

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0136998

(43) 공개일자 2021년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/08 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 7/08 (2013.01)

A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7026804

(22) 출원일자(국제) 2021년05월03일

심사청구일자 2021년08월23일

(85) 번역문제출일자 2021년08월23일

(86) 국제출원번호 PCT/KR2021/005563

(87) 국제공개번호 WO 2021/225344

국제공개일자 2021년11월11일

(30) 우선권주장

1020200055190 2020년05월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

권형주

충청북도 청주시 상당구 중흥로 70, 현대3차아파트 306동 1204호

박병권

강원도 춘천시 백령로 215, 춘천일성트루엘더퍼스트 109동 805호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

구현서

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **코로나 바이러스 억제용 펩타이드 및 그 용도****(57) 요약**

본 발명은 코로나바이러스 N-단백질에 결합하는 서열번호 1, 서열번호 6 및 서열번호 8로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 펩타이드, 코로나바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 그 스파이크 단백질 절편을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스에 대한 치료용 조성물 및 코로나바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 그 스파이크 단백질 절편을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 N-단백질에 결합하는 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 코로나바이러스 S 단백질과 N 단백질의 상호 작용의 이해 및 표적화에 기초한 본 발명의 펩타이드들은 MERS-CoV 및 SARS-CoV-2 및 SARS-CoV 및 HCoV-OC43를 포함하는 코로나바이러스들에 대한 치료에 도움이 될 수 있는 효과가 있다는 것을 제안한다.

(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)
C07K 14/001 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2770/20022 (2013.01)

김진수

서울특별시 은평구 녹번로 6-29 송학과크펠리스
 1001호

(72) 발명자

김동범

강원도 춘천시 후석로 325, 춘천더샵아파트 107동
 1003호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105200
과제번호	2016M3A9B6916708
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	중등호흡기증후군 면역치료를 위한 타겟 발굴 및 후보물질 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2016.07.01 ~ 2021.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711120267
과제번호	2020M3A9I2107294
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	SARS-CoV-2 조립을 타겟으로 하는 코로나19 신규 치료제 임상 후보물질 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2020.07.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

코로나바이러스 N-단백질에 결합하는 서열번호 1, 서열번호 6 및 서열번호 8로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 4의 펩타이드인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 코로나바이러스는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스, 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2 또는 인간 코로나바이러스 OC43 (HCoV-OC43)인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 펩타이드는 세포 침투용 펩타이드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 세포 침투용 펩타이드는 HIV의 Tat 펩타이드; Pep-1 펩타이드; 올리고라이신; 올리고아르기닌; 및 올리고 라이신 및 아르기닌의 혼합 펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 펩타이드인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 6

코로나바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 그 스파이크 단백질 절편을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스에 대한 치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 스파이크 단백질 절편은 스파이크 단백질의 막 횡단 이후의 도메인인 것을 특징으로 하는 코로나바이러스에 대한 치료용 조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 코로나바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 그 스파이크 단백질 절편은 서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 8의 단백질 또는 그 절편인 것을 특징으로 하는 코로나바이러스에 대한 치료용 조성물

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 코로나바이러스는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스, 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2 또는 인간 코로나바이러스 OC43 (HCoV-OC43)인 것을 특징으로 하는 코로나바이러스에 대한 치료용 조성물.

청구항 10

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 단백질 또는 그 절편은 세포 침투용 펩타이드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 코로나바이러스에 대한 치료용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 세포 침투용 펩타이드는 HIV의 tat 펩타이드; Pep-1 펩타이드; 올리고라이신; 올리고아르기닌; 및 올리고 라이신 및 아르기닌의 혼합 펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 펩타이드인 것을 특징으로 하는 코로나바이러스에 대한 치료용 조성물.

청구항 12

코로나바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 그 스파이크 단백질 절편을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 N-단백질에 결합하는 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 스파이크 단백질 절편은 스파이크 단백질의 막 횡단 이후의 도메인인 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 N-단백질에 결합하는 조성물.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 코로나바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 그 스파이크 단백질 절편은 서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 7 또는 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 특징으로 하는 코로나바이러스 N-단백질에 결합하는 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 코로나바이러스는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스, 중동호흡기증후군 코로나바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2 또는 인간 코로나바이러스 OC43 (HCoV-OC43)인 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 N-단백질에 결합하는 조성물.

청구항 16

제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 단백질 또는 그 절편은 세포 침투용 펩타이드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 N-단백질에 결합하는 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 세포 침투용 펩타이드는 HIV의 tat 펩타이드; Pep-1 펩타이드; 올리고라이신; 올리고아르기닌; 및 올리고 라이신 및 아르기닌의 혼합 펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 펩타이드인 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 N-단백질에 결합하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 코로나 바이러스 억제용 펩타이드 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 코로나바이러스는 코로나비리다에(Coronaviridae)과의 아과 코로나비리나에 (Coronavirinae)에 속하는 바이러스 종이며, 인간 및 동물을 감염시키고 호흡기, 위장관 또는 신경계 질환을 유발하는 포지티브-센스(positivesense) RNA 바이러스이다.

[0003] 코로나바이러스는 동물에서 발생하여, 2002년에서 2003년까지 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV)와 2012에 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스 (MERS-CoV)에 의해 예시되는 인간의 심각한 전염병을 유발할 수 있으며, 이는 신종 바이러스로 확인되었다. 놀랍게도, 이러한 바이러스는 침입성 병원체를 탐지하고 제거하기 위한 중요한 선천면역에 작용하는 대식세포의 세포질에서 복제될 수 있다. 코로나바이러스는 유형 I 인터페론 (IFN) 및 인터페론 자극 유전자(ISG)의 활성화를 방해하고 지연시키는 기능을 하며, 길항제 무리의 발현이 발병에 기여하는 다수의 인터페론 길항제를 코딩한다. 마우스의 SARS-CoV 감염을 이용한 최근의 연구는 질병에 기여하는 인터페론의 지연되고 제한된 생산을 기록했다.

[0004] 코로나바이러스 질환에 대한 기존의 백신 접근법은 자발적이고 자연적인 약독화, 바이러스 불활성화 및 발현 벡터를 통한 재조합 바이러스 구조 단백질에 기초한다. 기존 백신 후보는 강력한 보호 면역 반응을 유발하지 못한

다. 이러한 장기적인 보호의 부족은 적응 면역 및 면역 기억을 증진시키는데 중요한 분자인 유형 1 인터페론과 같은 선천적 면역 반응의 비효율적인 유도에 기인할 수 있다.

- [0005] 한편, 중동호흡기증후군(middle east respiratory syndrome, MERS)은 2012년 9월 중동 지역을 중심으로 처음 발생하였으며, WHO에서 발표한 바에 따르면, 2020년 3월을 기준으로 27개국으로 확산되어, 전 세계적으로 2,494명의 확진환자와 858명의 사망자를 발생시킨 치사율이 34%에 이르는 고위험 질환이다.
- [0006] 또한 2019년 12월 중국 우한에서 새로운 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)가 사람에게 감염되어, 2020년 4월 18일 기준으로 전 세계적으로 2,160,207명의 확진환자와 146,088명의 사망자를 발생시킨 고위험 질환인 코로나바이러스감염증-19 (COVID-19)이 발생되었다.
- [0007] MERS의 병원체인 중동호흡기증후군 코로나바이러스(middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)는 2012년에 새로 발견된 베타코로나바이러스이며, 약 3만 kb의 (+)-센스 단일가닥 RNA 바이러스로 중증급성호흡기증후군 (severe acute respiratory syndrome, SARS) 바이러스와 유사한 바이러스이다.
- [0008] MERS-CoV는 스파이크 단백질(S protein)을 이용해 사람의 DPP4(Dipeptidyl peptidase 4) 수용체에 결합하여 세포 내로 침투한다(Wang N, Shi X, Jiang LJ, Zhang S, Wang D, Tong P, Guo D, et al., Cell Research 2013;23:986). MERS-CoV는 1주일 정도의 잠복기를 가지며, 고열, 기침, 호흡곤란 등 심한 호흡기 증상을 일으킨다.
- [0009] 현재, MERS 치료는 면역조절인자인 인터페론과 항바이러스제인 리바비린(ribavirin) 또는 로피나비어(lopinavir)를 사용하여 치료하고 있다(Public Health England, ISARIC, 2015 Sep 5 ver 30; 정용필, 송준영, 서유빈 et al., Infection & Chemotherapy 2015).
- [0010] 인터페론은 인체에서 바이러스나 세균이 들어왔을 때 배출하는 면역 단백질로 주변 세포들에게 항바이러스 싸이토카인들을 내뿜도록 유도하여 바이러스 증식을 억제하고, 면역 세포들을 불러들여 바이러스에 감염된 세포들을 제거하도록 한다. 그러나 인터페론의 사용은 골수의 기능저하, 빈혈, 백혈구 수의 감소 또는 혈소판 수의 감소 등의 부작용을 유발한다.
- [0011] 또 다른 치료제인 리바비린은 뉴클레오시드 유사체(nucleoside analogue) 형태로 다양한 종류의 바이러스의 RNA 합성을 방해함으로써 이의 증식을 억제한다. 그러나 리바비린은 독성, 발암 또는 용혈빈혈 등의 부작용을 유발한다. 또한, MERS의 치료를 위해 인터페론과 리바비린을 투여하는 것에 대한 임상적인 근거도 희박하다. 붉은털원숭이 동물모델에서는 인터페론과 리바비린을 혼합하여 투여하였을 때 MERS의 치료효과를 보였으나(Falzarano D, Wit E, Rasmussen AL et al., Nature Medicine, 2013, 19, 10, p1313- 1318), 실제 중동에서 인터페론과 리바비린을 혼합하여 심각한 상태의 메르스 환자들 총 5명에게 주입하였을 때 큰 효과를 나타내지 못하였다(AI-Tawfiq JA, Momattin H, Dib J et al., International Journal of Infectious Diseases 2014, 20, p42-46).
- [0012] 현재까지 SARS-CoV-2 감염에 의한 코로나바이러스감염증-19 발생의 정확한 원인 및 코로나바이러스감염증-19의 치료제는 제시되지 못하고 있다.
- [0013] 따라서, 효과적으로 바이러스의 증식을 막으면서 중증환자, 면역저하환자 및 기저질환환자에게도 사용 가능한 생물학적으로 안전한 치료제의 개발이 필요하다.
- [0014] 관련특허로, 대한민국 특허등록 제10-1593641호에는 MERS-CoV 뉴클레오프시드에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 및 이를 포함하는 MERS-CoV 진단용 조성물이 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 코로나바이러스 치료제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 코로나바이러스 N-단백질에 결합하는 서열번호 1, 서열번호 6 및 서열번호 8로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 펩타이드를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 4의 펩타이드인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니

한다.

- [0018] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 코로나바이러스는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스, 중증호흡기 증후군 코로나바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2, 또는 인간코로나바이러스 OC43 (HCoV-OC43) 인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 펩타이드는 세포 침투용 펩타이드를 추가로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 세포 침투용 펩타이드는 HIV의 Tat 펩타이드; Pep-1 펩타이드; 올리고라이신; 올리고아르기닌; 및 올리고 라이신 및 아르기닌의 혼합 펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 펩타이드인 것이 바람직하고, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 침투용 펩타이드는 D-아르기닌 펩타이드인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0021] 또한 본 발명은 코로나바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 그 스파이크 단백질 절편을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스에 대한 치료용 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 스파이크 단백질 절편은 스파이크 단백질의 막 횡단 이후의 도메인(본 발명에서는 'C-말단 도메인' 또는 'CD'라 함)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0023] 상기 코로나바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 그 스파이크 단백질 절편은 서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 6 또는 서열번호 8의 단백질 또는 그 절편인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0024] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 코로나바이러스는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스, 중증호흡기 증후군 코로나바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2, 또는 인간코로나바이러스 OC43 (HCoV-OC43) 인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 단백질 또는 그 절편은 세포 침투용 펩타이드를 추가로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 세포 침투용 펩타이드는 HIV의 Tat 펩타이드; Pep-1 펩타이드; 올리고라이신; 올리고아르기닌; 및 올리고 라이신 및 아르기닌의 혼합 펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 펩타이드인 것이 바람직하고, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 침투용 펩타이드는 D-아르기닌 펩타이드인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0027] 또한 본 발명은 코로나바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 그 스파이크 단백질 절편을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 N-단백질에 결합하는 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 스파이크 단백질 절편은 스파이크 단백질의 막 횡단 이후의 도메인인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 코로나바이러스 유래 스파이크 단백질 또는 그 스파이크 단백질 절편은 서열번호 1, 서열번호 4, 서열번호 6 또는 서열번호 8의 단백질 또는 그 절편인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0030] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 코로나바이러스는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스, 중증호흡기 증후군 코로나바이러스, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2, 또는 인간코로나바이러스 OC43 (HCoV-OC43) 인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 단백질 또는 그 절편은 세포 침투용 펩타이드를 추가로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 세포 침투용 펩타이드는 HIV의 Tat 펩타이드; Pep-1 펩타이드; 올리고라이신; 올리고아르기닌; 및 올리고 라이신 및 아르기닌의 혼합 펩타이드로 구성된 군으로부터 선택된 펩타이드인 것이 바람직하고, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 침투용 펩타이드는 D-아르기닌 펩타이드인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0033] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 이용될 수 있는 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제는 본 발명의 효과를 해하지 않는 한 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 윤활제, 감미제, 방향제, 보

존제 등을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제의 대표적인 예로는, 락토즈, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 글리세린, 아카시아고무, 알지네이트, 칼슘포스페이트, 칼슘카보네이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘스테아레이트, 광물유, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 식물성 오일, 주사 가능한 에스테르, 위캡슐, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우리지 등을 들 수 있다. 본 발명의 선천면역 증진 및 항바이러스용 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 에어로졸, 외용제, 좌제 및 주사제로 이루어진 군으로부터 선택되는 형태일 수 있다. 약학 조성물의 제제화 방법은 기술 분야에 공지된 통상의 방법에 따라 수행될 수 있으며, 특별히 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여될 수 있으며, 투여량은 투여 대상의 연령, 성별, 체중, 상태, 질병의 정도, 약물의 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 적절히 선택될 수 있으나, 일반적으로 약 0.05~500mg/kg, 바람직하게는 약 0.1~250mg/kg을 1일 1~3회 투여할 수 있다.

[0035] 본 발명의 약학 조성물의 제제화 방법, 투여량, 투여 경로, 구성성분 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있음이 통상의 기술자에게 명백하다.

[0036] 본 발명의 약학 조성물은 바이러스 감염성 질병의 예방 및 치료에 이용될 수 있다. 본 발명의 항바이러스용 약학 조성물은 유효 성분으로 구백 추출물 외에 다른 약학적 활성 성분을 함께 포함하거나, 또는 다른 유효 성분을 포함하는 약학 조성물과 혼합되어 이용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 용어, "감염의 예방 또는 치료용 조성물"은 생체에 면역을 주는 항원을 함유한 생물학적인 제제로서, 감염증의 예방을 위하여 사람이나 동물에 주사하거나 경구 투여함으로써 생체에 면역이 생기게 하는 면역원 또는 항원성 물질인 백신 조성물 또는 약학적 조성물이 포함 될 수 있다.

[0038] 본 발명에서 용어, "예방"은 본 발명의 코로나 바이러스의 펩타이드 및/또는 펩타이드를 발현하는 형질전환체 또는 상기 형질 전환체를 유효성분으로 하는 조성물의 투여로 상기 코로나 바이러스 감염을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0039] 본 발명에서 용어, "치료"는 본 발명의 코로나바이러스 펩타이드 및/또는 펩타이드를 발현하는 형질전환체 또는 상기 형질전환체를 유효성분으로 하는 조성물의 투여로 상기 코로나바이러스의 감염 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

[0040] "면역원" 또는 "항원성 물질"은 펩티드, 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 발현하는 균주, 단백질, 올리고뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드, 재조합 박테리아 및 재조합 바이러스로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다. 구체적인 예를 들면, 상기 항원 물질은 불활성화된 전체 또는 부분 세포 제제 형태, 또는 통상적인 단백질 정제, 유전 공학 기법 또는 화학 합성에 의해 획득되는 항원 분자 형태일 수 있다.

[0041] 본 발명의 서술한 형질 전환체의 단백질 추출물 또는 상기 형질전환체로부터 분리된 재조합 코로나 바이러스 펩타이드를 포함하는 코로나 바이러스 감염에 대한 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사 용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥 내,복강 내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0042] 이러한 약학적 조성물에는 추가적으로 담체, 부형제 또는 희석제 등이 더 포함될 수 있으며, 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토오스, 텍스트로오스, 슈크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리쓰리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 비정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 더 포함할 수도 있다.

[0043] 본 발명의 유효 성분은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없

이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [0044] 본 발명의 약학적 조성물에서 유효성분의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 0.001 내지 5,000mg, 바람직하게는 0.1 내지 3,000mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 경로를 통하여 대상에 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.
- [0047] 본 발명에서 "대상"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함하고, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 인간을 의미한다.
- [0048] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0049] 본 발명에서 본 발명자들은 동시면역침전법(coimmunoprecipitation) 및 proteomics 분석을 통해 MERS-CoV에 감염된 세포에서 N 단백질과 스파이크 (S) 단백질의 직접적인 상호 작용을 새로 발견하였다. S 단백질의 C-말단 도메인(Spike CD)에 상응하는 합성된 펩티드는 인 비트로에서 N 단백질과 스파이크 (S) 단백질의 상호 작용을 억제하였다. 또한, 스파이크 CD 펩티드의 세포 침투는 MERS-CoV-감염 세포에서 바이러스 플라크 형성을 억제하였다.
- [0050] 또한 SARS-CoV-2의 스파이크 CD 펩티드의 세포 침투는 quantitative real-time RT-PCR로 SARS-CoV-2 바이러스 생산을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0051] 또한 HCoV-OC43에 감염된 세포에서 N 단백질과 스파이크 (S) 단백질의 직접적인 상호 작용을 새로 발견하였다. S 단백질의 C-말단 도메인(Spike CD)에 상응하는 합성된 펩티드의 세포내 침투는 HCoV-OC43-감염세포에서 HCoV-OC43의 N 단백질과 스파이크 (S) 단백질의 생산이 감소되는 것을 공 초점 현미경으로 확인하였고, 플라크 형성 실험으로 HCoV-OC43 바이러스 생산을 억제하는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명자들은 S 단백질과 N 단백질의 상호 작용의 이해 및 표적화가 MERS-CoV, SARS-CoV-2 및 HCoV-OC43을 포함하는 코로나바이러스들에 대한 미래의 치료에 도움이 될 것을 제안한다.
- [0052] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0053] MERS-CoV S 단백질과 N 단백질의 연관
- [0054] MERS-CoV-감염 세포에서 S 단백질 또는 M 단백질-상호 작용 단백질을 조사하기 위해, MERS-CoV- 감염된 Vero 세포 용해물에서 MERS-CoV S 단백질(항-S mAb)에 대한 모노클로날 항체(492-1G10E4E2 클론) 또는 MERS-CoV M 단백질(항-M mAb)에 대한 모노클로날 항체(M158-2D6F11 클론)로 면역 침전을 수행하고, 프로테오믹스 접근법에 의해 동시 면역 침전된 단백질을 분석하였다. MERS-CoV-감염 세포에서 S, M 및 N 단백질의 발현이 웨스턴 블롯팅에 의해 72 시간 동안 모니터링 될 때, N 단백질 발현은 MERS-CoV 감염 후 다른 것보다 가장 빠르고 강력하게 증가하였다(도 1 내지 4).
- [0055] 도 5(화살머리)에 도시된 바와 같이, 분자량이 ~ 45 kDa인 S 단백질-상호 작용 단백질을 SDS-PAGE에 의해 수득된 겔에서 염색되었다. 상호 작용 단백질을 겔에서 트립신으로 단편화하고 펩티드 단편을 ESI-TOF MS/MS에 의해 분석하였다. 결과는 MERS-CoV N 단백질의 총 아미노산의 57.14 % 서열 범위를 갖는 19 개의 일치된 펩티드 단편을 나타냈다(도 9). 이 결과는 S 단백질이 MERS-CoV-감염 세포에서 N 단백질과 주로 상호 작용한다는 것을 검증한다.
- [0056] S 단백질과 N 단백질의 상호 작용을 확인하기 위해, MERS-CoV-감염 세포 용해물을 사용하여 면역 침전 및 웨스턴 블로팅 분석을 수행 하였다. N 단백질은 항-S mAb에 의해 수득된 면역 복합체에서 검출되었으며, 이는 질량

분석법 분석과 일치한다 (도 6).

- [0057] 그러나 면역 복합체에서는 M 단백질이 발견되지 않았다. 도 7에 도시된 바와 같이, 뚜렷한 M 단백질-상호 작용 단백질은 SDS-PAGE에서 검출되지 않았다. 그러나, 항-M mAb에 의해 수득된 면역 복합체의 분석은 SARS-CoV (Z. J. Miknis, E. F. Donaldson, T. C. Umland, R. A. Rimmer, R. S. Baric, L. W. Schultz, *J. Virol.* **83**, 3007-3018 (2009).) 및 MHV-감염 세포 (K. R. Hurst, L. Kuo, C. A. Koetzner, R. Ye, B. Hsue, P. S. Masters, *J. Virol.* 13285-13297 (2005))에서 이전에 보고된 바와 같이 MERS-CoV-감염 세포(도 8)에서 N 단백질과 M 단백질의 상호 작용을 보여 주었다.
- [0058] 또한, 소량의 S 단백질이 항-M mAb의 면역 복합체에서 검출되었다. 항-N mAb에 의한 면역 침전 및 항-S mAb 또는 항-N Ab에 의한 웨스턴 블롯팅을 수행하여 N 단백질과 S 단백질 및 M 단백질의 상호 작용을 상호적인 방식으로 상호 확인하였다.
- [0059] MERS-CoV 스파이크 CD와 N 단백질의 상호 작용
- [0060] 다음으로 MERS-CoV S 단백질과 N 단백질 간의 상호 작용의 특이성을 자세하게 확인하였다.
- [0061] 스파이크 CD는 세포 및 조립된 바이러스에서 N 단백질과 결합할 수 있기 때문에, 본 발명자들은 전체 MERS-CoV의 전체 스파이크 CD (Spike CD-Full), 스파이크 CD의 전면 영역 (Spike-F), Spike CD의 중간 영역(Spike-M), Spike CD의 후면 영역 (Spike-B)을 커버하는 4 가지 종류의 펩티드를 합성하여 상호 작용을 동정하였다(그림 10).
- [0062] 각각의 바이오틴화된-스�파이크 CD 펩타이드(전체 Spike CD-바이오틴, 스파이크-F-바이오틴, 스파이크-M-바이오틴 또는 스파이크-B-바이오틴)를 MERS-CoV-감염 세포 용해물과 혼합하고, 스파이크 CD와 N 단백질의 결합을 스트렙타 비딘-비드를 사용한 면역 복합체 분석에 의해 확인되었다.
- [0063] 도 11는 스파이크 CD 펩티드가 N 단백질과 상호 작용을 하고, 스파이크 CD 펩티드가 막 횡단 도메인 근처 영역 (Spike CD-F)의 펩티드가 N 단백질과 밀접하게 결합할 수 있음을 보여준다.
- [0064] MERS-CoV 스파이크 CD와 N 단백질 사이의 주요 상호 작용 영역을 추가로 조사하기 위해, MERS-CoV-감염 세포 용해물에서 N 단백질과 전체 스파이크-CD-바이오틴의 상호 작용을 스파이크 CD-F, 스파이크 CD-M 또는 스파이크 CD-B로 전처리한 후 분석하였다.
- [0065] 도 12에 도시된 바와 같이, 이들 모든 펩티드는 스파이크 CD-F의 존재 하에서 가장 높은 활성을 가지며, 스파이크 CD- 전체와 N 단백질 사이의 상호 작용의 30-40 %를 억제할 수 있다. 이러한 명백한 작은 효과는 세포 용해물 중의 N 단백질이 바이러스 유래 S 단백질을 포함하는 상호 작용 단백질과 이미 결합되어 있다는 맥락에서 이해 될 수 있다. 종합하면, 본 발명자들은 스파이크 CD-F는 N 단백질과 상호 작용하는 가장 중요한 영역을 커버하고 있지만 스파이크 CD 전체가 상호 작용을 연구하는 가장 좋은 펩티드라고 결론 지을 수 있다.
- [0066] MERS-CoV 스파이크 CD 펩티드의 세포 투과는 MERS-CoV 생산을 억제함
- [0067] MERS-CoV의 펩티드 스파이크-CD-Full(전체)이 세포에서 S 단백질과 N 단백질 사이의 상호 작용을 억제하여 세포에서 MERS-CoV의 생성을 억제할 수 있는지를 확인하기 위해, 세포 투과 펩티드 전략을 사용하였다.
- [0068] 본 발명자들은 9 개의 D-아르기닌-접합된 전체 스파이크 CD-펩티드(R-Spike CD) 및 C- 말단에 비오틴을 갖는 유도체(R-Spike CD-Biotin)를 합성하였다. R-스�파이크 CD-비오틴을 Vero 세포에서 처리한 다음, 30 분 후에 공 초점 현미경으로 펩티드 흡수를 모니터링하였다. 공 초점 이미지는 형광 강도가 예상대로 용량 의존적으로 세포질에서 증가함을 보여 주었다(도 13).
- [0069] MERS-CoV-감염 세포에서 S, M 및 N 단백질의 발현에 대한 스파이크 CD 펩티드의 세포 투과 효과를 조사하기 위해, Vero 세포를 R-Spike CD의 존재 또는 부재하에 MERS-CoV (0.1 MOI)로 감염시켰다. 웨스턴 블롯팅 데이터에 따르면, 감염 후 48 시간에 S, M 및 N 단백질의 발현이 현저하게 증가하였고, R-스�파이크 CD 처리에 의해 단백질 발현이 감소되었다(도 14). 대조적으로, 공 초점 이미지는 S 단백질의 발현이 아마도 이 분석 민감도가 높기 때문에 R-Spike CD에 의해 크게 감소되었음을 보여준다(그림 15).
- [0070] 세포에서 MERS-CoV의 생산에 대한 Spike CD 펩티드의 세포 투과 효과를 조사하기 위해, Vero 세포를 R-Spike CD의 존재하에 MERS-CoV로 감염시켰다. 도 16 및 17은 세포가 용량-의존적 방식으로 R-스�파이크 CD로 처리 될 때 플라크 형성이 감소되었음을 보여준다. 그러나, 대조군 세포 투과 펩티드 (R-CP-1)에 의해 효과가 관찰되지 않았다. 이들 결과는 세포 투과성 스파이크 CD 펩티드에 의한 스파이크 CD와 N 단백질 사이의 상호 작용의 억제가

MERS-CoV 증폭을 감소시켰음을 확인하였다.

[0071] SARS-CoV-2 스파이크 CD 펩타이드의 세포 투과는 SARS-CoV-2 생산을 억제함

[0072] SARS-CoV-2의 스파이크-CD 펩타이드(Spike CD-COVID-19)가 세포에서 SARS-CoV-2의 S 단백질과 N 단백질 사이의 상호 작용을 저해하여 세포에서 SARS-CoV-2의 생성을 억제할 수 있는지를 확인하기 위해, 세포 투과 펩티드 전략을 사용하였다.

[0073] 본 발명자들은 9 개의 D-아르기닌-접합된 스파이크 CD-COVID-19 펩티드(R-Spike CD-COVID-19)를 합성하였다. 세포에서 SARS-CoV-2의 생산에 대한 스파이크 CD-COVID-19 펩티드의 세포 투과 효과를 조사하기 위해, Vero 세포를 SARS-CoV-2로 감염시키고 6시간 후에 CD-COVID-19 펩티드를 투여하였다. 도 18은 세포가 세포투과성 스파이크 CD-COVID-19(R-Spike CD-COVID-19)로 처리 될 때 SARS-CoV-2 생산이 70% 감소되었음을 보여준다. 그러나, 대조군 세포 투과 펩티드 (R-CP-1) 및 세포투과성 MERS-CoV의 스파이크 CD 펩티드(R-Spike-CD(MERS))에 의해 효과가 40%로 낮은 것을 관찰하였다. 이들 결과는 세포 투과성 스파이크 CD-COVID-19 펩티드에 의한 스파이크 CD와 N 단백질 사이의 상호 작용의 억제가 SARS-CoV-2 증폭을 감소시켰음을 확인하였다.

[0074] HCoV-OC43 스파이크 CD 펩티드의 세포 투과는 HCoV-OC43 생산을 억제함

[0075] HCoV-OC43의 S 단백질과 N 단백질의 상호 작용을 확인하기 위해, HCoV-OC43-감염 세포 용해물을 사용하여 면역 침전 및 웨스턴 블로팅 분석을 수행 하였다. N 단백질은 항-S Ab에 의해 수득된 면역 복합체에서 검출되었다 (도 19).

[0076] HCoV-OC43의 스파이크-CD 펩타이드(Spike CD-OC43)가 세포에서 HCoV-OC43의 S 단백질과 N 단백질 사이의 상호 작용을 저해하여 세포에서 HCoV-OC43의 생성을 억제할 수 있는지를 확인하기 위해, 세포 투과 펩티드 전략을 사용하였다.

[0077] 본 발명자들은 9 개의 D-아르기닌-접합된 스파이크 CD-OC43 펩티드(R-Spike CD-OC43)를 합성하였다. 세포에서 HCoV-OC43의 생산에 대한 스파이크 CD-OC43 펩티드의 세포 투과 효과를 조사하기 위해, Vero 세포를 HCoV-OC43로 감염시키고 6시간 후에 CD-OC43 펩티드를 투여하였다. 도 20 내지 21 및 도22는 세포가 세포투과성 스파이크 CD-OC43로 처리 될 때 HCoV-OC43의 S 단백질과 N 단백질생산이 감소되었음을 보여준다. 그러나, 대조군 펩티드에 의해 효과가 나타나지 않는 것을 관찰하였다. 또한 도 23은 세포가 세포투과성 스파이크 CD-OC43로 처리 될 때 HCoV-OC43 생산이 20% 감소되었음을 보여준다. 이들 결과는 세포 투과성 스파이크 CD-OC43 펩티드에 의한 스파이크 CD와 N 단백질 사이의 상호 작용의 억제가 HCoV-OC43 증폭을 감소시켰음을 확인하였다.

발명의 효과

[0078] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 코로나바이러스 S 단백질과 N 단백질의 상호 작용의 이해 및 표적화에 기초한 본 발명의 펩타이드들은 MERS-CoV 및 SARS-CoV-2 및 SARS-CoV 및 HCoV-OC43를 포함하는 코로나바이러스들에 대한 치료에 도움이 될 수 있는 효과가 있다는 것을 제안한다.

도면의 간단한 설명

[0079] 도 1 내지 4는 72 시간 MERS-CoV-감염 세포에서 S, M 및 N 단백질의 발현을 나타낸 그림으로, 세포 용해물은 Vero 세포 및 MERS-CoV-감염된 Vero 세포로부터 제조되었고, 50 μ g (도 1, 2, 4) 및 25 μ g (도 3)의 단백질을 포함하는 세포 용해물을 4-12 % 구배 SDS-PAGE로 분리하고 표시된 항체로 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 신호 검출을 위한 노출 시간은 각각 60 초 (도 1, 2, 4) 및 5 초(도 3)였다.

도 5 내지 8은 MERS-CoV S 단백질 및 M 단백질과 MERS-CoV N 단백질의 상호 작용을 나타내는 그림으로, (도 5, 및 7) S 단백질 (도 5) 및 M 단백질 (도 7) 결합 단백질의 확인으로, 세포 용해물은 Vero 세포 및 MERS-CoV-감염된 Vero 세포로부터 제조되었다. 세포 용해물(150 μ g 단백질)을 항-S mAb (도 5) 또는 항-M mAb (도 7)로 면역 침전시킨 후, 4-12 % 구배 SDS-PAGE로 분리하고 쿠마시브릴리언트 블루 G-250으로 염색하였다. 겔에서 지시된 (화살촉) 단백질 밴드를 트립신으로 분해하고, 처리된 펩티드를 ESI-TOF MS / MS로 분석하였다. LC, 중쇄. LC, 경쇄. (도 6, 및 8) S 단백질 및 M 단백질과 N 단백질의 연관을 나타낸 것으로, 세포 용해물은 Vero 세포 및 MERS-CoV-감염된 Vero 세포로부터 제조되었다. 용해물을 항-S mAb (도 6) 또는 항-M mAb (도 8)로 면역 침전시키고 면역 복합체를 기재된 항체로 웨스턴 블롯 처리하였다. N 단백질 (항-N Ab) 분석을 위한 면역 침전된 샘플의 로딩량은 다른 것 (항-S mAb, 항-M mAb) (도 6, 및 8) 분석을 위한 양의 절반이었다. 신호 검출을 위한 노출 시간은 각각 120 초 (anti-S mAb, anti-M mAb) 및 5 초 (anti-N Ab)였다,

도 9는 MERS-CoV S 단백질 결합 단백질의 확인을 나타낸 그림으로, MERS-CoV S 단백질과 동시 면역 침전된 단백질 밴드를 트립신으로 쪼개서 처리하고, 펩티드를 ESI-TOF MS/MS로 분석하였다. ~ 45 kDa 밴드에서 얻은 질량 피크 (화살표)의 MS/MS 분석은 MERS-CoV N 단백질의 펩티드 스펙트럼을 나타내며,

도 10 내지 12는 MERS-CoV S 단백질의 세포질 도메인과 MERS-CoV N 단백질의 상호 작용을 나타낸 그림으로, (도 10) S 단백질의 개략도 및 세포질 도메인의 서열을 나타내고, RBD, 수용체 결합 도메인; FP, 융합 펩티드; HR1 및 HR2, 헵타드 반복 영역 1 및 2; TM, 막 관통; CD, C- 말단 도메인; 스파이크 CD, MERS-CoV S 단백질의 C-말단 도메인; 스파이크 CD- 풀, MERS-CoV 스파이크 CD-F, 스파이크 CD-M 및 스파이크 CD-B는 합성 펩티드 서열을 나타낸다. (도 11) 면역 침전 분석을 나타내는 것으로, 세포 용해물은 Vero 세포 및 MERS-CoV-감염된 Vero 세포로부터 제조되었다. 각각의 바이오틴화된 합성 펩티드 서열로부터 수득된 면역 복합체에 항-N Ab를 사용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 우측 칼럼은 N 단백질의 상대적 밴드 강도를 나타낸다. (도 12) MERS-CoV 스파이크 CD와 MERS-CoV N 단백질의 상호 작용에 대한 스파이크 CD 펩티드의 경쟁을 나타내는 것으로, 세포 용해물은 MERS-CoV-감염된 Vero 세포로부터 제조되었다. 용해물을 각각의 스파이크 CD-F, 스파이크 CD-M 및 스파이크 CD-B 펩티드로 37 °C에서 2 시간 동안 인큐베이션한 다음, 바이오틴화된 스파이크 CD- 풀 펩티드 (Spike CD-Full-Biotin)로 37 °C에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 스트렙타비딘-비드에 의해 수득된 면역 복합체에 항-N 단백질 항체를 사용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 우측 칼럼은 N 단백질의 상대적 밴드 강도를 나타낸다.

도 13은 Vero 세포에서 R-Spike CD의 위치를 나타낸 그림으로, Vero 세포를 24 시간 동안 배양한 다음 37 °C에서 5 % CO₂ 배양기에서 30 분 동안 R-스파이크 CD-비오틴 펩티드로 배양하였다. 샘플을 4 % 파라포름알데히드로 고정시키고 0.1 % 트리톤 X-100으로 투과화시켰다. 세포-투과된 R-스파이크 CD-비오틴 펩티드는 Carl Zeiss LSM710에 의해 Alexa flour-488- 접합된 스트렙타비딘 (녹색)으로 검출되었다. 핵은 Hoechst 33258 (청색)로 염색되었다. 스케일 바, 10 μm. R-스파이크 CD, N- 말단에 9 개의 D- 아르기닌을 갖는 MERS-CoV S 단백질의 C-말단 도메인에 상응하는 펩타이드; R-스파이크 CD-비오틴, 바이오틴화된 R-스파이크 CD 펩타이드.

도 14 내지 17은 MERS-CoV 생산에 대한 R-Spike CD의 효과를 나타낸 그림으로, (도 14 및 15) R-Spike CD에 의한 MERS-CoV 단백질 생산 감소를 나타내는 것으로, (도 14) 세포 용해물은 MERS-CoV(R-Spike CD의 존재 또는 부재)로 감염된 Vero 세포로부터 기재된 시점에서 제조되었다. 기재된 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅에 의해 세포 용해물을 분석하였다. (도 15) Vero 세포를 무 혈청 배지에서 MERS-CoV (R-Spike CD 펩티드의 유무에 관계없이)로 감염시켰다. 세포를 48 시간 동안 배양한 다음, 항-S mAb와 그 다음 Alexa Flour 488- 접합된 염소 항-마우스 IgG 항체로 염색한 후 공 초점 현미경으로 분석하였다. 스케일 바, 20 μm. (도 16 및 17) R-스파이크 CD에 의한 MERS-CoV 플라크 형성의 억제를 나타내는 것으로, MERS-CoV를 2 배 연속 희석된 R-Spike CD 및 R-CP-1과 혼합하였다. MERS-CoV 바이러스-펩티드 혼합물을 37 °C에서 5 % CO₂ 배양기에서 Vero 세포에 처리 하였다. 1 시간 동안 배양한 후, 배지를 제거한 다음 0.6 % 옥소이드 아가를 함유하는 DMEM/F12로 보충하였다. 4 일 배양 후, 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 플라크 형성을 확인하였다. (도 16) 플라크 형성을 나타내는 대표적인 사진. (도 17) 0 μM 내지 100 μM의 각 펩티드로 처리한 후 MERS-CoV 감염에 의해 수득된 플라크의 정량화를 나타내는 것으로, 단지 MERS-CoV 바이러스로 처리된 대조군 플레이트에서 얻은 플라크 수는 100 %를 얻었다. R-스파이크 CD, N- 말단에 9 개의 D- 아르기닌을 갖는 S 단백질의 C-말단 도메인에 상응하는 펩타이드; R-CP-1, 9 개의 D- 아르기닌-접합 대조군 펩티드.

도 18은 SARS-CoV-2 생산에 대한 R-Spike CD-COVID-19의 효과를 나타낸 그림으로, 세포투과성 스파이크 CD-COVID-19 펩티드(R-Spike CD-COVID-19)에 의한 SARS-CoV-2 생산의 억제를 나타내는 것으로, SARS-CoV-2(0.1 MOI)을 37 °C에서 5 % CO₂ 배양기에서 Vero 세포에 처리하였다. 1 시간 동안 배양한 후, 배지를 제거한 다음 2% FBS를 포함하는 DMEM으로 보충하였다. 6 시간 동안 배양한 후, 세포투과성 스파이크 CD-COVID-19 펩티드(R-Spike CD-COVID-19), 대조군 세포 투과 펩티드 (R-CP-1) 및 세포투과성 MERS-CoV의 스파이크 CD 펩티드 (R-Spike CD(MERS)), 각 5 μM를 각각 처리하였다. SARS-CoV-2 감염 24시간 후, 세포배양액에서 바이러스 RNA를 분리하고, cDNA를 제조하였다. SARS-CoV-2의 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP)에 대한 primer들을 이용하여 real-time RCR을 수행하여 생산된 바이러스를 정량화하였다. R-스파이크 CD-COVID-19, N- 말단에 9 개의 D-아르기닌을 갖는 SARS-CoV-2 S 단백질의 C-말단 도메인에 상응하는 펩타이드; R-스파이크 CD, N- 말단에 9 개의 D-아르기닌을 갖는 MERS-CoV S 단백질의 C-말단 도메인에 상응하는 펩타이드; R-CP-1, 9 개의 D-아르기닌-접합 대조군 펩티드.

도 19는 72 시간 HCoV-OC43-감염 세포에서 S 및 N 단백질의 발현 및 HCoV-OC43 S 단백질과 HCoV-OC43 N 단백질

의 상호 작용을 나타내는 그림으로, (A) 세포 용해물은 Vero 세포 및 HCoV-OC43-감염된 Vero 세포로부터 제조되었고, 세포 용해물을 4-12 % 구배 SDS-PAGE로 분리하고 표시된 항체로 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. (B) S 단백질과 N 단백질의 연관을 나타낸 것으로, 세포 용해물은 Vero 세포 및 HCoV-OC43-감염된 Vero 세포로부터 제조되었다. 용해물을 항-S Ab로 면역 침전시키고 면역 복합체를 기재된 항체로 항-N mAb로 웨스턴 블롯 처리하였다. HC, 중쇄. LC, 경쇄. S, S 단백질. N, N 단백질.

도 20는 HCoV-OC43 S 단백질과 N 단백질 생산에 대한 R-Spike CD-OC43의 효과를 나타낸 그림으로, R-Spike CD-OC43에 의한 HCoV-OC43 단백질 생산 감소를 나타내는 것으로, 세포 용해물은 HCoV-OC43 (R-Spike CD-OC43의 존재 또는 부재)로 감염된 Vero 세포로부터 48시간 후에 제조되었다. 기재된 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅에 의해 세포 용해물을 분석하였다.

도 21 내지 22는 HCoV-OC43 S 단백질과 N 단백질 생산에 대한 R-Spike CD-OC43의 효과를 나타낸 그림으로, Vero 세포를 HCoV-OC43 (R-Spike CD-OC43의 존재 또는 부재)로 감염시켰다. 세포를 48 시간 동안 배양한 다음, (도 21) S 단백질은 항-S Ab와 그 다음 Alexa Flour 488- 접합된 염소 항-토끼 IgG 항체로 염색한 후 공 초점 현미경으로 분석하였다. (도 22) N 단백질은 항-N mAb와 그 다음 Alexa Flour 488- 접합된 토끼 항-마우스 IgG 항체로 염색한 후 공 초점 현미경으로 분석하였다. 스케일 바, 20 μ m.

도 23은 HCoV-OC43 바이러스 생산에 대한 R-Spike CD-OC43의 효과를 나타낸 그림으로, 스파이크 CD-OC43펩티드 (R-Spike CD-OC43)에 의한 HCoV-OC43 생산의 억제를 나타내는 것으로, HCoV-OC43(0.1 MOI)을 37 °C에서 5 % CO₂ 배양기에서 Vero 세포에 처리하였다. 1 시간 동안 배양한 후, 배지를 제거한 다음 2% FBS를 포함하는 DMEM으로 보충하였다. 6 시간 동안 배양한 후, 세포 투과 스파이크 CD-OC43 펩티드 (R-Spike-CD-OC43) 및 대조군 스파이크 CD-OC43 펩티드 (Spike-CD-OC43) (각 2 μ M)를 각각 처리하였다. HCoV-OC43 감염 48시간 후, 세포배양액에서 생산된 바이러스를 플라크형성 시험으로 정량화하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0080] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0081] 실시예 1: 세포주 및 바이러스

[0082] Vero 세포, Vero E6 세포 및 Calu-3 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 10 % 우 태아 혈청 (FBS, Thermo Fisher Scientific), 25 mM HEPES, 100 U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 함유하는 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)에서 세포를 배양하였다. 세포를 37 °C에서 95 % 공기 및 5 % CO₂의 대기 조건에서 인큐베이션 하였다. MERS-CoV/KOR/KNIH/002_05_2015와 SARS-CoV-2 (NCCP No. 43326)는 한국 질병 관리 본부에서 입수하였다. 바이러스 제조 및 세포 배양 절차는 생물 안전 수준 3(BSL-3) 조건에서 수행되었다. HCoV-OC43 (KBPV-VR-8)는 병원성바이러스은행(Korea Bank for Pathogenic Viruses, 고려대학교)에서 입수하였다. HCoV-OC43 제조 및 세포 배양 절차는 생물 안전 수준 2(BSL-2) 조건에서 수행되었다.

[0083] 실시예 2: 펩타이드 합성

[0084] MERS-CoV의 스파이크 CD를 MERS-CoV S 단백질 서열 (MERS-CoV/KOR/KNIH/ 002_05_2015(GI:829021049))로부터 분석하였고, S 단백질과 N 단백질의 상호 작용을 조사하기 위해 하기 펩타이드를 설계 하였다 :

[0085] 스파이크 CD-F, ¹³¹⁸TGCGTNCMGKLCNRC ¹³³³. (서열번호 1)

[0086] 스파이크 CD-M, ¹³²⁷KLKCNRCDDRYEYDL ¹³⁴³. (서열번호 2)

[0087] 스파이크 CD-B, ¹³³⁶DRYEYDLEPHKVHVH ¹³⁵³. (서열번호 3)

[0088] 스파이크 CD- 전체, ¹³¹⁸TGCGTNCMGKLCNRCDDRYEYDLEPHKVHVH ¹³⁵³. (서열번호 4)

[0089] 모든 펩티드는 자동 펩티드 합성기(Anygen Co., LTD. 광주)로 합성하였다. 펩티드를 세포 내로 침투시키기 위해, 각각의 펩티드를 N- 말단상의 9 개의 D-아르기닌(R-Spike CD) 및/또는 C-말단의 바이오틴(R-Spike CD-Biotin, Spike CD-Full-비오틴, 스파이크 CD-F-비오틴, 스파이크 CD-M-비오틴, 스파이크 CD-B-비오틴))과 접합시켰다 9 개의 D-아르기닌-컨쥬게이트된 대조군 펩티드 R-CP-1 (NH₂-d-RRRRRRRRR-AQARRKNYGLDIFP-COOH; (서열

번호 5))을 대조군 세포 침투 펩티드(D. Raina, 등 *Cancer Res.* **69**, 5133-5141 (2009))로 사용하였다.

- [0090] 코로나바이러스감염증-19 코로나바이러스인 SARS-CoV-2의 스파이크 CD를 SARS-CoV-2 S 단백질 서열 (QHD43416) 및 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스인 SARS-CoV의 스파이크 CD를 SARS-CoV S 단백질 서열 (NP_828851.1)로부터 분석하였고, 펩티드를 세포 내로 침투시키기 위해, SARS-CoV-2의 스파이크 CD 펩티드를 N-말단상의 9 개의 D-아르기닌(R-스파이크 CD-COVID-19)과 접합한 하기 펩타이드를 설계하였다 : SARS-CoV-2가 COVID-19(질병명)을 유발하는 바이러스 명칭이고, 펩타이드의 이름을 명명할 때 SARS-CoV-2가 너무 길어 COVID-19으로 명명함.
- [0091] 스파이크 CD-COVID-19, ¹²³⁴LCCMTSCCSCLKG **CC**SCGSCCKFDEDDSEPVKGVKLHYT ¹²⁷³ (서열번호 6)
- [0092] 스파이크 CD-SARS-CoV ¹²¹⁶LCCMTSCCSCLKG **AC**SCGSCCKFDEDDSEPVKGVKLHYT ¹²⁵⁵ (서열번호 7)
- [0093] 스파이크 CD-SARS-CoV가 스파이크 CD-COVID-19와 아미노산 서열이 하나가 달라 스파이크 CD-SARS-CoV 를 합성하여 별도의 실험을 하지는 않았음.
- [0094] 인간코로나바이러스 OC43 (HCoV-OC43)의 스파이크 CD를 HCoV-OC43 S 단백질 서열 (YP_009555241.1)로부터 분석하였고, 펩티드를 세포 내로 침투시키기 위해, HCoV-OC43의 스파이크 CD 펩티드를 N-말단상의 9 개의 D-아르기닌(R-스파이크 CD-OC43)과 접합한 하기 펩타이드를 설계하였다.
- [0095] 스파이크 CD-OC43, ¹³²⁰CCTGCGTSCFKKCGGCCDDYTG YQELVIKTSHDD ¹³⁵³ (서열번호 8)
- [0096] 실시예 3: 항체
- [0097] MERS-CoV S 단백질(항-S mAb)(B. K. Park, S. Maharjan, S. I. Lee, J. Kim, J.-Y. Bae, M.-S. Park, H.-J. Kwon, *BMB Rep* **52**, 397-402 (2019))에 대한 단일클론 항체 (492-1G10E4E2 클론) 및 MERS-CoV M 단백질(항-M mAb)(B. K. Park, S. I. Lee, J.-Y. Bae, M.-S. Park, Y. Lee, H.-J. Kwon, *Int J Pept Res Ther*, 1-8 (2018))에 대한 단일클론 항체(M158-2D6F11 클론)는 D. Kim, S. Kwon, J. W. Rhee, K. D. Kim, Y.-E. Kim, C.-S. Park, M. J. Choi, J.-G. Suh, D.-S. Kim, Y. Lee, *BMC Immunol.* **12**, 29 (2011)에 기재된 바와 같이 CpG-DNA-리포좀 복합체로 제형화된 각각의 펩티드 에피토프를 사용하여 BALB/c 마우스의 면역화 후 확립된 하이브리도마 세포로부터 제조하였다.
- [0098] 스파이크-492(⁴⁹²TKPLKYSYINKSRLSSDDRTEVPQ ⁵¹⁶; (서열번호 9)) 및 MERS-M158 (¹⁵⁸CDYDRLPNEVTVAKP NVLI ALKMKV ¹⁸²; (서열번호 10))을 각각 MERS-CoV의 S 단백질(Spike glycoprotein universal sequence (GI : 510785803)) 및 M 단백질에 대한 B 세포 에피토프 서열로 사용하였다. 토끼 항-MERS N 단백질 항체 (항 -N Ab)는 Sino Biological(Cat. No.40068-RP02, Vienna, Austria)에서 구입하였고 항-β-actin 항체는 Sigma-Aldrich (미국 미주리 주 세인트루이스)에서 구입하였다.
- [0099] 마우스 항-HCoV-OC43 N 단백질 항체 (항-N mAb)는 LSBio (Cat No. LS-C79764, Seattle, USA)에서 구입하였고, 토끼 항-HCoV-OC43 S 단백질 항체 (항-S Ab)는 LSBio (Cat No. LS-C371066)에서 구입하였다.
- [0100] 실시예 4: MERS-CoV 감염 및 공동면역침전법
- [0101] Vero 세포를 6×10^5 세포/10cm 디쉬의 밀도로 12 시간 동안 배양하였다. MERS-CoV(0.1 MOI)를 무 혈청 배지에서 Vero 세포에 접종한 후 37 °C에서 5 % CO₂ 배양기에서 1 시간 동안 배양하였다. 인큐베이션 후, 상청액을 제거한 후, 각 디쉬에 25 mM HEPES, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 배지로 보충하였다.
- [0102] 감염 3 일 후, 세포 용해 버퍼(10mM HEPES, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 100mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 프로테아제 억제제 각테일 및 1 % NP-40)에서 MERS-CoV-감염된 Vero 세포를 4 °C에서 30 분 동안 용해시켰다. 세포 용해물을 원심 분리하여 세포 잔해물을 제거하고, 세포 용해물을 4 °C에서 3 시간 동안 항-S mAb 또는 항-M mAb와 함께 인큐베이션하였다.
- [0103] 단백질 A 비드(CaptivAtm PrimAB 52 %(v/v) 슬러리, REPLIGEN, Waltham, MA, USA)를 첨가한 다음, 원심분리에 의해 면역 복합체를 수집하였다. 면역 복합체를 4-12 % 구배 SDS-PAGE(Bolttm 4-12 % Bis-Tris Plus 겔, Thermo Fisher Scientific)에 의해 분리하고 쿠마시 브릴리언트 블루 G-250으로 염색하였다.

- [0104] 실시예 5: MERS-CoV S 단백질 결합 단백질 분석
- [0105] MERS-CoV-감염 세포 용해물에서 항-S mAb로 면역침전 후, 그 면역 복합체를 4-12 % 구배 SDS-PAGE에 의해 분리한 다음, 관심있는 단백질 밴드를 절단하였다. 단백질 밴드는 Proteinworks Co(서울, 한국)에 의해 분석되었다.
- [0106] 겔 중의 단백질 밴드를 트립신으로 분해하고 생성된 펩티드를 Poros 역상 R2 컬럼(PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA)을 사용하여 분석하였다. 분리된 펩티드는 flight 질량 분석기/질량 분석기(4700 MALDI-TOF/TOF, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)의 전기 분무 이온화 시간을 사용하여 조사하였다. 펩티드 서열은 국립 생명공학정보센터 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 데이터베이스를 사용하여 분석하였다.
- [0107] 실시예 6: 웨스턴 블롯팅 및 면역 침전
- [0108] 감염되지 않은 Vero 세포 용해물 및 MERS-CoV-감염 세포 용해물을 세포 용해 버퍼(20mM Tris·HCl pH 8.0, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 100mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 1 % NP-40)로 제조하고 4 °C에서 14,000 rpm으로 20 분 동안 원심 분리한 후 4-12 % 비스-트리스 구배 겔(Thermo Fisher Scientific)에서 분리하였다.
- [0109] 분리된 단백질을 니트로 셀룰로스 막으로 옮긴 다음 막을 4 °C에서 밤새 항-S mAb, 항-M mAb, 항-N Ab 또는 항-β 액틴 항체와 함께 배양하였다. 막을 호스라디쉬 퍼옥시다제-접합된 이차 항체로 배양한 후, 면역 반응성 밴드를 enhanced chemiluminescence(ECL) 시약 (Thermo Fisher Scientific)으로 반응하였다.
- [0110] 각 MERS-CoV 단백질의 결합 특성을 수행하기 위해, 공동면역 침전분석을 상기와 같이 각각의 MERS-CoV 단백질로 수행하였다. 동시면역 침전된 단백질들은 항-S mAb, 항-M mAb 또는 항-N Ab를 사용하여 웨스턴 블롯팅에 의해 동정되었다.
- [0111] 실시예 7: MERS-CoV 스파이크 CD 펩타이드와 N 단백질의 상호 작용 분석
- [0112] MERS-CoV-감염된 세포 용해물을 하기 바이오틴화화된 펩티드:
- [0113] 스파이크 CD-전체-바이오틴,
- [0114] 스파이크 CD-F-바이오틴,
- [0115] 스파이크 CD-M- 바이오틴 및
- [0116] 스파이크 CD-B-바이오틴
- [0117] 중 하나와 함께 4 °C에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 배양 후, 스트렙타비딘-아가로스(Thermo Fisher Scientific)를 첨가한 후, 원심분리에 의해 면역 복합체를 수집하였다.
- [0118] 면역 복합체를 10 % SDS-PAGE에서 분리한 다음 항-N Ab를 사용하여 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 밴드 밀도는 Quantity One(Bio-Rad, 미국 캘리포니아 주 허클리스 소재)의 프로그램에 의해 분석되었다.
- [0119] N 단백질과의 상호 작용에 관여하는 스파이크-CD의 주요 영역을 결정하기 위해, MERS-CoV 감염된 세포 용해물을 스파이크 CD-F, 스파이크 CD-M 및 스파이크 CD-B의 각각의 펩티드와 함께 4 °C에서 인큐베이션하였다. 1 시간 동안 배양한 후, 스파이크 CD-바이오틴을 각 샘플에 첨가한 다음, 4 °C에서 2 시간 동안 배양하였다. N 단백질과 스파이크 CD-바이오틴의 상호 작용은 상기 한 바와 같이 스트렙타비딘-아가로스와 면역 침전에 의해 결정되었다.
- [0120] 실시예 8: MERS-CoV 스파이크 CD 펩티드의 세포 투과
- [0121] Vero 세포 (5×10^4)를 12 웰 플레이트에서 커버 글라스 상에 시딩하였다. 하루 후, 세포를 37 °C에서 30 분 동안 5 % CO₂ 배양기에서 R-스�파이크 CD-바이오틴으로 배양하였다.
- [0122] 세포를 4 % 파라포름알데히드로 고정시킨 후 1 % BSA를 함유하는 PBST로 세포를 투과시켰다. Alexa flour-488-부착된 스트렙타비딘 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)을 첨가하고 1 시간 동안 인큐베이션 한 다음, 샘플을 PBST로 세척하였다. Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific)을 첨가하여 핵을 염색시켰다. 그 슬라이드는 Carl Zeiss LSM710 (Carl Zeiss Co. Ltd. Oberkochen, Germany)에 의해 분석되었다.
- [0123] 실시예 9: 공 초점 현미경을 이용한 MERS-CoV S 단백질 발현 분석

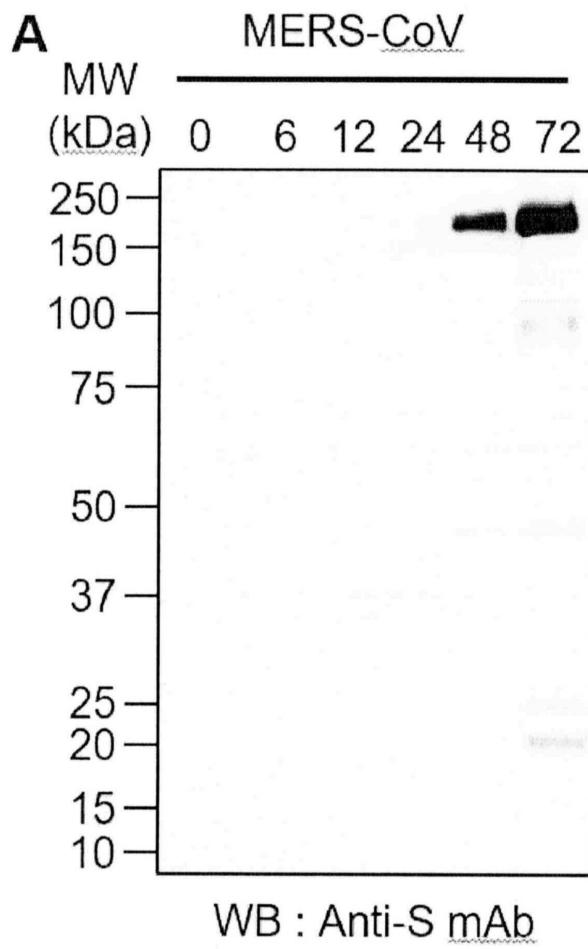
- [0124] Vero 세포 (5×10^4)를 12 웰 플레이트에서 커버 글라스 상에서 밤새 배양하고 무 혈청 배지에서 PBS 또는 R-스파이크 CD와 함께 MERS-CoV (0.1 MOI)로 감염시켰다.
- [0125] 48 시간 후, 세포를 고정한 후 1 % BSA를 함유하는 PBST로 세포를 투과시켰다. 투과된 세포를 2 시간 동안 항-S mAb와 함께 배양하였다. 세포를 1 % BSA를 함유하는 PBST로 세척한 다음 1 시간 동안 Alexa Flour 488-접합된 염소 항-마우스 IgG 항체 (Thermo Fisher Scientific)로 배양하였다. 핵을 Hoechst 33258로 염색한 다음 슬라이드를 Carl Zeiss LSM710으로 조사하였다.
- [0126] 실시예 10: 플라크 형성 분석
- [0127] Vero 세포 (6×10^5 세포/각 웰)를 6-웰 플레이트 (Corning, NY, USA) 상에 플레이팅하고 12 시간 동안 배양하였다. MERS-CoV (200 pfu)를 PBS에서 연속적으로 2 배 희석된 R-스파이크-CD 또는 R-CP-1과 혼합하였다.
- [0128] MERS-CoV 및 펩티드의 혼합물을 Vero 세포에 첨가한 후 1 시간 동안 배양하였다. 인큐베이션 후, 상층액을 제거하고, 플레이트에 0.6 % 옥소이드 아가를 함유하는 3 ml의 DMEM/F12 배지 (Thermo Fisher Scientific)로 보충하였다. 세포를 4 일 후에 크리스탈 바이올렛으로 염색하고, 플라크 수를 세고 바이러스만 처리한 대조군 샘플과 비교하였다.
- [0129] 실시예 11: SARS-CoV-2 스파이크 CD 펩티드의 SARS-CoV-2의 생산 억제 확인
- [0130] Vero 세포 (2×10^5 세포/각 웰)를 24-웰 플레이트 (Corning, NY, USA) 상에 플레이팅하고 12 시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 SARS-CoV-2 (0.1 MOI)를 37 °C에서 5 % CO₂ 배양기에서 1시간 동안 감염시켰다.
- [0131] 인큐베이션 후, 상층액을 제거하고, 플레이트에 2% FBS를 포함하는 DMEM으로 보충하였다. 6 시간 동안 배양한 후, 세포투과성 스파이크 CD-COVID-19 펩티드(R-Spike CD-COVID19), 대조군 세포 투과 펩티드 (R-CP-1) 및 세포투과 MERS-CoV의 스파이크 CD 펩티드(R-Spike CD(MERS)), 각 5 μ M)를 각각 처리하였다. 17 시간 배양 후, 세포배양액에서 바이러스 RNA를 분리하고, cDNA를 제조하였다. SARS-CoV-2의 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP)에 대한 primer들을 이용하여 real-time RCR을 수행하여 생산된 바이러스를 정량화하였다.
- [0132] 실시예 12: Real-time RT-PCR
- [0133] 세포배양액의 바이러스에서 RNA 분리는 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Catalog No. 52904, Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하였고, cDNA는 Reverse Transcription System kit (Catalog No. A3500, Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 합성하였다.
- [0134] 세포배양액의 SARS-CoV-2를 정량하기 위하여 다음과 같은 SARS-CoV-2의 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) 유전자에 대한 다음과 같은 primer들을 합성하였다. [참고문헌, Jeong-Min Kim et al., Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with COVID-19. Osong Public Health Res Perspect. 2020 Feb; 11(1): 3-7].
- [0135] Forward primer, 5'-GTGAAATGGTCATGTGTGGCGG(서열번호 11)'
- [0136] Reverse primer, 5'-CAAATGTTAAAAACACTATTAGCATA-3'(서열번호 12),
- [0137] TaqMan®Probe, 5'-FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-TAMRA-3' (서열번호 13)
- [0138] Primers 와 TaqMan®Probe서열들은 제노텍(Daejeon, South Korea)에서 합성하였다. 10 μ L의 GoTaq®Probe qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA)를 10 μ L의 forward, reverse primers(각각 125 nM) 와 TaqMan®Probe (250 nM) 혼합액에 넣고, 1 μ L의 cDNA 용액을 넣었다. 95°C에서 5 분간 가열하고, 95°C에서 15 sec, 60°C에서 1분씩 45 cycles PCR 반응시켰다. RdRP 유전자의 copy number는 RdRP 유전자의 cDNA에서 standard curve를 얻어 계산하였다.
- [0139] 실시예 13: HCoV-OC43 감염 및 S 단백질 결합 단백질 분석
- [0140] Vero 세포(6×10^5 세포/각 웰)를 6-웰 플레이트에서 12 시간 동안 배양하였다. HCoV-OC43(0.1 MOI)를 PBS에서 Vero 세포에 접종하고 37 °C에서 5 % CO₂ 배양기에서 1 시간 동안 배양하였다. 인큐베이션 후, 상층액을 제거한 후, 각 디쉬에 2% FBS, 25 mM HEPES, 100 U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM

배지로 보충하였다.

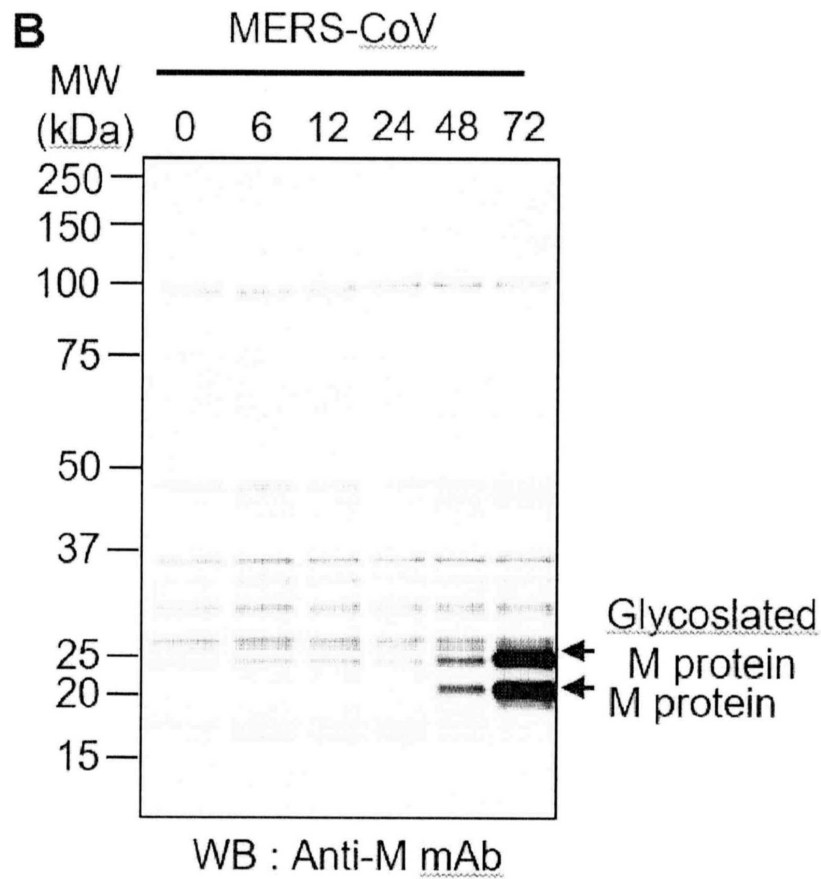
- [0141] 감염 3 일 후, 세포 용해 버퍼(10mM HEPES, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 100mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 프로테아제 억제제 콕테일 및 1% NP-40)에서 HCoV-OC43-감염된 Vero 세포를 4 °C에서 30 분 동안 용해시켰다. 감염되지 않은 Vero 세포 용해물 및 HCoV-OC43-감염 세포 용해물을 세포 용해 버퍼(20mM Tris · HCl pH 8.0, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 100mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 1 % NP-40)로 제조하고 4 °C에서 14,000 rpm으로 20 분 동안 원심분리한 후 4-12 % 비스-트리스 구배 겔(Thermo Fisher Scientific)에서 분리하였다.
- [0142] 분리된 단백질을 니트로 셀룰로스 막으로 옮긴 다음 막을 4 °C에서 밤새 항-S Ab, 항-N mAb 또는 항-β 액틴 항체와 함께 배양하였다. 막을 호스래디쉬 퍼옥시다제-접합된 이차 항체로 배양한 후, 면역 반응성 밴드를 enhanced chemiluminescence(ECL) 시약 (Thermo Fisher Scientific)으로 반응하였다.
- [0143] HCoV-OC43-감염 세포 용해물에서 항-S Ab로 면역침전 후, 그 면역 복합체를 4-12 % 구배 SDS-PAGE에 의해 분리한 다음, 동시면역 침전된 단백질들은 항-N mAb를 사용하여 웨스턴 블롯팅에 의해 동정되었다.
- [0144] 실시예 14: 공 초점 현미경을 이용한 HCoV-OC43 S 단백질 및 N 단백질 발현 분석
- [0145] Vero 세포 (5×10^4)를 12 웰 플레이트에서 커버 글라스 상에서 밤새 배양하고 PBS에서 HCoV-OC43 (0.1 MOI)로 1 시간 동안 감염시키고, 2% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다. 6 시간 후에 R-스파이크 CD-OC43를 처리하였다.
- [0146] 48 시간 후, 세포를 고정한 후 1 % BSA를 함유하는 PBST로 세포를 투과시켰다. 투과된 세포를 2 시간 동안 항-S Ab 또는 항-N mAb와 함께 배양하였다. 세포를 1 % BSA를 함유하는 PBST로 세척한 다음 1 시간 동안 Alexa Flour 488-접합된 염소 항-마우스 IgG 항체 (Thermo Fisher Scientific) 또는 염소 항-토끼 IgG 항체 (Thermo Fisher Scientific)로 배양하였다. 핵을 Hoechst 33258로 염색한 다음 슬라이드를 Carl Zeiss LSM710으로 조사하였다.
- [0147] 실시예 15: HCoV-OC43 스파이크 CD 펩티드의 HCoV-OC43의 생산 억제 확인
- [0148] Vero 세포 (2×10^5 세포/각 웰)를 24-웰 플레이트 (Corning, NY, USA) 상에 플레이팅하고 12 시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 HCoV-OC43 (0.1 MOI)를 37 °C에서 5 % CO₂ 배양기에서 1시간 동안 감염시켰다. 인큐베이션 후, 상층액을 제거하고, 플레이트에 2% FBS를 포함하는 DMEM 배지로 보충하였다. 6 시간 동안 배양한 후, 세포투과성 스파이크 CD-OC43 펩티드 (R-Spike CD-OC43) 및 HCoV-OC43 의 스파이크 CD 펩티드 (Spike CD-OC43) (각 2 μM)를 각각 처리하였다. 42 시간 배양 후, 세포배양액에 있는 바이러스를 플라크 형성 분석을 통하여 확인하였다.
- [0149] Vero 세포 (6×10^5 세포/각 웰)를 6-웰 플레이트 (Corning, NY, USA) 상에 플레이팅하고 12 시간 동안 배양하였다. 세포투과성 스파이크 CD-OC43 펩티드 (R-Spike CD-OC43) 및 HCoV-OC43 의 스파이크 CD 펩티드 (Spike CD-OC43) (각 2 μM)를 처리하고 배양한 세포배양액을 Vero 세포에 첨가한 후 1 시간 동안 배양하였다. 인큐베이션 후, 상층액을 제거하고, 플레이트에 0.6 % 옥소이드 아가를 함유하는 3 ml의 DMEM/F12 배지 (Thermo Fisher Scientific)로 보충하였다. 세포를 5 일 후에 크리스탈 바이올렛으로 염색하고, 플라크 수를 세고 바이러스만 처리한 대조군 샘플과 비교하였다.

도면

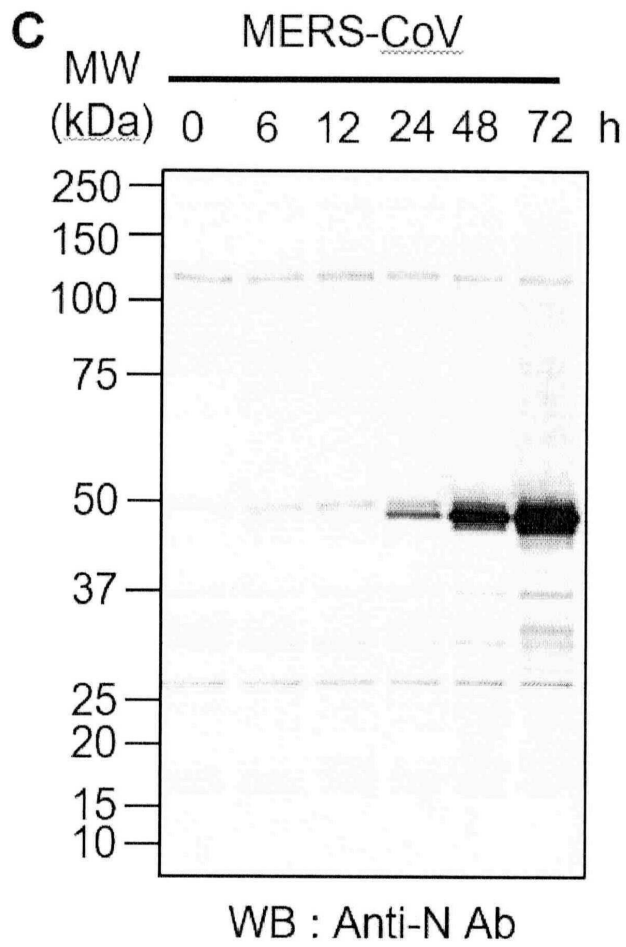
도면1



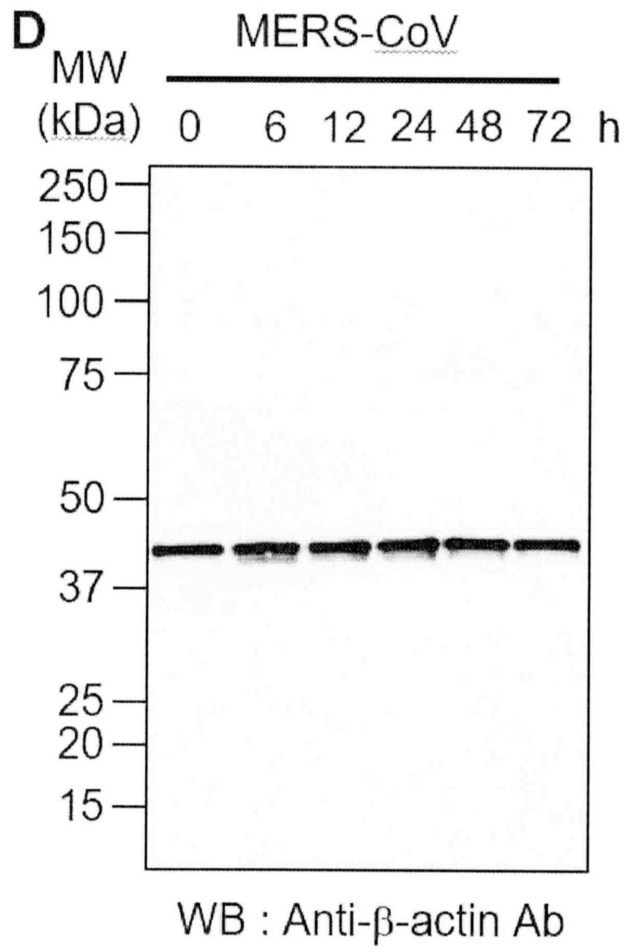
도면2



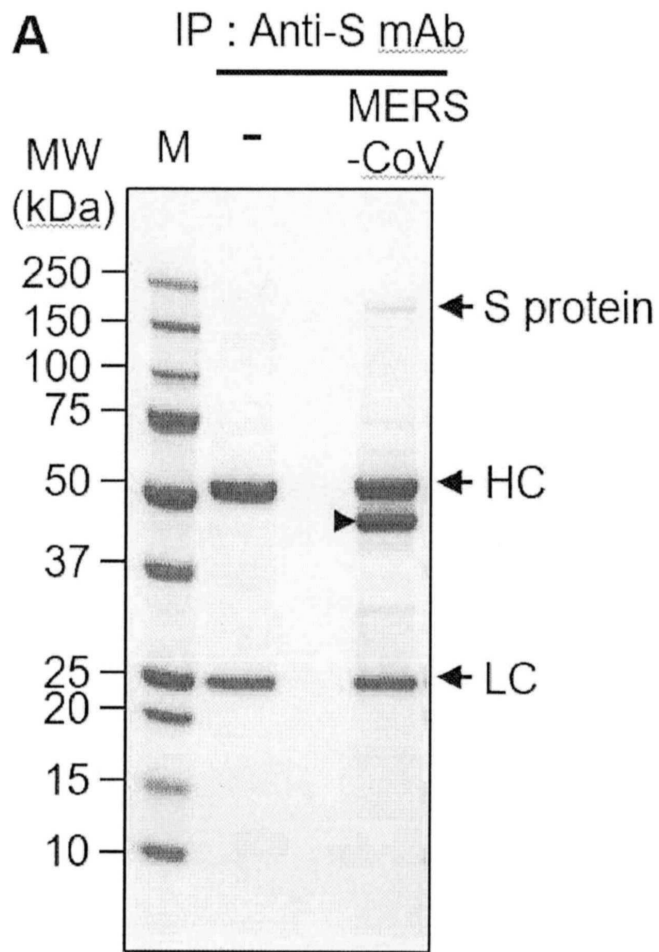
도면3



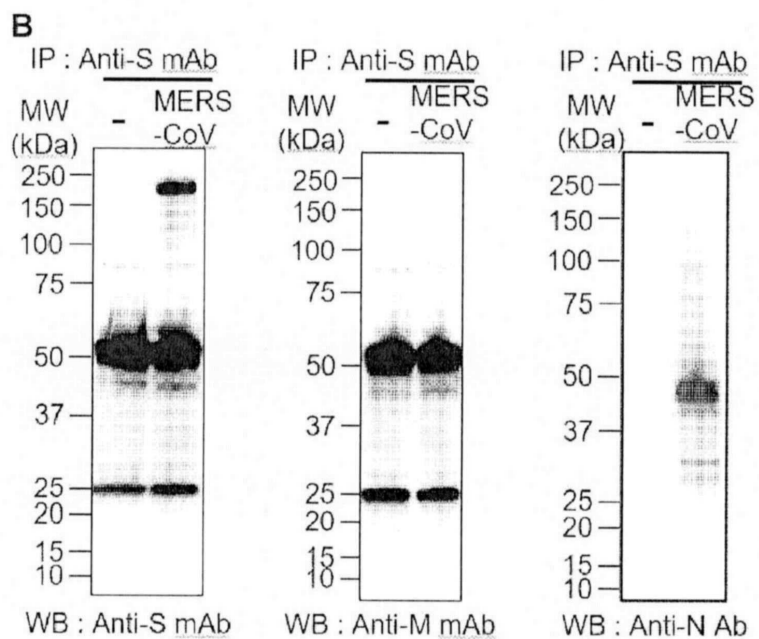
도면4



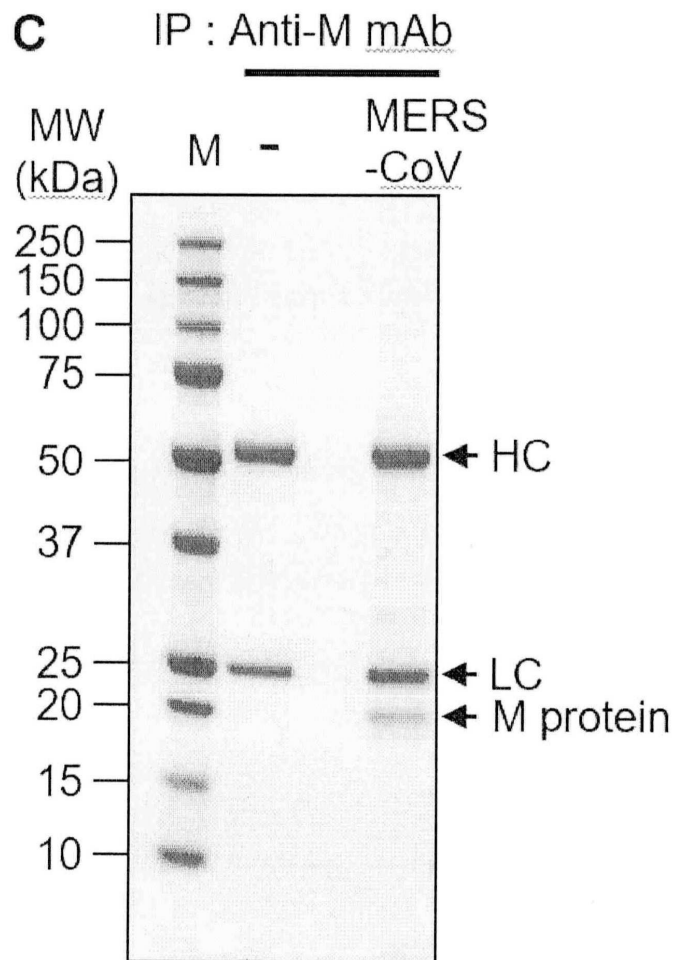
도면5



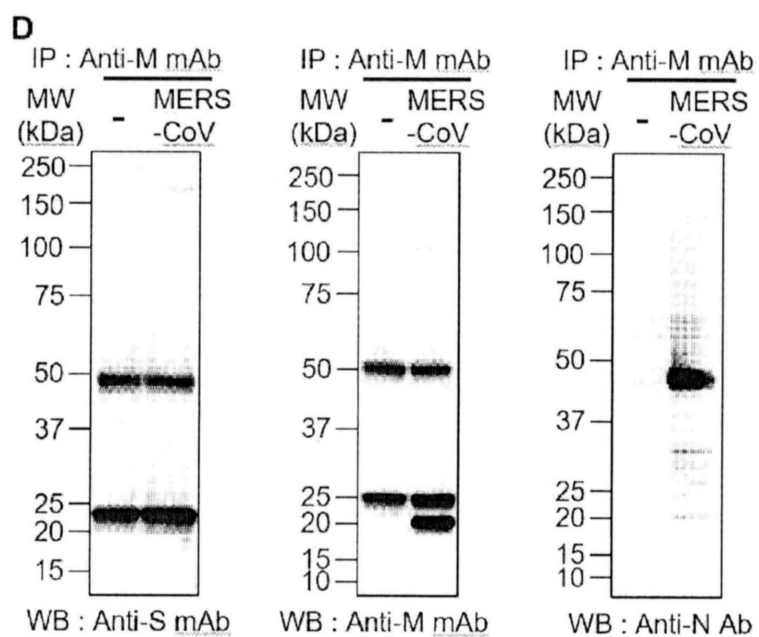
도면6



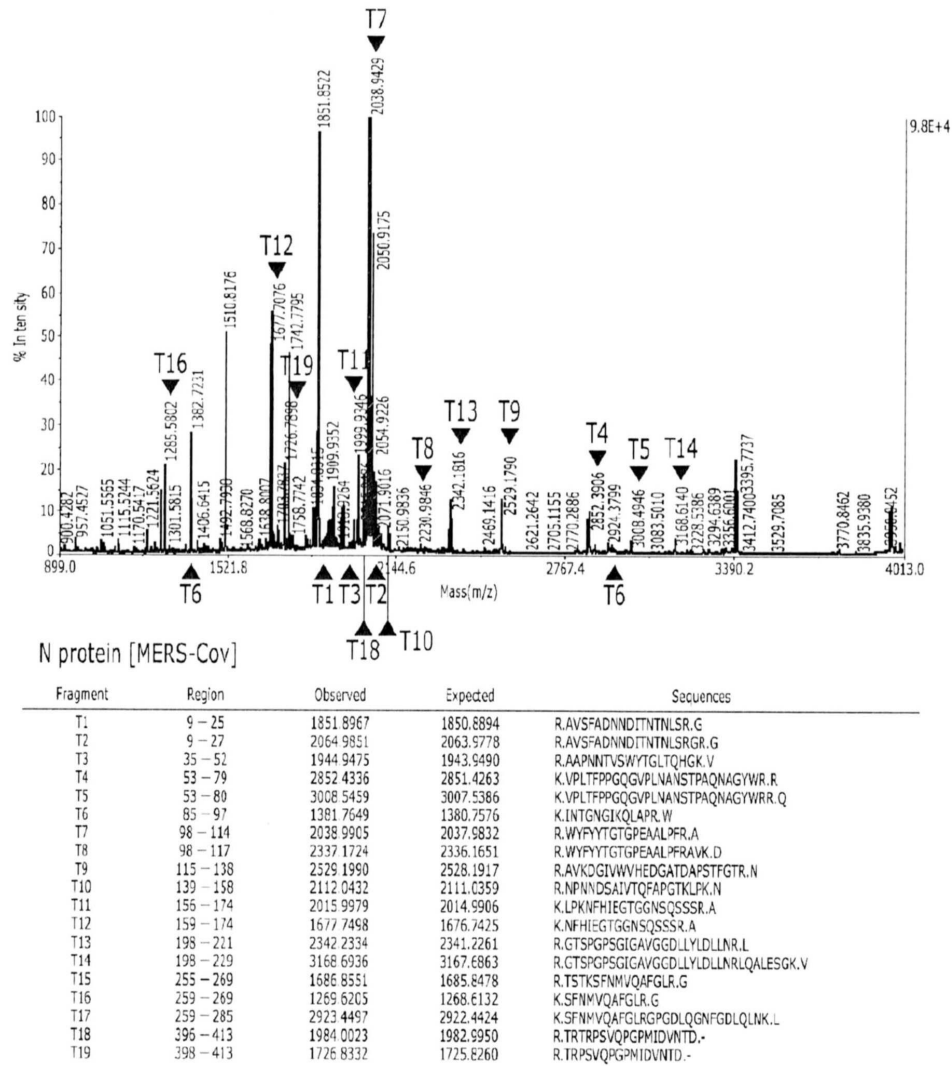
도면7



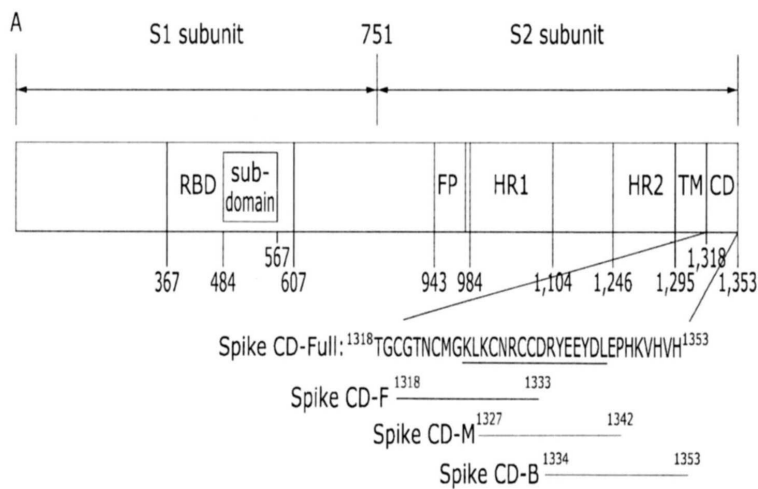
도면8



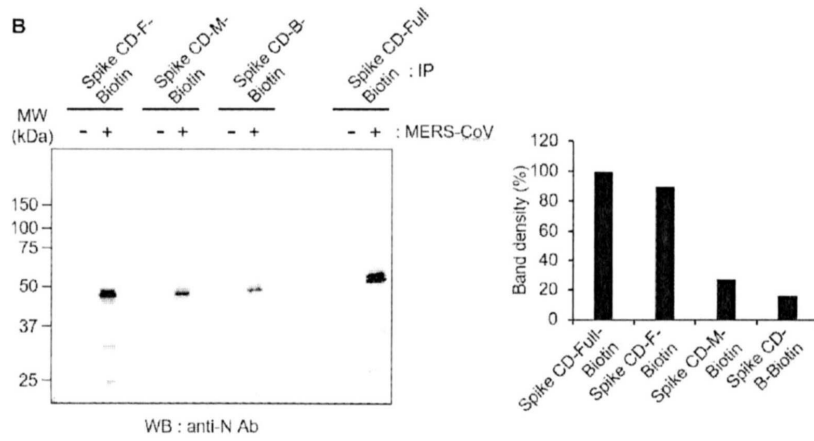
도면9



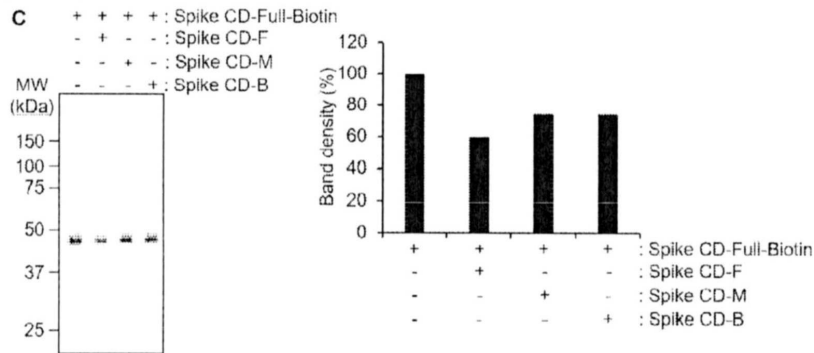
도면10



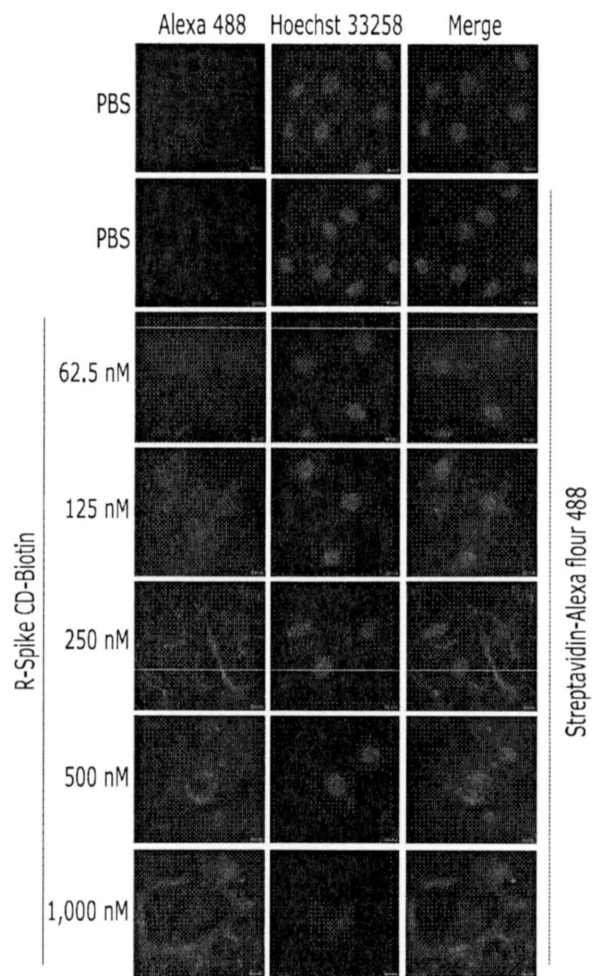
도면11



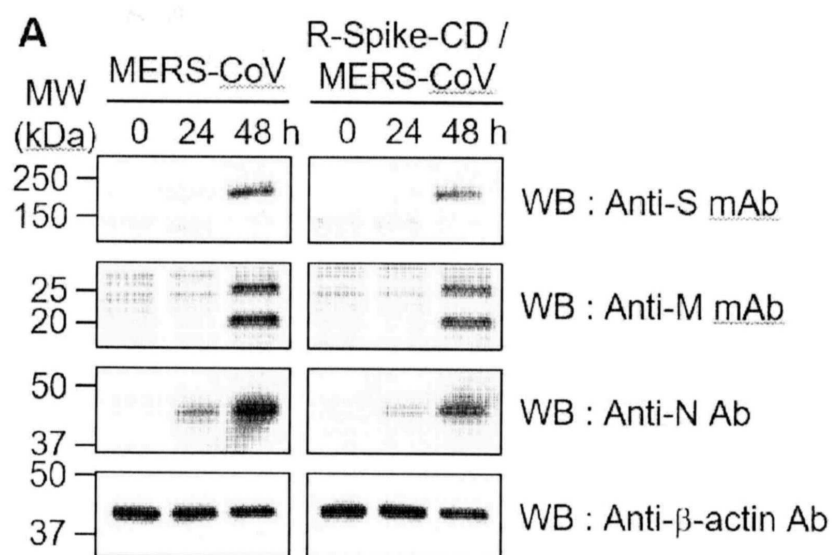
도면12



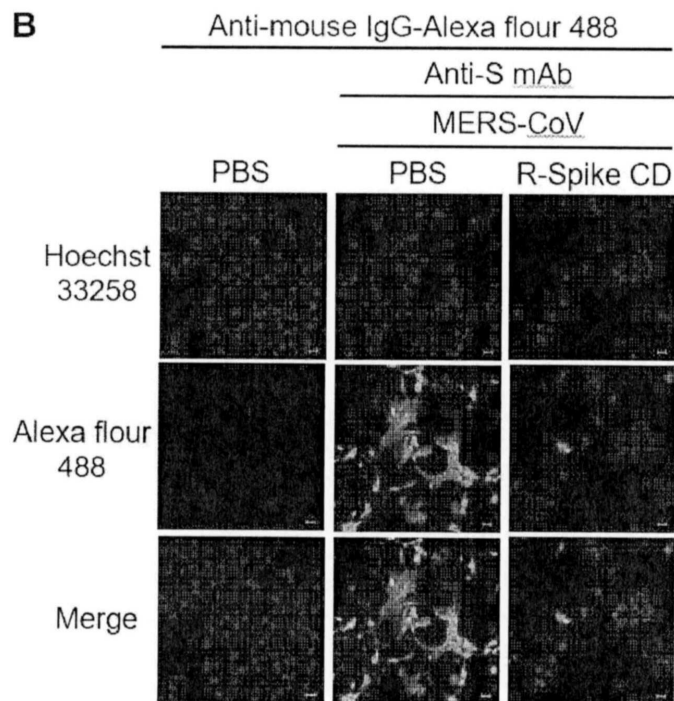
도면13



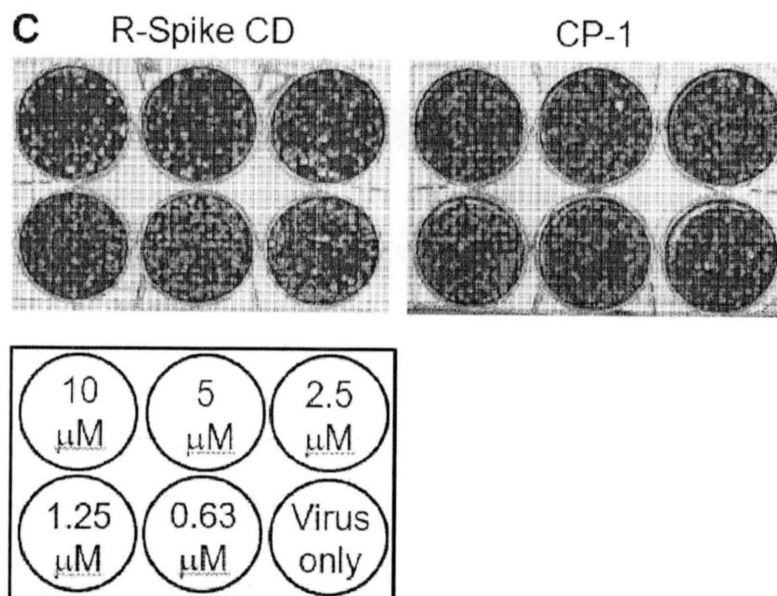
도면14



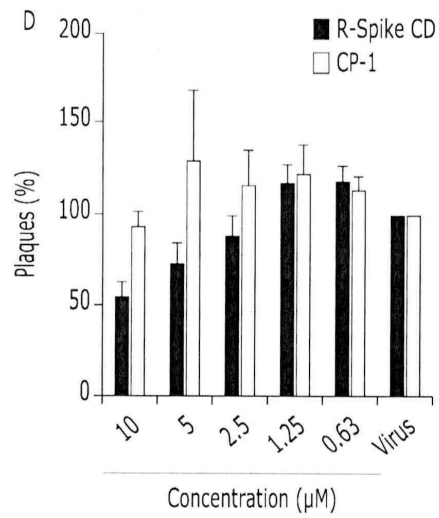
도면15



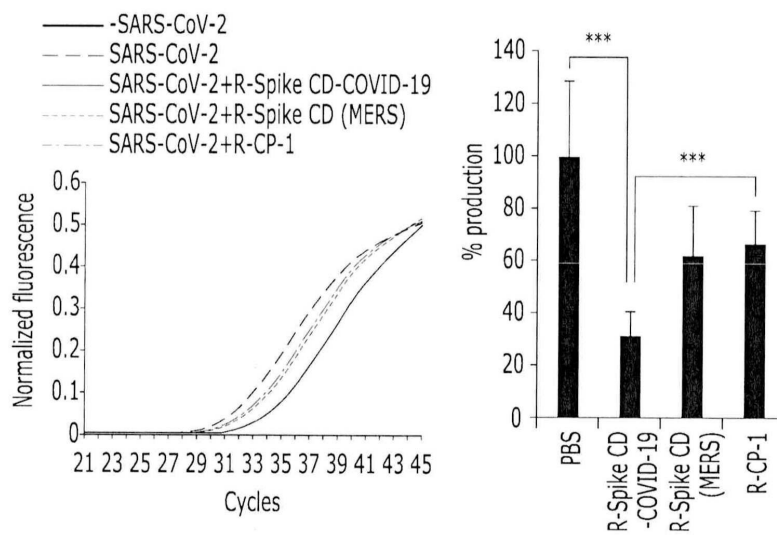
도면16



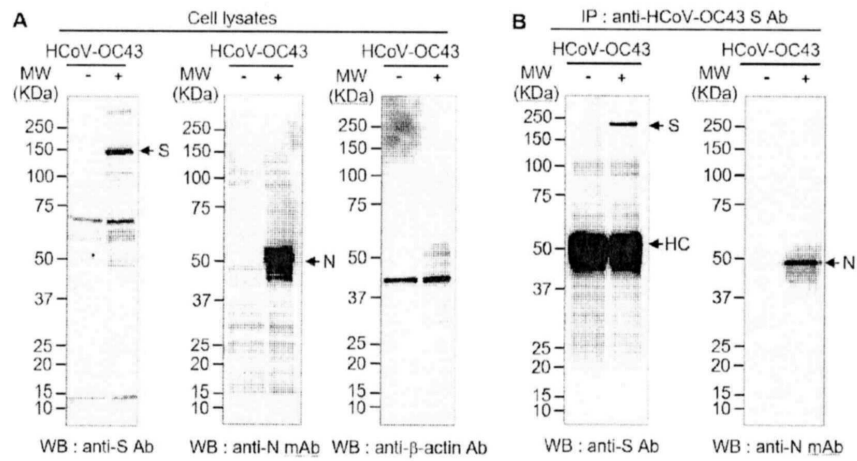
도면17



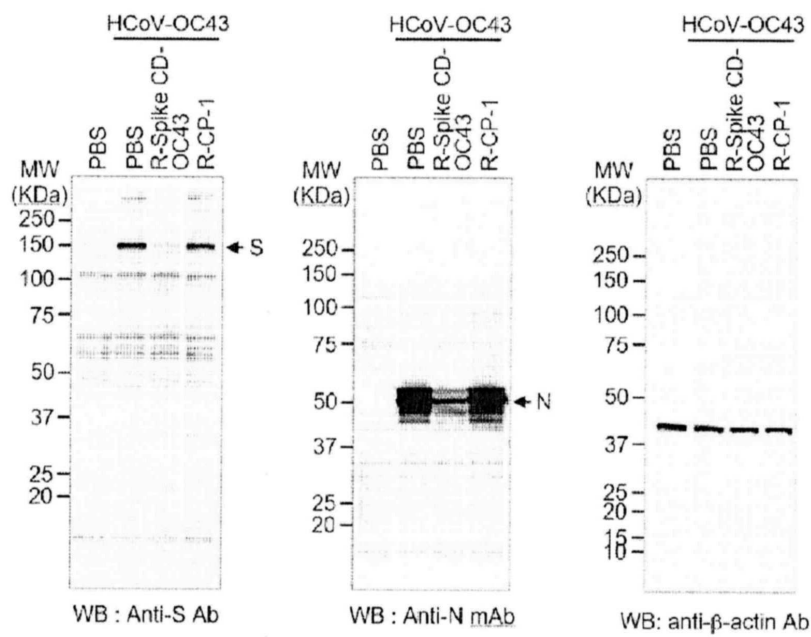
도면18



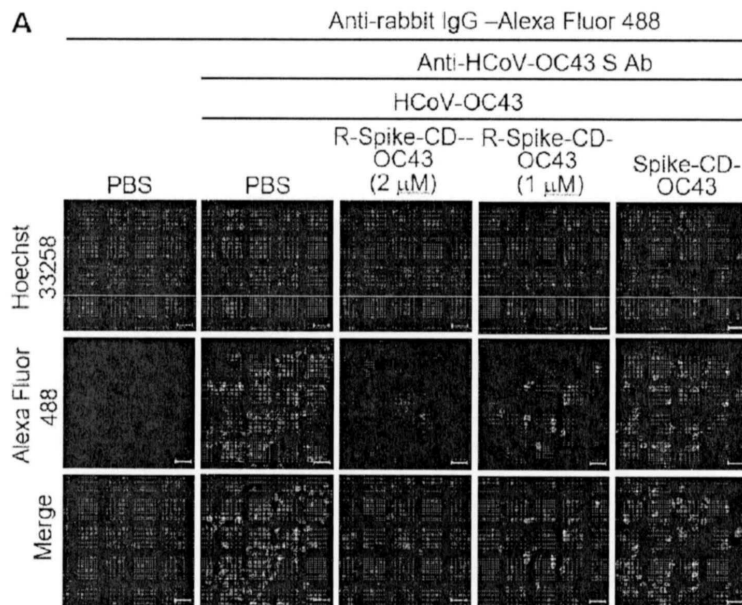
도면19



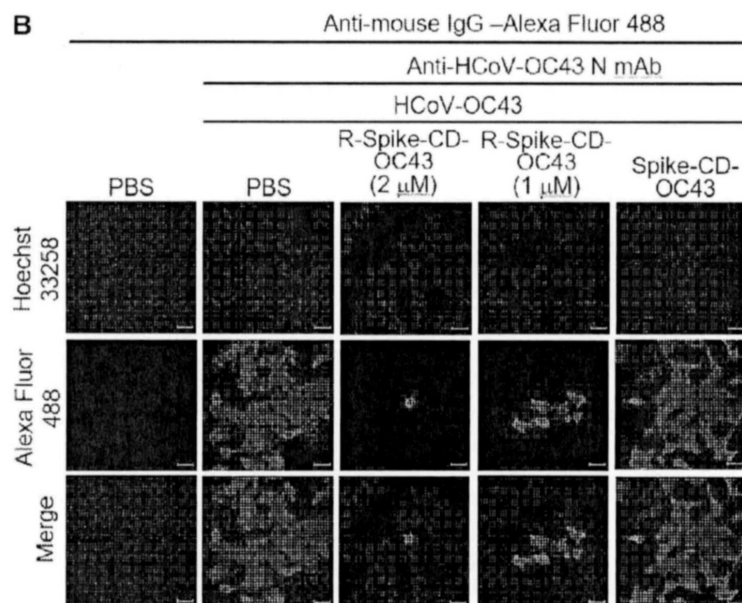
도면20



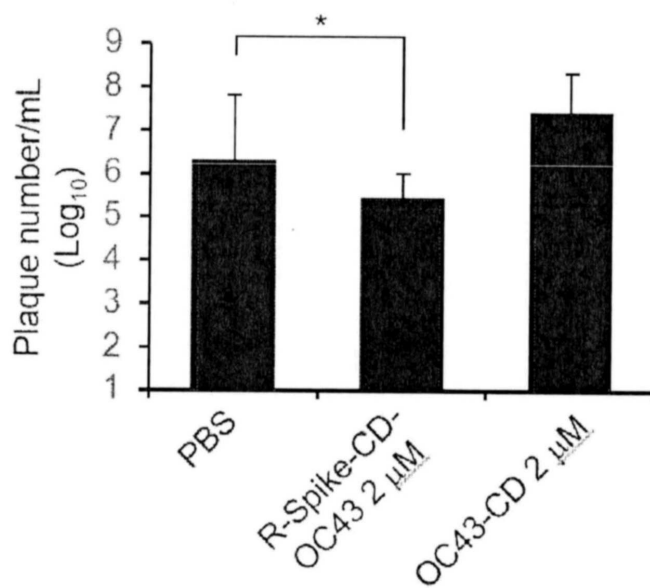
도면21



도면22



도면23



서열 목록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY

<120> A PEPTIDE FOR SUPPRESSING CORONAVIRUS AND USE OF THE SAME

<130> OP21-0005HSPCT

<150> KR 10-2020-0055190

<151> 2020-05-08

<160> 13

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD-F

<400> 1

Thr Gly Cys Gly Thr Asn Cys Met Gly Lys Leu Lys Cys Asn Arg Cys

1 5 10 15

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD-M

<400> 2

Lys Leu Lys Cys Asn Arg Cys Cys Asp Arg Tyr Glu Glu Tyr Asp Leu

1 5 10 15

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD-B

<400> 3

Asp Arg Tyr Glu Glu Tyr Asp Leu Glu Pro His Lys Val His Val His

1 5 10 15

<210> 4

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD

<400> 4

Thr Gly Cys Gly Thr Asn Cys Met Gly Lys Leu Lys Cys Asn Arg Cys

1 5 10 15

Cys Asp Arg Tyr Glu Glu Tyr Asp Leu Glu Pro His Lys Val His Val

20 25 30

His

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Control

<400> 5

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Ala Gln Ala Arg Arg Lys Asn

1 5 10 15

Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro

20

<210> 6

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> COVID-19

<400> 6

Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Cys Cys Ser

1 5 10 15

Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu

20 25 30

Lys Gly Val Lys Leu His Tyr Thr

35 40

<210> 7

<

211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD-SARS-CoV

<400> 7

Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Ala Cys Ser

1 5 10 15

Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu

20 25 30

Lys Gly Val Lys Leu His Tyr Thr

35 40

<210> 8

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCoV-OC43

<400> 8

Cys Cys Thr Gly Cys Gly Thr Ser Cys Phe Lys Lys Cys Gly Gly Cys

1 5 10 15

Cys Asp Asp Tyr Thr Gly Tyr Gln Glu Leu Val Ile Lys Thr Ser His
 20 25 30

Asp Asp

<210> 9

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Spike-492

<400> 9

Thr Lys Pro Leu Lys Tyr Ser Tyr Ile Asn Lys Cys Ser Arg Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Asp Asp Arg Thr Glu Val Pro Gln
 20 25

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MERS-M158

<400> 10

Cys Asp Tyr Asp Arg Leu Pro Asn Glu Val Thr Val Ala Lys Pro Asn
 1 5 10 15

Val Leu Ile Ala Leu Lys Met Val Lys
 20 25

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

gtgaaatggt catgtgtggc gg

22

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

caaatgttaa aaacactatt agcata 26

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 13

caggtggaac ctcatcagga gatgc 25