(100 eq)를 첨가하여, 반응물을 실온에서 4시간 동안 교반 하에 유지시켰다. 반응 조산물 1 μl 을 30% 아세토니트릴 (MeCN)/ H_2O 20 μl 에 용해한 다음 TCEP를 30 mM 농도에 도달할 때까지 첨가하였다. 37°C에서 5분간 인큐베이션한 후, 샘플을 HPLC-MS에 의해 분석하였다. 티오에스테르가 미량 미만으로 남으면, 30% MeCN/ H_2O + 0.1% TFA를 첨가해 반응물의 부피를 3 ml까지 증가시키고, 여과한 다음 정제하기 위해 분취용 HPLC 시스템에 주입하였다. $[\text{M}+\text{H}]^+ = 10600.96 \text{ g/mol}$, $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}/8 = 1326.1 \text{ g/mol}$, $[\text{M}+9\text{H}]^{9+}/9 = 1178.8 \text{ g/mol}$ $[\text{M}+10\text{H}]^{10+}/10 =$

1061.1 g/mol의 TFF3-C57K(Penty-p6)를 수득하였다. 1차 구조를 도 3에 예시한다.

[0062] 네이티브 TFF3는 또한 재조합 방식으로 제조하였다. 이를 위해, Jarva et al., 2020의 프로토콜을 따랐으며, 조정하였다.

[0063] 다음으로, TFF3 서열을 정제 태그를 도입하도록 5' 단부에서 연장하였다. 그 후, 생산물을 서열- 및 라이게이션-독립적인 클로닝 (SLIC)을 이용한 박테리아 발현을 위해 플라스미드 pET28b에 통합하였다. 최종 플라스미드는 서열분석을 통해 승인하고, 박테리아 발현을 위해 BL21CodonPlus(DE3) RIPL (R = 아르기닌, I = 이소류신 Ile, P = 프롤린, L = 루신) 세포로 형질전환하였다. 이는 아래에서 더 상세히 설명될 것이다.

[0064] **형질전환된 *E. coli* BL21CodonPlus(DE3) RIPL의 지수 증식기 스톱-배양물의 제조**

[0065] *E. coli* BL21CodonPlus(DE3) RIPL 세포에 해당 플라스미드를 형질전환하였다. 세포를 50 µg/ml 스트렙토마이신, 25 µg/µl 클로람페니콜 및 50 µg/ml 카나마이신이 함유된 용원성 브로스 (LB) 아가 플레이트에 도말하여, 37°C 에서 밤새 인큐베이터에서 배양하였다. 콜로니 하나를 취해 50 µg/ml 스트렙토마이신, 25 µg/µl 클로람페니콜 및 50 µg/ml 카나마이신이 함유된 LB 배지에 접종하여, 회전 진탕 배양기에서 250 rpm 및 37°C 하에 밤새 배양 하였다. TB (Terrific broth) 배지에 LB 배양물을 600 nm에서 측정된 (OD₆₀₀) 출발 광학 밀도 0.02로 접종하고, 회전 진탕 배양기에서 250 rpm 및 37°C 하에 배양하였다. 배양물은 OD₆₀₀ >2.867까지 배양하였다. 이 배양물에 7.527% DMSO를 첨가하고, 혼합물 (사전-배양물)을 액체 질소에서 급랭해 향후 사용시까지 -80°C에서 보관하였다.

[0066] **단백질 발현 및 세척**

[0067] TB 배지에 사전-배양물을 OD₆₀₀ 0.04로 접종하였다. 배양물은 회전 진탕 배양기에서 250 rpm 및 26°C 하에 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 박테리아 배양물을 얼음 위에 두어 15분간 냉각시키고, 원심분리기에서 3000 g 하에 15분간 스핀 다운하였다. 상층액은 버리고, 세포는 세척 완충제 (HEPES based, pH 7) + DNase I + 페닐메틸설포닐플루오라이드 (PMSF)에 재현탁하였다. 현탁물을 3000 g 하에 15분간 스핀 다운시키고, 상층액은 폐기하였다. 세척 단계를 반복하였다.

[0068] 표적 단백질을 His-태그 및 Strep-태그 (스트렙타비딘에 대한 결합 모티프) 정제를 이용한 탠덤 친화성 정제를 통해 정제하였다. 프로테아제 절단부는 컬럼에서 단백질 용출을 가능하게 한다. 용출된 단백질을 투석하고, SDS-PAGE에서 검증하였다.

[0069] **락탐-스테이플드 펩타이드의 제조**

[0070] 모든 락탐-스테이플드 펩타이드는 Rink-아미드 수지 상에서 제조하였다. 이소펩타이드 결합 형성을 위한 빌딩 블록은 N-α-Fmoc-N-ε-4-메틸트리틸-L-라이신 (이하, MttK라 함) 및 N-α-Fmoc-L-아스파르트산 β-2-페닐이소프로필 에스테르 (이하, PhiPr이라 함)였다. SPPS 후, 수지에 결합된 펩타이드에 다이클로로메탄 (DCM) 중의 2% TFA로 처리해 4-메틸트리틸 및 2-페닐이소프로필 탈보호를 유도하였다. 그 후, 이소펩타이드 결합 형성이 이루어지게 한 다음 DMF 중의 HATU 0.9당량 및 DIPEA 2당량을 첨가하였다. DMF 및 DCM에서 잘 행군 후, 커플링 각테일을 2차로 첨가하였다. TFA:H₂O:TIPS를 95:2.5:2.5로 이용해 수지에서 펩타이드를 절단시키고, 차가운 에테르로 석출하였다. 그 후, 펩타이드를 여과한 다음 건조하여 30% MeCN/H₂O + 0.1% TFA에 최종 부피 3 ml로 다시 용해하였다. 샘플을 여과한 후 정제하기 위해 분취용 HPLC 시스템에 주입하였다.

[0071] 락탐-스테이플드 펩타이드의 제조된 구조를 도 4-9에 예시한다.

[0072] 여러가지 사이클릭 바이러스 결합 모이어티의 SARS-CoV-2에 대한 결합 친화성 (해리 상수 K_d로 표시)을 아래 표 2에 요약 개시한다. 이는 마이크로 규모의 열 이동 (MST)에 의해 결정하였다. 사이클릭 p6 펩타이드는 마이크로물 결합 상수로 SARS-CoV-2에 결합함을 잘 알 수 있다.

[0073] 표 2: 여러가지 사이클릭 바이러스 결합 모이어티들의 특성.

표 2

펩타이드 명칭	서열	서열 번호	치환	나선도 /%	Kd/ µM
p6(K) ₄ (D) ₈	EEQ(K ₄)KTF(D ₈)DKFNHEAEDLFYQSSGLGKGDFR	4	A4K, L8D	2	n.d.

p6(K) ₈ (D) ₁₂	EEQAKTF(K ₈)DKF(D ₁₂)HEAEDLFYQSSGLGKGDFR	5	L8K, N12D	10	5 ± 3
p6(K) ₁₁ (D) ₁₅	EEQAKTFLDK(K ₁₁)NHE(D ₁₅)EDLFYQSSGLGKGDFR	6	F11K, A15D	n.d.	n.d.
p6(K) ₁₅ (D) ₁₉	EEQAKTFLDKFNHE(K ₁₅)EDL(D ₁₉)YQSSGLGKGDFR	7	A15K, F19D	n.d.	n.d.
p6(K) ₁₈ (D) ₂₂	EEQAKTFLDKFNHEAED(K ₁₈)FYQ(D ₂₂)SGLGKGDFR	8	L18K, S22D	8	n.d.
p6(K) _{8,18} (D) _{12,22}	EEQAKTF(K ₈)DKF(D ₁₂)HEAED(K ₁₈)FYQ(D ₂₂)SGLGKGDFR	9	A4K, L8D, L18K, S22D	28	10 ± 1
n.d. = 결정 안됨					

- [0075] 폐환 상호교환 (ring closing metatesis, RCM)에 의한 스테이플드 바이러스 결합 모이어티의 제조
- [0076] RCM 반응을 위해 다음과 같은 비-표준 아미노산들을 이용하였다:
- [0077] S5Fmoc = Fmoc-(S)-2-(4-펜테닐)Ala-OH
- [0078] R8Fmoc = Fmoc-(R)-2-(7-옥테닐)Ala-OH
- [0079] 이들 아미노산 (AA)의 경우 커플링 조건은 다음과 같다: AA 3.0 당량, HATU 2.9 eq, DIPEA 6 eq. AA에 대해 DMF를 0.2 M 농도가 되도록 첨가하였다.
- [0080] 모든 천연 아미노산의 경우, 커플링 조건은 다음과 같다: AA 5.0 eq, HATU 4.9 eq, DIPEA 10 eq. 각 AA에 대해 DMF를 0.2 M 농도가 되도록 첨가하였다.
- [0081] 검사 절단을 통해 비-스테이플드 펩타이드의 질량을 검증한 후, RCM을 수행하였다. 수지를 DCM (3 x 1 min) 1 ml 및 1,2-다이클로로에탄 (DCE) (3 x 1 min) 1 ml로 연속적으로 행구었다. 수지 (50 µmol)에 DCE 중의 6 mM Grubbs 1세대 촉매 용액 1 ml를 처리하였다 (수지 치환에 대해 20 mol%). 수득한 현탁물을 20-25℃에서 2시간 동안 질소 하에 계속 버블링하면서 교반하였다. 그 후, 용매를 배출시켰다. 그 후, Grubbs 촉매를 2번 첨가하였다. 그런 후, 수지를 DCE (3 x 1 min) 1 ml로 행군 후 DCM (3 x 1 min) 1 ml로 행구고, 질소 흐름 하에 건조시켰다. TFA:H₂O:TIPS를 95:2.5:2.5로 이용해 수지로부터 펩타이드 절단을 수행하였다. 조산물을 차가운 에테르로 석출시켜 여과한 후 건조하였다. 생산물을 30% MeCN/H₂O + 0.1% TFA에 최종 부피 3 ml로 재용해하였다. 샘플을 여과한 후 정제하기 위해 분취용 HPLC 시스템에 주입하였다.
- [0082] Fmoc-탈보호된 수지를 N-메틸-2-피롤리돈 (NMP) 1 ml에서 10분간 팽윤시키고 용매를 배출시켜, RCM 생산물에 대해 아세틸화를 수행하였다. 그런 후, NMP 중의 무수아세트산 및 DIPEA 용액 (85:315:1,600, 부피) 2 ml를 준비해 수지에 첨가하였다. 이 혼합물을 질소 버블링하면서 부드럽게 교반한 다음 용매를 배출시켰다. DCM 및 DMF로 잘 행구었다. 마지막으로, 절단 및 정제를 전술한 바와 같이 수행하였다.
- [0083] 탈보호한 후, 펩타이드는 i) S5 잔기 (알케닐화된 S-알라닌) 및 R8 잔기 (알케닐화된 R-알라닌) 또는 ii) S5 잔기 2개를 함유하였다. 알케닐 브릿지가 i) S5 잔기와 R8 잔기 간에 또는 ii) S5 잔기 2개 간에 형성되었다. 이 알케닐 브릿지는 S5 잔기 및 R8 잔기의 경우 7-운데세닐 잔기이다. 아울러, S5 잔기 2개의 경우 알케닐 브릿지는 4-옥테닐 잔기이다.
- [0084] RCM-제조된 스테이플드 펩타이드의 제조된 구조를 도 10-13에 예시한다.
- [0085] SARS-CoV-2에 대한 결합 친화성 (해리 상수 K_d로 표시)을 비롯한 여러가지 사이클릭 바이러스 결합 모이어티의 특성을 아래 표 3에 요약 개시한다. 결합 친화성은 마이크로 규모의 열 이동 (MST)을 통해 결정하였다. 사이클릭 p6 펩타이드 p6(R8)₁₅(S5)₂₂는 SARS-CoV-2에 나노몰 결합 상수로 결합함을 잘 알 수 있다.
- [0086] 표 3: 여러가지 사이클릭 바이러스 결합 모이어티들의 특성.

표 3

펩타이드 명칭	서열	서열 번호	치환	나선도/%	K _d / µM
p6(R8) ₁₅ (S5) ₂₂	EEQAKTFLDKFNHE (R8)EDLFYQ(S5)SGLGKGDFR	10	A15(R8), S22(S5)	28	0.275±0.142
Ac-p6(R8) ₁₅ (S5) ₂₂	AcEEQAKTFLDKFNHE(R8)EDLFYQ(S5)SGLGKGDFR	11	A15(R8), S22(S5)	25	n.d

p6(S5) ₁₈ (S5) ₂₂	EEQAKTFLDKFNHEAED(S5)FYQ(S5)SGLGK GDFR	12	L18(S5), S22(S5)	4	n.d.
Ac-p6(S5) ₁₈ (S5) ₂₂	AcEEQAKTFLDKFNHEAED(S5)FYQ(S5)SGL GKGDFR	13	L18(S5), S22(S5)	10	n.d.
n.d. = 결정 안됨					

[0088] **펩타이드 결합 친화성 측정**

[0089] 친화성 측정은 마이크로 규모의 열 이동 (MST)을 이용해 수행하였다. 여기서, 화학적 및 열 확산의 비율 (소렛 효과)은 결합된 리간드 (여기서, 펩타이드)의 개수에 따라 표지된 화합물 (여기서 RBD)의 이동성에 영향을 미친다. MST에서, 적외선 레이저는 국소 열점을 유발하였고, 이어 온도 구배가 형성되었다. 분자들은 물-단백질 계면에서 이의 특징에 따라 이러한 구배를 따라 이동한다. 결합된 리간드는 관찰된 단백질에서 정렬된 물 셀의 변화를 야기하고, 유효 표면 전위를 변경하거나 또는 추가할 수도 있다. 이는 열 이동 진폭 (thermophoresis amplitude)의 증가 또는 감소로 표시되는 열 이동 거동에 변화를 일으킨다. 여러가지 리간드 농도 부가시 형광 변화 (y 축)를 리간드 농도에 대한 도표로 작성할 수 있다. 최대 형광 변화의 1/2 (포화 곡선에서의 변곡점)로부터 단백질-리간드 상호작용의 Kd를 질량-작용 법칙을 적용해 도출할 수 있다 (Jerabek-Willemsen et al. 2014).

[0090] RBD 표지 및 정제를 2세대 NHS-레드 표지 키트 (NanoTemper)를 이용해 수행하였다. RBD 용액을 물로 10 μM까지 희석하고, pH8.0 소듐 카보네이트 수용액에서 재완충화한 다음 300 μM 적색 염료에서 암 조건 하에 인큐베이션하였다. 크기 배제 크로마토그래피를 통해 미반응 염료가 없는 표지된 RBD를 입수할 수 있었다. 표지 효율은 분광 측정을 통해 대략 1:1 (단백질:염료)인 것으로 분석되었다. 친화성 측정은 0.05% (v/v) Tween20이 첨가된 더블 베코의 포스페이트 완충 염수 (DPBS) (Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 무첨가) 및 프리미엄 모세관 (NanoTemper)에서 수행하였다.

[0091] 이후, 각 펩타이드를 희석제로서 PBS + 0.05% Tween20를 이용해 1:1로 16회 연속 희석하고 각각 최종 부피 10 μl를 이용해 MST를 측정하였다. 각 희석 샘플은 이후 10 nM 표지된 RBD 원액 10 μl와 함께, 즉 모든 샘플에서 표지된 표적 단백질을 5 nM 농도로 항상 유지시켜, 인큐베이션하였다.

[0092] MST 신호를 NanoTemper Technologies Monolith NT.115 Pico 장치에서 여기 전력 20% 및 MST 전력 40% 하에 획득하였다. 신호는 IR-레이저 개시 후 1.5초에 분석하였고, 수득한 데이터는 이전에 확인된 바와 같이 피팅하였다 (Bhatia et al. 2017). 이러한 조건은 모든 측정 샘플들에서 동일하게 유지하였다.

[0093] **p6 대 RBD의 친화성 측정 (SARS-CoV-2, Omicron B.1.1.529)**

[0094] 아울러, 화학 합성한 p6 펩타이드 (서열번호 3)를 일정한 농도 (5 nM)의 SARS-CoV-2 오미크론 변종 (균주 B.1.1.529)의 형광 표지된 RBD에 대해 타이틀레이션하였다. 해리 상수 (Kd) 280 nM이 결정되었다. 즉, p6 펩타이드는 SARS-CoV-2의 오미크론 변종에 대해 높은 결합 친화성을 나타내었다.

[0095] 도 14는 SARS-CoV-2의 야생형 (●), 알파 변종 (○), 델타 변종 (△) 및 오미크론 변종 (□)으로부터 유래한 형광 표지된 수용체 결합 도메인 (RBD)에 대해 MST를 이용한, 이전에 기술한 (서열번호 3에 따른) p6 펩타이드의 친화성 특징 결과를 도시한다 (야생형, 알파 변종 및 델타 변종: N=3, 오차 막대는 SEM을 표시함). p6 펩타이드는 모든 SARS-CoV-2 변종/균주에 높은 친화성으로 결합함을 잘 알 수 있다 (이들 실험의 정량적인 결과는 표 1을 참조함).

[0096] **p4 유도체 및 p6 유도체**

[0097] 추가적인 p4 유도체 및 p6 유도체 여러 개를 합성하고, 수용체 결합 도메인에 대한 이들 p4 및 p6 유도체의 친화성을 p6 펩타이드에 대해 상기 설명한 바와 같은 MST 실험으로 검사하였다.

[0098] p4 유도체들 모두 Sarto et al. 2022에 언급된 바와 같이 합성하였다. p6 유도체 p6-rigid, p6-dis 및 p6-rigid-dis는 PSL (Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg)에서 TFA-염으로 합성하였다. 이들 펩타이드가 입수되면 PBS 중에 재구성한 다음 액체 질소에서 급랭한 후 향후 사용시까지 -80℃에서 보관하였다.

[0099] 표 4는 여러 검사 p4 유도체와 친화성 측정으로 수득한 해리 상수를 열거한다. 모든 펩타이드들의 시스테인 잔기는 이의 정상적인 환원된 상태이다. 친화성 측정 결과를 또한 도 16-32에 예시한다.

[0100] 표 4: p4 유도체 (바이러스 결합 모이어티)의 특성.

표 4

펩타이드 명칭	서열	서열번호	SARS-CoV-2 표적 균주	Kd/ μM	95% CI / μM ^{*4}
p4C2	EEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSS	23	2019-nCov	0.034	[0.02, 0.056]
p4C3	EECAKTFLDKFNHEAEDLFYQSS	24	2019-nCov	0.042	[0.024, 0.071]
p4C4	EEQCKTFLDKFNHEAEDLFYQSS	25	2019-nCov	1.298	[0.31, 6.241]
p4C5	EEQACTFLDKFNHEAEDLFYQSS	26	2019-nCov	2.141	[0.557, 7.241]
p4C6	EEQAKCFLDKFNHEAEDLFYQSS	27	2019-nCov	n.d.	n.d.
p4C7	EEQAKTCLDKFNHEAEDLFYQSS	28	2019-nCov	1.941	[0.791, 5.117]
p4C8	EEQAKTFCDKFNHEAEDLFYQSS	29	2019-nCov	0.281	[0.179, 0.432]
p4C9	EEQAKTFLCKFNHEAEDLFYQSS	30	2019-nCov	3.226	[1.901, 5.501]
p4C10	EEQAKTFLDCFNHEAEDLFYQSS	31	2019-nCov	0.331	[0.11, 0.958]
p4C11	EEQAKTFLDKCNHEAEDLFYQSS	32	2019-nCov	0.012	[0.006, 0.021]
p4C12	EEQAKTFLDKFCHEAEDLFYQSS	33	2019-nCov	2.048	[1.026, 4.409]
p4C13	EEQAKTFLDKFNCEAEDLFYQSS	34	2019-nCov	0.028	[-0.012, 2.55]
p4C4,8	EEQCKTFCDKFNHEAEDLFYQSS	35	2019-nCov	0.059	[0.04, 0.085]
p4C8,12	EEQAKTFCDKFCHEAEDLFYQSS	36	2019-nCov	0.047	[0.007, 0.348]
p4C11,15	EEQAKTFLDKCNHECEDLFYQSS	37	2019-nCov	0.068	[0.047, 0.099]
p4C15,19	EEQAKTFLDKFNHECEDLCYQSS	38	2019-nCov	0.238	[0.155, 0.371]
p4C18,22	EEQAKTFLDKFNHEAEDCFYQCS	39	2019-nCov	0.218	[0.156, 0.302]
p4C4,8,18,22	EEQCKTFCDKFNHEAEDCFYQCS	40	2019-nCov	0.400	[0.156, 0.302]
*4 CI = 신뢰구간 n.d. = 결정 안됨					

SARS-CoV-2 RBD에 대한 해리 상수가 0.3 미만, 특히 0.2 미만, 특히 0.1 미만, 특히 0.05 미만, 특히 0.04 미만, 특히 0.03 미만, 특히 0.02 미만인 모든 p4 유도체가 특히 적절한 바이러스 결합 모이어티이다.

표 5는 여러 검사 p6 유도체와 친화성 측정으로 수득한 해리 상수를 열거한다. 모든 펩타이드들의 시스테인 잔기는 이의 산화된 상태이므로, 이들은 분자내 이황화 결합을 형성한다. 친화성 측정 결과를 또한 도 33-35에 예시한다.

표 5: p6 유도체 (바이러스 결합 모이어티)의 특성.

표 5

펩타이드 명칭	서열	서열번호	SARS-CoV-2 표적 균주	Kd/ μM	95% CI / μM
p6-rigid	EAAAKEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSGLGKGD FR	41	2019-nCov	4.531	[0.954, 21.4]
p6-dis	EEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSCGLGKGDFRC	42	2019-nCov	2.596	[1.174, 5.771]
p6-rigid-dis	EAAAKEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSCGLGKGD FRC	43	2019-nCov	5.135	[1.487, 16.9]

TFF3-p6의 재조합 생산

TFF3-p6를 또한 재조합 방식으로 생산하였다. 이를 위해 Jarva et al., 2020의 프로토콜을 준수하였고 조정하였다.

TFF3 서열을 연장하여 정제 태그 및 TEV (Tobacco Etch Virus) 프로테아제 절단부를 5' 단부에, p6를 3' 단부에 도입하였다. 그런 후, 생산물을 박테리아 발현을 위해 서열- 및 라이게이션-독립적인 클로닝 (SLIC)을 이용해 플라스미드 pET28b에 통합하였다. 최종 플라스미드는 서열분석을 통해 승인하고, 박테리아 발현을 위해 BL21CodonPlus(DE3) RIPL 세포로 형질전환하였다. 이는 상기 "형질전환된 *E. coli* BL21CodonPlus(DE3) RIPL의 지수 증식기 스톱-배양물의 제조" 단락에서 상세히 기술된 바와 같이 수행하였다

단백질 발현 및 세척

[0110] TB 배지에 사전-배양물을 OD₆₀₀ 0.04로 접종하였다. 배양물은 회전 진탕 배양기에서 250 rpm 및 26℃ 하에 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 박테리아 배양물을 얼음 위에 두어 15분간 냉각시키고, 원심분리기에서 3000 g 하에 15분간 스핀 다운하였다. 상층액은 버리고, 세포는 세척 완충제 (HEPES based, pH 8)에 재현탁하였다. 현탁물을 3000 g 하에 15분간 스핀 다운시키고, 상층액은 폐기하였다. 세척 단계를 반복하였다. 박테리아 세포는 세포용해 완충제 (HEPES based, pH 8)에서 초음파 처리에 의해 세포용해하였다. 세포용해물을 12.000 g에서 45분간 스핀 다운하고, 펠렛은 버리고, 상층액은 0.2 µm 필터를 통해 여과하였다.

[0111] 단백질 정제

[0112] 표적 단백질을 His-태그 및 Strep-태그 (스트렙타비딘에 대한 결합 모티프) 정제를 이용한 탠덤 친화성 정제를 통해 정제하였다. 이미다졸 (ImH)을 여과한 박테리아 세포용해물에 최종 농도 40 mM로 첨가하였다. 세포용해물을 HisTrap 컬럼 (Cytiva)에 Akta Pure 25 (Cytiva) 신속 단백질 액체 크로마토그래피 (FPLC) 장치를 이용해 적용하였다. 컬럼을 세척 완충제 (300 mM NaCl, 50 mM Tris-base, 40 mM ImH, pH 7.5)로 행구고, 단백질을 용출 완충제 (300 mM NaCl, 50 mM Tris-base, 400 mM ImH, pH 7.5)로 용출시켜, 분획으로 용출물을 수집하였다. 대상 생산물이 함유된 분획들을 SDS-PAGE를 통해 식별하여, 합쳤다.

[0113] 합친 분획들은 Strep-Tactin XT 4Flow 컬럼 (IBA Lifesciences)에 Akta Pure 25를 이용해 적용하였다. 컬럼은 세척 완충제 (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8)로 행구고, 단백질은 용출 완충제 (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM 바이오틴, pH 8)로 용출시켜, 분획으로 용출물을 수집하였다. 대상 생산물이 함유된 분획들을 SDS-PAGE를 통해 식별하여 합친 후 PBS (pH 7.4)에 대해 투석하였다. NanoDrop2000 분광광도계 (Thermo Fisher Scientific)를 이용해 280 nm에서 흡착 스펙트럼을 통해 단백질 함량을 결정하였다.

[0114] 탠덤 친화성 정제 태그를 제거하기 위해, ProTEV Plus (Promega)를 제조사의 권고안에 따라 이용해 정제한 생산물을 밤새 30℃에서 인큐베이션하였으며, 정제 생산물 15 µg 당 1 U ProTEV Plus를 이용하였다.

[0115] ImH를 반응 믹스에 최종 농도 40 mM로 첨가한 다음 이를 HisTrap 컬럼에 Akta Pure 25를 사용해 적용하고, 세척 완충제 (300 mM NaCl, 50 mM Tris-base, 40 mM ImH, pH 7.5)로 컬럼을 행구었다. 최종 생산물 (TFF3-p6)이 함유된 통과물 (flow through)을 분획으로 수집되고, 절단된 정제 태그 및 ProTEV Plus (또한 His-태그 함유)는 컬럼 안에 남아있었다. 최종 생산물이 함유된 분획들은 SDS-PAGE를 통해 식별해 합치고, PBS (pH 7.4)에 대해 투석하였다. Vivaspin PES Centrifugal Concentrator (Sartorius)를 사용해 최종 단백질 농도를 NanoDrop2000 측정에 따라 1 mg/mL 내지 3 mg/mL로 부피를 감소시켰다. 용액을 액체 질소에서 급랭하고, 향후 사용시까지 -20℃에서 보관하였다. 올바른 최종 생산물 및 순도를 SDS-PAGE 및 초-성능 액체 크로마토그래피-질량 분광측정 (UPLC/MS)으로 제어하였다.

[0116] TFF-p6 대 SARS-CoV-2 RBD의 친화성 측정

[0117] 이들 실험에서, 화학 합성한 TFF3-p6 (TFF3-C57K(Penty-p6) 또는 TFF3-p6 syn; 이의 1차 구조를 도 3에 예시하며 서열번호 18에서 재현함) 및 서열번호 19에 따른 재조합 TFF3-p6 (TFF3-p6 rec)를, 일정한 농도 (5 nM)의 야생형 SARS-CoV2 (nCov2019로도 언급됨) 및 SARS-CoV2의 델타 변종 (Delta (B.1.617.2)로도 언급됨)의 형광 표지된 RBD에 대해 타이트레이션하였다. 수득된 해리 상수 (Kd)를 표 6에 열거한다. 이러한 친화성 측정 결과는 TFF3-p6 syn의 경우 도 15에, TFF3-p6 rec의 경우 도 36에 나타낸다.

[0118] 표 6: TFF-p6 대 SARS-CoV-2 RBD의 친화성 측정의 해리 상수.

표 6

펩타이드 명칭	서열번호	SARS-CoV-2 표적 균주	Kd / µM	95% CI / µM
TFF3-p6 rec	19	2019-nCov	0.141	[0.109, 0.182]
TFF3-p6 rec	19	Delta (B.1.617.2)	0.243	[0.117, 0.495]
TFF3-p6 syn	18	2019-nCov	12.69	[6.87, 23.8]
TFF3-p6 syn	18	Delta (B.1.617.2)	2.672	[1.263, 5.67]

[0120] 세포독성 분석

[0121] Cell Counting Kit (Hycultec, HY-K0301)를 제조사의 지침에 따라 이용해 세포 생존성을 결정하였다.

[0122] A549, HBE 및 Calu-3 세포를 10% (v/v) FBS, 100 U/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM에

서 배양하였다. 세포는 96웰 플레이트에 5×10^4 세포/ml의 밀도로 웰 당 DMEM 배지 $90 \mu\text{l}$ 중에 접종해 밤새 37°C 및 5% CO_2 하에 배양하였다.

[0123] 탈이온수에 용해한 재조합 TFF3-p6 또는 tags-TFF3-p6 (여전히 친화성 태그 함유) $10 \mu\text{l}$ 를 연속 희석으로 첨가하였으며, 양성 대조군 (1% SDS)과 음성 대조군 (비히클; 배지, H_2O)도 포함시켰으며, 이를 다시 48시간 동안 37°C 및 5% CO_2 하에 인큐베이션하였다. 백그라운드를 제거하기 위해, 세포는 없고 오직 샘플만 수용된 웰도 이용하였다. 48시간 배양한 후, CCK8 용액을 첨가 ($10 \mu\text{l}$ /웰)해 염료를 약 3시간 인큐베이션한 후 Tecan plate reader (SPARK, TECAN-reader Tecan Group Ltd.)를 사용해 흡광도 ($450 \text{ nm}/650 \text{ nm}$)를 측정하였다. 백그라운드 신호를 공제한 후 비-처리 대조군을 100%로 설정해 세포 생존성을 계산하였다.

[0124] 재조합 TFF3-p6도 tags-TFF3-p6도 음성 대조군과 유의한 차이가 없었다. 오히려, 모든 경우들에서 세포 생존성이 대략 100%였다. 이와는 대조적으로, 양성 대조군은 0% 또는 이에 근접한 세포 생존성을 나타내었다.

[0125] **항-바이러스 효능**

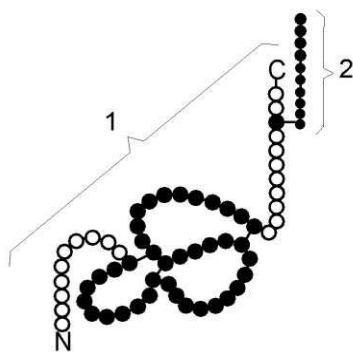
[0126] TFF3-p6의 항-바이러스 효능을 검사하기 위해, 슈도바이러스 감염 시스템을 이용하였다. 이 시스템은 수포성 구내염 바이러스 (VSV)에 기반한 것으로, VSV 외막 당단백질이 결핍되어 있지만 eGFP 및 SARS-CoV-2 스파이크 단백질은 포함되어 있다 (VSV $\Delta\text{G-CoV-2}$; Markus Hoffmann et al.).

[0127] TFF3-p6 또는 PBS (대조군)을 2.625×10^4 ffu/ml 바이러스 및 최종 농도 $50 \mu\text{M}$ 의 VSV $\Delta\text{G-CoV-2}$ 와 30분간 $100 \mu\text{l}$ 에서 인큐베이션하였다. 혼합물을 VeroE6 세포에 첨가해 세포 배양 인큐베이터에서 37°C 에서 24시간 동안 배양하였다. 형광 현미경을 사용해 사진을 촬영하고, 감염된 세포의 수를 결정하였다.

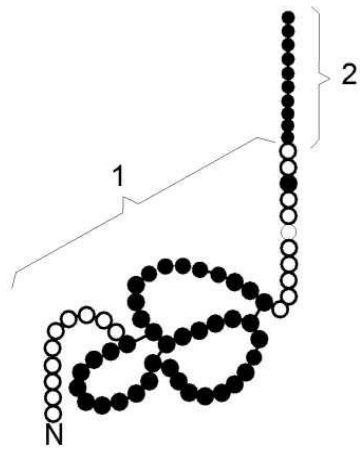
[0128] TFF3-p6는 VeroE6 세포의 VSV $\Delta\text{G-CoV-2}$ 슈도바이러스 감염을 PBS 대조군과 비교해 약 40%까지 낮출 수 있었다.

도면

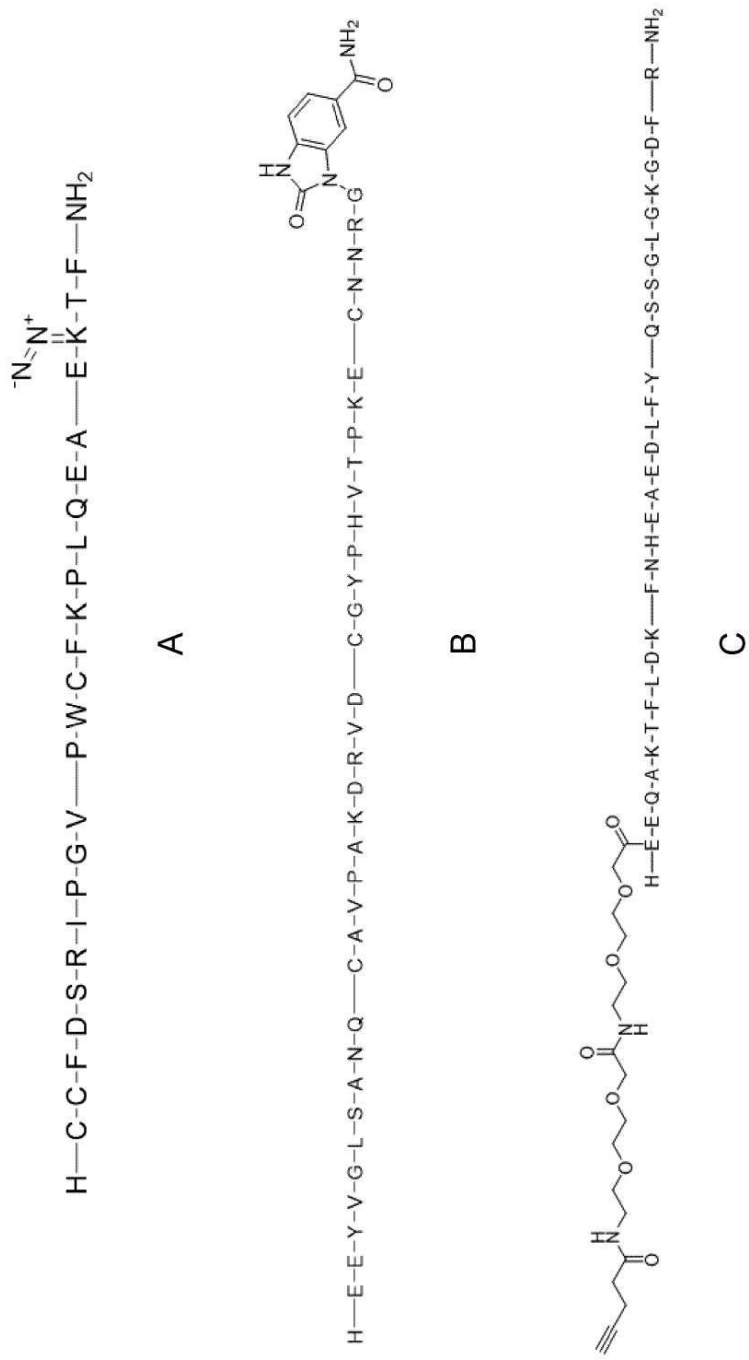
도면1a



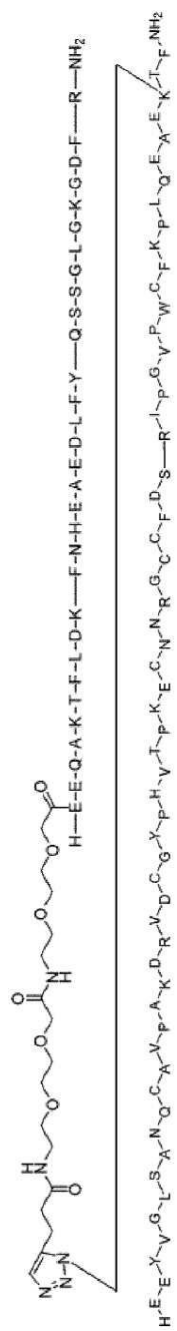
도면1b



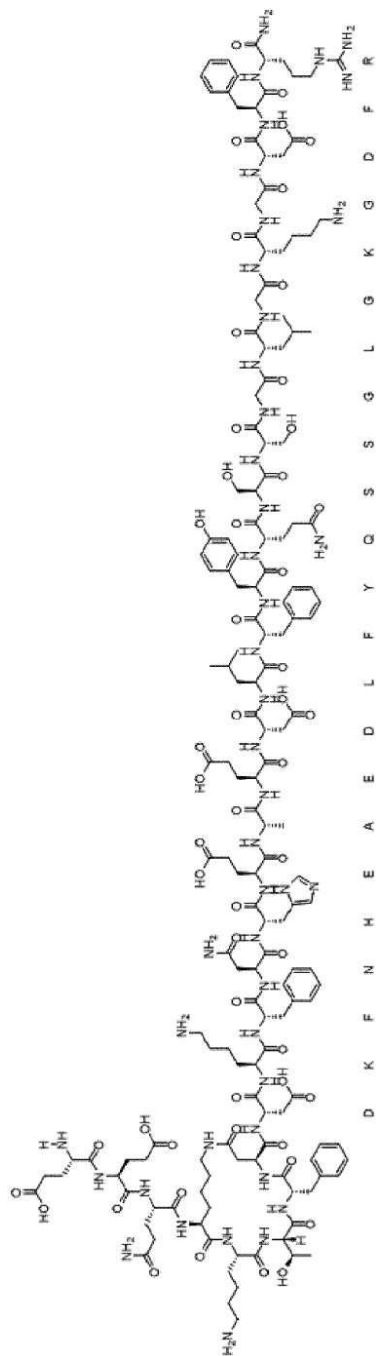
도면2



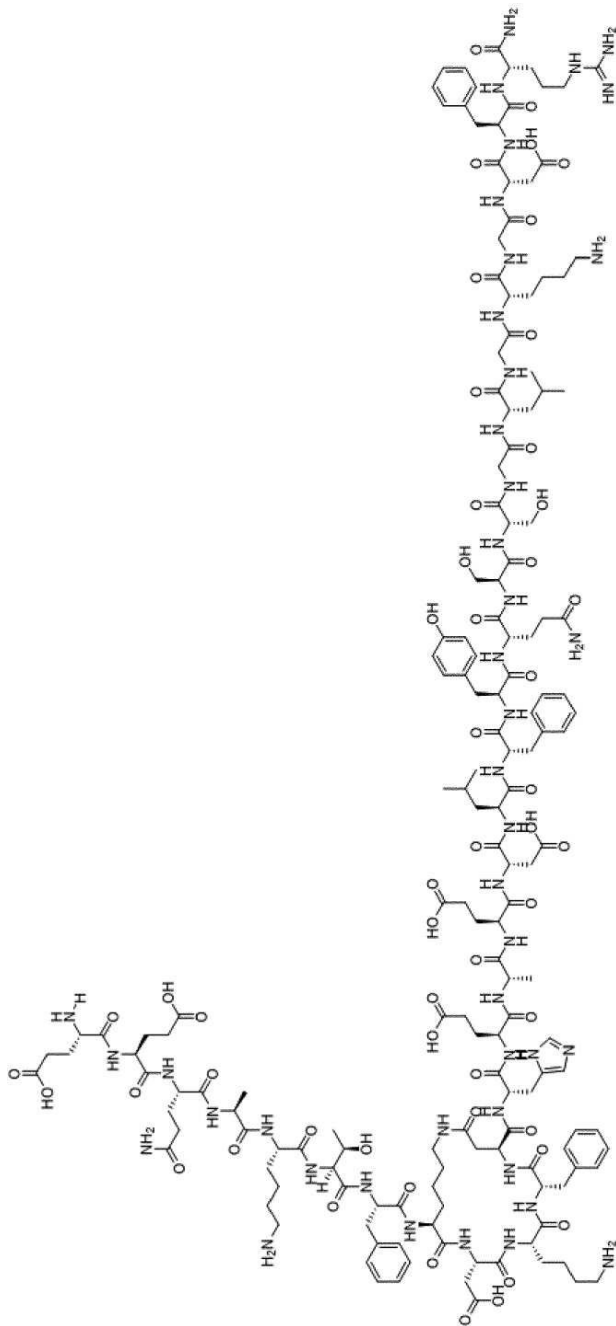
도면3



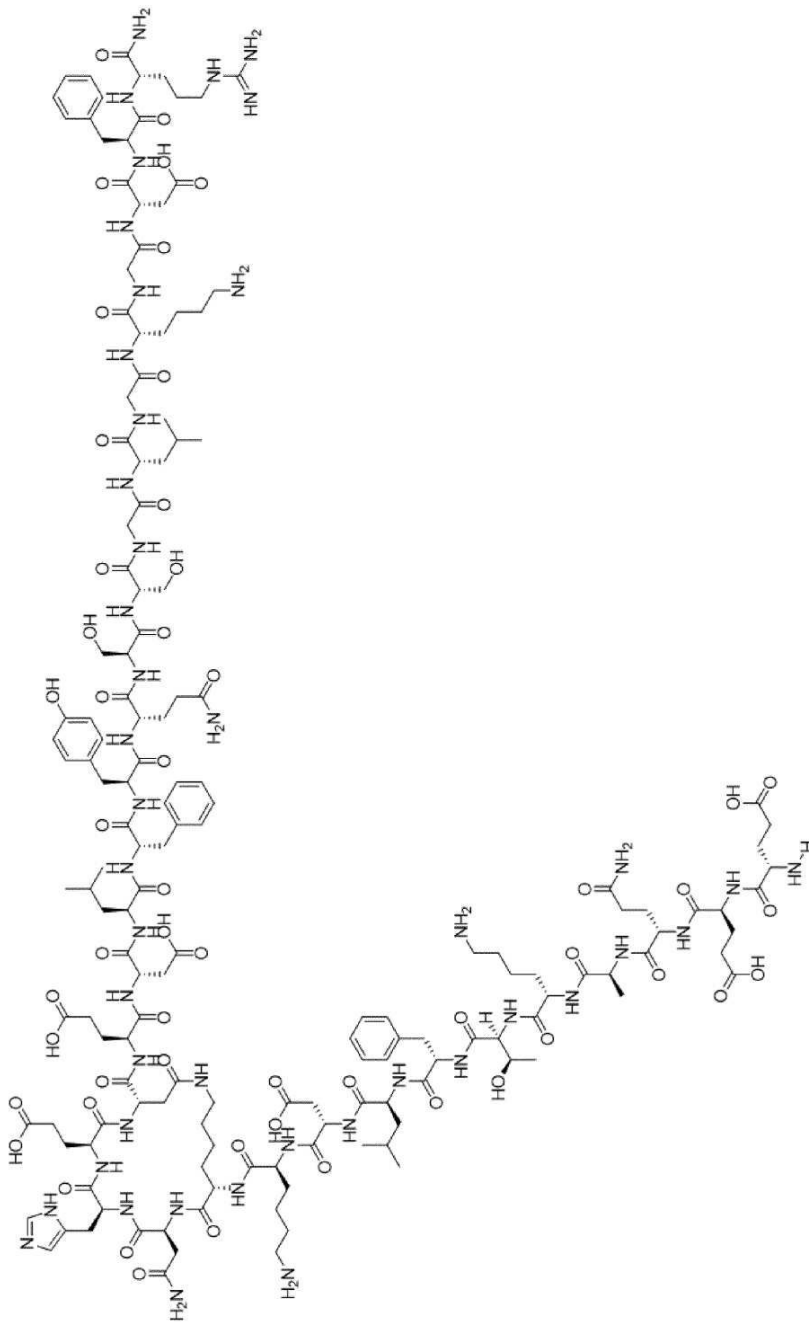
도면4



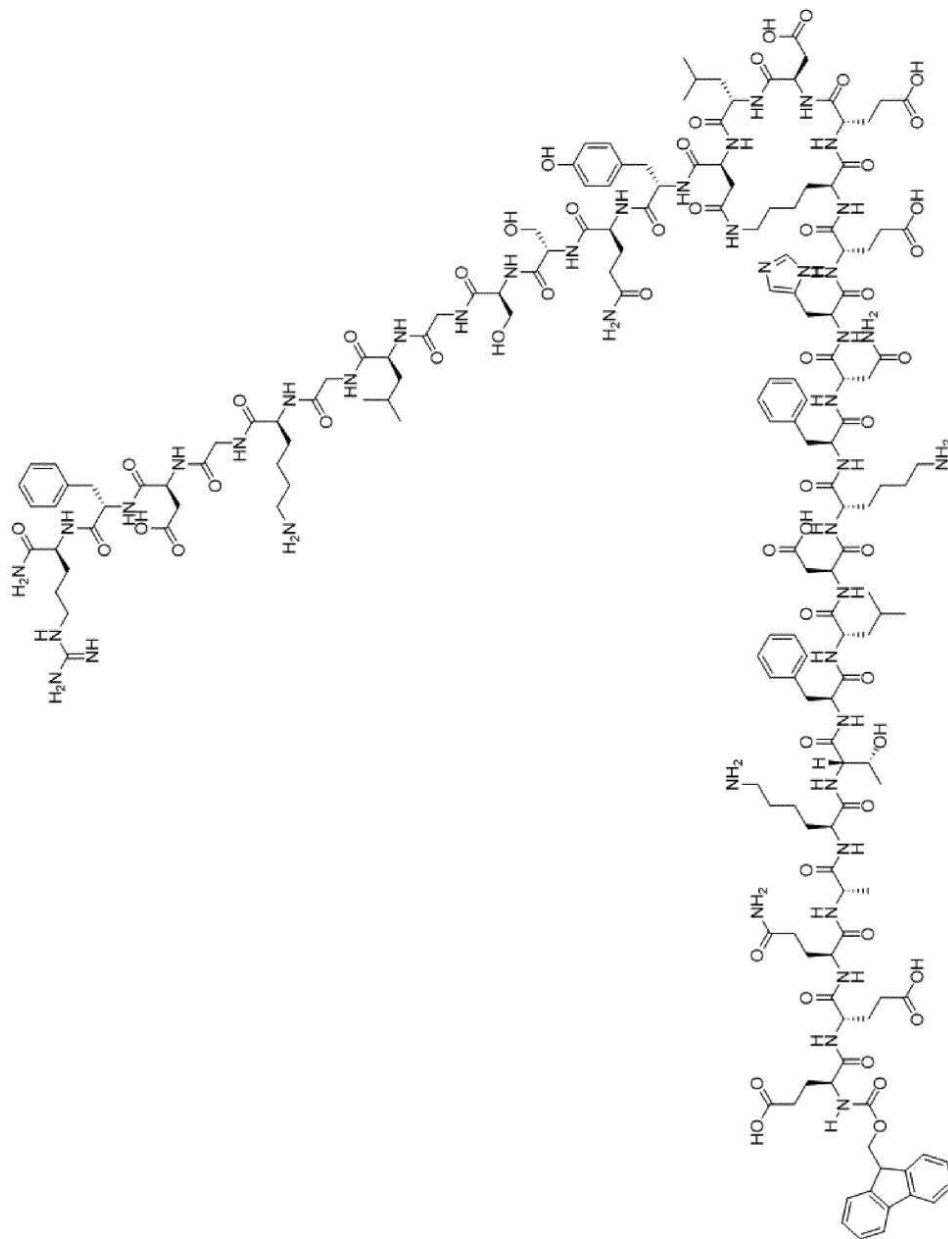
도면5



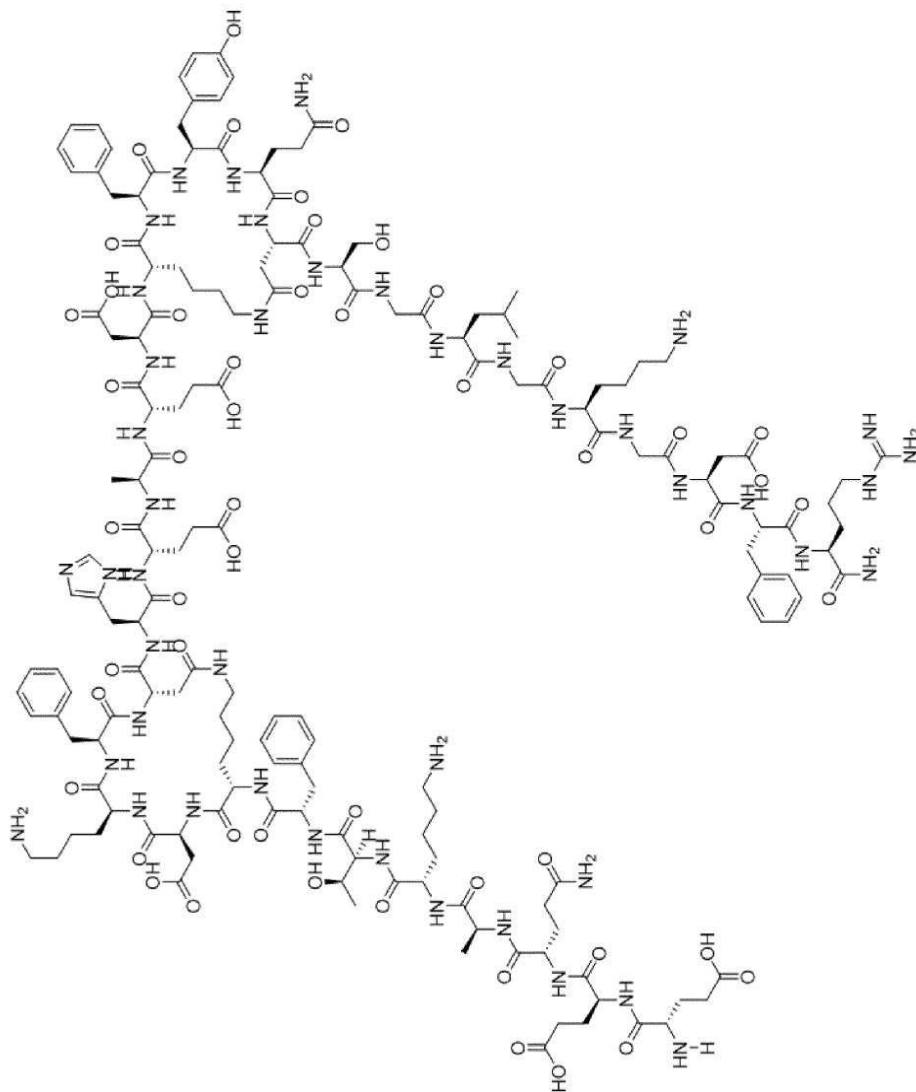
도면6



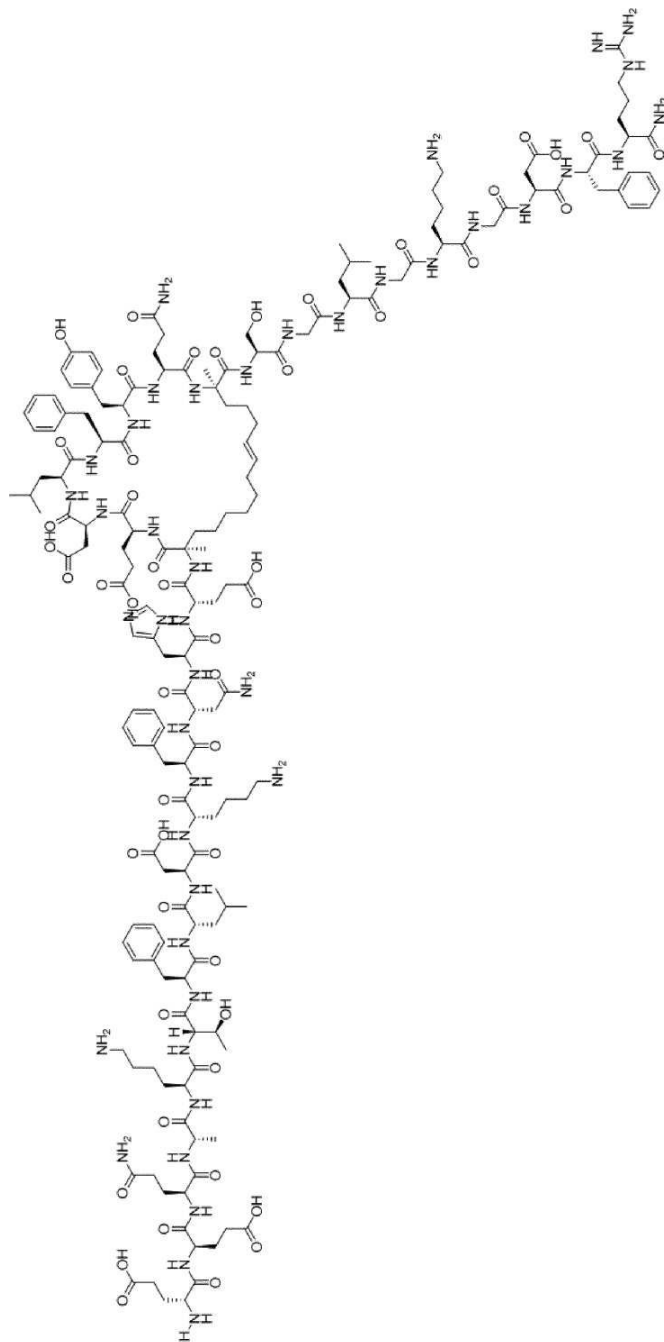
도면7



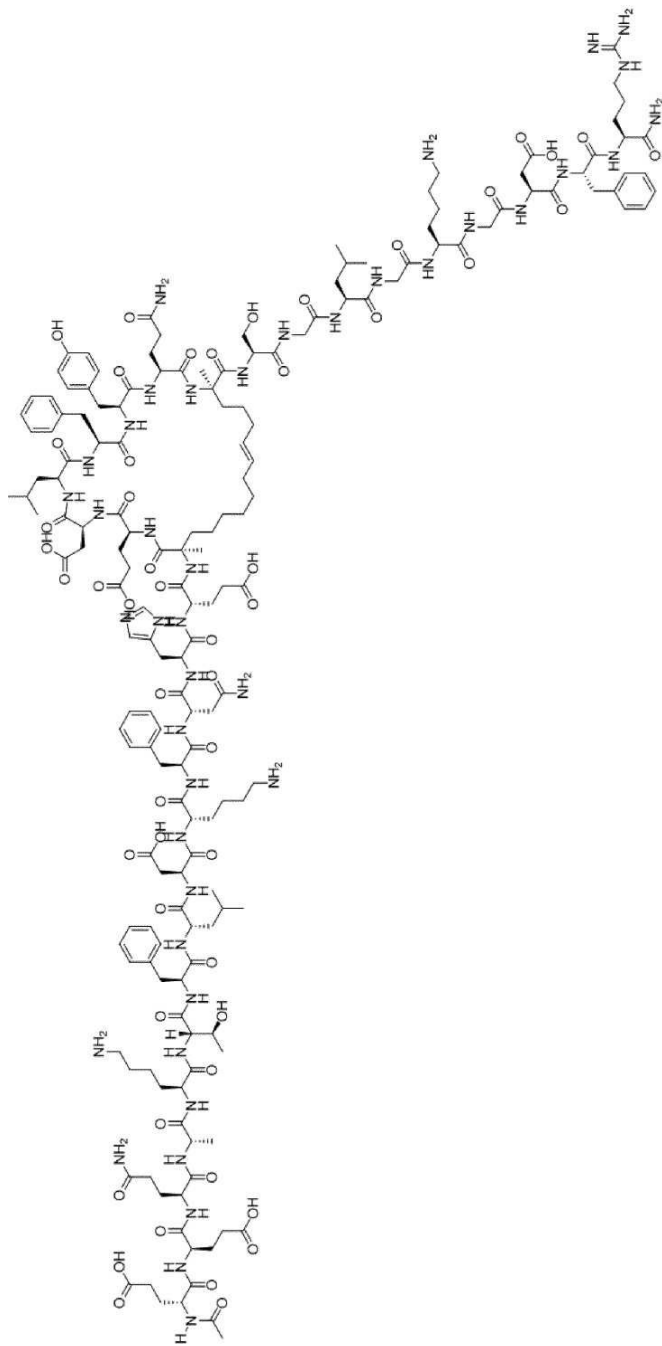
도면9



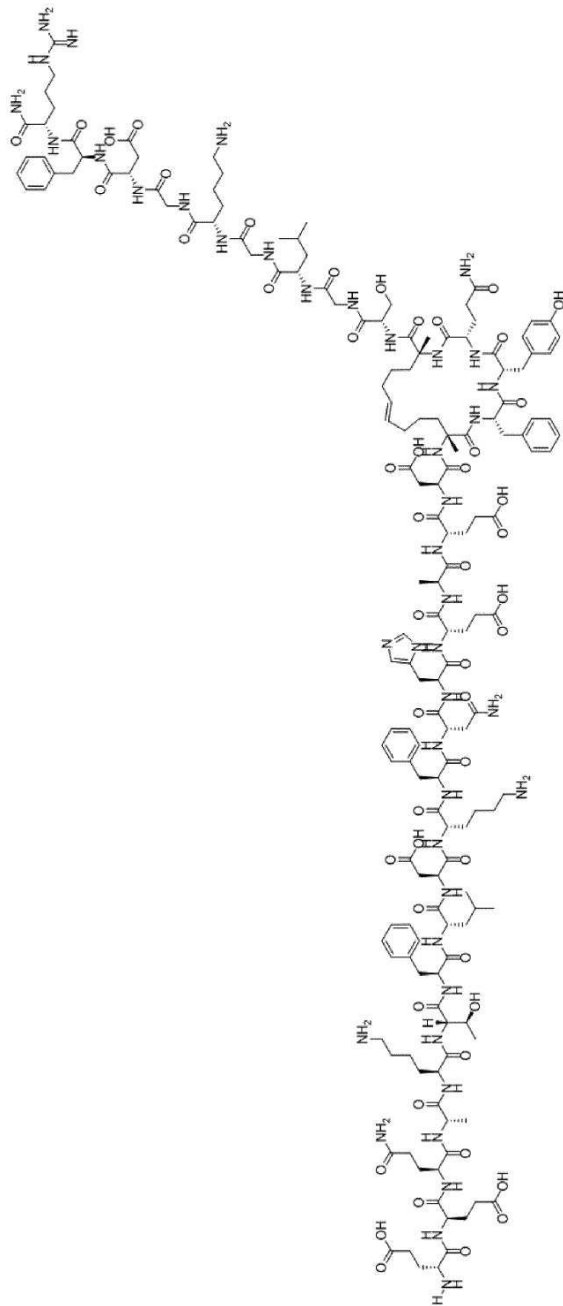
도면10



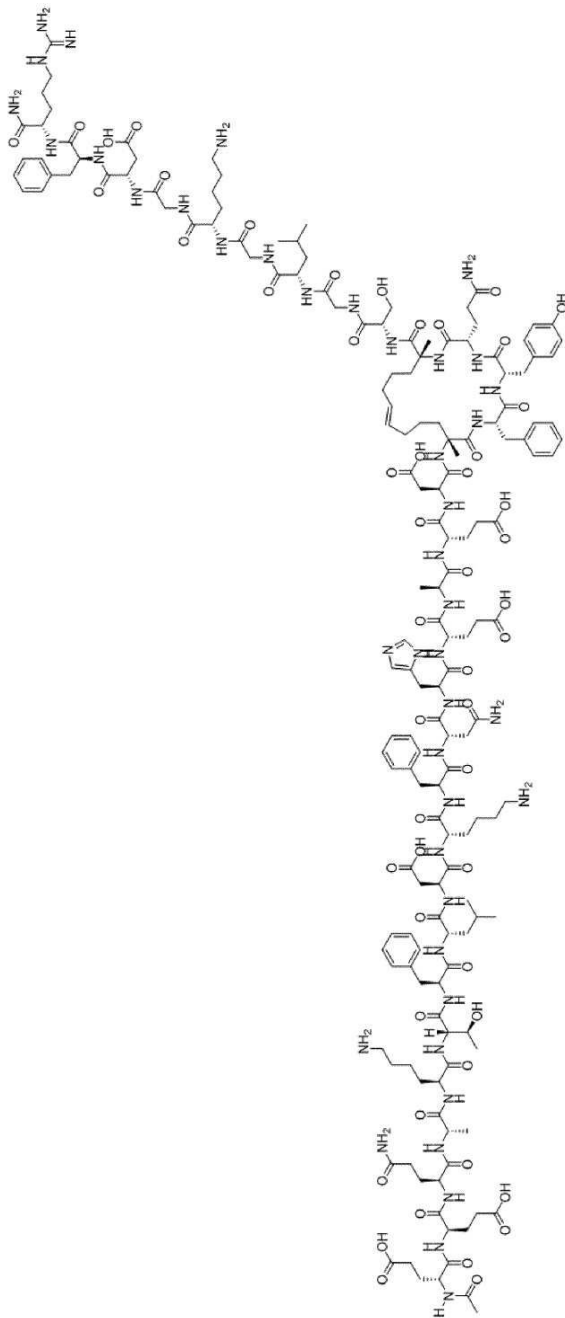
도면11



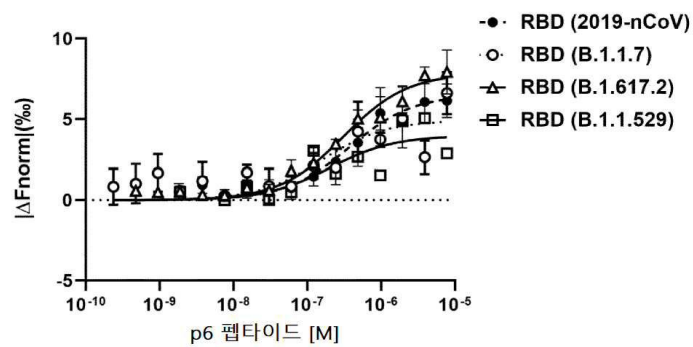
도면12



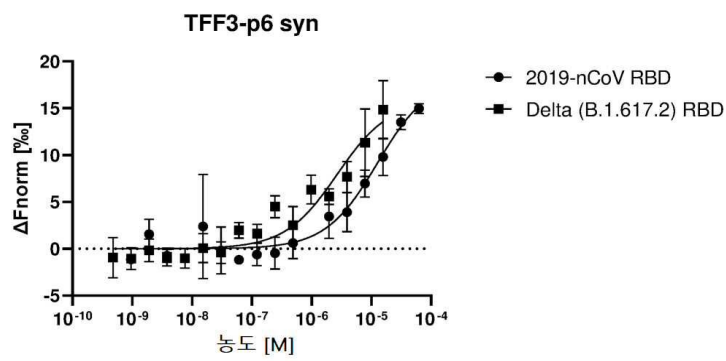
도면 13



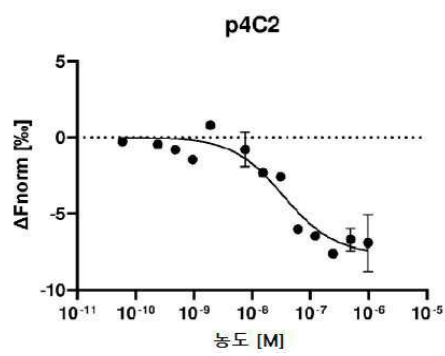
도면14



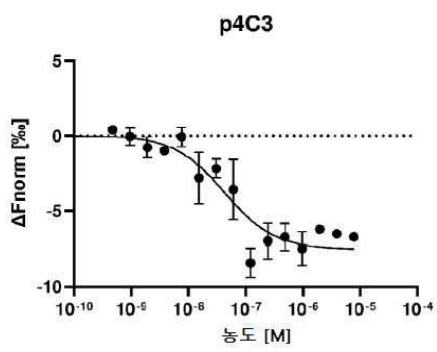
도면15



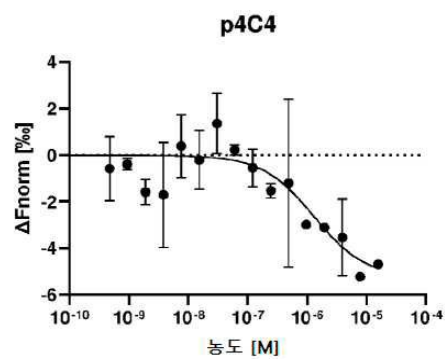
도면16



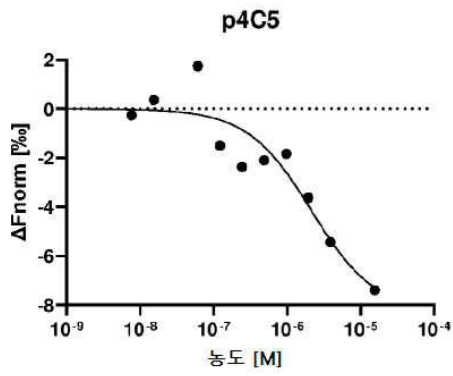
도면17



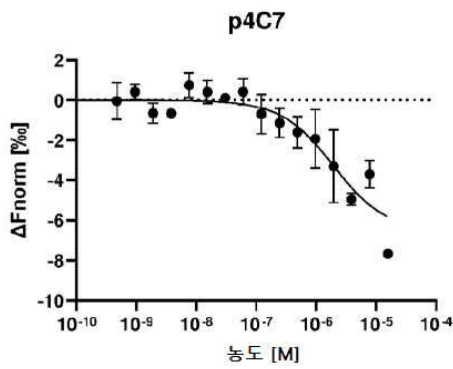
도면18



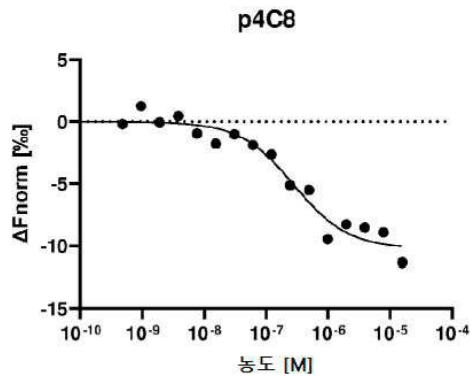
도면19



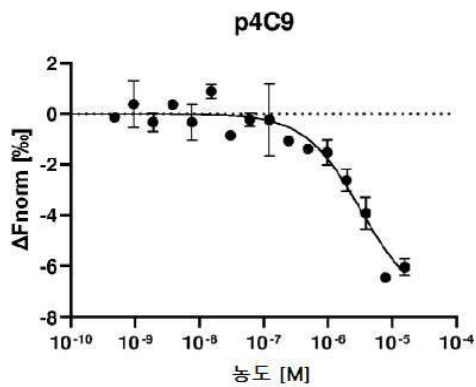
도면20



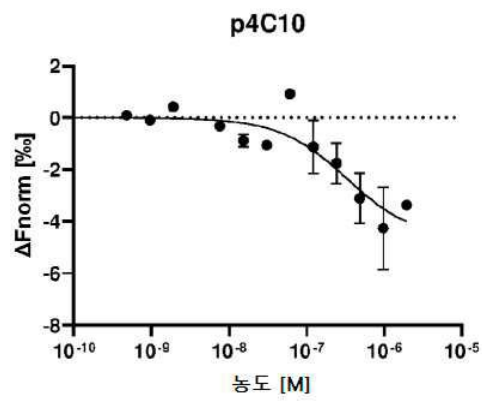
도면21



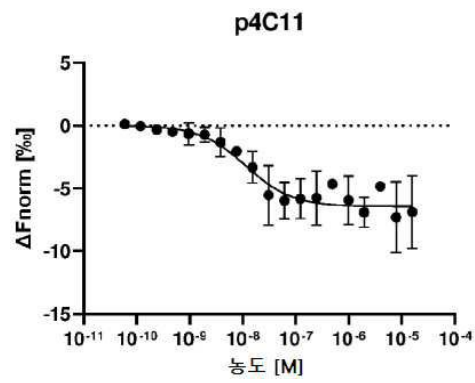
도면22



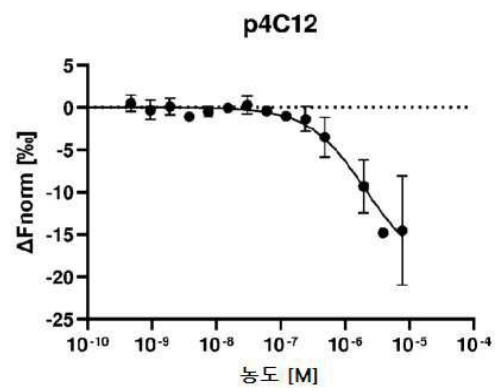
도면23



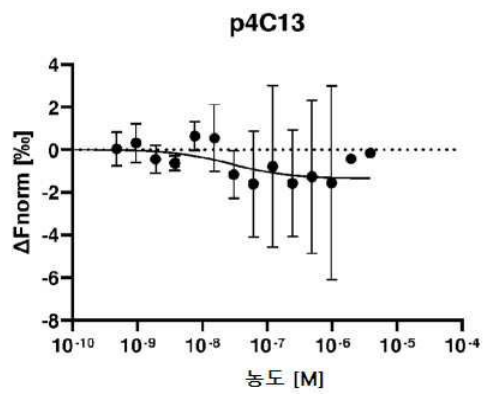
도면24



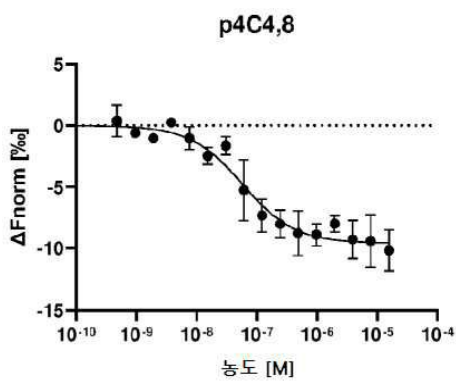
도면25



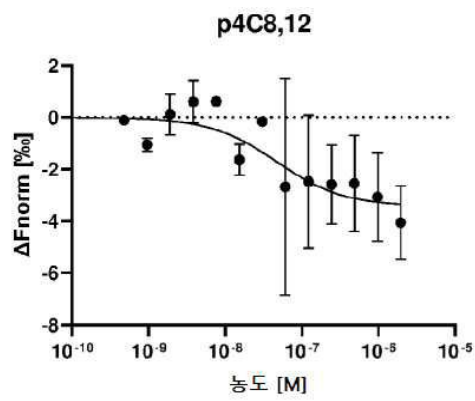
도면26



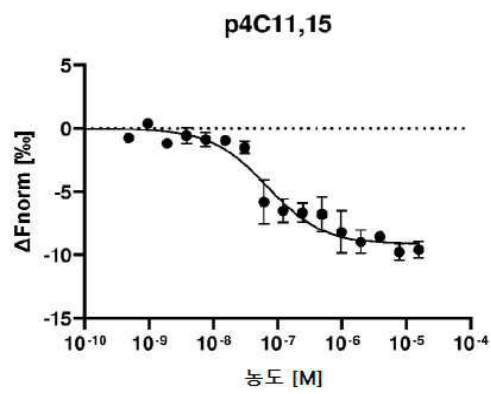
도면27



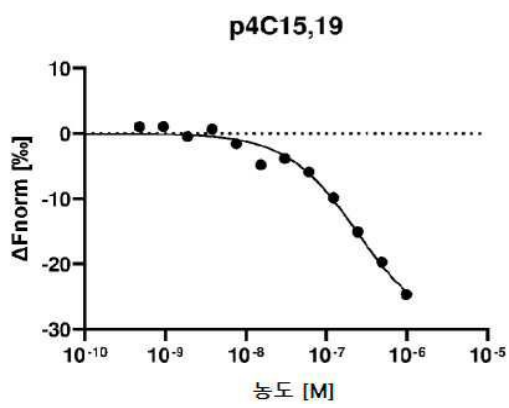
도면28



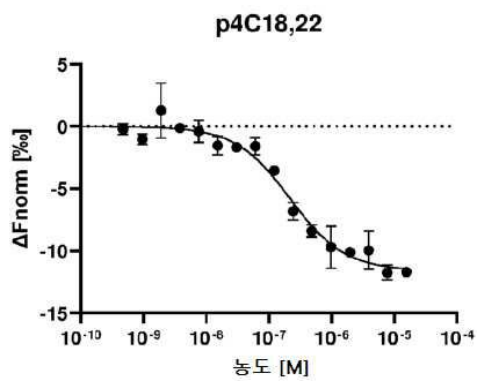
도면29



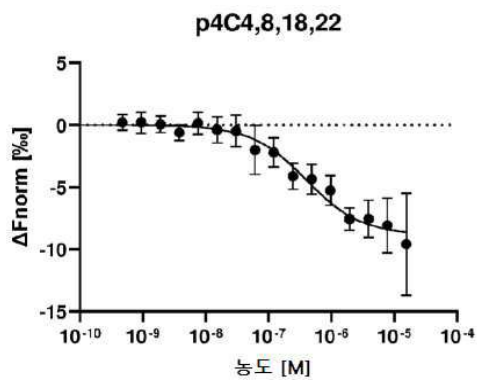
도면30



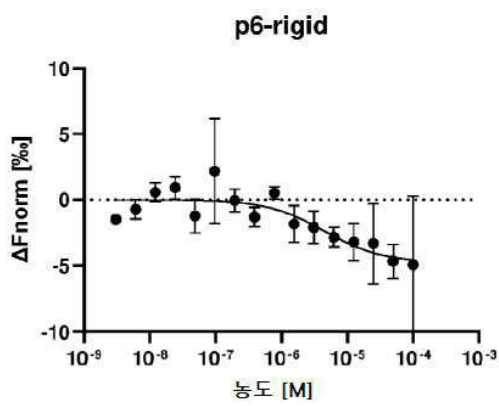
도면31



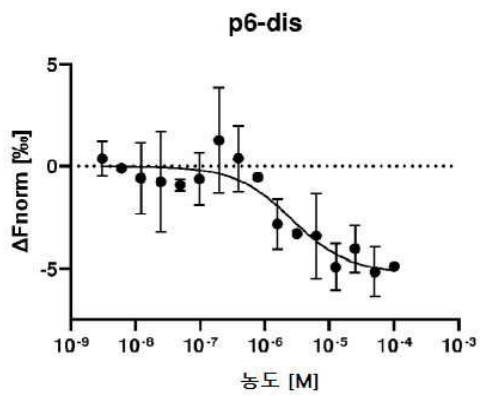
도면32



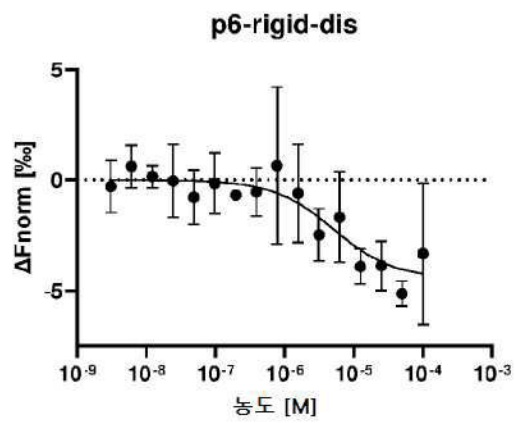
도면33



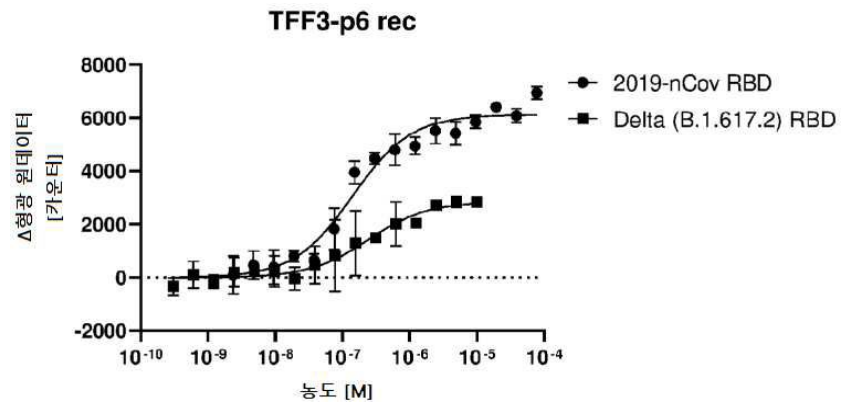
도면34



도면35



도면36



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.