(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0058045
(43) 공개일자 2023년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/48 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/485 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7003077
(22) 출원일자(국제) 2021년07월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년01월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/042372
(87) 국제공개번호 WO 2022/020353
국제공개일자 2022년01월27일
(30) 우선권주장
63/053,817 2020년07월20일 미국(US)
63/150,686 2021년02월18일 미국(US)

(71) 출원인
다나-파버 캔서 인스티튜트 인크.
미국 메사추세츠 02215 보스턴 브룩클린 애비뉴 450
(72) 발명자
토르치아, 제임스
미국 메사추세츠 02127 보스턴 더블유 8티에이치 스트리트 154 유닛 1에스
프리먼, 고든, 제이.
미국 메사추세츠 02445 브루클린 월넛 스트리트 305
(74) 대리인
특허법인 광장리앤고

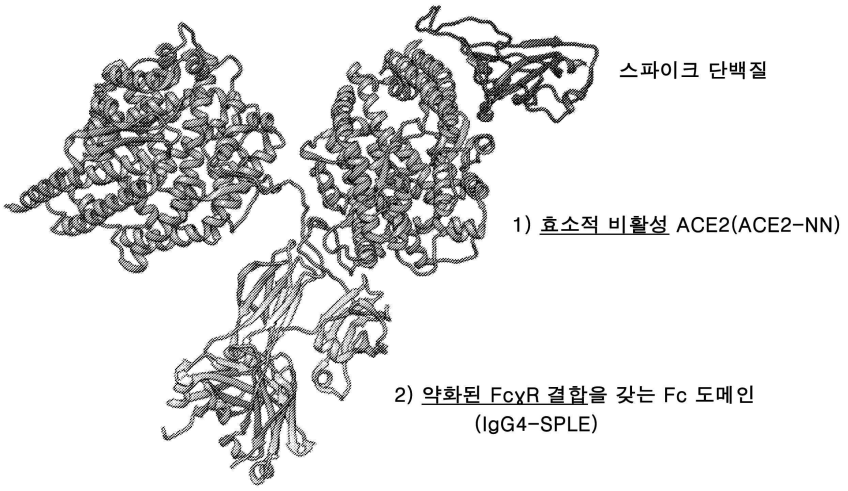
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 **코로나바이러스 감염을 치료 및 예방하기 위한 방법 및 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 부분적으로, 코로나바이러스 감염을 치료 또는 예방하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 31/14 (2018.01)
C12Y 304/17023 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

ACE2 세포외 도메인 폴리펩타이드 또는 이의 단편, 힌지 폴리펩타이드, 및 단편 결정성(Fc) 도메인 또는 이의 단편을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드로서, 상기 ACE2 세포외 도메인은 효소적으로 비활성이며, 상기 Fc 도메인 또는 이의 단편은 Fcɣ 수용체에 대해 약화된 결합 친화도를 갖는, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 ACE2 세포외 도메인 폴리펩타이드가 서열번호 1-4 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 ACE2 세포외 도메인 폴리펩타이드가 H374, H378, R273, H345, H345, H505, H505, R169, W271 및 K481로 이루어지는 군으로부터 선택되는 잔기 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ACE2 세포외 도메인 폴리펩타이드가 야생형 ACE2 폴리펩타이드에 비해 H374N, H378N, R273Q, H345A, H345L, H505A, H505L, R169Q, W271Q, 및 K481Q로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 야생형 ACE2 폴리펩타이드에 비해 H374N 또는 H378N 치환인 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 6

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 야생형 ACE2 폴리펩타이드에 비해 H374N 및 H378N 치환인 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 7

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 R273Q, H345A, H345L, H505A, H505L 아미노산 치환인 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 8

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산 치환이 R169Q, W271Q 및 K481Q 아미노산 치환인 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ACE2 세포외 도메인이 코로나바이러스에 대해 친화도가 있는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 코로나바이러스가 SARS-CoV-1 및 SARS-CoV-2로 이루어진 군으로부터 선택되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 Fc 수용체에 대한 상기 Fc 도메인의 결합을 감소시키거나 제거하는, 야생형 Fc 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 Fc 수용체가 FcɣIIa 수용체인 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 표 5의 아미노산 서열을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 IgG4 항체로부터 유래되는 것인 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 L235 및 P329로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드가 S228P 또는 L235E 아미노산 치환을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드가 S228P 및 L235E 아미노산 치환을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 서열번호 33-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 19

제11항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 IgG1 항체로부터 유래되는 것인 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 L234A, L235A, N297A, N297D 및 P329G로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 서열번호 37-42 또는 서열번호 55 중 어느 하나와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 22

제11항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 IgG2 항체로부터 유래되는 것인 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 Fc 도메인이 서열번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 힌지 영역이 표 2, 3 또는 4의 아미노산 서열을 포함하는

ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 25

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 힌지 영역이 프롤린 또는 시스테인-프롤린 디펩타이드로 이루어진 것인 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 26

서열번호 48, 49, 56 또는 57과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자.

청구항 28

서열번호 50, 51, 58 또는 59와 적어도 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산.

청구항 29

제27항 또는 제28항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 벡터가 발현 벡터인 벡터.

청구항 31

제29항 또는 제30항의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 세포가 포유동물 세포인 세포.

청구항 33

코로나바이러스를 포함하는 유체를 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드와 접촉시키는 것을 포함하는 코로나바이러스를 격리시키는 방법으로서, 상기 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드가 코로나바이러스에 결합함으로써 코로나바이러스를 격리시키는 것인 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 격리된 코로나바이러스가 전체 길이의 ACE2 폴리펩타이드에 결합할 수 없는 방법.

청구항 35

세포에 의해 발현된 내인성 ACE2 폴리펩타이드에 대해 코로나바이러스가 결합하는 것을 저해하는 방법으로서, 상기 세포와 소통하는 유체를 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드와 접촉시키는 것을 포함하고, 상기 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드가 상기 코로나바이러스에 결합하여, 내인성으로 발현된 ACE2 폴리펩타이드에 상기 코로나바이러스가 결합하는 것을 저해하는 것인 방법.

청구항 36

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유체가 간질액, 혈액, 혈장, 혈청, 점액, 뇌척수액 또는 림프인 방법.

청구항 37

코로나바이러스 감염에 걸리거나 걸린 것으로 의심되는 대상체를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 대상체에게 투여

하는 것을 포함하는 방법.

청구항 38

감염 위험이 있는 대상체에서 코로나바이러스 감염을 예방하는 방법으로서, 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 39

대상체에서 코로나바이러스 감염의 항체 의존적 면역증강을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 40

제33항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 코로나바이러스가 SARS-CoV-1 및 SARS-CoV-2로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 41

제33항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 포유동물 세포인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 포유동물 세포가 인간 세포인 방법.

청구항 43

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 포유동물인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 대상체가 인간인 방법.

청구항 45

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여가 피하, 정맥내, 비경구, 복강내, 척수강내, 경구, 흡입, 분무 및 경피로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 46

제33항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서,

a. 코로나바이러스가 다른 코로나바이러스를 중화할 수 있는 단클론 항체에 의한 중화에 내성이고/이거나;

b. 코로나바이러스가 SARS-CoV-2를 중화할 수 있는 단클론 항체에 의한 중화에 내성인 SARS-CoV-2의 변이체이고/이거나;

c. 코로나바이러스가 코로나바이러스 백신에 의해 부여되는 면역에 내성이고/이거나;

d. 코로나바이러스가 SARS-CoV-2 백신에 의해 부여된 면역에 내성인 SARS-CoV-2의 변이체이고/이거나;

e. 코로나바이러스가 이전 코로나바이러스 감염에 의해 부여된 자연 면역에 내성이고/이거나;

f. 코로나바이러스가 이전 SARS-CoV-2 감염에 의해 부여된 자연 면역에 내성인 SARS-CoV-2의 변이체이고/이거나;

g. 코로나바이러스가 S-단백질에 E484 치환을 보유하고/하거나;

h. 코로나바이러스가 S-단백질에 N501 치환을 보유하고/하거나;

i. 코로나바이러스가 S-단백질에 K417 치환을 보유하고/하거나;

j. 코로나바이러스가 S-단백질에 E484 및 N501 치환을 보유하고/하거나;

k. 코로나바이러스가 S-단백질에 E484K 치환을 보유하고/하거나;

l. 코로나바이러스가 S-단백질에 E484Q 치환을 보유하고/하거나;

m. 코로나바이러스가 S-단백질에 N501Y 치환을 보유하고/하거나;

n. 코로나바이러스가 S-단백질에 K417N 치환을 보유하고/하거나;

o. 코로나바이러스가 S-단백질에 E484K 및 N501Y 치환을 보유하고/하거나;

p. 코로나바이러스가 S-단백질에 E484, N501 및 K417 치환을 보유하고/하거나;

q. 코로나바이러스가 S-단백질에 E484K, N501Y 및 K417N 치환을 보유하고/하거나;

r. 코로나바이러스가 S-단백질에 L452 치환을 보유하고/하거나;

s. 코로나바이러스가 S-단백질에 L452R 치환을 보유하고/하거나;

t. 코로나바이러스가 S-단백질에 T478 치환을 보유하고/하거나;

u. 코로나바이러스가 S-단백질에 T478K 치환을 보유하고/하거나;

v. 코로나바이러스가 S-단백질에 L452 및 T478 치환을 보유하고/하거나;

w. 코로나바이러스가 S-단백질에 L452R 및 T478K 치환을 보유하고/하거나;

x. 코로나바이러스가 20I/501Y.V1, "영국 변이체" 또는 알파 변이체로도 알려진 B.1.1.7 계통의 자손이고/이거나;

y. 코로나바이러스가 20I/501Y.V1, "영국 변이체" 또는 알파 변이체로도 알려진 B.1.1.7 계통이고/이거나;

z. 코로나바이러스가 20H/501Y.V2, "남아프리카 COVID-19 변이체" 또는 베타 변이체로도 알려진 B.1.351 계통의 자손이고/이거나(S-단백질 수용체 결합 도메인의 외부에 다른 치환 외에 E484K, N501Y 및 K417N 치환을 보유함);

aa. 코로나바이러스가 20H/501Y.V2, "남아프리카 COVID-19 변이체" 또는 베타 변이체로도 알려진 B.1.351 계통이고/이거나(S-단백질 수용체 결합 도메인의 외부에 다른 치환 외에 E484K, N501Y 및 K417N 치환을 보유함);

bb. 코로나바이러스가 "브라질 COVID-19 변이체", 계통 P.1, 또는 감마 변이체로도 알려진 B.1.1.248 계통의 자손이고/이거나(S-단백질 수용체 결합 도메인의 외부에 다른 치환 외에 E484K 및 N501Y 치환을 보유함);

cc. 코로나바이러스가 "브라질 COVID-19 변이체", 계통 P.1, 또는 감마 변이체로도 알려진 B.1.1.248 계통이고/이거나(S-단백질 수용체 결합 도메인의 외부에 다른 치환 외에 E484K 및 N501Y 치환을 보유함);

dd. 코로나바이러스가 B.1.617 계통의 자손이고/이거나;

ee. 코로나바이러스가 B.1.617.1 계통의 자손이고/이거나(E484Q 치환을 보유함);

ff. 코로나바이러스가 B.1.617.1 계통이고/이거나(E484Q 치환을 보유함);

gg. 코로나바이러스가 델타 변이체로도 알려진 B.1.617.2 계통의 자손이고/이거나(다른 S-단백질 돌연변이 외에 L452R 및 T478K 치환을 보유함);

hh. 코로나바이러스가 델타 변이체로도 알려진 B.1.617.2 계통이고/이거나(다른 S-단백질 돌연변이 외에 L452R 및 T478K 치환을 보유함);

ii. 코로나바이러스가 B.1.617.3 계통의 자손이고/이거나(E484Q 치환을 보유함);

jj. 코로나바이러스가 B.1.617.3 계통(E484Q 치환을 보유함)인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2020년 7월 20일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 제63/053,817호 및 2021년 2월 18일에 출원된 미국

가출원 일련 번호 제63/150,686호에 대한 우선권의 이익을 주장한다; 각 출원의 전체 내용은 이 참조에 의해 전체 내용이 본원에 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 신종 코로나바이러스 SARS-CoV-2에 의해 유발된 COVID-19로 인해 전 세계적인 유행 동안 수십만 명이 병에 걸리거나 사망했다. 백신이 개발되고 있지만 임상 해석까지는 적어도 18개월이 남아 있으며, 대규모 임상 연구에서 안전성 및 효능을 모두 입증해야 하는 문제에 직면해 있다. 백신의 효능 및 가용성에 따라, 감염 및 사망은 이후 일정 기간 동안 계속될 수 있다.

[0004] 기존의 항바이러스성 소분자 및 질환 개량성 면역 조절인자에 대한 임상 시험은 진행 중이지만, 이들의 안전성, 효능 및 임의의 잠재적인 효능의 크기는 여전히 불확실한 상태이다. 중화 항체도 개발 중이며 대규모로 전달될 수 있는 수동 면역요법의 가능성을 제공한다. 가능성 있는 접근 방식이지만, 중화 항체의 효능은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 상의 별개의 에피토프에 결합하고 스파이크 단백질이 이의 세포 표면 수용체인 안지오텐신 전환 효소 2(ACE2)에 결합하지 못하게 하는 능력에 의존적이다. 별개의 스파이크 단백질 에피토프에 대한 항체 결합의 의존성은 ACE2 결합을 보존하면서 항체 결합을 저해하는 스파이크 단백질 서열의 변경이 바이러스로 하여금 중화를 회피하도록 할 수 있음을 의미한다. 따라서, 중화 항체는 특히 중화 항체를 사용한 광범위한 치료가 바이러스에 진화 압력을 가하는 경우 많은 감염 개체의 집단에서 발생할 수 있는 SARS-CoV-2의 돌연변이 변이체에 대해 효과적이지 않을 수 있다. 유사하게, 중화 항체는 유전적 부동의 대상이 된 미래의 ACE2-유도 신종 코로나바이러스에 대하여 효과적이지 않을 수 있다.

[0005] 또한, 폐 합병증은 COVID-19의 이환율과 사망률에 대한 주요 기여인자이다. 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)을 포함한 폐 합병증의 원인이 되는 병인은 복잡하고 다원적이지만, 항체-의존적 면역증강(ADE)으로 알려진 면역병리학적 현상은 ARDS가 있는 COVID-19 환자에서 기여 메커니즘으로서 주장되었다. ADE는 중화 항체가 바이러스 감염 또는 Fcɣ 수용체를 발현하는 면역 세포의 과잉자극을 촉진함으로써 감염과 염증을 실제로 악화시킬 수 있는 일부 바이러스 증후군에서 관찰되는 현상이다(Iwasaki 등 (2020) *Nat. Rev. Immunol.* 20: 339-42; Taylor 등 (2015) *Immunol. Rev.* 268: 340-364).

[0006] 따라서, COVID-19의 치료 및 예방을 위한 SARS-CoV2의 약리학적 저해제는 여전히 매우 필요한 상태이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 적어도 부분적으로 비활성 가용성 ACE2 단백질이 SARS-CoV-2 바이러스가 내인성 ACE2에 결합하는 것을 경쟁적으로 저해하여 바이러스가 세포에 진입되는 것을 방지한다는 발견에 기초한다.

[0008] 본 발명의 한 측면은 ACE2 세포외 도메인 폴리펩타이드 또는 이의 단편, 힌지 폴리펩타이드, 및 단편 결정성(Fc) 도메인 또는 이의 단편을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 제공하며, 여기서 ACE2 세포외 도메인은 효소적으로 비활성이며, Fc 도메인 또는 이의 단편은 Fcɣ 수용체에 대해 약화된 결합 친화도를 갖는다.

[0009] 본 발명의 임의의 측면에 적용될 수 있고/있거나 본원에 기술된 임의의 다른 실시양태와 조합될 수 있는 다수의 실시양태가 추가로 제공된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, ACE2 세포외 도메인 폴리펩타이드는 서열번호 1-4 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, ACE2 세포외 도메인 폴리펩타이드는 H374, H378, R273, H345, H345, H505, H505, R169, W271, 및 K481로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, ACE2 세포외 도메인 폴리펩타이드는 야생형 ACE2 폴리펩타이드에 비해 H374N, H378N, R273Q, H345A, H345L, H505A, H505L, R169Q, W271Q, 및 K481Q로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 야생형 ACE2 폴리펩타이드에 비해 H374N 또는 H378N 치환이다. 또 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 야생형 ACE2 폴리펩타이드에 비해 H374N 및 H378N 치환이다. 또 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 R273Q, H345A, H345L, H505A, H505L 아미노산 치환이다. 또 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산 치환은 R169Q, W271Q 및 K481Q 아미노산 치환이다.

또 다른 실시양태에서, ACE2 세포외 도메인은 코로나바이러스에 대해 친화도가 있다. 또 다른 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-1 및 SARS-CoV-2로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인의 결합을 감소시키거나 제거하는 야생형 Fc 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 수용체는 FcɣIIa 수용체이다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 표 5의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG4 항체로부터 유도된다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 L235 및 P329로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다. 다른 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 S228P 또는 L235E 아미노산 치환을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 S228P 및 L235E 아미노산 치환을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 서열번호 33-36 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG1 항체로부터 유도된다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 L234A, L235A, N297A, N297D 및 P329G로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 서열번호 37-42 또는 서열번호 55 중 어느 하나와 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG2 항체로부터 유도된다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인은 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 힌지 영역은 표 2, 3 또는 4로부터의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 힌지 영역은 프롤린 또는 시스테인-프롤린 디펩타이드로 이루어진다.

[0010] 본 발명의 또 다른 측면은 서열번호 48, 49, 56 또는 57과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 제공한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 측면은 임의의 상기 측면의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.

[0012] 또 다른 측면에서, 서열번호 50, 51, 58 또는 59와 적어도 90% 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자가 제공된다. 본 발명의 임의의 측면에 적용될 수 있고, 및/또는 본원에 기술된 임의의 다른 실시양태와 조합될 수 있는 다수의 실시양태가 추가로 제공된다. 예를 들어, 한 실시양태는 바로 앞의 측면 중 어느 하나의 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다. 다른 실시양태에서, 벡터는 발현 벡터이다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 직전 실시양태 중 어느 하나의 벡터를 포함하는 세포가 제공된다. 또 다른 실시양태는 직전 실시양태 중 어느 하나의 벡터를 포함하는 세포를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 측면은 코로나바이러스를 포함하는 유체를 상기 측면 중 어느 하나의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드와 접촉시키는 것을 포함하는 코로나바이러스 격리 방법을 제공하며, 여기서 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 코로나바이러스에 결합함으로써 코로나바이러스를 격리시킨다.

[0014] 본 발명의 임의의 측면에 적용될 수 있고 및/또는 본원에 기술된 임의의 다른 실시양태와 조합될 수 있는 다수의 실시양태가 추가로 제공된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 격리된 코로나바이러스는 전체 길이의 ACE2 폴리펩타이드에 결합할 수 없다. 한 실시양태에서, 유체는 간질액, 혈액, 혈장, 혈청, 점액, 뇌척수액 또는 림프액이다. 본원에 기술된 방법의 또 다른 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-1 및 SARS-CoV-2로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0015] 본 발명의 또 다른 측면은 세포에 의해 발현되는 내인성 ACE2 폴리펩타이드에 코로나바이러스가 결합하는 것을 저해하는 방법을 제공하며, 이 방법은 세포와 소통하는 유체를 상기 측면 중 어느 한 측면의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드와 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 코로나바이러스에 결합하여 내인성으로 발현된 ACE2 폴리펩타이드에 코로나바이러스가 결합하는 것을 저해한다. 한 실시양태에서, 유체는 간질액, 혈액, 혈장, 혈청, 점액, 뇌척수액 또는 림프액이다. 또 다른 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-1 및 SARS-CoV-2로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0016] 또 다른 측면은 코로나바이러스 감염을 갖거나 가진 것으로 의심되는 대상체를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 측면들 중 어느 하나의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-1 및 SARS-CoV-2로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 포유동물이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 또 다른 실시양태에서, 투여는 피하, 정맥내, 비경구, 복강내, 척추강내, 경구, 흡입, 분무, 및 경피로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0017] 또 다른 측면에서, 감염 위험이 있는 대상체에서 코로나바이러스 감염을 예방하기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은 대상체에게 상기 측면 중 어느 하나의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-1 및 SARS-CoV-2로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 포유동물이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 또 다른 실시양태에서, 투여는 피하, 정맥내, 비경구, 복강내, 척추강내, 경구, 흡입, 분무 및 경피로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0018] 본 발명의 또 다른 측면은 대상체에서 코로나바이러스 감염의 항체 의존적 면역증강을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 이 방법은 대상체에게 상기 측면들 중 어느 하나의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0019] 본 발명의 임의의 측면에 적용될 수 있고 및/또는 본원에 기술된 임의의 다른 실시양태와 조합될 수 있는 다수의 실시양태가 추가로 제공된다. 예를 들어, 일 실시양태에서, 코로나바이러스 감염은 SARS-CoV-1 감염 및 SARS-CoV-2 감염으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일 실시양태에서, 대상체는 포유동물이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 또 다른 실시양태에서, 투여는 피하, 정맥내, 비경구, 복강내, 척추강내, 경구, 흡입, 분무 및 경피로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0020] 본 발명의 임의의 측면에 적용될 수 있고 및/또는 본원에 기술된 임의의 다른 실시양태와 조합될 수 있는 다수의 추가 실시양태가 제공된다. 예를 들어, 일 실시양태에서, 코로나바이러스는 다른 코로나바이러스를 중화할 수 있는 단클론 항체에 의한 중화에 대해 내성이고; SARS-CoV-2를 중화할 수 있는 단클론 항체에 의한 중화에 내성인 SARS-CoV-2의 변이체이며; 코로나바이러스 백신에 의해 부여되는 면역에 내성이고; SARS-CoV-2 백신에 의해 부여된 면역에 내성인 SARS-CoV-2의 변이체이며; 이전 코로나바이러스 감염에 의해 부여된 자연 면역에 내성이고; 이전 SARS-CoV-2 감염에 의해 부여된 자연 면역에 내성인 SARS-CoV-2의 변이체이고; S-단백질에 E484 치환을 보유하고; S-단백질에 N501 치환을 보유하며; S-단백질에 K417 치환을 보유하고; S-단백질에 E484 및 N501 치환을 보유하고; S-단백질에 E484K 치환을 보유하고; S-단백질에 E484Q 치환을 보유하고; S-단백질에 N501Y 치환을 보유하고; S-단백질에 K417N 치환을 보유하고; S-단백질에 E484K 및 N501Y 치환을 보유하고; S-단백질에 E484, N501 및 K417 치환을 보유하고; S-단백질에 E484K, N501Y 및 K417N 치환을 보유하고; S-단백질에 L452 치환을 보유하고; S-단백질에 L452R 치환을 보유하고; S-단백질에 T478 치환을 보유하고; S-단백질에 T478K 치환을 보유하고; S-단백질에 L452 및 T478 치환을 보유하고; S-단백질에 L452R 및 T478K 치환을 보유하고; 20I/501Y.V1, "영국 변이체" 또는 알파 변이체로도 알려진 B.1.1.7 계통의 자손이고; 20I/501Y.V1, "영국 변이체" 또는 알파 변이체로도 알려진 B.1.1.7 계통이며; 20H/501Y.V2, "남아프리카 COVID-19 변이체" 또는 베타 변이체로도 알려진 B.1.351 계통의 자손이고(S-단백질 수용체 결합 도메인의 외부에 다른 치환 외에 E484K, N501Y 및 K417N 치환을 보유함)이고; 20H/501Y.V2, "남아프리카 COVID-19 변이체" 또는 베타 변이체로도 알려진 B.1.351 계통이고(S-단백질 수용체 결합 도메인의 외부에 다른 치환 외에 E484K, N501Y 및 K417N 치환을 보유함); "브라질 COVID-19 변이체", 계통 P.1, 또는 감마 변이체로도 알려진 B.1.1.248 계통의 자손이고(S-단백질 수용체 결합 도메인의 외부에 다른 치환 외에 E484K 및 N501Y 치환을 보유함); "브라질 COVID-19 변이체", 계통 P.1, 또는 감마 변이체로도 알려진 B.1.1.248 계통이고(S-단백질 수용체 결합 도메인의 외부에 다른 치환 외에 E484K 및 N501Y 치환을 보유함); B.1.617 계통의 자손이고; B.1.617.1 계통의 자손이며(E484Q 치환을 보유함); B.1.617.1 계통이고(E484Q 치환을 보유함); 델타 변이체로도 알려진 B.1.617.2 계통의 자손이고(다른 S-단백질 돌연변이 외에 L452R 및 T478K 치환을 보유함); 델타 변이체로도 알려진 B.1.617.2 계통이고(다른 S-단백질 돌연변이 외에 L452R 및 T478K 치환을 보유함); B.1.617.3 계통의 자손이고(E484Q 치환을 보유함); 및/또는 B.1.617.3 계통(E484Q 치환을 보유함)이다.

도면의 간단한 설명

[0021] **도 1**은 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 3차원 예시이다.

도 2a 및 **도 2b**는 SARS-CoV-2에 결합하는 2개의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 능력을 특성화한다. 도 2a는 DF-COV-01 및 DF-COV-02가 SARS-CoV-2에 강력하게 결합함을 보여주는 결합 곡선이다. DF-COV-01 및 DF-COV-02의 농도는 μg/ml 단위로 측정된다. 도 2b는 도 2a에 도시된 동일한 결합 곡선이지만, DF-COV-01 및 DF-COV-02의 농도는 몰 농도로 측정된다.

도 3은 위형 SARS-CoV-2 바이러스 입자를 중화하는 2개의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 능력을 특성화하는 그래프를 포함한다. DF-COV-01 및 DF-COV-02는 ACE2 발현 293T 세포로의 바이러스 진입을 저해한다.

도 4a 및 **도 4b**는 고정된 재조합 인간 FcɣRIIa에 대한 2개의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 친화도를 고정된 재조합 인간 FcɣRIIa에 대한 정제된 다클론 인간 IgG의 친화도과 비교한 것이다. 도 4a는 DF-COV-01 및 DF-COV-02가 인간 IgG와 비교할 때 현저히 약화된 FcɣRIIa 결합을 갖는다는 것을 보여주는 결합 곡선이다. DF-COV-01 및 DF-COV-02의 농도는 μg/ml 단위로 측정된다. 도 4b는 도 4a에 도시된 동일한 결합 곡선이지만, DF-COV-01 및 DF-COV-02의 농도는 몰 농도로 측정된다.

도 5는 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 ACE2 효소 활성을 야생형 ACE2 세포외 도메인을 함유하는 2개의 ACE2-Fc 융합체의 효소 활성과 비교한 것이다. DF-COV-01 및 DF-COV-02는 효소 활성을 나타내지 않는 반면, 매칭되는 야생형 ACE2-Fc 융합체는 효소 활성을 나타낸다.

도 6a 및 **도 6b**는 DF-COV-01 및 DF-COV-02가 루시퍼라제 및 GFP 리포터 유전자 둘 모두를 함유하는 위형 SARS-CoV-2 바이러스 입자를 중화시키는 능력을 특성화한다. ACE2 발현 293T 세포를 표적으로 사용했다. 도 6a에서, 감염은 루시퍼라제 발현을 검출하는 발광 검정에 의해 측정되었다. 도 6b에서, 293T 세포의 감염은 GFP 발현을 검출하는 형광 현미경에 의해 가시화되었다. DF-COV-01과 DF-COV-02 둘 모두는 ACE2 발현 293T 세포로의 바이러스 진입을 저해하고, DF-COV-01이 DF-COV-02보다 더 강력하게 중화한다.

도 7은 DF-COV-01 및 DF-COV-02가 야생형 SARS-CoV-2 바이러스를 중화하고 인간 유도 만능 줄기 세포에서 유래한 인간 폐포 2형 세포(iAT2)의 감염을 방지하는 능력을 특성화한다. SARS-CoV-2에 의한 iAT2 세포의 감염은 SARS-CoV-02 N-단백질에 대한 형광 표지 항체에 의해 검출되었고 유세포 분석으로 측정되었다. DF-COV-01 및 DF-COV-02는 둘 모두가 감염을 저해했지만, 음성 대조군 Fc 융합체(PD-L1-Fc)는 저해하지 않았다.

도 8은 복강내 주사를 통해 투여했을 때 햄스터에서 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 약동학(PK) 곡선을 보여주는 그래프이다. DF-COV-01의 혈청 반감기($t_{1/2}$)는 DF-COV-02보다 길다. DF-COV-02의 분포 부피(V_d)는 DF-COV-01보다 크다. DF-COV-02는 DF-COV-01보다 더 큰 정도로 말초 조직에 침투하는 것으로 여겨진다.

도 9a - 도 9e는 생체 내에서 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 DF-COV-01, DF-COV-02, DF-COV-03 및 DF-COV-04의 활성을 특성화한다. 시리아 햄스터에게 SARS-CoV-2를 비강으로 공격하고 총 3일 동안 40 mg/kg의 DF-COV-01을 1일 1회 또는 20 mg/kg의 DF-COV-02, DF-COV-03, DF-COV-04 또는 비히클 대조군(PBS)을 1일 2회 처리했다. 도 9a는 3일째 구인두 바이러스 역가를 비교한 것이고, 도 9b는 3일째 비갑개 바이러스 역가를 비교한 것이며, 도 9c는 3일째 폐 역가를 비교한 것이고, 도 9d는 3일째 각 그룹의 햄스터 체중을 비교한 것이며(0일째 각 개체의 체중 대비), 도 9e는 비히클 대조군(PBS)으로 처리된 것과 DF-COV-01로 처리된 햄스터의 시간 경과에 따른 체중을 비교한 것이다. DF-COV-01은 비히클 대조군(PBS)과 비교하여 구인두 역가, 비갑개 역가 및 폐 역가를 감소시켰다. 체중 손실은 햄스터의 SARS-CoV-2 감염의 징후이다. DF-COV-01로 처리된 햄스터는 비히클 대조군(PBS)으로 처리된 햄스터에 비해 3일째 평균 체중이 더 높았다. DF-COV-01로 처리된 여러 햄스터는 모든 햄스터가 희생된 3일까지 손실된 체중을 회복하기 시작했다.

도 10a 및 **도 10b**는 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 개략적이고 3차원적인 예시를 포함한다. 도 10a는 침묵 IgG4-SPLE Fc 도메인에 융합된, 효소적으로 비활성인 전체 길이의 ACE2 세포외 도메인인 ACE2-NN(18-740)을 갖는 ACE2-Fc 융합체인 DF-COV-01을 도시한 것이다. 도 10b는 침묵 IgG4-SPLE Fc 도메인에 융합된, 효소적으로 비활성인 ACE2 메탈로펩티다제 도메인인 ACE2-NN(18-612)을 갖는 ACE2-Fc 융합체인 DF-COV-02를 도시한 것이다. ACE2 세포외 도메인의 막-근접 줄기가 DF-COV-01의 유연성을 향상시킬 수 있음을 알 수 있다. 또한, DF-COV-02가 더 작고 이의 주변 조직 침투가 이 더 작은 분자량 및 더 작은 유체역학적 반경에 의해 향상될 수 있음을 알 수 있다.

도 11은 침묵 IgG1-LALA Fc 도메인에 융합된 효소적으로 비활성인 ACE2 메탈로프로테아제 도메인인 ACE2-NN(18-615)와의 ACE2-Fc 융합체인 DF-COV-03의 개략도를 포함한다. IgG1 Fc 도메인의 힌지 영역은 IgG4 Fc 도메인보다 더 유연하며, 유연한 G4AG4 인공 링커 서열도 포함된다.

도 12a 및 **도 12b**는 SARS-CoV-2 S-단백질에 결합하는 2개의 ACE2 메탈로프로테아제 도메인의 아미노 말단과 카르복시 말단 사이의 거리를 비교하는 3차원 예시 및 이 비교를 기반으로 설계된 ACE2-Fc 융합체의 개략적 예시를 포함한다. 도 12a에서, SARS-CoV-2 S-단백질 RBD(PDB: 6M0J)에 결합한 ACE2 메탈로프로테아제 도메인의 2개의 결정 구조의 RBD는 전체 길이 SARS-CoV-2 S-단백질 구조(PDB: 6X2B)에서 "업(up)" 형태로 2개의 RBD와 오버레이되었다. ACE2 메탈로프로테아제 도메인의 아미노 말단 사이의 거리는 40Å인 것으로 측정되었고, ACE 메탈로프로테아제 도메인의 카르복시말단 사이의 거리는 93Å인 것으로 측정되었다. 도 12b는 침묵 IgG1-LALA Fc 도메인에 융합된 효소적으로 비활성인 ACE2 메탈로프로테아제 도메인 ACE2-NN(18-615)을 갖는 ACE2-Fc 융합체인

DF-COV-04의 개략적 예시이다. 이 폴리펩타이드의 ACE2와 Fc 도메인의 배향은 역방향이고, Fc 도메인은 ACE2 도메인에 대해 아미노 말단이다. DF-COV-04의 2개의 ACE2 메탈로프로테아제 도메인이 동일한 바이러스 S-단백질에 있는 2개의 RBD에 동시에 결합하는 경우, 에너지적으로 더 유리한 더 짧은 거리에 걸치는 링커가 필요할 수 있다. 따라서, Fc 도메인에 대해 카르복시말단에 위치한 ACE2 메탈로프로테아제 도메인을 갖는 ACE2-Fc 융합체는 바이러스 중화의 효능을 향상시킬 수 있다.

도 13a 및 **도 13b**는 DF-COV-01, DF-COV-02, DF-COV-03 및 DF-COV-04가 위형 SARS-CoV-2 바이러스 입자를 중화시키는 능력을 특성화한다. ACE2-발현 293T 세포를 표적으로 사용했고 루시퍼라제 리포터 발현을 검출하는 발광 검정에 의해 감염을 측정했다. 도 13a는 농도 μg/mL에 따른 중화 곡선을 포함한다. 도 13b는 나노몰 단위의 농도에 의한 중화 곡선을 포함한다. DF-COV-01은 바이러스를 가장 강력하게 중화시켰고(IC50 1.8nM), DF-COV-04도 바이러스를 강력하게 중화시켰다(IC50 4.4nM). DF-COV-02 및 DF-COV-03은 바이러스를 덜 강력하게 중화시켰다(각각 IC50 10nM 및 15nM).

도 14a 및 **도 14b**는 SARS-CoV-2 S-단백질에 결합하는 DF-COV-01, DF-COV-02, DF-COV-03 및 DF-COV-04의 능력을 특성화한다. 도 14a는 μg/mL 농도에 따른 결합 곡선을 포함하고 도 14b는 나노몰 단위의 농도에 의한 결합 곡선을 포함한다. DF-COV-01 및 DF-COV-02는 S-단백질에 대해 동등한 결합을 갖는다. DF-COV-03은 DF-COV-01 및 DF-COV-02보다 S-단백질에 대해 약간 더 높은 결합력을 갖는다. 놀랍게도, DF-COV-04는 DF-COV-02 및 DF-COV-03보다 더 강력한 바이러스 중화를 입증했음에도 불구하고, 이 검정에 의해 측정된 바와 같이 S-단백질에 대해 더 낮은 결합력을 갖는다.

도 15a 및 **도 15b**는 SARS-CoV-2 S-단백질에 대한 DF-COV-01, DF-COV-02, DF-COV-03 및 DF-COV-04의 결합 친화도를 측정한다. 친화도는 고정된 DF-COV 화합물과 용액 중의 SARS-CoV-2 S-단백질을 이용하여 생물층 간섭계(Octet)로 결정했다. DF-COV-01 및 DF-COV-02는 DF-COV-03 및 DF-COV-04보다 SARS-CoV-2 S-단백질에 대해 친화도가 더 높았다.

도 16a - **도 16d**는 분무 후 DF-COV-01, DF-COV-02, DF-COV-03 및 DF-COV-04의 안정성을 특성화한다. 각 화합물을 진동 메쉬 분무기로 분무한 다음, 마이크로원심분리관에 수집했다. 고정된 SARS-CoV-2 S-단백질에 대한 분무된 화합물의 결합을 분무 전에 취한 샘플의 결합(기준선)과 비교했다. 결합은 항-인간 IgG-HRP 2차 항체를 통해 검출되었다. 4가지 DF-COV 화합물 모두에서, 분무된 샘플과 비-분무된 샘플(기준선) 사이의 S-단백질 결합 결합력의 유의미한 차이는 없었다.

도 17은 시리아 햄스터에서 DF-COV-01, DF-COV-02, DF-COV-03 및 DF-COV-04의 혈청 반감기를 비교한 것이다. 각 DF-COV 화합물 8 mg/kg은 0 시간에 별도의 3마리 햄스터 그룹에 복강내 주사를 통해 투여했다. 정맥 채혈은 4, 8, 24, 48 및 72시간에 수행했고, DF-COV 화합물의 혈청 농도는 각 샘플마다 ELISA로 결정했다. DF-COV-01은 52시간인 가장 긴 혈청 반감기를 갖고 있었다. 다른 3가지 ACE2-Fc 설계 순열은 대략 16, 13 및 7시간의 훨씬 더 짧은 반감기를 가졌다.

도 18은 SARS-CoV-2에 의해 비강내 공격되고 DF-COV-01, DF-COV-02, DF-COV-03, DF-COV-04 또는 비히클 대조군(PBS)에 의해 치료된 시리아 햄스터 간의 일일 체중 추세를 비교한 것이다.

도 19a 및 **도 19b**는 SARS-CoV-2 감염의 치료 모델에서 햄스터를 치료하는 DF-COV-01의 능력을 입증하며, 여기서 햄스터는 $1x10^4$ PFU의 SARS-CoV-2로 공격받은 후 12시간 후에 치료된다. 도 19a는 치료의 개략도를 제공하고 도 19b는 결과를 제공한다.

도 20a 및 **도 20b**는 SARS-CoV-2 변이체에 대한 DF-COV 화합물의 결합 특성을 입증한다. 도 20a는 수치 데이터를 제공하고 도 20b는 적정 곡선을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 적어도 부분적으로 비활성 가용성 ACE2 단백질이 SARS-CoV-2 바이러스가 내인성 ACE2에 결합하는 것을 경쟁적으로 저해하여 바이러스가 세포로 진입하는 것을 방지한다는 발견을 기초로 한다. 본 발명에 의해 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 SARS-CoV 및 SARS-CoV-2를 강력하게 저해하고 유리한 약동학을 갖는다.

[0023] Fc 도메인에 대한 표면 수용체 세포외 도메인의 융합은 표면 수용체의 반감기를 연장하고 약물로 사용될 수 있도록 하는 일반적인 방법이다. 수용체-Fc 융합체의 예로는 무엇보다도 에타너셉트, 아바타셉트, 벨라타셉트, 알레파셉트 및 릴로나셉트를 포함한다. 이 약물의 반감기는 3 내지 15일 사이이다. Fc 도메인에 대한 융합은 Fc

도메인이 이량체를 형성하여 2개의 수용체 도메인이 약물의 각 분자에 존재할 것이어서 이의 결합력(binding avidity)을 증가시키기 때문에, 결합 파트너에 대한 수용체의 결합력을 증가시키는 추가된 이점이 있는. Fc 융합체는 Fc 신생아 수용체에 의해 내피 세포를 가로질러 동반되어 일반적으로 더 높은 말초 조직 농도를 나타내기 때문에 쉽게 맥관구조를 가로질러 이동한다.

[0024] ACE2는 단일 통과(single-pass) 막 단백질이며 이의 세포외 도메인은 IgG의 Fc 도메인에 융합되어 Fc 융합체를 생성할 수 있다. 코로나바이러스에 의한 세포 감염을 저해하기 위해 ACE2-Fc 융합 단백질을 활용하는 개념은 이전에 입증된 바 있다. 2004년에 하바드 의과 대학의 무어(Moore) 등은 ACE2-Fc 융합체가 시험관내에서 SARS-CoV 슈도바이러스에 의한 표적 세포의 감염을 약 2nM의 IC50으로 강력하게 저해할 수 있음을 입증했다((2004) *J. Virol.*, 78(19):10628-35). 더욱 최근인 2020년 2월에 중국 상하이에 있는 제2 군의대학의 레이(Lei) 등은 이러한 발견을 확인했고 ACE2-Fc 융합체가 SARS-CoV-2를 훨씬 더 강력하게 0.1 μg/mL 미만 또는 0.5 nM 미만의 IC50으로 저해한다는 것을 입증했다((2020) *Nat.Commun.*11(1):2070). 이러한 전임상 연구는 가용성 ACE2-Fc가 세포 표면 ACE2와 성공적으로 경쟁하여 표적 세포의 감염을 방지할 수 있음을 입증한다. 이러한 낮은 농도 내지 나노몰 이하 범위의 IC50은 ACE2와 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질 사이의 매우 강렬한 상호작용을 암시한다. ACE2-Fc의 IC50은 중화성 단클론 항체의 IC50과 유사하다. 예를 들어, 왕(Wang) 등은 약 0.5nM의 유사한 IC50을 갖는 SARS-CoV-2 중화 항체를 최근에 보고했다(Wang 등 (2020) *Nat. Commun.* 11:225). 본 발명에 포괄된 융합 단백질은 Fcγ 수용체에 대한 친화도가 감소된 Fc 도메인 단편에 융합된 효소적으로 사멸한 ACE2 세포외 도메인을 사용함으로써 더 나아간다.

[0025] 본원에 추가로 기술된 바와 같이, 본 발명에 포괄된 ACE2-Fc 융합 단백질은 1) 효능적인 투여(예를 들어, 피하 투여)를 허용하는 약동학으로 인해, 통원 치료 및 예방의 허용, 2) 비활성 ACE2가 RAAS 경로 저해로 인한 저혈압을 회피함으로 인한 혈역학적 부작용의 회피, 3) 침묵 Fc 도메인이 선천적 면역 세포 감염의 위험 및 자연 발생의 ADE의 중단을 감소시키기 때문에 항체-의존적 면역증강(ADE) 위험의 완화, 및 4) 중화 항체 및 백신과 달리, 정의된 에피토프가 의존적이지 않음으로 인한 ACE2-유도 신종 코로나바이러스의 효능적인 표적화를 비롯한 다수의 장점을 갖는다.

[0026] I. 정의

[0027] 관사 "일(a)" 및 "하나(an)"는 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 2 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭하기 위해 사용된다. 예를 들어, "요소"는 하나의 요소 또는 2 이상의 요소를 의미한다.

[0028] 용어 "투여하는"은 작용제가 의도된 기능을 수행하도록 하는 투여 경로를 포함하도록 의도된다. 사용될 수 있는 신체 치료를 위한 투여 경로의 예로는 주사(피하, 정맥내, 비경구, 복강내, 척추강내 등), 경구, 흡입, 분무 및 경피 경로를 포함한다. 주사는 볼루스 주사이거나 연속 주입일 수 있다. 투여 경로에 따라 작용제는 의도된 기능을 수행하는 능력에 해로운 영향을 미칠 수 있는 자연 조건으로부터 보호하기 위해 선택된 물질로 코팅되거나 그 물질에 배치될 수 있다. 작용제는 단독으로 또는 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있다. 작용제는 또한 생체내에서 그의 활성 형태로 전환되는 전구약물(prodrug)로서 투여될 수 있다.

[0029] 본원에 달리 명시되지 않는 한, 용어 "항체" 및 "항체들"은 광범위하게 항체의 자연 발생 형태(예를 들어, IgG, IgA, IgM, IgE) 및 재조합 항체, 예컨대, 단일 사슬 항체, 키메라 및 인간화 항체 및 다중-특이적 항체, 뿐만 아니라 이들 모두의 단편 및 유도체를 포괄하며, 단편 및 유도체는 적어도 항원 결합 부위를 갖는다. 항체 유도체는 항체에 접합된 단백질 또는 화학 모이어티를 포함할 수 있다.

[0030] 본원에 사용된 용어 "항체"는 또한 항체의 "항원-결합 부분"(또는 간단히 "항체 부분")을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "항원-결합 부분"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체(예를 들어, 본 발명에 의해 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드)의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원 결합 기능은 전체 길이의 항체의 단편에 의해 수행될 수 있음이 밝혀졌다. 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어에 포괄되는 결합 단편의 예로는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어지는 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 2개의 Fab 단편이 힌지 영역에서 이황화 가교에 의해 연결된 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어지는 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 이루어지는 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 이루어지는 dAb 단편(Ward 등, (1989) *Nature* 341:544-546); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. 또한, Fv 단편의 2개의 도메인인 VL 및 VH는 별도의 유전자에 의해 암호화되지만, VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 폴리펩타이드를 형성하는 단일 단백질 사슬로서 제조될 수 있게 하는 합성 링커에 의해 재조합 방법을 사용하여 접합될 수 있다(단일 사슬 Fv(scFv)로 알려짐; 예를 들어, Bird 등 (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston 등 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; 및 Osbourn 등 1998, Nature Biotechnology 16: 778 참조). 이러

한 단일 사슬 항체는 또한 항체의 "항원-결합 부분"이라는 용어 내에 포괄되는 것으로 의도된다. 특정 scFv의 임의의 VH 및 VL 서열은 완전한 IgG 폴리펩타이드 또는 다른 이소형을 암호화하는 발현 벡터를 생성하기 위해 인간 면역글로불린 불변 영역 cDNA 또는 게놈 서열에 연결될 수 있다. VH 및 VL은 또한 단백질 화학 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 Fab, Fv 또는 기타 면역글로불린 단편의 생성에 사용될 수도 있다. 디아바디와 같은 단일 사슬 항체의 다른 형태도 포괄된다. 디아바디는 VH 및 VL 도메인이 단일 폴리펩타이드 사슬에서 발현되는 2가의 이중특이성 항체이지만, 동일 사슬에서 2개의 도메인 사이에 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써 도메인이 또 다른 사슬의 상보적인 도메인과 쌍을 형성할 수 밖에 없어 2개의 항원 결합 부위를 생성한다(예를 들어, Holliger 등 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448; Poljak 등 (1994) *Structure* 2:1121-1123 참조).

[0031] 더욱이, 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩타이드와 항체 또는 항체 부분의 공유 또는 비공유 연합에 의해 형성된 더 큰 면역부착 폴리펩타이드의 일부일 수 있다. 이러한 면역부착 폴리펩타이드의 예로는 사량체 scFv 폴리펩타이드를 만들기 위한 스트렙타비딘 코어 영역의 사용(Kipriyanov 등 (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) 및 2가 및 비오티닐화된 scFv 폴리펩타이드를 만들기 위한 시스테인 잔기, 단백질 서브유닛 펩타이드 및 C-말단 폴리히스티딘 태그의 사용(Kipriyanov 등 (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058)을 포함한다. Fc 단편과 같은 항체 부분은 각각 전체 항체의 파파인 또는 펩신 분해와 같은 통상적인 기술을 사용하여 전체 항체로부터 제조될 수 있다. 더욱이, 항체, 항체 부분 및 면역부착 폴리펩타이드는 본원에 기술된 바와 같은 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 수득할 수 있다.

[0032] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체-의존적 면역증강(ADE)"은 세포 내로 항체-보조 바이러스 진입에 의해 유발되는 질환 또는 상태(즉, 코로나바이러스 감염)의 악화를 지칭한다. 예를 들어, SARS-CoV-2 항원에 특이적으로 결합된 중화 항체의 Fc 도메인은 Fcɣ 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체)에 의해 인식될 수 있다. Fcɣ 수용체가 Fc 도메인에 결합할 때, 수용체는 세포 내로 항체 및 결합된 바이러스의 진입을 매개한다. 바이러스는 그 다음 세포 내에서 파괴되는 대신에, 바이러스 진입은 증가된 세포 감염 및 염증을 초래한다. 전형적으로, ADE는 FcɣIIa 수용체에 의해 매개된다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 암호화되는 항체 부류(예를 들어, IgM, IgG1, IgG2C 등)를 지칭한다.

[0034] 용어 "예방하다", "예방하는", "예방", "예방적 치료" 등은 질환, 장애, 또는 상태를 갖고 있지 않지만, 발병할 위험에 있거나 발병에 민감한 대상체의 질환, 장애 또는 상태의 발병 가능성을 감소시키는 것을 지칭한다.

[0035] 용어 "암호 영역"은 아미노산 잔기로 해독되는 코돈을 포함하는 뉴클레오타이드 서열의 영역을 지칭하는 반면, 용어 "비암호 영역"은 아미노산으로 해독되지 않는 뉴클레오타이드 서열의 영역(예를 들어, 5' 및 3' 비해독 영역)을 지칭한다.

[0036] 용어 "상보적인"은 2개의 핵산 가닥의 영역 사이 또는 동일한 핵산 가닥의 2개의 영역 사이의 서열 상보성의 광범위한 개념을 지칭한다. 제1 핵산 영역의 아데닌 잔기는 잔기가 티민 또는 우라실인 경우, 제1 영역과 역평행인 제2 핵산 영역의 잔기와 특정 수소 결합("염기 쌍형성")을 형성할 수 있는 것으로 알려져 있다. 마찬가지로, 제1 핵산 가닥의 시토신 잔기는 제1 가닥과 역평행인 제2 핵산 가닥의 잔기와, 이 잔기가 구아닌인 경우, 염기 쌍형성을 할 수 있는 것으로 알려져 있다. 핵산의 제1 영역은 두 영역이 역평행 방식으로 배열될 때, 제1 영역의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 잔기가 제2 영역의 잔기와 염기 쌍형성을 할 수 있다면, 동일하거나 상이한 핵산의 제2 영역에 상보적이다. 일부 실시양태에서, 제1 영역은 제1 부분을 포함하고 제2 영역은 제2 부분을 포함하고, 이에 의해 제1 및 제2 부분이 역평행 방식으로 배열되면, 제1 부분의 뉴클레오타이드 잔기의 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%는 제2 부분의 뉴클레오타이드 잔기와 염기 쌍형성을 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 부분의 모든 뉴클레오타이드 잔기는 제2 부분의 뉴클레오타이드 잔기와 염기 쌍형성을 할 수 있다.

[0037] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "저해하는" 및 이의 문법적 등가물은 특정 작용, 기능 또는 상호작용을 감소, 제한 및/또는 차단하는 것을 지칭한다. 주어진 산출량 또는 매개변수의 감소된 수준은 산출량 또는 매개변수의 절대적인 부재를 의미할 수는 있지만, 반드시 부재일 필요는 없다. 본 발명은 산출량 또는 매개변수를 완전히 제거하는 방법을 필요로 하지 않으며 이에 제한되지 않는다. 주어진 산출량 또는 매개변수는 본원 및 실시예에서 논의되는 바와 같은 면역조직화학적, 분자생물학적, 세포 생물학적, 임상적 및 생화학적 검정을 포함하나 이에 제한되지 않는 본 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 반대 용어 "촉진하는", "증가하는" 및 이들의 문법적 등가어는 저해 또는 감소에 대해 기술된 것의 반대인 주어진 산출량 또는 매개변

수 수준의 증가를 지칭한다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "상호작용하는" 또는 "상호작용"은 2개의 상호작용 분자 또는 이의 단편이 서로에 대해 물리적으로 근접하도록 하기 위해 2개의 분자(예를 들어, 단백질, 핵산), 또는 이의 단편이 서로에 대해 충분한 물리적 친화도를 나타낸다는 것을 의미한다. 상호작용의 극단적인 경우는 두 실체의 지속적이고 안정적인 근접성을 초래하는 화학 결합의 형성이다. 화학적으로 결합된 상호작용보다 일반적으로 더 동력학적이지만, 물리적 친화도에만 기반한 상호작용은 두 분자를 공동국재화하는 데 동등하게 효과적일 수 있다. 물리적 친화도 및 화학 결합의 예로는 전기적 전하 차이, 소수성, 수소 결합, 반데르발스 힘, 이온 힘, 공유 결합 및 이들의 조합에 의해 유발되는 힘을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 상호작용 도메인, 단편, 단백질 또는 실체 사이의 근접 상태는 일시적 또는 영구적, 가역적 또는 비가역적일 수 있다. 어떠한 경우든지, 이는 두 실체의 자연적인 무작위 움직임에 의해 유발되는 접촉과 대조되고 구별될 수 있다. 전형적으로, 반드시 그런 것은 아니지만, "상호작용"은 상호작용 도메인, 단편, 단백질 또는 실체 간의 결합에 의해 나타난다. 상호작용의 예로는 항원과 항체, 리간드와 수용체, 효소와 기질 등 사이의 특이적 상호작용을 포함한다.

[0039] 일반적으로, 이러한 상호작용은 상기 분자 중 하나 또는 둘 모두의 활성(생물학적 효과를 생성함)을 초래한다. 활성은 분자 중 하나 또는 둘 모두의 직접적인 활성일 수 있다(예를 들어, 신호 전달). 대안적으로, 상호작용에서 하나 또는 둘 모두의 분자는 이들의 리간드에 결합하는 것이 방지될 수 있고, 따라서 리간드 결합 활성(예를 들어, 그의 리간드에 결합하여 면역 반응을 촉발 또는 저해함)과 관련하여 비활성 상태로 유지될 수 있다. 이러한 상호작용을 저해하는 것은 상호작용에 관여하는 하나 이상의 분자의 활성의 파괴를 초래한다. 이러한 상호작용을 향상시키는 것은 상기 물리적 접촉의 가능성을 연장하거나 증가시키는 것이며, 상기 활성의 가능성을 연장하거나 증가시키는 것이다.

[0040] 두 분자 또는 이의 단편 사이의 "상호작용"은 다수의 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 상호작용은 기능적 검정에 의해 결정될 수 있다. 예컨대, 2-혼성체 시스템. 단백질-단백질 상호작용은 2개의 상호작용 파트너 사이의 친화도 결합에 기초한 다양한 생물물리학적 및 생화학적 접근법에 의해 결정될 수도 있다. 관련 기술분야에 일반적으로 공지된 이러한 생화학적 방법으로는 단백질 친화도 크로마토그래피, 친화도 블로팅, 면역침강 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 상호작용의 강도 또는 품질을 반영하는, 2개의 상호작용 단백질에 대한 결합 상수는 또한 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 결정할 수도 있다. 문헌[Phizicky and Fields, (1995) *Microbiol Rev.*, 59:94-123] 참조.

[0041] 본원에 사용된 바와 같이, "키트"는 본 발명에 의해 포괄되는 인간 또는 인간화된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 발현을 특이적으로 검출 또는 조정하기 위한 프로브와 같은 적어도 하나의 시약을 포함하는 임의의 제조품(예를 들어, 패키지 또는 용기)이다. 키트는 본 발명에 의해 포괄되는 방법을 수행하기 위한 단위로서 판촉, 배포 또는 판매될 수 있다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조정하다"는 상향 조절 및 하향 조절, 예를 들어, 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 발현 및/또는 활성을 향상 또는 저해하는 것을 포함한다.

[0043] "단리된 단백질"은 세포로부터 단리되거나 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 때, 다른 단백질, 세포 물질, 분리 배지 및 배양 배지가 실질적으로 없는 단백질, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 기타 화학물질이 실질적으로 없는 단백질을 지칭한다. "단리된" 또는 "정제된" 단백질 또는 이의 생물학적 활성 부분은 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질이 유래된 세포 또는 조직 공급원으로부터의 세포 물질 또는 다른 오염 단백질이 실질적으로 없거나, 또는 화학적으로 합성된 경우 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없는 것이다. "세포 물질이 실질적으로 없는"이라는 표현은 단백질이 단리되거나 재조합적으로 생산되는 세포의 세포 성분으로부터 분리된, 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 제조물을 포함한다. 한 실시양태에서, "세포 물질이 실질적으로 없는"이라는 표현은 비-ACE2-Fc 융합 단백질("오염 단백질"이라고도 본원에서 지칭됨)이 약 30% 미만(건조 중량), 약 20% 미만, 약 10% 미만, 또는 5% 미만인 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 제조물을 포함한다. 융합 단백질 또는 이의 단편, 예를 들어, 이의 생물학적 활성 단편이 재조합적으로 생산되는 경우, 이는 또한 배양 배지가 실질적으로 없는 것이며, 즉 배양 배지는 단백질 제조물의 부피의 약 20% 미만, 약 10% 미만, 또는 약 5% 미만을 나타낸다.

[0044] 본원에 사용된, 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자 및 RNA 분자를 포함하는 것으로 의도된다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단리된 핵산 분자"는 뉴클레오타이드 서열에 다른 뉴클레오타이드 서열이 없는 핵산 분자를 지칭하고, 다른 서열은 인간 게놈 DNA에서 자연적으로 핵산 측면에 있을 수 있다.

[0045] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결된" 것이다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우, 암호 서열에 작동가능하게 연결된다. 전사 조절 서열과 관련하여, 작동가능하게 연결된은 연결되는 DNA 서열이 연속적이며, 2개의 단백질 암호 영역을 접합시키기 위해 필요한 경우 연속적이고 판독 프레임 내에 있음을 의미한다. 스위치 서열의 경우, 작동가능하게 연결된은 서열이 스위치 재조합을 달성할 수 있음을 나타낸다.

[0046] 핵산의 경우, 용어 "실질적인 상동성"은 2개의 핵산 또는 이의 지정된 서열이 최적으로 정렬되고 비교될 때, 적당한 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실에 의해, 뉴클레오타이드의 적어도 약 80%, 일반적으로 뉴클레오타이드의 적어도 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상으로 동일함을 나타낸다. 대안적으로, 실질적인 상동성은 분절이 선택적 혼성화 조건 하에서 가닥의 보체와 혼성화할 때 존재한다.

[0047] 두 서열 사이의 퍼센트 동일성은 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입해야 하는 갭의 수 및 각 갭의 길이를 감안하여 서열들이 공유하는 동일한 위치 수의 함수이다(즉, 동일성% = 동일 위치의 #/총 위치 # x 100). 두 서열 사이의 서열의 비교 및 동일성 퍼센트의 결정은 하기 비제한적 예에 기술된 바와 같이 수학적 알고리즘을 사용하여 달성할 수 있다.

[0048] 두 뉴클레오타이드 서열 간의 동일성 퍼센트는 NWSgapdna. CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70 또는 80의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 사용한 GCG 소프트웨어 패키지(GCG 컴패니 웹사이트의 월드 와이드 웹 상에서 이용가능함)의 GAP 프로그램을 사용하여 결정할 수 있다. 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 사이의 동일성 퍼센트는 또한 PAM120 가중 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 사용하여, ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 혼입된 E. Meyers 및 W. Miller(CABIOS, 4:11 17(1989))의 알고리즘을 사용하여 결정할 수도 있다. 또한, 두 아미노산 서열 사이의 동일성 퍼센트는 Blosum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지(GCG 컴패니 웹사이트의 월드 와이드 웹 상에서 이용가능함)의 GAP 프로그램에 혼입된 Needleman 및 Wunsch(J. Mol. Biol. (48):444 453 (1970)) 알고리즘을 사용하여 결정할 수 있다.

[0049] 본 발명에 포괄되는 핵산 및 단백질 서열은 예를 들어 관련 서열을 식별하기 위해 공개 데이터베이스에 대한 검색을 수행하기 위한 "질의 서열"로서 추가로 사용될 수 있다. 이러한 검색은 Altschul 등 (1990) J. Mol. Biol. 215:403 10의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램(버전 2.0)을 사용하여 수행할 수 있다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은 NBLAST 프로그램, 점수=100, 단어 길이=12로 수행되어 본 발명에 포괄되는 핵산 분자에 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 수득할 수 있다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램, 점수=50, 단어 길이=3으로 수행되어 본 발명에 포괄되는 단백질 분자에 상동성인 아미노산 서열을 수득할 수 있다. 비교 목적의 갭 정렬을 수득하기 위해, Gapped BLAST를 Altschul 등, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389 3402에 기술된 바와 같이 활용할 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 활용하는 경우, 각 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 매개변수가 사용될 수 있다(NCBI 웹 사이트의 월드 와이드 웹에서 이용가능).

[0050] 핵산은 전체 세포, 세포 용해물 또는 부분적으로 정제되거나 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다. 핵산은 알칼리/SDS 처리, CsCl 밴드화, 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동 및 관련 기술에 공지된 다른 것을 포함한 표준 기술에 의해 다른 세포 구성 요소 또는 다른 오염 물질, 예를 들어 다른 세포 핵산 또는 단백질로부터 정제될 때 "단리"되거나 "실질적으로 순수해진다"(F. Ausubel, 등, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987) 참조).

[0051] "전사된 폴리뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드 전사체"는 ACE2-Fc 융합 핵산의 전사 및 존재한다면 RNA 전사체의 정상적인 전사후 프로세싱(예를 들어, 스플라이싱), 및 RNA 전사체의 역전사에 의해 제조된 성숙 mRNA의 전부 또는 일부에 상보적이거나 상동성인 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA, hnRNA, cDNA, 또는 이러한 RNA 또는 cDNA의 유사체)이다.

[0052] 용어 "소분자"는 관련 기술분야의 용어이며, 분자량이 약 1000 미만 또는 분자량이 약 500 미만인 분자를 포함한다. 한 실시양태에서, 소분자는 펩타이드 결합을 독점적으로 포함하는 것은 아니다. 다른 실시양태에서, 소분자는 올리고머성이 아니다. 활성에 대해 선별될 수 있는 예시적인 소분자 화합물로는 펩타이드, 펩타이드모방체, 핵산, 탄수화물, 작은 유기 분자(예를 들어, 폴리케타이드)(Cane 등(1998) *Science* 282:63), 및 천연물 추출 라이브러리를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 다른 실시양태에서, 화합물은 작은 유기 비-펩타이드 화합물이다. 추가 실시양태에서, 소분자는 생합성이 아니다.

[0053] 용어 "특이적 결합"은 소정의 항원에 대한 항체 결합을 지칭한다. 전형적으로, 항체는 피분석물로서 관심 항원과 리간드로서 항체를 사용하여 BIACORE® 검정 기구에서 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기술에 의해 결정했을 때, 대략 10^{-7}M 미만, 예컨대, 대략 10^{-8}M 미만, 10^{-9}M 미만, 또는 10^{-10}M 또는 훨씬 더 낮은 친화도(K_D)로 결합하고, 소정의 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 외에 다른 비-특이적 항원(예를 들어, BSA, 카세인)에 대한 결합의 친화도보다 적어도 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2.0배, 2.5배, 3.0배, 3.5배, 4.0배, 4.5배, 5.0배, 6.0배, 7.0배, 8.0배, 9.0배, 10.0배 또는 더 높은 친화도로 소정의 항원에 결합한다. "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"라는 어구는 본원에서 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"라는 용어와 상호교환적으로 사용된다. 선택적 결합은 다른 항원보다 한 항원의 결합을 구별하는 항체의 능력을 지칭하는 상대적인 용어이다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "도메인"은 단백질 또는 폴리펩타이드의 기능적 부분, 분절 또는 영역을 의미한다. "상호작용 도메인"은 다른 단백질, 단백질 단편 또는 단리된 도메인에 비해 해당 단백질, 단백질 단편 또는 단리된 도메인의 물리적 친화도에 책임이 있는 단백질, 폴리펩타이드 또는 단백질 단편의 부분, 분절 또는 영역을 구체적으로 지칭한다.

[0055] 달리 언급하지 않는 한, 본원에서 사용되는 용어 "화합물"은 펩타이드, 핵산, 탄수화물, 천연물 추출 라이브러리, 작은 유기 분자와 같은 유기 분자, 화학 물질, 금속 및 유기 금속 분자를 포함하나 이에 제한되지 않는 무기 분자를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0056] 본원에 사용된 용어 "유도체", "유사체" 또는 "변이체"는 동일한 크기의 아미노산 서열 상에서 또는 관련 기술분야에 공지된 컴퓨터 상동성 프로그램에 의해 정렬이 수행된 정렬된 서열과 비교 시, 다양한 실시형태에서 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99% 동일성에 의해 ACE2 폴리펩타이드에 실질적으로 상동성인 영역을 포함하는 폴리펩타이드 또는 이의 암호화 핵산이 엄중, 적당히 엄중, 또는 비엄중 조건 하에서 구성요소 단백질을 암호화하는 서열에 혼성화할 수 있는 것을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 이는 각각 아미노산 치환, 결실 및 첨가에 의한 자연 발생 단백질의 변형의 결과인 단백질을 의미하며, 여기서 유도체는 자연 발생의 단백질의 생물학적 기능을 반드시 동일한 정도는 아닐지라도 여전히 나타낸다. 이러한 단백질의 생물학적 기능은, 예를 들어, 본 발명에서 제공되는 것으로서 적합한 이용가능한 시험관내 검정에 의해 조사될 수 있다.

[0057] 본원에 사용된 용어 "기능적으로 활성"은 이 폴리펩타이드, 즉 단편 또는 유도체가 관련된 실시양태에 따른 단백질의 구조적, 조절, 또는 생화학적 기능을 갖는 폴리펩타이드, 즉 단편 또는 유도체를 지칭한다.

[0058] "기능-보존적 변이체"는 단백질 또는 효소에서 주어진 아미노산 잔기가 폴리펩타이드의 전반적인 형태 및 기능을 변경함이 없이 변화된 것, 예를 들어, 유사한 특성(예를 들어, 극성, 수소 결합 잠재성, 산성, 염기성, 소수성, 방향족성 등)을 갖는 것에 의한 아미노산의 대체를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 보존된 것으로서 표시된 것 외에 다른 아미노산은 유사한 기능의 임의의 2개의 단백질 간의 단백질 또는 아미노산 서열 유사성 퍼센트가 변동될 수 있고, 예를 들어, 유사성이 MEGALIGN 알고리즘에 기초하는 클러스터 방법(Cluster Method)과 같은 정렬 계획에 따라 결정 시, 예를 들어, 70% 내지 99%일 수 있도록, 단백질에서 차이가 있을 수 있다. "기능-보존적 변이체"는 또한 BLAST 또는 FASTA 알고리즘에 의해 결정 시, 적어도 60% 아미노산 동일성을 갖는, 또는 적어도 75%. 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 심지어 적어도 95%이고, 비교되는 천연 또는 부모 단백질과 동일한 또는 실질적으로 유사한 특성 또는 기능을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0059] 기준 폴리펩타이드와 관련하여 사용된 경우, 용어 "폴리펩타이드 단편" 또는 "단편"은 기준 폴리펩타이드 자체와 비교 시, 아미노산 잔기가 결실되지만, 나머지 아미노산 서열은 기준 폴리펩타이드의 상응하는 위치와 일반적으로 동일한 폴리펩타이드를 지칭한다. 이러한 결실은 기준 폴리펩타이드의 아미노 말단에서, 내부적으로, 또는 카르복실-말단에서, 또는 대안적으로 둘 모두에서 발생할 수 있다. 단편은 전형적으로 적어도 5개, 6개, 8개, 또는 10개 아미노산 길이, 적어도 14개 아미노산 길이, 적어도 20개, 30개, 40개 또는 50개 아미노산 길이, 적어도 75개 아미노산 길이, 또는 적어도 100개, 150개, 200개, 300개, 500개, 또는 그 이상의 아미노산 길이이다. 이들은, 전체 길이의 폴리펩타이드의 길이 미만인 한, 예를 들어, 적어도 및/또는 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480, 500, 520, 540, 560, 580, 600, 620, 640, 660, 680, 700, 720, 740, 760, 780, 800, 820, 840, 860, 880, 900, 920, 940, 960, 980, 1000, 1020, 1040, 1060, 1080, 1100, 1120, 1140, 1160, 1180, 1200, 1220, 1240, 1260, 1280, 1300, 1320, 1340개 또는 그 이상의 길이를 포함하는 것일 수 있다. 대안적으로, 이들은 전체 길이의 폴리펩타이드의 길이 미만인 한, 상기 범

위 미만 및/또는 상기 범위를 제외한 것일 수 있다.

[0060] 본원에 사용된 "상동성"은 동일한 핵산 가닥의 두 영역 사이 또는 2개의 상이한 핵산 가닥의 영역 사이의 뉴클레오타이드 서열 유사성을 지칭한다. 두 영역 모두에서 뉴클레오타이드 잔기 위치가 동일한 뉴클레오타이드 잔기로 점유된 경우, 이 영역은 그 위치에서 상동성인 것이다. 각 영역의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 잔기 위치가 동일한 잔기로 점유된 경우, 제1 영역은 제2 영역에 상동성인 것이다. 두 영역 사이의 상동성은 동일한 뉴클레오타이드 잔기에 의해 점유된 두 영역의 뉴클레오타이드 잔기 위치의 비율에 의거하여 표현된다. 한 예를 들면, 뉴클레오타이드 서열 5'-ATTGCC-3'를 갖는 영역 및 뉴클레오타이드 서열 5'-TATGGC-3'를 갖는 영역은 50% 상동성을 공유한다. 일부 실시양태에서, 제1 영역은 제1 부분을 포함하고, 제2 영역은 제2 부분을 포함하여, 이 부위들 각각의 뉴클레오타이드 잔기의 적어도 약 50%, 및 일부 실시양태에서 적어도 약 75%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%가 동일한 뉴클레오타이드 잔기에 의해 점유된다. 일부 실시양태에서, 각 부분의 모든 뉴클레오타이드 잔기 위치는 동일한 뉴클레오타이드 잔기에 의해 점유된다.

[0061] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 본 발명에 포괄되는 재조합 발현 벡터와 같은 본 발명에 포괄되는 핵산이 도입된 세포를 지칭하는 것으로 의도된다. 용어 "숙주 세포" 및 "재조합 숙주 세포"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이러한 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손 또는 잠재적 자손을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 다음 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에 이러한 자손은 사실상 부모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본원에서 사용되는 용어의 범위 내에 포함된다.

[0062] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 여기에 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산을 지칭한다. 벡터의 한 유형은 "플라스미드"이며, 이는 추가 DNA 분절이 결찰될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이며, 여기서 추가 DNA 분절은 바이러스 게놈에 결찰될 수 있다. 특정 벡터는 이들이 도입된 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있다(예를 들어, 박테리아의 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포에 도입되는 즉시 숙주 세포의 게놈에 통합되어 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" 또는 간단히 "발현 벡터"로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서 "플라스미드"와 "벡터"는 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 벡터 형태이므로 상호교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 제공하는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 연관 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 벡터를 포함하는 것으로 의도된다.

[0063] "화학 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없는"이라는 용어는 단백질 합성에 관여하는 화학적 전구체 또는 다른 화학물질로부터 단백질이 분리되어 있는 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질의 제조물을 포함한다. 한 실시양태에서, "화학 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없는"이라는 말은 화학적 전구체 또는 비-항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질 화학물질이 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만 또는 약 5% 미만(건조 중량 기준)인 항체, 폴리펩타이드, 펩타이드 또는 융합 단백질의 제조물을 포함한다.

[0064] 단백질과 관련하여 사용될 때, 용어 "활성"은 생물학적 과정 및 세포 기능에서 나타나는 활성, 다른 분자 또는 이의 모이어티와 상호작용하거나 결합하는 능력, 특정 분자와의 결합 친화도 또는 특이성, 시험관내 또는 생체내 안정성(예를 들어, 단백질 분해율), 항원성 및 면역원성, 효소 활성 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 특정 단백질에 의해 표시되거나 또는 연관된 임의의 생리학적 또는 생화학적 활성을 의미한다. 이러한 활성은 관련 기술자에게 분명한 임의의 다양한 적합한 방법에 의해 검출 또는 검정될 수 있다.

[0065] 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 적용가능한 경우, 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이들은 화학적으로 변형, 예를 들어, 해독후 변형될 수 있다. 예를 들어, 이들은 글리코실화될 수 있고, 또는 변형된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 이들은 또한 신호 서열의 첨가에 의해 변형되어, 폴리펩타이드에 이러한 서열이 원래 함유되지 않는 세포로부터 이들의 분비를 촉진할 수 있다. 이들은 태그에 의해 태그화될 수 있다. 본 발명에 사용하기 위한 폴리펩타이드/단백질은 실질적으로 단리된 형태일 수 있다. 폴리펩타이드/단백질은 폴리펩타이드의 의도된 목적을 방해하지 않아서 여전히 실질적으로 단리된 것으로서 간주될 수 있는 담체 또는 희석제와 혼합될 수 있다. 본 발명에 사용하기 위한 폴리펩타이드/단백질은 또한 실질적으로 정제된 형태일 수도 있고, 이 경우, 일반적으로 제조물 중의 폴리펩타이드의 중량을 기준으로 50% 초과, 예를 들어, 80%, 90%, 95% 또는 99% 초과가 본 발명의 폴리펩타이드인 제조물 중의 폴리펩타이드를 포함할 것이다.

[0066] 용어 "혼성 단백질", "혼성 폴리펩타이드", "혼성 펩타이드", "융합 단백질", "융합 폴리펩타이드" 및 "융합 펩

타이드"는 특정 폴리펩타이드에 자연적으로 연결되지 않는 하나 이상의 폴리펩타이드 분자에 특정 폴리펩타이드 분자가 공유 연결되어 있는 비-자연 발생의 단백질을 의미하기 위해 상호교환적으로 본원에 사용된다. 따라서, "혼성 단백질"은 공유 연결에 의해 함께 연결된 2개의 자연 발생의 단백질 또는 단편일 수 있다. "혼성 단백질"은 또한 2개의 인공 폴리펩타이드를 함께 공유 연결함으로써 형성된 단백질일 수도 있다. 전형적으로, 2개 이상의 폴리펩타이드 분자는 펩타이드 결합에 의해 함께 연결되거나 융합되어 단일 비-분지화된 폴리펩타이드 사슬을 형성하지만, 반드시 그런 것은 아니다.

[0067] 본원에 사용된 용어 "태그"는 가장 광범위한 의미로 이해되는 것을 의미하며, 임의의 적합한 효소, 형광, 또는 방사성 표지 및 적합한 에피토프를 포함하지만, 이에 제한되지는 않고, 예를 들어, HA-태그 Myc-태그 T7, His-태그, FLAG-태그, 칼모둘린 결합 단백질, 글루타치온-S-전이효소, 스트렙-태그, KT3-에피토프, EEF-에피토프, 녹색 형광 단백질 및 이의 변이체를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0068] "안지오텐신 I 전환 효소 2"로도 알려진 용어 "ACE2"는 안지오텐신 I 전환 효소와 상당한 상동성을 갖는 디펩타이딜 카르복시디펩티다제를 지칭한다. 단백질은 안지오텐신 I을 안지오텐신 1-9로, 안지오텐신 II를 안지오텐신 1-7로 전환시킨다(Donoghue 등 (2000) *Circ Res.*, 87(5):E1-9., Tipnis 등 (2000) *J Biol Chem.*, 275(43):33238-43, Vickers 등(2002) *J Biol Chem.*, 277(17):14838-43). ACE2 단백질은 또한 아펠린-13 및 다이노르핀-13을 고효율로 가수분해한다(Vickers 등 (2002)). ACE2는 중증급성호흡기증후군(SARS)을 유발하는 바이러스(SARS CoV-1)(Li 등 (2003) *Nature* 426: 450-454) 및 COVID-19를 유발하는 SARS CoV-2(Hoffman 등 (2020) *Cell*, Apr 16;181(2):271-280.e8)를 포함한 코로나바이러스의 스파이크(S) 단백질에 효율적으로 결합한다.

[0069] 용어 "전체 길이의 ACE2 폴리펩타이드" 또는 "야생형 ACE2 폴리펩타이드"는 다음에 대해 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 지칭한다:

```
  1 MSSSSWLLLS LVAVTAAQST IEEQAKTFLD KFNHEAEDLF YQSSLASWNY NTNITEENVQ
 61 NMNNAGDKWS AFLKEQSTLA QMYPLQEIQN LTVKLQLQAL QQNGSSVLSE DKSKRLNTIL
121 NTMSTIYSTG KVCNPDNPQE CLLLEPGLNE IMANSLDYNE RLWAWESWRS EVGKQLRPLY
181 EEYVVLKNEM ARANHYEDYG DYWRGDYEVN GVDGYDYSRG QLIEDVEHTF EEIKPLYEHL
241 HAYVRAKLMN AYPSYISPIG CLPAHLLGDM WGRFWTNLYS LTVPFGQKPN IDVTDAMVDQ
301 AWDAQRIFKE AEKFFVSVGL PNMTQGFWEN SMLTDPGNVQ KAVCHPTAWD LGKGDFRILM
361 CTKVTMDDFL TAHHEMGHIQ YDMAYAAQPF LLRNGANEGF HEAVGEIMSL SAATPKHLKS
421 IGLLSPDFQE DNETEINFLL KQALTIVGTL PFTYMLEKWR WMVFKGEIPK DQWMKKWWEM
481 KREIVGVVEP VPHDETYCDP ASLFHVSNDY SFIRYYTRTL YQFQFQEALC QAAKHEGPLH
541 KCDISNSTEA GQKLFNMLRL GKSEPWTLAL ENVVGAKNMN VRPLLNYFEP LFTWLKDQNK
601 NSFVGWSTDW SPYADQSIKV RISLKSALGD KAYEWNDNEM YLFRSSVAYA MRQYFLKVKN
661 QMILFGEEDV RVANLKPRIS FNFFVTAPKN VSDIIPRTEV EKAIRMSRSR INDAFRLNDN
721 SLEFLGIQPT LGPPNQPPVS IWLIVFGVVM GVIVVGIVIL IFTGIRDRKK KNKARSGENP
781 YASIDISKGE NNPGFQNTDD VQTSF
```

[0070]

[0071] 용어 "ACE2"는 이의 단편, 변이체(예를 들어, 대립형질 변이체) 및 유도체를 포함하는 것으로 의도된다. 대표적인 인간 ACE2 cDNA 및 인간 ACE2 단백질 서열은 관련 기술분야에 잘 알려져 있고 국립 생명공학 정보 센터(NCBI)에서 공공연하게 이용가능하다. 인간 ACE2 이소형은 전사체 NM_001371415.1에 의해 암호화되는 단백질 NP_001358344.1, 전사체 NM_021804.3에 의해 암호화되는 단백질 NP_068576.1, 및 전사체 AY358714.1에 의해 암호화되는 단백질 AAQ89076.1을 포함한다. 인간 외의 다른 유기체에서의 ACE2 오솔로그의 핵산 및 폴리펩타이드 서열은 잘 알려져 있으며, 예를 들어 침팬지(XM_016942979.1 - XP_016798468.1; 및 XM_016942980.1 - XP_016798469.1), 붉은털원숭이(NM_001135696.1 - NP_001129168.1; XM_028841825.1 - XP_028697658.1; 및 XM_015126958.2 - XP_014982444.2), 개(NM_001165260.1 - NP_001158732.1; XM_014111329.2 - XP_013966804.1; XM_022415506.1 - XP_022271214.1; 및 XM_005640992.2 - XP_005641049.1), 소(NM_001024502.4 - NP_001019673.2; XM_005228428.4 - XP_005228485.1; XM_015461785.2 - XP_015317271.1; XM_005228429.4 - XP_005228486.1; 및 XM_024987850.1 - XP_024843618.1), 마우스(NM_001130513.1 - NP_001123985.1; 및 NM_027286.4 - NP_081562.2), 래트(NM_001012006.1 - NP_001012006.1), 닭(XM_416822.5 - XP_416822.2), 개구리(XM_002938247.4 - XP_002938293.2), 제브라피시(NM_001007297.1 - NP_001007298.1; XM_005169359.4 - XP_005169416.1; 및 XM_005169360.4 - XP_005169417.13.2), 및 C. 엘레강스(NM_001029383.6 -

NP_001024453.1)을 포함한다.

[0072] 용어 "단편 결정화성 도메인" 또는 "Fc 도메인"은 IgG 항체의 단편 결정화성 영역을 지칭한다. 이 도메인은 항체의 세포 내재화를 허용하는 Fcγ 수용체(예를 들어, FcγIIa 수용체)에 결합한다.

[0073] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "ACE-2 유도 코로나바이러스"는 ACE2 단백질을 사용하여 세포로 진입하는 코로나바이러스의 하위세트를 지칭한다. 적어도 7개의 코로나바이러스가 ACE2를 활용하는 것으로 알려져 있고, 예컨대, 전 세계적 중요성이 있는 3가지 바이러스인 NL63, 2004년 중증급성호흡기증후군 발발에 책임 있는 바이러스인 SARS-CoV, 및 COVID-19 유행에 책임이 있는 바이러스인 SARS-CoV-2가 있다(Li 등 (2003) *Nature*, 426(6965):450-54.; Hoffman 등 (2020) *Cell*, 181(2):271-80 e8.

[0074] 용어 "코로나바이러스 감염을 진단하는"은 코로노바이러스 또는 이의 아형, 코로나바이러스 폴리펩타이드 또는 상기 코로나바이러스 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자, 또는 개체에서 코로나바이러스 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 또는 부재를 결정하기 위한 본 발명의 방법, 시스템, 및 암호의 사용을 포함한다. 이 용어는 또한 개체에서 질환 활성의 수준을 평가하기 위한 방법, 시스템, 및 암호도 포함한다.

[0075] 특정 단백질의 아미노산 서열과 유전자 암호(이하에 제시됨)에 의해 정의된 단백질을 암호할 수 있는 뉴클레오타이드 서열 사이에는 공지되고 확실한 대응성이 있다. 마찬가지로, 유전자 암호에 의해 정의된 바와 같이 해당 핵산에 의해 암호화된 아미노산 서열과 특정 핵산의 뉴클레오타이드 서열 사이에는 공지되고 확실한 대응성이 있다.

유전자 암호	
알라닌 (Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
아르기닌 (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
아스파라긴 (Asn, N)	AAC, AAT
아스파르트산 (Asp, D)	GAC, GAT
시스테인 (Cys, C)	TGC, TGT
글루탐산 (Glu, E)	GAA, GAG
글루타민 (Gln, Q)	CAA, CAG
글리신 (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
히스티딘 (His, H)	CAC, CAT
이소류신 (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
류신 (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
리신 (Lys, K)	AAA, AAG
메티오닌 (Met, M)	ATG
페닐알라닌 (Phe, F)	TTC, TTT
프롤린 (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
세린 (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
트레오닌 (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
트립토판 (Trp, W)	TGG
티로신 (Tyr, Y)	TAC, TAT
발린 (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
종결 신호 (종단)	TAA, TAG, TGA

[0076]

[0077] 유전자 암호의 중요하고 잘 알려진 특징은 중복성으로, 단백질을 만드는 데 사용된 대부분의 아미노산의 경우, 2 이상의 암호화 뉴클레오타이드 3중자(triplet)가 사용될 수 있다(상기 예시됨). 따라서, 다수의 상이한 뉴클레오타이드 서열은 주어진 아미노산 서열을 암호화할 수 있다. 이러한 뉴클레오타이드 서열은 모든 유기체에서

동일한 아미노산 서열의 생성을 초래하므로, 기능적으로 동등한 것으로 간주된다(단, 특정 유기체는 일부 서열을 다른 것보다 더 효율적으로 해독할 수 있음). 더욱이, 때때로 퓨린 또는 피리미딘의 메틸화된 변이체가 주어진 뉴클레오타이드 서열에서 발견될 수 있다. 이러한 메틸화는 트리뉴클레오타이드 코돈과 상응하는 아미노산 사이의 암호 관계에 영향을 미치지 않는다.

[0078] 전술한 관점에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 핵산(또는 이의 임의의 부분)을 암호화하는 DNA 또는 RNA의 뉴클레오타이드 서열은 DNA 또는 RNA를 아미노산 서열로 해독하는 유전자 암호를 사용하여 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 아미노산 서열을 유도하는데 사용될 수 있다. 마찬가지로, 폴리펩타이드 아미노산 서열의 경우, 폴리펩타이드를 암호화할 수 있는 상응하는 뉴클레오타이드 서열은 유전자 암호로부터 추론될 수 있다(그 중복성으로 인해, 임의의 주어진 아미노산 서열에 대해 다중 핵산 서열을 생성할 것임). 따라서, 본원에서 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 설명 및/또는 개시는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열의 설명 및/또는 개시도 포함하는 것으로 간주되어야 한다. 유사하게, 본원에서 폴리펩타이드 아미노산 서열의 설명 및/또는 개시는 아미노산 서열을 암호화할 수 있는 모든 가능한 뉴클레오타이드 서열의 설명 및/또는 개시도 포함하는 것으로 간주되어야 한다.

[0079] 마지막으로, 본 발명에 포괄되는 ACE2-융합 폴리펩타이드 및 이의 단편에 대한 핵산 및 아미노산 서열 정보는 관련 기술분야에 공지되어 있으며 국립 생명공학 정보 센터(NCBI)와 같은 공개적으로 이용가능한 데이터베이스에서 쉽게 이용할 수 있다. 예시적인 핵산 및 아미노산 서열은 표 1-8에 제공된다.

표 1

서열번호 1 H374N H378N 치환을 갖는 ACE2 세포외 도메인의 아미노산 서열 (잔기 18-740)

QSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQN
LTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLW
AWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPL
YEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFK
EAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVTMDDFLTAH**N**EMG**N**IQYD
MAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLKQALTIVGTLPFTYM
LEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEA
LCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKN
SFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGDKAYEWNDNEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEEDVRVAN
LKPRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGPPNQPPVS

서열번호 2 H374N H378N 치환을 갖는 ACE2 세포외 도메인의 하위세트 (잔기 18-708)

QSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQN
LTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLW
AWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPL
YEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFK
EAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVTMDDFLTAH**N**EMG**N**IQYD
MAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLKQALTIVGTLPFTYM
LEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEA
LCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKN
SFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGDKAYEWNDNEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEEDVRVAN
LKPRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSR

서열번호 3 H374N H378N 치환을 갖는 ACE2 세포외 도메인의 하위세트 (잔기 18-615)

QSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQN
LTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLW
AWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPL
YEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFK
EAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVTMDDFLTAH**N**EMG**N**IQYD
MAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLKQALTIVGTLPFTYM
LEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEA
LCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKN
SFVGWSTDWSPYAD

서열번호 4 H374N H374N 치환을 갖는 ACE2 세포외 도메인의 하위세트 (잔기 18-612)

QSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQN
LTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLW
AWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPL
YEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFK
EAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVTMDDFLTAH**N**EMG**N**IQYD
MAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLKQALTIVGTLPFTYM
LEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEA
LCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKN
SFVGWSTDWSP

[0080]

표 2: S228P 치환 및 다른 링커를 갖는 IgG4 유래의 힌지

서열번호 5
VESKYGPPCPPCP

서열번호 6
ESKYGPPCPPCP

서열번호 7
SKYGPPCPPCP

서열번호 8
KYGPPCPPCP

서열번호 9
YGPPCPPCP

서열번호 10
GPPCPPCP

서열번호 11
PPCPPCP

서열번호 12
PCPPCP

서열번호 13
CPPCP

서열번호 14
PPCP

서열번호 15
PCP

서열번호 52 (제1 잔기가 G인 것을 제외하고는 서열번호 5와 유사)
GESKYGPPCPPCP

서열번호 53 (G4AG4 링커)
GGGGAGGGG

서열번호 54 (G4AG4AG4 링커)
GGGGAGGGGAGGGG

[0081]

표 3: IgG1 유래의 힌지

서열번호 16
EPKSCDKTHTCP

서열번호 17
PKSCDKTHTCP

서열번호 18
KSCDKTHTCP

서열번호 19
SCDKTHTCP

서열번호 20
CDKTHTCP

서열번호 21
DKTHTCP

서열번호 22
KTHTCP

서열번호 23
THTCP

서열번호 24
HTCP

서열번호 25
TCP

[0082]

표 4: IgG2 유래의 힌지

서열번호 26
ERKCCVECPPCP

서열번호 27
RKCCVECPPCP

서열번호 28
KCCVECPPCP

서열번호 29
CCVECPPCP

서열번호 30
CVECPPCP

서열번호 31
VECPPCP

서열번호 32
ECPPCP

표 5: Fc 도메인

서열번호 33 L235E 치환을 갖는 IgG4 Fc 도메인
APEF**E**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

서열번호 34 L235E 및 P329G 치환을 갖는 IgG4 Fc 도메인
APEF**E**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL**G**SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

서열번호 35 IgG1 P329G 치환을 갖는 IgG4 Fc 도메인
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL**G**SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0083]

서열번호 36 IgG1 P329A 치환을 갖는 IgG4 Fc 도메인

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

서열번호 37 L234A 및 L235A 치환을 갖는 IgG1

PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

서열번호 38 L234A, L235A, 및 P329G 치환을 갖는 IgG1

PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

서열번호 39 N297A 치환을 갖는 IgG1

PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

서열번호 40 N297D 치환을 갖는 IgG1

PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYDSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

서열번호 41 P329G 치환을 갖는 IgG1

PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

서열번호 42 P329A 치환을 갖는 IgG1

PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

서열번호 55 L234A 및 L235A 치환을 갖는 IgG1 ("EEM" 대신에 "DEL"을 갖는 것을 제외하고는 서열번호 37과 유사)

PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

[0084]

표 6 기준 IgG Fc 및 불변 도메인

서열번호 43 IgG4 Fc 도메인

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

서열번호 44 IgG2 Fc 도메인

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS
VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

서열번호 45 인간 IgG1 불변 영역 (Eu 번호매김)

```
       127         137         147         157         167
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
       177         187         197         207         217
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
       227         237         247         257         267
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
       277         287         297         307         317
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
       327         337         347         357         367
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
       377         387         397         407         417
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
       427         437         447
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
```

서열번호 46 인간 IgG2 불변 영역 (Eu 번호매김)

```
       127         137         147         157         167
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
       177         187         197         207         217
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER
   |*# 230         240         250         260         270
KCCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
       280         290         300         310         320
EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
       330         340         350         360         370
KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG
       380         390         400         410         420
FYPSDISVEW ESNGQPENNY KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
       430         440    446
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
|=V222, *=E224, #=C226
```

[0085]

서열번호 47 인간 IgG4 불변 영역 (Eu 번호매김)

```
       127        137        147        157        167
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
       177        187        197        207        217
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
 ||226 230        240        250        260        270
KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
       280        290        300        310        320
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
       330        340        350        360        370
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
       380        390        400        410        420
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
       430        440     447
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK
```

|| = 이들 IgG4 힌지 잔기 (Y & G)는 Eu 번호를 갖지 않음

표 7

서열번호 48 DF-COV-01 아미노산 서열

```
QSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQN
LTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLW
AWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPL
YEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFK
EAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVTMDDFLTAHNEMGNIQYD
MAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLKQALTIVGTLPFTYM
LEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEA
LCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKN
SFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGDKAYEWNDNEMYLFRSSVAYAMRQYFLKVKNQMILFGEEDVRVAN
LKPRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGPPNQPPVSGPPCPPC
PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
```

***서열번호 60 ACE2 아미노산 서열**

```
MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNNAGDKWSAFL
KEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEP
GLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSR
GQLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNID
VTDAMVDQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVT
MDDFLTAHHEMGHIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINF
LLKQALTIVGTLPFTYMLEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYS
FIRYYTRTLYQFQFQEALCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNMNVRPL
LNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYADQSIKVRISLKSALGDKAYEWNDNEMYLFRSSVAYAMRQYFLK
VKNQMILFGEEDVRVANLKPRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPT
LGPPNQPPVSIWLIVFGVVMGVIVVGIVILIFTGIRDRKKKNKARSGENPYASIDISKGENNPGFQNTDDVQT
SF
```

[0086]

[0087] * ACE2의 대표적인 서열은 서열번호 60으로서 제공된다. 아미노말단 리더는 이탤리체이며, ACE2 펩티다제 도메인(PD)(아미노산 18 내지 615)은 볼드체이다. 아미노산 615에 대해 카르복시말단인 ACE2의 부분은 콜렉트린-유사 도메인(CLD)이라고 명명되었다(Yan 등 (2020) *Science* 367:1444-1448). 이 용어는 ACE2의 막근접(juxtamembrane), 막관통, 및 세포질 도메인을 포함하는 이 영역이 신장의 막관통 단백질 콜렉트린과 유사성을 공유한다는 사실에 관한 것이다(Hamming 등(2007) *J.Pathol*. 212:1-11). 특히, 서열 정렬은 ACE의 아미노산 614 내지 카르복시말단이 콜렉트린의 아미노산 21 내지 241과 47.8% 동일성을 공유한다는 것을 입증한다(Zhang 등(2001) *J.Biol.Chem*. 276:17132-17139). 대표적인 서열번호 60에서, 콜렉트린-유사 도메인(CLD)은 볼드체화되지 않았다. CLD의 막근접(세포외) 부분인 아미노산 616 내지 740은 밑줄친 것이고 CLD의 막관통 및 세포질 부분에는 밑줄이 없다.

서열번호 49 DF-COV-02 아미노산 서열

QSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQN
LTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLW
AWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPL
YEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFK
EAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVTMDDFLTAHNEMGNIQYD
MAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLKQALTIVGTLPFTYM
LEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEA
LCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKN
SFVGWSTDWSPGESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

서열번호 56 DF-COV-03 아미노산 서열 ([ACE2(18-615)-NN]-[G4AG4]-[IgG1 힌지]-

[hIgG1(LALA) Fc]) [IgG1 힌지는 볼드체 및 이탤리체임]

QSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQN
LTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLW
AWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPL
YEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFK
EAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVTMDDFLTAH**N**EMG**N**IQYD
MAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNETEINFLLKQALTIVGTLPFTYM
LEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEA
LCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKN
SFVGWSTDWSPYAD***GGGGAGGGGDKTHTCPPCP***APE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
[0088] WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

서열번호 57 DF-COV-04 아미노산 서열 ([IgG1 힌지]-[hIgG1(LALA) Fc]-

[G4AG4AG4]-[ACE2(18-612)-NN]) [IgG1 힌지는 볼드체 및 이탤리체임]

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKGGGGAGGGGAGGGGQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNNAGDK
WSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQEC
LLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVGKQLRPLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDG
YDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQ
KPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILM
CTKVTMDDFLTAHNEMGNIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNE
TEINFLLKQALTIVGTLPFTYMLEKWRWMVFKGEIPKDQWMKKWWEMKREIVGVVEPVPHDETYCDPASLFHV
SNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEALCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRLGKSEPWTLALENVVGAKNM
NVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSP

표 8 – DF-COV 핵산 서열

서열번호 50 전체 DF-COV-01 뉴클레오타이드 서열

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTTCCTGTCAGTAACGACTGGTGTCCACTCCCAGTCAACAATCGAGG
AGCAGGCAAAGACCTTCCTGGACAAGTTTAACCACGAAGCGGAGGACCTGTTCTACCAGAGCAGCCTGGCGAG
CTGGAATTACAACACCAACATCACCGAGGAGAACGTGCAGAACATGAATAACGCTGGCGACAAGTGGAGCGCC
TTCTTGAAGGAGCAATCCACCCTGGCCCAGATGTACCCGCTGCAAGAGATACAGAACCTGACTGTGAAGCTGC
AACTGCAGGCCCTGCAGCAGAACGGCTCCAGCGTGCTGAGCGAAGACAAGAGCAAAAGGCTGAATACCATATT
GAACACGATGAGCACCATCTACAGCACCGGCAAAGTATGCAACCCCGACAACCCCCAAGAGTGTCTGTTGTTG
GAACCCGGCCTGAACGAGATTATGGCGAACTCCCTGGACTACAACGAACGCCTGTGGGCATGGGAGTCTTGGA
GGTCAGAGGTTGGCAAGCAACTGAGGCCGTTGTACGAAGAGTACGTGGTGCTGAAGAACGAAATGGCACGGGC
CAATCATTATGAGGACTACGGTGATTATTGGAGGGGCGACTACGAGGTGAACGGCGTGGACGGCTACGACTAT
AGCAGGGGCCAACTTATAGAGGACGTAGAGCACACTTTTGAGGAAATCAAACCCCTGTACGAGCACTTGCATG
CCTACGTACGCGCCAAACTGATGAATGCGTACCCCAGCTACATCAGCCCCATCGGCTGCCTGCCCGCACACCT
GCTCGGCGACATGTGGGGCCGATTCTGGACCAATCTGTATAGCCTCACCGTGCCCTTTGGCCAGAAGCCGAAC
ATAGATGTGACGGATGCTATGGTAGACCAGGCGTGGGATGCACAGCGCATCTTCAAGGAGGCCGAGAAGTTCT
TCGTGAGCGTCGGCTTGCCCAACATGACCCAGGGTTTCTGGGAGAACTCAATGCTGACTGACCCCGGCAACGT
ACAGAAAGCCGTATGCCACCCAACTGCTTGGGACCTGGGTAAGGGAGACTTCCGGATCCTCATGTGTACCAAG
GTGACCATGGATGACTTTCTCACCGCCCACAATGAAATGGGCAACATCCAGTACGATATGGCCTACGCAGCGC
AGCCATTCCTTCTGAGGAACGGTGCCAACGAGGGCTTCCATGAGGCAGTCGGAGAGATCATGAGCCTGTCAGC
GGCGACCCCTAAACATCTGAAGAGCATCGGGCTGCTGTCTCCGGACTTTCAAGAGGACAATGAGACTGAGATC
AACTTCCTCCTGAAACAGGCGCTGACCATTGTAGGCACCTTGCCCTTCACCTACATGCTGGAGAAGTGGCGAT
GGATGGTGTTTAAGGGCGAGATCCCGAAGGACCAGTGGATGAAAAAGTGGTGGGAGATGAAGAGGGAGATCGT
CGGCGTAGTTGAGCCGGTCCCCCACGACGAAACCTACTGCGATCCTGCCAGCCTGTTCCACGTGAGCAACGAT
TACAGTTTTATCAGGTACTACACCAGGACCCTTTACCAATTTCAGTTCCAGGAGGCACTGTGCCAGGCCGCCA
AGCACGAAGGCCCCCTGCACAAGTGCGACATCAGCAACAGCACCGAGGCGGGTCAAAAGCTGTTTAACATGCT
GAGGCTGGGCAAGAGCGAGCCGTGGACCCTGGCCCTGGAAAACGTTGTGGGCGCAAAAAACATGAACGTGAGG
CCCCTGCTGAACTACTTCGAGCCCCTGTTCACCTGGCTGAAGGACCAGAACAAGAACAGTTTCGTGGGCTGGA
GTACCGATTGGAGTCCCTATGCCGACCAGAGCATCAAGGTGAGGATTAGCCTCAAGAGCGCCCTGGGCGACAA
GGCCTATGAATGGAACGACAACGAGATGTACCTGTTCAGGTCAAGCGTGGCCTACGCCATGAGGCAGTACTTC
CTGAAAGTGAAGAACCAGATGATACTGTTCGGCGAGGAGGACGTGAGGGTGGCCAACCTGAAGCCCAGGATAT
CATTCAATTTCTTCGTGACCGCTCCCAAGAACGTGAGCGACATCATCCCCAGGACCGAGGTGGAGAAGGCCAT
CAGGATGAGCCGCAGCAGGATTAACGACGCCTTCAGGCTGAACGATAACAGCCTGGAGTTCCTTGGCATCCAG
CCAACCCTGGGACCACCCAACCAGCCTCCCGTTAGCGGACCCCCCTGTCCTCCTTGCCCTGCTCCTGAATTTG
AGGGAGGCCCCTCCGTCTTCCTGTTTCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACACCCGAAGT
CACCTGCGTCGTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGAGTGGAG
GTGCATAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTGCTCACCG
TCCTGCATCAGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCAT
CGAGAAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAACCTCGGGAGCCCCAAGTGTATACCCTCCCTCCCAGCCAGGAG
[0089] GAGATGACCAAGAATCAAGTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTGTGGAAT

GAGATGACCAAGAATCAAGTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTGTGGAAT
GGGAAAGCAATGGCCAACCTGAGAACAACTACAAGACCACACCCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTTCTT
CCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCCCGGTGGCAAGAGGGAAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCAC
GAGGCTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGAGCCTCGGCAAGTAA

서열번호 51 전체 DF-COV-02 뉴클레오타이드 서열

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTTCCTGTCAGTAACGACTGGTGTCCACTCCCAGTCAACAATCGAGG
AGCAGGCAAAGACCTTCCTGGACAAGTTTAACCACGAAGCGGAGGACCTGTTCTACCAGAGCAGCCTGGCGAG
CTGGAATTACAACACCAACATCACCGAGGAGAACGTGCAGAACATGAATAACGCTGGCGACAAGTGGAGCGCC
TTCTTGAAGGAGCAATCCACCCTGGCCCAGATGTACCCGCTGCAAGAGATACAGAACCTGACTGTGAAGCTGC
AACTGCAGGCCCTGCAGCAGAACGGCTCCAGCGTGCTGAGCGAAGACAAGAGCAAAAGGCTGAATACCATATT
GAACACGATGAGCACCATCTACAGCACCGGCAAAGTATGCAACCCCGACAACCCCCAAGAGTGTCTGTTGTTG
GAACCCGGCCTGAACGAGATTATGGCGAACTCCCTGGACTACAACGAACGCCTGTGGGCATGGGAGTCTTGGA
GGTCAGAGGTTGGCAAGCAACTGAGGCCGTTGTACGAAGAGTACGTGGTGCTGAAGAACGAAATGGCACGGGC
CAATCATTATGAGGACTACGGTGATTATTGGAGGGGCGACTACGAGGTGAACGGCGTGGACGGCTACGACTAT
AGCAGGGGCCAACTTATAGAGGACGTAGAGCACACTTTTGAGGAAATCAAACCCCTGTACGAGCACTTGCATG
CCTACGTACGCGCCAAACTGATGAATGCGTACCCCAGCTACATCAGCCCCATCGGCTGCCTGCCCGCACACCT
GCTCGGCGACATGTGGGGCCGATTCTGGACCAATCTGTATAGCCTCACCGTGCCCTTTGGCCAGAAGCCGAAC
ATAGATGTGACGGATGCTATGGTAGACCAGGCGTGGGATGCACAGCGCATCTTCAAGGAGGCCGAGAAGTTCT
TCGTGAGCGTCGGCTTGCCCAACATGACCCAGGGTTTCTGGGAGAACTCAATGCTGACTGACCCCGGCAACGT
ACAGAAAGCCGTATGCCACCCAACTGCTTGGGACCTGGGTAAGGGAGACTTCCGGATCCTCATGTGTACCAAG
GTGACCATGGATGACTTTCTCACCGCCCACAATGAAATGGGCAACATCCAGTACGATATGGCCTACGCAGCGC
AGCCATTCCTTCTGAGGAACGGTGCCAACGAGGGCTTCCATGAGGCAGTCGGAGAGATCATGAGCCTGTCAGC
GGCGACCCCTAAACATCTGAAGAGCATCGGGCTGCTGTCTCCGGACTTTCAAGAGGACAATGAGACTGAGATC
AACTTCCTCCTGAAACAGGCGCTGACCATTGTAGGCACCTTGCCCTTCACCTACATGCTGGAGAAGTGGCGAT
GGATGGTGTTTAAGGGCGAGATCCCGAAGGACCAGTGGATGAAAAAGTGGTGGGAGATGAAGAGGGAGATCGT
CGGCGTAGTTGAGCCGGTCCCCCACGACGAAACCTACTGCGATCCTGCCAGCCTGTTCCACGTGAGCAACGAT
TACAGTTTTATCAGGTACTACACCAGGACCCTTTACCAATTTCAGTTCCAGGAGGCACTGTGCCAGGCCGCCA
AGCACGAAGGCCCCCTGCACAAGTGCGACATCAGCAACAGCACCGAGGCGGGTCAAAAGCTGTTTAACATGCT
GAGGCTGGGCAAGAGCGAGCCGTGGACCCTGGCCCTGGAAAACGTTGTGGGCGCAAAAAACATGAACGTGAGG
CCCCTGCTGAACTACTTCGAGCCCCTGTTCACCTGGCTGAAGGACCAGAACAAGAACAGTTTCGTGGGCTGGA
GTACCGATTGGAGTCCCGGTGAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTCCTCCTTGCCCTGCTCCTGAATTTGAGGG
AGGCCCCTCCGTCTTCCTGTTTCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACACCCGAAGTCACC
TGCGTCGTGGTGGATGTCAGCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGAGTGGAGGTGC
ATAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAAGAGCAGTTCAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTGCTCACCGTCCT
GCATCAGGATTGGCTCAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAG
AAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAACCTCGGGAGCCCCAAGTGTATACCCTCCCTCCCAGCCAGGAGGAGA
TGACCAAGAATCAAGTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCCTCCGACATCGCTGTGGAATGGGA
AAGCAATGGCCAACCTGAGAACAACTACAAGACCACACCCCCCGTGCTGGACTCCGATGGCTCCTTCTTCCTG
TACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCCCGGTGGCAAGAGGGAAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGG
CTCTCCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGAGCCTCGGCAAGTAA

서열번호 58 전체 DF-COV-03 뉴클레오타이드 서열

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTTCCTGTCAGTAACGACTGGTGTCCACTCCCAGTCAACAATCGAGG
AGCAGGCAAAGACCTTCCTGGACAAGTTTAACCACGAAGCGGAGGACCTGTTCTACCAGAGCAGCCTGGCGAG
CTGGAATTACAACACCAACATCACCGAGGAGAACGTGCAGAACATGAATAACGCTGGCGACAAGTGGAGCGCC
TTCTTGAAGGAGCAATCCACCCTGGCCCAGATGTACCCGCTGCAAGAGATACAGAACCTGACTGTGAAGCTGC
AACTGCAGGCCCTGCAGCAGAACGGCTCCAGCGTGCTGAGCGAAGACAAGAGCAAAAGGCTGAATACCATATT
GAACACGATGAGCACCATCTACAGCACCGGCAAAGTATGCAACCCCGACAACCCCCAAGAGTGTCTGTTGTTG
GAACCCGGCCTGAACGAGATTATGGCGAACTCCCTGGACTACAACGAACGCCTGTGGGCATGGGAGTCTTGGA
GGTCAGAGGTTGGCAAGCAACTGAGGCCGTTGTACGAAGAGTACGTGGTGCTGAAGAACGAAATGGCACGGGC
CAATCATTATGAGGACTACGGTGATTATTGGAGGGGCGACTACGAGGTGAACGGCGTGGACGGCTACGACTAT
AGCAGGGGCCAACTTATAGAGGACGTAGAGCACACTTTTGAGGAAATCAAACCCCTGTACGAGCACTTGCATG
CCTACGTACGCGCCAAACTGATGAATGCGTACCCCAGCTACATCAGCCCCATCGGCTGCCTGCCCGCACACCT
GCTCGGCGACATGTGGGGCCGATTCTGGACCAATCTGTATAGCCTCACCGTGCCCTTTGGCCAGAAGCCGAAC
ATAGATGTGACGGATGCTATGGTAGACCAGGCGTGGGATGCACAGCGCATCTTCAAGGAGGCCGAGAAGTTCT
TCGTGAGCGTCGGCTTGCCCAACATGACCCAGGGTTTCTGGGAGAACTCAATGCTGACTGACCCCGGCAACGT

[0090] ACAGAAAGCCGTATGCCACCCAACTGCTTGGGACCTGGGTAAGGGAGACTTCCGGATCCTCATGTGTACCAAG

GTGACCATGGATGACTTTCTCACCGCCCACAATGAAATGGGCAACATCCAGTACGATATGGCCTACGCAGCGC
AGCCATTCCTTCTGAGGAACGGTGCCAACGAGGGCTTCCATGAGGCAGTCGGAGAGATCATGAGCCTGTCAGC
GGCGACCCCTAAACATCTGAAGAGCATCGGGCTGCTGTCTCCGGACTTTCAAGAGGACAATGAGACTGAGATC
AACTTCCTCCTGAAACAGGCGCTGACCATTGTAGGCACCTTGCCCTTCACCTACATGCTGGAGAAGTGGCGAT
GGATGGTGTTTAAGGGCGAGATCCCGAAGGACCAGTGGATGAAAAAGTGGTGGGAGATGAAGAGGGAGATCGT
CGGCGTAGTTGAGCCGGTCCCCCACGACGAAACCTACTGCGATCCTGCCAGCCTGTTCCACGTGAGCAACGAT
TACAGTTTTATCAGGTACTACACCAGGACCCTTTACCAATTTCAGTTCCAGGAGGCACTGTGCCAGGCCGCCA
AGCACGAAGGCCCCCTGCACAAGTGCGACATCAGCAACAGCACCGAGGCGGGTCAAAAGCTGTTTAACATGCT
GAGGCTGGGCAAGAGCGAGCCGTGGACCCTGGCCCTGGAAAACGTTGTGGGCGCAAAAAACATGAACGTGAGG
CCCCTGCTGAACTACTTCGAGCCCCTGTTCACCTGGCTGAAGGACCAGAACAAGAACAGTTTCGTGGGCTGGA
GTACCGATTGGAGTCCCTATGCCGACGGCGGAGGTGGTGCAGGAGGCGGTGGAGACAAAACTCACACATGCCC
ACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA
ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA
TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
TAAATGA

서열번호 59 전체 DF-COV-04 뉴클레오타이드 서열

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCTTCCTGTCAGTAACGACTGGTGTCCACTCCGACAAAACTCACACAT
GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACAC
CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
CTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC
CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAAGGCGGAGGTGGTGCAGGAGGCGGTGGAGCCGGTGGCGGAGGACAGTCAACAATCGAGGAGCAGGC
AAAGACCTTCCTGGACAAGTTTAACCACGAAGCGGAGGACCTGTTCTACCAGAGCAGCCTGGCGAGCTGGAAT
TACAACACCAACATCACCGAGGAGAACGTGCAGAACATGAATAACGCTGGCGACAAGTGGAGCGCCTTCTTGA
AGGAGCAATCCACCCTGGCCCAGATGTACCCGCTGCAAGAGATACAGAACCTGACTGTGAAGCTGCAACTGCA
GGCCCTGCAGCAGAACGGCTCCAGCGTGCTGAGCGAAGACAAGAGCAAAAGGCTGAATACCATATTGAACACG
ATGAGCACCATCTACAGCACCGGCAAAGTATGCAACCCCGACAACCCCCAAGAGTGTCTGTTGTTGGAACCCG
GCCTGAACGAGATTATGGCGAACTCCCTGGACTACAACGAACGCCTGTGGGCATGGGAGTCTTGGAGGTCAGA
GGTTGGCAAGCAACTGAGGCCGTTGTACGAAGAGTACGTGGTGCTGAAGAACGAAATGGCACGGGCCAATCAT
TATGAGGACTACGGTGATTATTGGAGGGGCGACTACGAGGTGAACGGCGTGGACGGCTACGACTATAGCAGGG
GCCAACTTATAGAGGACGTAGAGCACACTTTTGAGGAAATCAAACCCCTGTACGAGCACTTGCATGCCTACGT
ACGCGCCAAACTGATGAATGCGTACCCCAGCTACATCAGCCCCATCGGCTGCCTGCCCGCACACCTGCTCGGC
GACATGTGGGGCCGATTCTGGACCAATCTGTATAGCCTCACCGTGCCCTTTGGCCAGAAGCCGAACATAGATG
TGACGGATGCTATGGTAGACCAGGCGTGGGATGCACAGCGCATCTTCAAGGAGGCCGAGAAGTTCTTCGTGAG
CGTCGGCTTGCCCAACATGACCCAGGGTTTCTGGGAGAACTCAATGCTGACTGACCCCGGCAACGTACAGAAA
GCCGTATGCCACCCAACTGCTTGGGACCTGGGTAAGGGAGACTTCCGGATCCTCATGTGTACCAAGGTGACCA
TGGATGACTTTCTCACCGCCCACAATGAAATGGGCAACATCCAGTACGATATGGCCTACGCAGCGCAGCCATT
CCTTCTGAGGAACGGTGCCAACGAGGGCTTCCATGAGGCAGTCGGAGAGATCATGAGCCTGTCAGCGGCGACC
CCTAAACATCTGAAGAGCATCGGGCTGCTGTCTCCGGACTTTCAAGAGGACAATGAGACTGAGATCAACTTCC
TCCTGAAACAGGCGCTGACCATTGTAGGCACCTTGCCCTTCACCTACATGCTGGAGAAGTGGCGATGGATGGT
GTTTAAGGGCGAGATCCCGAAGGACCAGTGGATGAAAAAGTGGTGGGAGATGAAGAGGGAGATCGTCGGCGTA
GTTGAGCCGGTCCCCCACGACGAAACCTACTGCGATCCTGCCAGCCTGTTCCACGTGAGCAACGATTACAGTT
TTATCAGGTACTACACCAGGACCCTTTACCAATTTCAGTTCCAGGAGGCACTGTGCCAGGCCGCCAAGCACGA
AGGCCCCCTGCACAAGTGCGACATCAGCAACAGCACCGAGGCGGGTCAAAAGCTGTTTAACATGCTGAGGCTG
GGCAAGAGCGAGCCGTGGACCCTGGCCCTGGAAAACGTTGTGGGCGCAAAAAACATGAACGTGAGGCCCCTGC
TGAACTACTTCGAGCCCCTGTTCACCTGGCTGAAGGACCAGAACAAGAACAGTTTCGTGGGCTGGAGTACCGA
[0091] TTGGAGTCCCTGA

[0092] * 표 1-7에는 표 1 또는 5-7에 나열된 임의의 서열번호의 아미노산 서열과 전체 길이에 걸쳐 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열 또는 이의 일부를 포함하는 폴리펩타이드 분자, 뿐만 아니라 단백질의 오솔로그가 포함된다. 이러한 폴리펩타이드는 본원에 추가로 기술된 전체 길이의 폴리펩타이드의 기능을 가질 수 있다.

[0093] * 표 8에는 RNA 핵산 분자(예를 들어, 티민이 우리딘으로 대체됨), 암호화된 단백질의 오솔로그를 암호화하는 핵산 분자, 뿐만 아니라, 표 8에 나열된 임의의 서열번호의 핵산 서열과 전체 길이를 따라 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 핵산 서열 또는 이의 일부를 포함하는 DNA 또는 RNA 핵산 서열이 포함된다. 이러한 핵산 서열은 본원에 추가로 기술된 전체 길이의 핵산의 기능을 가질 수 있다.

[0094] * 표 6에는 본원에 기재된 Fc 도메인 치환에도 사용되는 "Eu" 번호매김 시스템을 사용하여 번호가 매겨진 전체 길이 IgG1, IgG2 및 IgG4 서열인 서열번호 45-47이 포함된다. 번호매김은 IgG1, IgG2 및 IgG4의 CH1 도메인에도 마찬가지이다. 그러나, 힌지 영역의 길이가 다르기 때문에, 힌지, CH2 및 CH3 도메인 내의 번호 매김은 IgG1, IgG2 및 IgG4에서와 다르다. EU 번호매김 시스템은 IMGT 및 Kabat 시스템 대신에 사용될 수 있다

(www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html 및 Edelman 등 (1969) *Proc. Natl. Acad. USA*, 63: 78-85 참조).

[0095] **II. 작용제 및 조성물**

[0096] a. 핵산

[0097] 본 발명에 포괄되는 한 측면은 코로나바이러스(예를 들어, SARS-CoV-2)에 결합하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 핵산은 코로나바이러스(예를 들어, SARS-CoV-2)에 결합하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 암호화하여, 세포 표면에서 발현되는 내인성 ACE2에 바이러스가 결합하는 것을 경쟁적으로 저해하며, 여기서 상기 폴리펩타이드는 1) 서열번호 1-4 중 어느 하나의 ACE2 세포외 도메인 또는 이의 단편의 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열; 2) 서열번호 33-42 또는 55 중 어느 하나의 Fc 도메인 또는 이의 단편의 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인, 또는 이의 단편 폴리펩타이드; 및 3) ACE2 세포외 도메인 또는 이의 단편과 Fc 도메인 또는 이의 단편 사이에 개재하는 힌지 폴리펩타이드로서, 서열번호 5-32 또는 52 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 힌지 폴리펩타이드를 포함한다.

[0098] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "핵산 분자"는 DNA 분자(즉, cDNA 또는 게놈 DNA) 및 RNA 분자(즉, mRNA) 및 뉴클레오타이드 유사체를 사용하여 생성된 DNA 또는 RNA의 유사체를 포함하는 것으로 의도된다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA일 수 있다.

[0099] 본 발명에 포괄되는 핵산 분자는 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 암호화하며, 여기서 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 ACE2 세포외 도메인 또는 이의 단편, 힌지 폴리펩타이드, 및 Fc 도메인 또는 이의 단편을 포함한다. 핵산에 의해 암호화된 ACE2 세포외 도메인 또는 이의 단편은 표 1에 나타낸 아미노산 서열, 또는 표 1에 나타낸 아미노산 서열과 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 또는 그 이상(예를 들어, 약 98%) 상동성인 아미노산 서열 또는 이의 일부(즉, 100, 200, 300, 400, 450, 500개 또는 그 이상의 아미노산 잔기)를 갖고, 여기서, 핵산은 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드가 H374N 및 H378N에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 이 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드가 R273Q, H345A, H345L, H505A 및 H505L에 상응하는 위치에 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 R169Q, W271Q 및 K481Q에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 상기 아미노산 치환은 전체 길이의 ACE2 폴리펩타이드에 상대적인 것이다. 일부 실시양태에서, 핵산은 전체 길이의 ACE2 폴리펩타이드의 아미노산 18-600, 18-615, 18-708 또는 18-740을 포함하는 ACE2 세포외 도메인을 암호화한다.

[0100] 본 발명에 포괄되는 핵산 분자에 의해 암호화된 Fc 도메인 또는 이의 단편은 표 5에 나타낸 아미노산 서열, 또는 표 5에 나타낸 아미노산 서열과 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95% 또는 그 이상(예를 들어, 약 98%)의 상동성인 아미노산 서열, 또는 이의 일부(즉, 100개, 200개, 300개, 400개, 450개, 500개 또는 그 이상의 아미노산 잔기)를 갖는다. Fc 도메인 또는 이의 단편은 약화된 Fc 수용체(즉, FcγIIaR) 결합을 갖는 Fc 폴리펩타이드를 초래하는 핵산 서열의 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들어, S228P 및/또는 L235E 점 치환을 포함하는 인간 IgG4 Fc 도메인 또는 이의 단편은 FcγR(예를 들어, FcγIIa 수용체)에 대한 Fc 결합을 약화시킬 수 있다. 한 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 S228 또는 L235E 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 S228P 및 L235E 아미노산 치환을 포함한다. FcγR(예를 들어, FcγIIa 수용체)에 대한 Fc 도메인 또는 이의 단편의 결합을 약화시키거나 제거할 수 있는 다른 치환으로는 IgG1 Fc 도메인 또는 이의 단편 중 L234A, L235A, N297X 및/또는 P329G 돌연변이체를 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 L234A 및 L235A 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 L234A, L235A, N297A, N297D, 및/또는 P329G 아미노산 치환을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 L234A 및 N297A 또는 N297D 아미노산 치환을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 L235A 및 N297A 또는 N297D 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 L234A, L235A 및 P329G 아미노산 치환을 포함한다. 아미노산 치환은 전체 길이의 IgG Fc 도메인에 상대적이다. 일부 실시양태에서, 힌지 폴리펩타이드는 Fab-암 교환을 약화시키는 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 각각 S228P 치환을 포함하는 표 2의 아미노산 서열을 포함한다. 일반적으로, S228P 치환은 IgG4 항체에서 자연적으로 발생하는 Fab-암 교환을 저해하지만, S228P는 Fc 감마 수용체 결합에 영향을 미치지 않는다. IgG4 Fc 도메인은 IgG1보다 Fc 감마 수용체에 대한 친화도가 낮고 L235E 치환은 이 친화도를 더욱 더 낮춘다. Fc 도메인 또는 이의 단편은 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인 또는 이의 단편의 결합을 약화시키거나 제

거하기 위해 부가적인 치환(예를 들어, L235E 치환)을 추가로 포함할 수 있다.

[0101] 다른 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 암호화하고, 이에 따라 표 1-7에 나타낸 아미노산 서열 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 상이한 핵산 서열을 갖는 핵산 분자가 본 발명에 포함된다. 더욱이, 유인 동물과 같은 상이한 종으로부터의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 암호화하여, 표 1-7에 나타낸 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 상이한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 분자는 본 발명에 포괄되는 범위 내인 것으로 의도된다. 예를 들어, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 침팬지 핵산 서열은 인간 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 뉴클레오타이드 서열을 기반으로 하여 식별될 수 있다.

[0102] 한 실시양태에서, 본 발명의 핵산 분자(들)는 융합 단백질 또는 이의 일부가 코로나바이러스(예를 들어, SARS-CoV-2)에 결합할 수 있고 Fc 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체)에 대한 결합 친화도가 감소하거나 없도록, 표 1 및 5-7에 나타낸 아미노산 서열과 충분히 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또는 이의 일부를 암호화한다. 각각의 이러한 생물학적 특성을 측정하기 위한 방법 및 검정은 관련 기술분야에 잘 알려져 있고, 대표적이고 비제한적인 실시양태는 이하 실시예 및 상기 정의에 기술되어 있다.

[0103] 본원에 사용된 바와 같이, "충분히 상동성인"이라는 말은 단백질 또는 이의 일부(즉, ACE2 세포외 도메인, 또는 이의 단편)가 코로나바이러스(예를 들어, SARS-CoV-2)에 결합하도록, 표 1-7에 나타낸 아미노산 서열 또는 이의 단편과 동일하거나 등가인 아미노산 잔기의 최소 수(예를 들어, 표 1-7에 나타낸 아미노산 서열 또는 이의 단편의 아미노산 잔기와 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기)를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 이의 일부를 지칭한다.

[0104] 다른 실시양태에서, 단백질은 표 1-7에 나타낸 아미노산 서열의 전체 아미노산 서열 또는 이의 단편과 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 상동성인 것이다.

[0105] 일부 실시양태에서, 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 핵산 분자에 의해 암호화되는 단백질의 부분은 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 생물학적 활성 부분이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 생물학적 활성 부분"은 코로나바이러스(예를 들어, SARS-CoV2 바이러스)에 결합하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 부분, 즉 ACE2 세포외 도메인, 또는 이의 단편을 포함하는 것으로 의도된다. 일부 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 전체 길이의 ACE2 폴리펩타이드의 다른 활성을 보유하지 않는다.

[0106] 본원에 기재된 바와 같은 표준 결합 검정, 예를 들어 면역침강 및 효모 2-혼성체 검정, 또는 기능 검정, 예를 들어, RNAi 또는 과발현 실험은 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 생물학적 활성 단편이 전체 길이의 ACE2 폴리펩타이드의 코로나바이러스 결합 활성을 유지하는 능력을 결정하기 위해 수행될 수 있다.

[0107] 본 발명은 유전자 암호의 축퇴성으로 인해 표 1-7에 나타낸 아미노산 서열 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 상이하고, 이에 따라 동일한 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 분자를 추가로 포괄한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 핵산 분자는 표 1-7에 나타낸 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 갖는 단백질, 또는 이의 단편, 또는 표 1-7에 나타낸 아미노산 서열 또는 이의 단편과 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 상동성이거나, 또는 표 1-7에 나타낸 아미노산 서열과 적어도 1, 2, 3, 5 또는 10개의 아미노산이되, 30, 20, 15개 이하의 아미노산이 상이한 아미노산 서열을 갖는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 195, 190, 185, 180, 175, 170, 165, 160, 155, 150, 145, 140, 135, 130, 125, 120, 115, 110, 105, 100, 95, 90, 85, 80, 75 또는 70개 미만의 아미노산 길이인 관심 있는 전체 길이의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 부분을 암호화하는 핵산 서열로 이루어진다.

[0108] 숙련된 기술자는 변화가 표 1-7에 나타낸 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 돌연변이에 의해 도입되어, 변형된 폴리펩타이드의 기능적 능력의 변경 없이, 암호화된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 변화를 야기할 수 있다. 예를 들어, "비-필수" 아미노산 잔기의 아미노산 치환을 야기하는 뉴클레오타이드 치환이 서열에 만들어질 수 있다. "비-필수" 아미노산 잔기는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 활성을 유의미하게 변경함이 없이 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 서열(예를 들어, 표 1-7에 나타낸 서열, 또는 이의 단편)로부터 변경될 수 있는 잔기인 반면, "필수" 아미노산 잔기는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 활성(즉, 코로나바이러스(예를 들어, SARS-CoV-2)에 대한 결합)에 필요한 것이다. 하지만, 다른 아미노산 잔기(예를 들어, 마우스와 인간 사이에서 보존되지 않거나 또는 단지 반보존적인 것)는 활성에 필수적이지 않을 수 있어, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 활성을 변경함이 없이 변경에 순응적일 가능성이 있다.

[0109] 따라서, 본 발명에 포괄되는 또 다른 측면은 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 활성에 필수적이지 않은 아미노산 잔기의 변화를 함유하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 이러한 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 표 1-7에 나타낸 아미노산 서열 또는 이의 단편과 아미노산 서열이 상이하지만, 본원에 기술된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 코로나바이러스 결합 활성을 유지한다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 여기서 단백질은 하나 이상의 변형된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 도메인이 결여되어 있다(예를 들어, 힌지 또는 Fc 도메인은 결여될 수 있지만, ACE2 세포외 도메인은 코로나바이러스에 결합하는데 책임이 있으므로 반드시 존재한다). 정의 섹션에 진술된 바와 같이, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 구조-기능 관계는 통상의 기술자가 ACE2 도메인의 코로나바이러스 결합 활성을 보존하면서 돌연변이되거나 달리 변경될 수 있는 영역을 쉽게 이해할 정도로 알려져 있다.

[0110] 본원에 사용된 바와 같이, "서열 동일성 또는 상동성"은 2개의 폴리펩타이드 분자 사이 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 지칭한다. 2개의 비교된 서열 모두에서 한 위치가 동일한 염기 또는 아미노산 단량체 서브유닛에 의해 점유될 때, 예를 들어, 2개의 DNA 분자 각각의 한 위치가 아데닌에 의해 점유되면, 분자는 그 위치에서 상동성이거나 서열 동일성이다. 2개의 서열 사이의 상동성 또는 서열 동일성의 퍼센트는 2개의 서열에 의해 공유되는 매칭되거나 또는 상동성인 동일 위치의 수를 비교되는 위치의 수로 나누고 100을 곱한 함수이다. 예를 들어, 2개의 서열의 위치 중 10개 중 6개가 동일하다면, 두 서열은 60% 상동성이거나 또는 60% 서열 동일성을 갖는 것이다. 한 예를 들어, DNA 서열 ATTGCC 및 TATGGC는 50% 상동성 또는 서열 동일성을 공유한다. 일반적으로, 비교는 두 서열이 최대 상동성을 제공하도록 정렬될 때 이루어진다. 달리 특정되지 않는 한, "루프 아웃 영역", 예를 들어, 서열 중 하나에서 결실 또는 삽입으로 인해 발생하는 영역은 미스매칭으로서 계산된다.

[0111] 서열의 비교 및 2개의 서열 사이의 상동성 퍼센트의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 정렬은 Clustal 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 다중 정렬 매개변수는 갭 페널티(GAP Penalty) = 10, 갭 길이 페널티(Gap Length Penalty) = 10을 포함한다. DNA 정렬의 경우, 쌍별 정렬 매개변수는 Htuple=2, 갭 페널티=5, 창=4 및 Diagonal saved=4일 수 있다. 단백질 정렬의 경우, 쌍별 정렬 매개변수는 Ktuple=1, 간격 페널티=3, 창=5 및 Diagonals Saved=5일 수 있다.

[0112] 한 실시양태에서, 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성 퍼센트는 Blossom 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 갭 가중치 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5 또는 6을 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지(온라인에서 이용가능)의 GAP 프로그램에 혼입된 Needleman 및 Wunsch(*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) 알고리즘으로 결정한다. 또 다른 실시양태에서, 2개의 뉴클레오타이드 서열 사이의 동일성 퍼센트는 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70 또는 80의 갭 가중치 및 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 길이 가중치를 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지(온라인에서 이용가능)의 GAP 프로그램으로 결정한다. 다른 실시양태에서, 2개의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열 사이의 동일성 퍼센트는 PAM120 가중 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페털티를 사용하여, ALIGN 프로그램(버전 2.0)(온라인에서 이용가능)에 혼입된 E. Meyers 및 W. Miller의 알고리즘(CABIOS, 4:11-17 (1989))으로 결정한다.

[0113] 표 1-7에 나타낸 단백질 도메인에 상동성인 도메인을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 분자는 하나 이상의 뉴클레오타이드 치환, 부가 또는 결실이 암호화된 단백질에 도입되도록 폴리펩타이드 도메인, 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 또는 상동성 뉴클레오타이드 서열에 하나 이상의 뉴클레오타이드 치환, 부가 또는 결실을 도입시켜 생성할 수 있다. 돌연변이는 표 1-7에 나타낸 폴리펩타이드 도메인, 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에, 또는 상동성 뉴클레오타이드 서열에 부위-유도 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발과 같은 표준 기술에 의해 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 보존적 아미노산 치환은 하나 이상의 예측된 비-필수 아미노산 잔기에서 이루어지다. "보존적 아미노산 치환"은 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기에 의해 아미노산 잔기가 대체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 관련 기술분야에 정의되어 있다. 이러한 패밀리로는 염기성 측쇄(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비전하 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 따라서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 중 예측된 비필수 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리의 또 다른 아미노산 잔기에 의해 대체된다. 대안적으로, 또 다른 실시양태에서, 돌연변이는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 암호 서열의 전부 또는 일부를 따라, 예컨대, 포화 돌연변이유발에 의해, 무작위로 도입될 수 있고, 생성된 돌연변이체는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 활성을 보유하는 돌연변이체를 식별하기 위해 본원에 기술된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 활성에 대해 스

크리닝될 수 있다. 표 1-7에 나타낸 하나 이상의 폴리펩타이드 도메인, 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 돌연변이유발 후, 암호화된 단백질은 재조합적으로(본원에 기술된 바와 같음) 발현될 수 있고, 단백질의 활성은, 예를 들어, 본원에 기술된 검정을 사용하여 결정할 수 있다.

[0114] ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 수준은 전사된 분자 또는 단백질의 발현을 검출하기 위해 임의의 매우 다양한 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다. 이러한 방법의 비제한적인 예로는 단백질을 검출하기 위한 면역학적 방법, 단백질 정제 방법, 단백질 기능 또는 활성 검정, 핵산 혼성화 방법, 핵산 역전사 방법, 및 핵산 증폭 방법을 포함한다.

[0115] 일부 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 수준은 유전자 전사체(예를 들어, mRNA)를 측정하여, 해독된 단백질의 양을 측정하여, 또는 유전자 산물의 활성을 측정하여 확인한다. 발현 수준은 mRNA 수준, 단백질 수준, 또는 단백질 활성을 검출하는 것을 비롯한 다양한 방식으로 모니터될 수 있고, 이 중 임의의 수준은 표준 기술을 사용하여 측정할 수 있다. 검출은 유전자 발현 수준(예를 들어, 게놈 DNA, cDNA, mRNA, 단백질, 또는 효소 활성)을 정량하는 것을 수반할 수 있고, 또는 대안적으로 유전자 발현의 수준이, 특히 대조군 수준과 비교하여, 정성적으로 평가될 수 있다. 검출되는 수준의 유형은 문맥으로부터 명백할 것이다.

[0116] 특정 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 mRNA 발현 수준은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 생물학적 샘플에서 동일계내 및 시험관내 형식 둘 모두에 의해 결정될 수 있다. 용어 "생물학적 샘플"은 대상체 내에 존재하는 조직, 세포 및 유체뿐만 아니라, 대상체로부터 단리된 조직, 세포, 생물학적 유체 및 이의 단리물을 포함하는 것으로 의도된다. 많은 발현 검출 방법은 단리된 RNA를 사용한다. 시험관내 방법의 경우, mRNA의 단리에 대해 선택하지 않는 임의의 RNA 단리 기술은 세포로부터 RNA의 정제에 활용될 수 있다(예를 들어, Ausubel 등, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York 1987-1999). 추가로, 다수의 조직 샘플은, 예를 들어, Chomczynski(1989, 미국 특허 제4,843,155호)의 단일 단계 RNA 단리 공정과 같은 관련 기술분야의 기술자에게 잘 알려진 기술을 사용하여 쉽게 처리될 수 있다.

[0117] 단리된 mRNA는 서던(Southern) 또는 노던(Northern) 분석, 중합효소 연쇄 반응 분석 및 프로브 어레이를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 혼성화 또는 증폭 검정에 사용될 수 있다.

[0118] 한 형식에서, mRNA는 예를 들어 단리된 mRNA를 아가로스 겔 상으로 진행시키고 mRNA를 겔로부터 니트로셀룰로오스와 같은 막으로 전달함으로써, 고체 표면 상에 고정되고 프로브와 접촉된다. 다른 형식에서, 프로브(들)는 고체 표면 상에 고정되고 mRNA는, 예를 들어, 유전자 칩 어레이, 예를 들어 Affymetrix™ 유전자 칩 어레이에서 프로브(들)와 접촉된다. 숙련된 기술자는 ACE2-Fc 융합 mRNA 발현 수준의 수준을 검출하는데 사용하기 위해 공지된 mRNA 검출 방법을 쉽게 채택할 수 있다.

[0119] 샘플에서 ACE2-Fc 융합 mRNA 발현 수준을 결정하기 위한 대안적인 방법은, 예를 들어, rtPCR(Mullis, 1987, 미국 특허 제4,683,202호에 제시된 실험 실시양태), 리가아제 연쇄 반응(Barany, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:189-193), 자체-지속 서열 복제(Guatelli 등, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), 전사 증폭 시스템(Kwoh 등, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-베타 복제효소(Lizardi 등, 1988, *Bio/Technology* 6:1197), 롤링 서클 복제(Lizardi 등, 미국 특허 제5,854,033호) 또는 임의의 다른 핵산 증폭 방법에 의한 핵산 증폭 공정, 및 이어서 관련 기술분야의 기술자에게 잘 알려진 기술을 사용한 증폭된 분자의 검출을 수반한다. 이러한 검출 체계는 그러한 분자가 매우 적은 수로 존재하는 경우 핵산 분자의 검출에 특히 유용하다. 본원에 사용된 바와 같이, 증폭 프라이머는 유전자의 5' 또는 3' 영역(각각 플러스 및 마이너스 가닥 또는 그 반대)에 어닐링할 수 있고 그 사이에 짧은 영역을 함유할 수 있는 한 쌍의 핵산 분자인 것으로서 정의된다. 일반적으로, 증폭 프라이머는 길이가 약 10 내지 30개 뉴클레오타이드이고 길이가 약 50 내지 200개 뉴클레오타이드인 영역의 측면에 위치한다. 적절한 조건 하에서 적절한 시약을 사용하여 이러한 프라이머는 프라이머 측면에 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자의 증폭을 허용한다.

[0120] 동일계내 방법의 경우, mRNA는 검출 전에 세포에서 단리될 필요는 없다. 그러한 방법에서, 세포 또는 조직 샘플은 알려진 조직학적 방법을 사용하여 제조/처리된다. 그런 다음 샘플은 지지체, 전형적으로 유리 슬라이드에 고정되고, 그 다음 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 mRNA에 혼성화할 수 있는 프로브와 접촉된다.

[0121] 절대적 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 발현 수준에 기초하여 결정하는 것에 대한 대안으로서, 결정은 정규화된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 발현 수준에 기초하여 이루어질 수 있다. 발현 수준은 절대적인 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 발현을 비-ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 유전자, 예를 들어, 구성적으로 발현되는 하우스키핑 유전자의 발현과 비교함으로써 절대적인 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 발현 수준을 교정함으로써 정규화된다. 정규화에 적

합한 유전자로는 하우스키핑 유전자, 예컨대, 액틴 유전자, 또는 상피 세포-특이적 유전자를 포함한다. 이러한 정규화는 하나의 샘플, 예를 들어, 대상체 샘플의 발현 수준을 다른 샘플, 예를 들어, 정상 샘플과 비교하거나, 또는 다른 공급원의 샘플을 서로 비교할 수 있게 한다.

[0122] ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 수준 또는 활성은 또한 발현된 폴리펩타이드를 검출하거나 정량함으로써 검출 및/또는 정량할 수 있다. ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 관련 기술분야의 기술자에게 잘 알려진 임의의 많은 수단에 의해 검출되고 정량될 수 있다. 이들로는 전기영동, 모세관 전기영동, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 박층 크로마토그래피(TLC), 과확산 크로마토그래피 등과 같은 분석용 생화학적 방법, 또는 유체 또는 겔 프레시피틴(precipitin) 반응, 면역확산(단일 또는 이중), 면역전기영동, 방사성 면역침강소(RIA), 효소-연결 면역흡착 검정(ELISA), 면역형광 검정, 웨스턴 블로팅 등을 포함할 수 있다. 숙련된 기술자는 세포가 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 발현하는지 여부를 결정하는 데 사용하기 위한 공지된 단백질/항체 검출 방법을 쉽게 채택할 수 있다.

[0123] b. 재조합 발현 벡터 및 숙주 세포

[0124] 본 발명의 또 다른 측면은 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드(또는 이의 일부)를 암호화하는 핵산을 함유하는 벡터, 예를 들어, 발현 벡터의 사용에 관한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터의 한 유형은 "플라스미드"이며, 이는 부가 DNA 분절이 결찰될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 또 다른 유형의 벡터는 부가적인 DNA 분절이 바이러스 게놈에 결찰될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 이들이 도입되는 숙주 세포에서 자율적으로 복제할 수 있다(예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터(예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포에 도입될 때 숙주 세포의 게놈에 통합되어 숙주 게놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용성이 있는 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드"와 "벡터"는 플라스미드가 가장 일반적으로 사용되는 벡터 형태이므로 상호교환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 제공하는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)와 같은 다른 형태의 발현 벡터를 포함하는 것으로 의도된다. 한 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 핵산 분자를 포함하는 아데노바이러스 벡터가 사용된다.

[0125] 본 발명에 포괄되는 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태로 본 발명의 핵산을 포함하며, 이는 재조합 발현 벡터가 발현될 핵산 서열에 작동적으로 연결된, 발현에 사용되는 숙주 세포에 기초하여 선택되는, 하나 이상의 조절 서열을 포함한다. 재조합 발현 벡터 내에서, "작동적으로 연결된"은 뉴클레오타이드 서열의 발현을 허용하는 방식(예를 들어, 시험관내 전사/해독계 내에서, 또는 숙주 세포에 벡터가 도입된 경우 숙주 세포에서)으로 관심 뉴클레오타이드 서열이 조절 서열(들)에 연결된 것을 의미하는 것으로 의도된다. 용어 "조절 서열"은 프로모터, 인핸서, 및 다른 발현 제어 요소(예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 조절 서열은, 예를 들어, Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)에 기술되어 있다. 조절 서열은 많은 유형의 숙주 세포에서 뉴클레오타이드 서열의 구성적 발현을 유도하는 것 및 특정 숙주 세포에서만 뉴클레오타이드 서열의 발현을 유도하는 것(예를 들어, 조직 특이적 조절 서열)을 포함한다. 발현 벡터의 설계는 형질전환될 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 따라 달라질 수 있음을 관련 기술분야의 기술자라면 이해할 것이다. 본 발명의 발현 벡터는 숙주 세포에 도입되어, 본원에 기재된 바와 같은 핵산에 의해 암호화되는 융합 단백질 또는 펩타이드를 비롯한 단백질 또는 펩타이드를 생산할 수 있다.

[0126] 본 발명의 재조합 발현 벡터는 원핵 또는 진핵 세포에서 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 발현을 위해 설계될 수 있다. 예를 들어, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 E.콜라이와 같은 박테리아 세포, 곤충 세포(바큘로바이러스 발현 벡터 사용), 효모 세포 또는 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)에서 추가로 논의되어 있다. 대안적으로, 재조합 발현 벡터는, 예를 들어, T7 프로모터 조절 서열 및 T7 중합효소를 사용하여 시험관내에서 전사 및 해독될 수 있다.

[0127] 원핵생물에서 단백질의 발현은 융합 또는 비융합 단백질의 발현을 유도하는 구성적 또는 유도성 프로모터를 함유하는 벡터를 사용하여 E.콜라이에서 가장 종종 수행된다. 융합 벡터는 본원에서 암호화된 단백질에, 일반적으로 재조합 단백질의 아미노 말단에, 다수의 아미노산을 부가한다. 이러한 융합 벡터는 전형적으로 3가지 목적에 기여한다: 1) 재조합 단백질의 발현을 증가시키기 위해; 2) 재조합 단백질의 용해도를 증가시키기 위해; 및 3) 친화도 정제에서 리간드로서 작용함으로써 재조합 단백질의 정제를 돕기 위해. 종종, 융합 발현 벡터에서, 단백

분해 절단 부위는 융합 모이어티와 재조합 단백질의 접합점에 도입되어, 융합 단백질의 정제에 이어서 융합 모이어티로부터 재조합 단백질을 분리할 수 있도록 한다. 이러한 효소, 및 이들의 동족 인식 서열로는 인자 Xa, 트롬빈 및 엔테로키나제를 포함한다. 전형적인 융합 발현 벡터로는 글루타티온 S-전이효소(GST), 말토오스 E 결합 단백질, 또는 단백질 A를 각각 표적 재조합 단백질에 융합시키는, pGEX(Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL(New England Biolabs, Beverly, MA) 및 pRIT5(Pharmacia, Piscataway, NJ)를 포함한다. 한 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 암호 서열은 pGEX 발현 벡터에 클로닝되어, N-말단에서 C-말단으로, GST-트롬빈 절단 부위-ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질을 암호화하는 벡터를 생성한다. 융합 단백질은 글루타티온-아가로스 수지를 사용하는 친화도 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. GST에 융합되지 않은 재조합 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 융합 단백질을 트롬빈으로 절단하여 회수할 수 있다.

[0128] 적절한 유도성 비-융합 E.콜라이 발현 벡터의 예로는 pTrc(Amann 등, (1988) *Gene* 69:301-315) 및 pET 11d(Studier 등, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89)를 포함한다. pTrc 벡터로부터의 표적 유전자 발현은 혼성 trp-lac 융합 프로모터로부터의 숙주 RNA 중합효소 전사에 의존적이다. pET 11d 벡터로부터의 표적 유전자 발현은 공동발현된 바이러스 RNA 중합효소(T7 gn1)에 의해 매개되는 T7 gn10-lac 융합 프로모터로부터의 전사에 의존적이다. 이 바이러스 중합효소는 lacUV 5 프로모터의 전사 제어 하에 T7 gn1 유전자를 품고 있는 상주성 λ 프로파지의 숙주 균주 BL21(DE3) 또는 HMS174(DE3)에 의해 공급된다.

[0129] E.콜라이에서 재조합 단백질 발현을 최대화하기 위한 하나의 전략은 재조합 단백질을 단백분해적으로 절단하는 능력이 손상된 숙주 박테리아에서 단백질을 발현시키는 것이다(Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128). 또 다른 전략은 각 아미노산에 대한 개별 코돈이 예를 들어, E.콜라이에서 활용되는 것이도록 발현 벡터 내에 삽입될 핵산의 핵산 서열을 변경하는 것이다(Wada 등 (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). 본 발명의 핵산 서열의 이러한 변경은 표준 DNA 합성 기술에 의해 수행될 수 있다.

[0130] 다른 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 발현 벡터는 효모 발현 벡터이다. 효모 S. 세레비제(*S.cerivisae*)에서 발현시키기 위한 벡터의 예로는 pYepSec1(Baldari, 등, (1987) *EMBO J.* 6:229-234), pMFa(Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88(Schultz 등, (1987) *Gene* 54:113-123) 및 pYES2(Invitrogen Corporation, San Diego, CA)를 포함한다.

[0131] 대안적으로, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 바큘로바이러스 발현 벡터를 사용하여 곤충 세포에서 발현될 수 있다. 배양된 곤충 세포(예를 들어, Sf 9 세포)에서 단백질의 발현에 이용가능한 바큘로바이러스 벡터로는 pAc 시리즈(Smith 등 (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) 및 pVL 시리즈(Lucklow and Summers(1989) *Virology* 170:31-39)를 포함한다.

[0132] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 핵산은 포유동물 발현 벡터를 사용하여 포유동물 세포에서 발현된다. 포유동물 발현 벡터의 예로는 pCDM8(Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) 및 pMT2PC(Kaufman 등 (1987) *EMBO J.* 6:187-195)를 포함한다. 포유동물 세포에서 사용될 때, 발현 벡터의 제어 기능은 종종 바이러스 조절 요소에 의해 제공된다. 예를 들어, 일반적으로 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 사이토메갈로바이러스 및 시미안 바이러스 40에서 유래된다. 원핵 세포 및 진핵 세포 모두에 대한 다른 적합한 발현 시스템에 대해서는 Sambrook, J., Fritsh, E. F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989를 참조한다.

[0133] 또 다른 실시양태에서, 재조합 포유동물 발현 벡터는 특정 세포 유형에서 핵산의 발현을 유도할 수 있다(예를 들어, 조직-특이적 조절 요소가 핵산을 발현하는 데 사용된다). 조직 특이적 조절 요소는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 적합한 조직-특이적 프로모터의 비제한적인 예로는 알부민 프로모터(간 특이적; Pinkert 등 (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), 림프계 특이적 프로모터(Calame and Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275), 특히 T 세포 수용체의 프로모터(Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) 및 면역글로불린(Banerji 등 (1983) *Cell* 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748), 뉴런-특이적 프로모터(예를 들어, 신경필라멘트 프로모터; Byrne and Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477), 췌장-특이적 프로모터(Edlund 등(1985) *Science* 230:912-916), 및 유선-특이적 프로모터(예를 들어, 유청 프로토머; 미국 특허 제4,873,316호 및 유럽 출원 공개 제264,166호)를 포함한다. 발달-조절 프로모터도 포괄되며, 그 예로는, 뮤린 혹

스 프로모터(Kessel and Gruss (1990) *Science* 249:374-379) 및 α-태아단백질 프로모터(Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546)가 있다.

[0134] 본 발명에 포괄되는 또 다른 측면은 본 발명에 포괄되는 재조합 발현 벡터 또는 핵산이 도입된 숙주 세포에 관한 것이다. "숙주 세포" 및 "재조합 숙주 세포"라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이러한 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손 또는 잠재적인 자손을 지칭하는 것으로 이해한다. 돌연변이 또는 환경 영향으로 인해 특정 변형이 후속 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 사실상 부모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에서 사용되는 용어의 범위에 여전히 포함된다.

[0135] 숙주 세포는 임의의 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 예를 들어, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 E.콜라이와 같은 박테리아 세포, 곤충 세포, 효모 또는 포유동물 세포(예를 들어, Fao 간암 세포, 1차 간세포, 중국 햄스터 난소 세포(CHO) 또는 COS 세포)에서 발현될 수 있다. 다른 적합한 숙주 세포는 관련 기술분야의 기술자에게 공지되어 있다.

[0136] 벡터 DNA는 통상적인 형질전환 또는 형질감염 기술을 통해 원핵 또는 진핵 세포에 도입될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "형질전환" 및 "형질감염"은 외래 핵산(예를 들어, DNA)을 숙주 세포에 도입하기 위한 인산칼슘 또는 염화칼슘 공침전, DEAE-덱스트란-매개 형질감염, 리포펙션 또는 전기천공법을 비롯한 다양한 공인된 기술을 지칭하는 것으로 의도된다. 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키기 위한 적합한 방법은 Sambrook, 등 (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) 및 기타 실험실 매뉴얼에서 찾아볼 수 있다.

[0137] 세포 배양물은 숙주 세포, 배지 및 기타 부산물을 포함한다. 세포 배양에 적합한 배지는 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 단편은 폴리펩타이드를 함유하는 세포와 배지의 혼합물로부터 분비 및 단리될 수 있다. 대안적으로, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 단편은 세포질에 보유될 수 있고, 세포는 수확되어, 용해되고, 융합 단백질이 단리될 수 있다. ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 단편은 이온 교환 크로마토그래피, 겔 여과 크로마토그래피, 한외여과, 전기영동 및 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 특별한 에피토프에 특이적인 항체를 이용한 면역친화도 정제를 비롯한, 단백질 정제를 위해 관련 기술분야에 공지된 기술을 사용하여 세포 배양 배지, 숙주 세포 또는 둘 모두로부터 단리될 수 있다.

[0138] 일부 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 생물학적 활성 단편은 이종 폴리펩타이드에 융합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 융합된 폴리펩타이드는 상응하는 비융합 ACE2 폴리펩타이드보다 더 긴 반감기를 갖는다. 다른 실시양태에서, 관련 기술분야에 공지된 표준 방법에 따라 정제 목적을 위해 이종 태그(예를 들어, 에피토프 태그)가 사용될 수 있다.

[0139] 따라서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 전부 또는 선택된 부분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 미생물 또는 진핵 세포 과정을 통해 단백질의 재조합 형태를 생산하기 위해 사용될 수 있다. 서열을 발현 벡터와 같은 폴리뉴클레오타이드 작제물에 결찰시키고, 진핵생물(효모, 조류, 곤충 또는 포유동물) 또는 원핵생물(박테리아 세포)의 숙주로 형질전환 또는 형질감염시키는 것은 표준 절차이다. 대상 발명에 따른 미생물 수단 또는 조직 배양 기술에 의해 재조합 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 제조하기 위해 유사한 절차 또는 이의 변형이 사용될 수 있다.

[0140] 또 다른 변형에서, 단백질 생산은 시험관내 해독 시스템을 사용하여 달성할 수 있다. 시험관내 해독 시스템은 일반적으로 RNA 분자를 단백질로 해독하는 데 필요한 적어도 최소 요소를 함유하는 무세포 추출물인 해독 시스템이다. 시험관내 해독 시스템은 전형적으로 적어도 리보솜, tRNA, 개시인자 메티오닐-tRNAMet, 해독에 관여하는 단백질 또는 복합체, 예를 들어 eIF2, eIF3, 캡-결합 단백질(CBP) 및 진핵세포 개시 인자 4F(eIF4F)를 포함하는 캡-결합(CB) 복합체를 포함한다. 다양한 시험관내 해독 시스템은 관련 기술분야에 잘 알려져 있으며 상업적으로 이용가능한 키트를 포함한다. 시험관내 해독 시스템의 예로는 토끼 망상적혈구 용해물, 토끼 난모세포 용해물, 인간 세포 용해물, 곤충 세포 용해물 및 밀 배아 추출물과 같은 진핵세포 용해물을 포함한다. 용해물은 위스콘신주 매디슨 소재의 프로메가 코포레이션(Promega Corp.); 캘리포니아주 라졸라에 소재하는 스트라타진(Stratagene); 일리노이주 알링턴 하이츠에 소재하는 아머샴(Amersham); 및 뉴욕주 그랜드 아일랜드에 소재하는 GIBCO/BRL과 같은 제조업체로부터 상업적으로 이용가능하다. 시험관내 해독 시스템은 전형적으로 거대분자, 예컨대, 효소, 해독, 개시 및 연장 인자, 화학적 시약 및 리보솜을 포함한다. 또한, 시험관내 전사 시스템이 사용될 수 있다. 이러한 시스템은 전형적으로 적어도 RNA 중합효소 전효소, 리보뉴클레오타이드 및 임의의 필수적인 전사 개시, 연장 및 종결 인자를 포함한다. 시험관내 전사 및 해독은 하나 이상의 단리된 DNA로부터 단백질을 생산하는 원팟(one-pot) 반응으로 커플링될 수 있다.

[0141] 특정 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 단편은 화학적으로, 무세포계에서 리보솜적으로, 또는 세포내에서 리보솜적으로 합성될 수 있다. 화학적 합성은 단계적 고상 합성, 펩타이드 단편의 입체형태적-보조 재결찰을 통한 반합성, 클로닝된 또는 합성 펩타이드 분절의 효소적 결찰, 및 화학적 결찰을 포함하는 다양한 관련 기술분야의 공인된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 천연 화학 결찰은 일시적인 티오에스테르-연결된 중간체를 생성하는 2개의 비보호된 펩타이드 분절의 화학선택적 반응을 이용한다. 그 다음, 일시적인 티오에스테르-연결 중간체는 자발적으로 재배열되어 결찰 부위에 천연 펩타이드 결합을 갖는 전체 길이의 결찰 생성물을 제공한다. 전체 길이의 결찰 생성물은 무세포 합성에 의해 생성된 단백질과 화학적으로 동일하다. 전체 길이의 결찰 생성물은 허용되는 대로 리폴딩 및/또는 산화되어 천연 이황화-함유 단백질 분자를 형성할 수 있다. (예를 들어, 미국 특허 제6,184,344호 및 제6,174,530호; 및 T. W. Muir 등, (1993) *Curr. Opin. Biotech.*, vol. 4, p 420; M. Miller, 등, (1989) *Science*: vol. 246, p 1149; A. Wlodawer, 등, (1989) *Science*: vol. 245, p 616; L. H. Huang, 등, (1991) *Biochemistry*: vol. 30, p 7402; M. Sclmolzer, 등, (1992) *Int. J. Pept. Prot. Res.*: vol. 40, p 180-193; K. Rajarathnam, 등, (1994) *Science*: vol. 264, p 90; R. E. Offord, "Chemical Approaches to Protein Engineering", in Protein Design and the Development of New therapeutics and Vaccines, J. B. Hook, G. Poste, Eds., (Plenum Press, New York, 1990) pp. 253-282; C. J. A. Wallace, 등, (1992) *J. Biol. Chem.*: vol. 267, p 3852; L. Abrahmsen, 등, (1991) *Biochemistry*: vol. 30, p 4151; T. K. Chang, 등, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12544-12548; M. Schnlzer, 등, (1992) *Science*: vol., 3256, p 221; 및 K. Akaji, 등, (1985) *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 33: 184 참조).

[0142] 포유동물 세포의 안정적인 형질감염을 위해, 사용된 발현 벡터 및 형질감염 기술에 따라 세포의 소분획만이 이들의 게놈 내로 외래 DNA를 통합할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 통합체를 식별하고 선택하기 위해 선택가능한 마커(예를 들어, 항생제에 대한 내성)를 암호화하는 유전자는 일반적으로 관심 유전자와 함께 숙주 세포 내로 도입된다. 선택가능한 마커로는 G418, 하이그로마이신 및 메토트렉세이트와 같은 약물에 대한 내성을 부여하는 마커를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 선택가능한 마커를 암호화하는 핵산은 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 것과 동일한 벡터 상에서 숙주 세포 내로 도입될 수 있거나, 별도의 벡터 상에서 도입될 수 있다. 도입된 핵산으로 안정적으로 형질감염된 세포는 약물 선택에 의해 식별될 수 있다(예를 들어, 선택가능한 마커 유전자가 혼입된 세포는 생존할 것이지만, 다른 세포는 사멸한다).

[0143] 본 발명에 포괄되는 숙주 세포, 예컨대, 배양물 중의 원핵 또는 진핵 숙주 세포는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 생산(즉, 발현)하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 숙주 세포를 사용하여 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 생산하는 방법을 추가로 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드가 생성될 때까지 적합한 배지에서 본 발명의 숙주 세포(ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 재조합 발현 벡터가 도입됨)를 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 배지 또는 숙주 세포로부터 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 단리하는 것을 추가로 포함한다.

[0144] c. <u>ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드</u>

[0145] 본 발명은 또한 코로나바이러스(예를 들어, COVID-19의 원인 인자인 SARS-CoV-2 및 SARS의 원인 인자인 SARS-CoV-1)에 결합하고 이 바이러스가 세포 표면에서 내생적으로 발현되는 ACE2에 결합하는 것을 경쟁적으로 저해하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 가용성, 정제된 및/또는 단리된 형태를 제공한다. ACE2-Fc 융합 단백질은 ACE2 폴리펩타이드의 세포외 도메인 또는 이의 일부 및 면역글로불린 폴리펩타이드(예를 들어, IgG1, IgG2 또는 IgG4 폴리펩타이드)의 Fc 도메인 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. ACE2 세포외 도메인 또는 이의 단편과 Fc 도메인은 힌지 폴리펩타이드에 의해 분리된다. 일부 실시양태에서, ACE2 세포외 도메인, 또는 이의 단편과 Fc 도메인은 단일 프롤린 또는 시스테인-프롤린 디펩타이드에 의해 분리된다. 일부 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 인간 ACE2 세포외 도메인, 또는 이의 단편에 대해 적어도 70%, 80%, 90% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열번호 1-4 중 어느 하나의 아미노산 서열, 서열번호 5-32 또는 52 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 힌지의 아미노산 서열, 및 서열번호 33-42 또는 55 중 어느 하나의 Fc 도메인, 또는 이의 단편의 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 본원에 기재된 방법에 따라 사용될 수 있다.

[0146] 한 측면에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 야생형 ACE2 폴리펩타이드에 H374N 및 H378N 아미노산 치환과 유사한 아미노산 치환을 포함하는 서열번호 1-4 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 인간 ACE2 세포외 도메인, 또는 이의 단편, 또는 1개 내지 20개의 부가적인 보존적 아미노산 치환과 함께 H374N 및 H378N 아미노산 치환을 포함하는, 서열번호 1-4 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 인간 ACE2 세포외 도메인, 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, ACE2 세포외 도메인은 H374N 및 H378N에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한

다. 일부 실시양태에서, ACE2 세포외 도메인은 R273Q, H345A, H345L, H505A 및 H505L에 상응하는 위치에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, ACE2 세포외 도메인은 R169Q, W271Q 및 K481Q에 상응하는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 상기 아미노산 치환은 전체 길이의 ACE2 폴리펩타이드에 상대적인 것이다. 일부 실시양태에서, 핵산은 전체 길이의 ACE2 폴리펩타이드의 아미노산 18-600, 18-615, 18-708 또는 18-740을 포함하는 ACE2 세포외 도메인을 암호화한다.

[0147] ACE2 세포외 도메인의 효소 활성을 감소시키는 점 치환이 본원에서 고려된다. 일부 실시양태에서, 점 치환은 ACE2 활성의 더 큰 감소를 초래하는 반면, 다른 것들은 SARS-CoV-2 또는 SARS-CoV 스파이크 단백질(S-단백질)에 대한 ACE2의 결합 결합력을 감소시켰다. S-단백질에 대한 강렬한 결합의 유지가 요구된다.

[0148] 명확하게 말하면, 서열번호 1-4는 아미노산 잔기 위치 357 및 361에 아스파라긴 잔기를 포함한다. 이 잔기는 코로나바이러스에 대한 결합을 저해함이 없이 ACE2 폴리펩타이드의 효소 활성을 감소시키거나 제거한다. 본원에 기재된 임의의 ACE2 세포외 도메인 또는 이의 단편의 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 또한 인간 ACE2 세포외 도메인, 또는 이의 단편의 아미노산 서열 또는 이의 단편과 적어도 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 99.5% 동일할 수 있다.

[0149] 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 또한 Fc 도메인 단편을 포함한다. 온전한 IgG 항체의 Fc 도메인은 이의 Fcɣ 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체)에 대한 결합에 의해, 항체-의존성 세포의 세포독성 및 항체-의존성 세포의 식세포작용과 같은 항체 이펙터 기능에 책임이 있다(Kand and Jung (2019) *Exp & Mol. Med.*, 51: 138-46; Moi 등(2010) *J. Gen. Virol.*, 91: 103-11, Jiang 등(2011) *Nat. Reviews Drug Discovery*, 10: 101-10). 재조합 Fc 도메인은 Fc 도메인이 Fcɣ 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체)에 결합하지 않거나, 또는 적어도 약화된 Fcɣ 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체) 결합 활성을 갖도록 조작될 수 있다(Saunders (2019) *Frontiers Immunology*, 10: Art. 1296; Shotlothauer 등 (2016) *Prot. Eng., Design & Selection*, 29(10):457-66). 부가적으로, Fc 도메인, 또는 이의 단편은 부가적인 이점, 예컨대, 치료용 폴리펩타이드(즉, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드)에 혼입되었을 때 순환계에서 증가된 수명 기간(Saunders (2019))을 제공하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0150] 일부 실시양태에서, Fc 도메인은 서열번호 33-42 또는 55 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 IgG1, IgG2, 또는 IgG4 Fc 도메인으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 Fcɣ 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체)에 대해 감소된 결합 친화도를 갖는다. Fc 도메인 중 아미노산 치환은 Fcɣ 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체)에 대한 결합 친화도를 감소시킬 수 있다; 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명에 포괄된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, P329G, 또는 이들의 조합의 아미노산 치환을 갖는 IgG1 Fc 도메인으로부터 유래되는 Fc 도메인 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 L234A, L235A 및 P329G 아미노산 치환을 갖는 IgG1 Fc 도메인으로부터 유래된 Fc 도메인 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 IgG4 Fc 도메인으로부터 유래되고 L235E 및 P329G 아미노산 치환을 갖는다. 한 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 IgG1 Fc 도메인으로부터 유래되고 P329G 아미노산 치환을 갖는다. 한 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 IgG4 Fc 도메인으로부터 유래되고 L235E 아미노산 치환을 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 IgG1 Fc 도메인으로부터 유래되고 L234A 및 L235A 아미노산 치환을 갖는다. 한 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 야생형 IgG4 Fc 도메인으로부터 유래된다. 한 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 IgG1 Fc 도메인으로부터 유래되고 N297D 아미노산 치환을 갖는다. 한 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 IgG1 Fc 도메인으로부터 유래되고 N297A 아미노산 치환을 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 IgG1 Fc 도메인으로부터 유래되고 N297Q 아미노산 치환을 갖는다. 한 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 야생형 IgG2 Fc 도메인으로부터 유래된다. 전체적으로 번호매김된 아미노산 잔기는 전체 길이의 단백질 또는 도메인(즉, 전체 길이의 ACE2 폴리펩타이드 또는 전체 길이의 IgG Fc 도메인)에 상대적인 것이다. 본원에 기재된 임의의 Fc 도메인 단편 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 또한 인간 Fc 도메인 아미노산 서열 또는 이의 단편과 적어도 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 99.5% 동일할 수 있다.

[0151] 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 ACE2 세포외 도메인 및 Fc 도메인 단편은 세포외 도메인과 Fc 도메인을 분리하는 부가적인 폴리펩타이드에 융합될 수 있다. 용어 "힌지" 또는 "힌지 영역" 또는 "힌지 폴리펩타이드"는 이러한 개재성 폴리펩타이드를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 사용되는 Fc 도메인의 이소형과 상응한다. 예를 들어, IgG4 힌지 서열이 사용된다면, S228P 치환은 Fab-암 교환을 최소화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 표 2-4의 임의의 서열번호의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 Fcɣ 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체)에 대한 Fc 단편의 결합

친화도를 감소시키는 Fc 도메인 내의 아미노산 치환과 유사한 아미노산 잔기를 포함할 것이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 감소된 Fab-암 교환과 연관된 IgG4 Fc 도메인의 S228P 아미노산 치환과 유사한 아미노산을 포함하는 힌지 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 S228P 아미노산 치환을 포함하는 힌지 영역 및 L235E 아미노산 치환을 포함하는 Fc 단편을 포함하고, 폴리펩타이드는 IgG4-SPLE Fc 도메인을 갖는다고 한다. 일부 실시양태에서, L235E 치환은 Fcɣ 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체)에 대한 IgG4 Fc 도메인의 감소된 친화도를 부여한다.

[0152] 한 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 H374N 및 H378N 치환을 포함하는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 ACE2 세포외 도메인; 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 힌지 영역; 및 서열번호 33의 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인 단편을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 H374N 및 H378N 치환을 포함하는 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 ACE2 세포외 도메인; 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 힌지 영역; 및 서열번호 33의 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 서열번호 48, 49, 56, 또는 57의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 서열번호 48, 49, 56, 또는 57의 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 서열번호 50, 51, 58 또는 59의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 70%, 80% 또는 90% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자에 의해 암호화된다.

[0153] 본원에 기재된 임의의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 단편은 코로나바이러스(예를 들어, SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 등)에 대한 결합 친화도, 감소되거나 제거된 ACE2 효소 활성, 및 Fc 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체)에 대한 Fc 도메인 또는 이의 단편의 감소되거나 제거된 결합을 갖는다. 단클론 항체가 때로 관련 바이러스 간에 교차 반응성을 나타낼 수 있지만, 전형적으로 단클론 항체는 이들을 유발하는 바이러스에 대해 더 높은 결합력을 나타내며, 재조작 및 최적화되지 않는 한, 새로운 관련 바이러스에 대해서는 종종 부분적으로만 중화시킨다. 이와 대조적으로, 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 ACE2-의존성 코로나바이러스가 결합하는 실제 수용체의 최적화된 가용성 형태이며, 따라서 세포-표면 수용체로서 ACE2를 이용하는 임의의 미래의 신규 코로나바이러스에 대한 경쟁적 저해제로서 기능해야 한다.

[0154] 특정 실시양태에서, 감소되거나 제거된 ACE2 효소 활성 및 Fc 수용체에 대한 Fc 도메인 또는 이의 단편의 감소된 결합은 전체 길이의 ACE2 폴리펩타이드 또는 야생형 Fc 도메인, 또는 이의 단편에 비해, 적어도 1.1배, 적어도 1.2배, 적어도 1.3배, 적어도 1.4배, 적어도 1.5배, 적어도 1.6배, 적어도 1.7배, 적어도 1.8배, 적어도 1.9배, 적어도 2.0배, 적어도 2.1배, 적어도 2.2배, 적어도 2.3배, 적어도 2.4배, 적어도 2.5배, 적어도 2.6배, 적어도 2.7배, 적어도 2.8배, 적어도 2.9배, 적어도 3.0배, 적어도 3.1배, 적어도 3.2배, 적어도 3.3배, 적어도 3.4배, 적어도 3.5배, 적어도 3.6배, 적어도 3.7배, 적어도 3.8배, 적어도 3.9배, 적어도 4.0배, 적어도 4.1배, 적어도 4.2배, 적어도 4.3배, 적어도 4.4배, 적어도 4.5배, 적어도 4.6배, 적어도 4.7배, 적어도 4.8배, 적어도 4.9배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 11배, 적어도 12배, 적어도 13배, 적어도 14배, 적어도 15배, 적어도 16배, 적어도 17배, 적어도 18배, 적어도 19배, 적어도 20배, 적어도 21배, 적어도 22배, 적어도 23배, 적어도 24배, 적어도 25배, 적어도 26배, 적어도 27배, 적어도 28배, 적어도 29배, 적어도 30배, 적어도 31배, 적어도 32배, 적어도 33배, 적어도 34배, 적어도 35배, 적어도 36배, 적어도 37배, 적어도 38배, 적어도 39배, 적어도 40배, 적어도 41배, 적어도 42배, 적어도 43배, 적어도 44배, 적어도 45배, 적어도 46배, 적어도 47배, 적어도 48배, 적어도 49배, 적어도 50배, 적어도 51배, 적어도 52배, 적어도 53배, 적어도 54배, 적어도 55배, 적어도 56배, 적어도 57배, 적어도 58배, 적어도 59배, 적어도 60배, 적어도 61배, 적어도 62배, 적어도 63배, 적어도 64배, 적어도 65배, 적어도 66배, 적어도 67배, 적어도 68배, 적어도 69배, 적어도 70배, 적어도 71배, 적어도 72배, 적어도 73배, 적어도 74배, 적어도 75배, 적어도 76배, 적어도 77배, 적어도 78배, 적어도 79배, 적어도 80배, 적어도 81배, 적어도 82배, 적어도 83배, 적어도 84배, 적어도 85배, 적어도 86배, 적어도 87배, 적어도 88배, 적어도 89배, 적어도 90배, 적어도 91배, 적어도 92배, 적어도 93배, 적어도 94배, 적어도 95배, 적어도 96배, 적어도 97배, 적어도 98배, 적어도 99배, 적어도 100배, 또는 이에 내포적인 임의의 범위, 예컨대, 5배 내지 20배로 감소된다.

[0155] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 및 약 25% 미만, 또는 대안적으로 15% 또는 대안적으로 5% 미만의 오염성 생물학적 거대분자 또는 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 고려한다.

[0156] 본 발명은 추가로 핵산, 벡터, 숙주 세포 등과 같이, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 생산, 검출 또는 특성화하는 것과 관련된 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 발현 및/또는

활성을 조정하는 화합물로서 제공될 수 있다.

[0157] 본 발명의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 이의 용해도 및 생체이용률을 증가시키고/시키거나 이의 정제, 식별, 검출 및/또는 구조적 특성화를 용이하게 하는 Fc 도메인 또는 이의 단편을 함유하는 융합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 융합 파트너가 혈장에서 융합 단백질 안정성을 향상시키고/시키거나 전신 생체이용률을 향상시키는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 발현시키는 것이 유용할 수 있다. 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드에 혼입될 수 있는 예시적인 부가적 도메인으로는, 예를 들어, 글루타티온 S-전이효소(GST), 단백질 A, 단백질 G, 칼모듈린-결합 펩타이드, 티오레독신, 말토스 결합 단백질, HA, myc, 폴리 아르기닌, 폴리 His, 폴리 His-Asp 또는 FLAG 융합 단백질 및 태그를 포함한다. 부가적인 예시적 도메인으로는 신호 펩타이드, 유형 2I 분비 시스템-표적화 펩타이드, 트랜스사이토시스 도메인, 핵 국재화 신호 등과 같이 생체내 단백질 국재화를 변경하는 도메인을 포함한다. 다양한 실시양태에서, 본 발명의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 하나 이상의 이종 융합체를 포함할 수 있다. 폴리펩타이드는 동일한 융합 도메인의 여러 카피를 함유할 수 있거나 2 이상의 상이한 도메인에 대한 융합체를 함유할 수 있다. 융합체는 폴리펩타이드의 N-말단, 폴리펩타이드의 C-말단, 또는 폴리펩타이드의 N-말단과 C-말단 모두에서 발생할 수 있다. 융합 단백질의 작제를 용이하게 하거나, 융합 단백질의 단백질 발현 또는 구조적 제약을 최적화하기 위해, 본 발명의 폴리펩타이드와 융합 도메인 사이에 링커 서열을 포함하는 것 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 또 다른 실시양태에서, 폴리펩타이드는 단백질 발현 후 또는 그 이후에 태그를 제거하기 위해 융합 폴리펩타이드와 본 발명의 폴리펩타이드 사이에 프로테아제 절단 부위를 함유하도록 작제될 수 있다. 적합한 엔도프로테아제의 예로는, 예를 들어, 인자 Xa 및 TEV 프로테아제를 포함한다.

[0158] 또 다른 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 형광 표지에 의해 표지화되어 그의 검출, 정제 또는 구조적 특성화를 용이하게 할 수 있다. 예시적 실시양태에서, 본 발명의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는, 예를 들어, 녹색 형광 단백질(GFP), 향상된 녹색 형광 단백질(EGFP), 레닐라 레니포미스(Renilla Reniformis) 녹색 형광 단백질, GFPmut2, GFPuv4, 향상된 황색 형광 단백질(EYFP), 향상된 청록색 형광 단백질(ECFP), 향상된 청색 형광 단백질(EBFP), 시트린 및 디스코소마(dsRED)의 적색 형광 단백질을 비롯한 검출가능한 형광 신호를 생성하는 이종 폴리펩타이드 서열에 융합될 수 있다.

[0159] 일부 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 일부는 이 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 일부가 효소적으로 사멸되거나 효소 활성이 감소했지만 코로나바이러스 및 Fcɣ 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체)에 의해 인식되지 않는 Fc 단편에 결합할 수 있도록, 표 1, 5 또는 7에 나타낸 아미노산 서열과 충분히 상동성인 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 일부는 이 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 일부가 효소적으로 사멸되거나 효소 활성이 감소했지만 코로나바이러스에 결합할 수 있도록, 표 1에 제시된 아미노산 서열과 충분히 상동성인 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 일부는 이 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 또는 이의 일부가 Fc 폴리펩타이드에 대한 야생형 서열에 비해 증가된 안정성을 갖고 및/또는 Fcɣ 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체)에 결합하지 않도록, 표 5에 나타낸 아미노산 서열과 충분히 상동성인 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 각각이 야생형 ACE2 폴리펩타이드 중 H374N 및 H378N 아미노산 치환과 유사한 아미노산 치환을 포함하는 표 1에 나타낸 아미노산 서열, 또는 이의 단편, 또는 각각이 H374N 및 H378N 아미노산 치환을 포함하는 표 1에 나타낸 아미노산 서열, 또는 이의 단편과 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함한다. 명확히 하기 위해, 표 1에 나타낸 아미노산 서열은 아미노산 잔기 위치 357 및 361에 아스파르가닌 잔기를 포함한다. 이들 잔기는 ACE2 효소 활성을 감소시키거나 제거하지만 코로나바이러스의 ACE2 결합을 저해하지는 않는다. ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 또한 표 5에 나타낸 아미노산 서열, 또는 이의 단편, 또는 표 1에 나타낸 아미노산 서열 또는 이의 단편과 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 상동성인 아미노산 서열을 갖는 Fc 도메인, 또는 이의 단편의 폴리펩타이드를 포함한다. ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 ACE2 도메인과 Fc 도메인, 또는 이의 단편은 힌지 영역에 의해 분리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 표 2, 3 또는 4에 나타낸 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 도메인 또는 이의 단편의 폴리펩타이드는 Fc 수용체(예: FcɣIIa 수용체)에 결합하는 단편의 능력을 약화시키는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 Fc 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체)에 결합하는 단편의 능력을 약화시키는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함할 것이다.

[0160] 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 코로나바이러스 감염의 항체-의존적 면역증강(ADE)을 감소시키거나 제거하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, Fc 도메인 또는 이의 단편은 ACE2-Fc 융합 단백질에 결합하고,

Fc 도메인 또는 이의 단편의 아미노산 서열은 Fc 수용체(예를 들어, FcγIIa 수용체)에 대한 단편의 결합을 감소시키기 위해 최적화될 수 있다. 힌지 영역은 Fc 수용체에 결합하는 Fc 도메인 또는 이의 단편의 능력을 약화시키는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 Fab-암 교환을 감소시키는 아미노산 치환을 그의 힌지(예를 들어, S228P)에 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, ACE2-Fc 수용체는 Fc 수용체에 결합하는 Fc 도메인, 또는 이의 단편의 능력을 감소시키거나 제거하는 아미노산 치환(예를 들어, L235E)을 힌지 영역 또는 Fc 도메인, 또는 이의 단편에 포함한다.

[0161] 본 발명의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 표준 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 상이한 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 DNA 단편은 통상적인 기술에 따라, 예를 들어, 결찰을 위해 평활 말단화된 또는 엇갈린 말단화된 말단, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한효소 분해, 적절한 경우 응집성 말단의 충전(filling-in), 바람직하지 않은 접합을 피하기 위한 알칼리 포스파타제 처리 및 효소 결찰을 이용하여, 프레임내에 함께 결찰된다. 또 다른 실시양태에서, 융합 유전자는 자동 DNA 합성기를 포함하는 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 대안적으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 키메라 유전자 서열을 생성하기 위해 후속적으로 어닐링되고 재증폭될 수 있는 2개의 연속적인 유전자 단편 사이에 상보적 오버행을 발생시키는 앵커 프라이머를 사용하여 수행될 수 있다(예를 들어, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel 등 John Wiley & Sons: 1992). 더욱이, 이미 융합 모이어티(예를 들어, GST 폴리펩타이드)를 암호화하는 많은 발현 벡터가 상업적으로 이용가능하다. ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드-암호화 핵산은 융합 모이어티가 프레임내에 연결되도록 그러한 발현 벡터에 클로닝될 수 있다.

[0162] 본 발명은 또한 ACE2 세포외 도메인 및 Fc 도메인의 아미노산 서열 상동체를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 인간 ACE2 세포외 도메인 및 Fc 도메인의 상동체는 돌연변이유발, 예를 들어, 인간 ACE2 세포외 도메인과 Fc 도메인 각각의 별개의 점 돌연변이 또는 절두(truncation)에 의해 생성될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "상동체"라는 용어는 인간 ACE2 세포외 도메인 및/또는 Fc 도메인 폴리펩타이드의 변이체 형태를 지칭한다. 한 실시양태에서, 단백질의 자연 발생 형태의 생물학적 활성의 하위세트를 갖는 상동체에 의한 대상체의 치료는 ACE2 세포외 도메인 및/또는 Fc 도메인 또는 이의 단편의 자연 발생 형태에 의한 치료에 비해 대상체에 더 적은 부작용을 갖는다.

[0163] 대안적 실시양태에서, 인간 ACE2 세포외 도메인 또는 Fc 도메인, 또는 이의 단편의 상동체는 ACE2 세포외 도메인 또는 Fc 도메인 또는 이의 단편의 돌연변이체, 예를 들어, 절두 돌연변이체의 조합 라이브러리를 스크리닝함으로써 식별될 수 있다. 한 실시양태에서, ACE2 세포외 도메인 또는 Fc 도메인 변이체의 다양한 라이브러리는 핵산 수준에서의 조합 돌연변이유발에 의해 생성되고 다양한 유전자 라이브러리에 의해 암호화된다. 변형된 ACE2 세포외 도메인 또는 Fc 도메인 변이체의 다양한 라이브러리는, 예를 들어, 잠재적 ACE2 세포외 도메인 또는 Fc 도메인 서열의 축퇴성 세트가 개별 폴리펩타이드로서, 또는 대안적으로, 그 안에 ACE2 세포외 도메인 또는 Fc 도메인 또는 이의 단편의 서열의 세트를 함유하는 더 큰 융합 단백질(예를 들어, 파지 디스플레이용)의 세트로서 발현가능하도록 유전자 서열에 합성 올리고뉴클레오타이드의 혼합물을 효소적으로 결찰시킴으로써 생성될 수 있다. 축퇴성 올리고뉴클레오타이드 서열로부터 잠재적인 ACE2 세포외 도메인 또는 Fc 도메인, 또는 이의 단편의 상동체의 라이브러리를 생산하기 위해 사용될 수 있는 방법으로는 다양한 방법이 있다. 축퇴성 유전자 서열의 화학적 합성은 자동 DNA 합성기에서 수행될 수 있으며, 합성 유전자는 그 다음 적절한 발현 벡터에 결찰된다. 축퇴성 유전자 세트의 사용은 잠재적인 ACE2 세포외 도메인 또는 Fc 도메인 또는 이의 단편 서열의 원하는 세트를 암호화하는 서열 전부를 하나의 혼합물에 제공할 수 있도록 한다. 축퇴성 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다(예를 들어, Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura 등 (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura 등 (1984) *Science* 198:1056, Ike 등(1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477 참조).

[0164] III. 약제학적 조성물

[0165] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체(첨가제) 및/또는 희석제와 함께 제형화된, 표 1에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열 및 표 5에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 약제학적으로 허용되는 조성물은 표 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 포함한다.

[0166] 이하에 상세히 기술된 바와 같이, 본 발명에 포괄되는 약제학적 조성물은 하기를 위해 조정된 것을 포함하여 고

체 또는 액체 형태로 투여하기 위해 특별하게 제형화될 수 있다: (1) 경구 투여, 예를 들어 드렌치(수성 또는 비수성 용액 또는 현탁액), 정제, 볼루스, 분말, 과립, 페이스트; (2) 예를 들어, 멸균 용액 또는 현탁액으로서 피하, 근육내 또는 정맥내 주사 등에 의한 비경구 투여; (3) 피부에 적용되는 크림, 연고 또는 스프레이와 같은 국소 적용; (4) 예를 들어, 페서리, 크림 또는 폼으로서, 질내 또는 직장내; 또는 (5) 예를 들어, 화합물을 함유하는 수성 에어로졸, 리포솜 제제 또는 고체 입자로서, 에어로졸.

[0167] 용어 "치료 효과"는 약리학적 활성 물질에 의해 동물, 특히, 포유동물, 보다 특히, 인간에서 발생하는 국소적 또는 전신적 효과를 지칭한다. 따라서, 이 용어는 질환의 진단, 치유, 완화, 치료 또는 예방에, 또는 동물 또는 인간에서 바람직한 신체적 또는 정신적 발달 및 상태의 향상에 사용하기 위해 의도된 임의의 물질을 의미한다. "치료적 유효량"이라는 어구는 임의의 치료에 적용가능한 합당한 이익/위험 비율로 일부 원하는 국소 또는 전신 효과를 생성하는 그러한 물질의 양을 의미한다. 특정 실시양태에서, 화합물의 치료적 유효량은 이의 치료 지수, 용해도 등에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 의해 발견된 특정 화합물은 이러한 치료에 적용가능한 합당한 이익/위험 비율을 생성하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다.

[0168] 본원에 사용된 "치료 유효량"이라는 어구는 합당한 이익/위험 비율로 코로나바이러스 감염 증상(예를 들어, 발열, 기침, 궤양, 인후, 피로, 숨가쁨, 호흡곤란, 빈호흡, 저산소증 등)의 감소 또는 완화와 같은 치료 효과를 생성하기에 효과적인 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 양을 의미한다.

[0169] "약제학적으로 허용되는"이라는 어구는 건전한 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제나 합병증 없이, 합당한 이익/위험 비율에 어울리게, 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 제제, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.

[0170] 본원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체"라는 어구는 하나의 기관, 또는 신체의 일부로부터 다른 기관 또는 신체의 일부로 대상 화학물질을 운반하거나 수송하는데 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클을 의미한다. 각 담체는 제형의 다른 성분과 화합가능하고 대상체에게 해를 끼치지 않는다는 의미에서 "허용되는"이어야 한다. 약제학적으로 허용되는 담체로서 작용할 수 있는 물질의 일부 예로는 (1) 락토스, 글루코스 및 수크로스와 같은 당류; (2) 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; (3) 셀룰로오스 및 이의 유도체, 예컨대, 카르복시메틸 셀룰로오스 나트륨, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트; (4) 분말화된 트라가칸트; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 활석; (8) 코코아 버터 및 좌약용 왁스와 같은 부형제; (9) 오일류, 예컨대, 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; (10) 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜; (11) 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올; (12) 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트와 같은 에스테르; (13) 한천; (14) 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄과 같은 완충제; (15) 알긴산; (16) 발열원이 없는 물; (17) 등장성 식염수; (18) 링거액; (19) 에틸 알코올; (20) 인산염 완충 용액; 및 (21) 약제학적 제형에 사용되는 기타 무독성 화합성 물질을 포함한다.

[0171] 습윤제, 유화제 및 윤활제, 예컨대 라우릴 황산나트륨 및 마그네슘 스테아레이트 뿐만 아니라 착색제, 이형제, 코팅제, 감미제, 향미제 및 향료, 방부제 및 산화방지제도 조성물에 존재할 수 있다.

[0172] 약제학적으로 허용되는 산화방지제의 예로는 (1) 아스코르브산, 시스테인 염산염, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등과 같은 수용성 산화방지제; (2) 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 오일-용해성 산화방지제; 및 (3) 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등과 같은 금속 킬레이트제를 포함한다.

[0173] 본 발명에 포괄되는 방법에 유용한 제형으로는 경구, 비강, 국소(구강 및 설하 포함), 직장, 질, 에어로졸 및/또는 비경구 투여에 적합한 것을 포함한다. 제형은 편리하게 단위 투여 형태로 제공될 수 있고, 약학 분야에 널리 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 숙주, 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 단일 투여 형태를 생성하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 화합물의 양일 것이다. 일반적으로, 100% 중에서, 이 양은 약 1% 내지 약 99%이 활성 성분, 예를 들어 약 5% 내지 약 70%, 또는 약 10% 내지 약 30%의 범위일 것이다.

[0174] 이들 제형 또는 조성물을 제조하는 방법은 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 담체 및 선택적으로 하나 이상의 보조 성분과 회합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 호흡 결합해제제(uncoupling

agent)를 액체 담체, 또는 미분된 고체 담체, 또는 둘 모두와 균일하고 친밀하게 회합시킨 다음, 필요한 경우 생성물을 성형함으로써 제조된다.

[0175] 경구 투여에 적합한 제형은 활성 성분으로서 소정량의 호흡 결합해제제를 각각 함유하는, 캡슐, 카세제, 알약, 정제, 로젠지(유향 기반, 일반적으로 수크로즈 및 아카시아 또는 트라가칸트 사용), 분말, 과립의 형태이거나 수성 또는 비수성 액체 중의 용액 또는 현탁액으로서, 또는 수중유 또는 유중수 액체 에멀젼으로서, 또는 엘릭시르 또는 시럽으로서, 또는 파스틸(젤라틴 및 글리세린 또는 수크로스 및 아카시아와 같은 불활성 기제 사용)로서 및/또는 구강 세척제 등의 형태일 수 있다. 화합물은 또한 볼루스, 연질약 또는 페이스트로서 투여될 수도 있다.

[0176] 경구 투여를 위한 고체 투여 형태(캡슐, 정제, 알약, 당의정, 분말, 과립 등)에서, 활성 성분은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 예컨대, 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘, 및/또는 (1) 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및/또는 규산과 같은 충전제 또는 증량제; (2) 결합제, 예를 들어, 카르복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아; (3) 글리세롤과 같은 습윤제; (4) 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염 및 탄산나트륨과 같은 붕해제; (5) 파라핀과 같은 용해 지연제; (6) 4차 암모늄 화합물과 같은 흡수 촉진제; (7) 습윤제, 예를 들어 아세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트; (8) 카올린 및 벤토나이트 점토와 같은 흡수제; (9) 윤활제, 예컨대 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴 황산나트륨 및 이들의 혼합물; 및 (10) 착색제 중 임의의 것과 혼합된다. 캡슐, 정제 및 알약의 경우, 약제학적 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 락토스 또는 유당, 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질 충전 젤라틴 캡슐 중의 충전제로서 사용될 수 있다.

[0177] 정제는 선택적으로 하나 이상의 보조 성분과 함께 압축 또는 성형으로 제조될 수 있다. 압축 정제는 결합제(예를 들어, 젤라틴 또는 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스), 윤활제, 불활성 희석제, 방부제, 붕해제(예를 들어, 전분 글리콜산 나트륨 또는 가교 카르복시메틸 셀룰로오스 나트륨), 표면활성제 또는 분산제를 사용하여 제조할 수 있다. 성형된 정제는 불활성 액체 희석제에 의해 습윤화된 분말형 퓁타이드 또는 퓁타이드모방체의 혼합물을 적합한 기계에서 성형하여 제조할 수 있다.

[0178] 정제, 및 다른 고체 투여 형태, 예컨대, 당의정, 캡슐, 알약 및 과립은 선택적으로 코팅 및 외피, 예를 들어 장용 코팅 및 약제학적 제형화 기술 분야에서 잘 알려진 기타 코팅에 의해 스코어링되거나 제조될 수 있다. 이들은 또한 원하는 방출 프로필을 제공하기 위한 다양한 비율의 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스, 다른 중합체 매트릭스, 리포좀 및/또는 마이크로스피어를 사용하여 본원의 활성 성분의 느린 방출 또는 제어 방출을 제공하도록 제형화될 수 있다. 이들은, 예를 들어, 박테리아 보유 필터를 통한 여과에 의해, 또는 사용 직전에 멸균수 또는 일부 다른 멸균 주사가능한 매체에 용해될 수 있는 멸균 고체 조성물 형태의 멸균제를 혼입함으로써 멸균될 수 있다. 이들 조성물은 또한 선택적으로 불투명화제를 함유할 수 있고 활성 성분(들)만을 방출하거나, 또는 위장관의 특정 부분에서, 선택적으로, 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 매립화 조성물의 예로는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다. 활성 성분은 또한 적절하다면 전술한 부형제 중 하나 이상과 함께 마이크로캡슐화된 형태에 존재할 수 있다.

[0179] 경구 투여를 위한 액체 투여 형태로는 약제학적으로 허용되는 에멀젼, 마이크로에멀젼, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 활성 성분 이외에, 액체 투여 형태는 관련 기술분야에서 일반적으로 사용되는 불활성 희석제, 예를 들어, 물 또는 기타 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일류(특히, 면실유, 땅콩, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 참깨유), 글리세롤, 테트라하이드로푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.

[0180] 불활성 희석제 외에, 경구 조성물은 또한 습윤제, 유화제 및 현탁화제, 감미제, 풍미제, 착색제, 향료 및 방부제와 같은 보조제를 포함할 수 있다.

[0181] 현탁화제는 활성제 이외에, 예를 들어, 에톡실화된 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미정질 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 한천-한천 및 트라가칸트, 및 이들의 혼합물과 같은 현탁화제를 함유할 수 있다.

[0182] 직장 또는 질 투여용 제형은 하나 이상의 호흡 결합해제제를, 예를 들어, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌약용 왁스 또는 살리실레이트를 포함하는 하나 이상의 적합한 비자극성 부형제 또는 담체와 혼합하여 제조할 수

있고, 실온에서 고체이지만 체온에서는 액체이므로 직장이나 질강에서 녹아서 활성제를 방출하는 좌약으로서 제공될 수 있다.

[0183] 질 투여에 적합한 제형으로는 또한 적절한 것으로 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 담체를 함유하는 페서리, 탐폰, 크림, 겔, 페이스트, 폼 또는 스프레이 제형을 포함한다.

[0184] 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 국소, 분무 또는 경피 투여를 위한 투여 형태로는 분말, 스프레이, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 성분은 멸균 조건 하에서 약제학적으로 허용되는 담체 및 필요할 수 있는 임의의 방부제, 완충제 또는 추진제와 혼합될 수 있다.

[0185] 연고, 페이스트, 크림 및 겔은 호흡 결합해제제 외에, 동식물 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 활석 및 산화아연, 또는 이들의 혼합물과 같은 부형제를 함유할 수 있다.

[0186] 분말 및 스프레이는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 외에 락토스, 활석, 규산, 수산화알루미늄, 규산칼슘 및 폴리아미드 분말, 또는 이들 물질의 혼합물과 같은 부형제를 함유할 수 있다. 스프레이는 클로로플루오로탄화수소 및 휘발성 비치환 탄화수소, 예컨대, 부탄 및 프로판과 같은 통상적인 분사제를 추가로 함유할 수 있다.

[0187] ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 에어로졸에 의해 대안적으로 투여될 수 있다. 이것은 수성 에어로졸, 리포솜 제제 또는 화합물을 함유하는 고체 입자를 제조함으로써 달성된다. 비수성(예를 들어, 플루오로탄소 추진제) 현탁액이 사용될 수 있다. 음파 분무기는 화합물의 분해를 초래할 수 있는 전단에 작용제를 노출시키는 것을 최소화한다.

[0188] 일상적으로, 수성 에어로졸은 약제학적으로 허용되는 통상적인 담체 및 안정제와 함께 작용제의 수성 용액 또는 현탁액을 제형화함으로써 제조된다. 담체 및 안정제는 특정 화합물의 요건에 따라 달라지지만, 전형적으로 비이온성 계면활성제(Tweens, Pluronics 또는 폴리에틸렌 글리콜), 혈청 알부민과 같은 무해한 단백질, 소르비탄 에스테르, 올레산, 레시틴, 글리신과 같은 아미노산, 완충제, 염, 당, 또는 당 알코올을 포함한다. 에어로졸은 일반적으로 등장성 용액으로 제조된다.

[0189] 경피 패치는 신체에 대한 호흡 결합해제제의 제어된 전달을 제공하는 부가적인 이점이 있다. 이러한 투여 형태는 작용제를 적절한 매질에 용해 또는 분산시켜 제조할 수 있다. 흡수 향상제는 또한 피부를 가로지르는 펩타이드모방체의 유량을 증가시키는 데에도 사용될 수 있다. 이러한 유량의 속도는 속도 제어 막을 제공하거나 중합체 매트릭스 또는 겔에 펩타이드모방체를 분산시킴으로써 제어할 수 있다.

[0190] 안과용 제형, 눈 연고, 분말, 용액 등도 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 고려된다.

[0191] 비경구 투여에 적합한 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀젼, 또는 산화방지제, 완충제, 세균발육저지제, 의도된 수혜자의 혈액과 제형을 등장성으로 만드는 용질, 또는 현탁화제 또는 증점제를 함유할 수 있는, 멸균 주사용 용액 또는 분산액으로 사용 직전에 재구성될 수 있는 멸균 분말과 조합된 하나 이상의 호흡 결합해제제를 포함한다.

[0192] 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예로는 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브 오일 및 에틸 올레이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용하고, 분산액의 경우에는 필요한 입자 크기를 유지하여, 그리고 계면활성제를 사용하여 유지할 수 있다.

[0193] 이들 조성물은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 포함함으로써 보장될 수 있다. 또한, 당, 염화나트륨 등과 같은 등장제를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 모노스테아린산 알루미늄 및 젤라틴과 같이 흡수를 지연시키는 작용제를 포함함으로써 주사성 약제학적 형태의 장기간 흡수를 야기할 수 있다.

[0194] 일부 경우에. 약물의 효과를 지속시키기 위해 피하 주사나 근육 주사를 통해 약물의 흡수를 늦추는 것이 바람직하다. 이는 수용성이 불량한 결정질 또는 무정형 물질의 액체 현탁액을 사용하여 달성할 수 있다. 약물의 흡수 속도는 그 다음 용해 속도에 따라 결정되며, 결국 결정 크기 및 결정 형태에 따라 달라질 수 있다. 대안적으로, 비경구 투여된 약물 형태의 흡수 지연은 약물을 오일 비히클에 용해시키거나 현탁시킴으로써 달성된다.

[0195] 주사용 데포 형태는 폴리락타이드-폴리글리콜라이드와 같은 생분해성 중합체에서 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 마이크로캡슐 매트릭스를 형성시킴으로써 제조된다. 약물 대 중합체의 비율 및 사용된 특정 중합체의 특성에 따라, 약물 방출 속도는 제어될 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예로는 폴리(오르소에스테르) 및 폴리(무수물)을 포함한다. 데포 주사 제형은 또한 신체 조직과 화합성인 리포좀 또는 마이크로에멀젼에 약물을 포획시켜 제조한다.

[0196] 본 발명에 포괄되는 호흡 결합해제제가 약제로서 인간 및 동물에게 투여될 때, 이들은 그 자체로서, 또는 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 담체와 조합으로 0.1 내지 99.5%(예를 들어, 0.5 내지 90%)의 활성 성분을 함유하는 약제학적 조성물로서 제공될 수 있다.

[0197] 본 발명의 약제학적 조성물에서 활성 성분의 실제 투여 수준은 대상체에게 유독함이 없이, 특정 대상체, 조성물, 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 달성하기에 효과적인 활성 성분의 양을 얻도록 본 발명에 포괄된 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0198] 본 발명의 핵산 분자는 벡터에 삽입되어 유전자 요법 벡터로서 사용될 수 있다. 유전자 요법 벡터는, 예를 들어, 정맥내 주사, 국소 투여(미국 특허 제5,328,470호) 또는 정위 주사(예를 들어, Chen 등 (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054 3057 참조)에 의해 대상체에게 전달될 수 있다. 유전자 요법 벡터의 약제학적 제제는 허용되는 희석제에 유전자 요법 벡터를 포함할 수 있거나, 유전자 전달 비히클이 내장된 서방형 매트릭스를 포함할 수 있다. 대안적으로, 완전한 유전자 전달 벡터가 재조합 세포, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터로부터 온전하게 생성될 수 있는 경우, 약제학적 제제는 유전자 전달 시스템을 생성하는 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다.

[0199] 본 발명은 제한하는 것으로 해석되어서는 안되는 하기 실시예에 의해 추가로 예시된다. 도면뿐만 아니라 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참조문헌, 특허 및 공개된 특허 출원의 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0200] IV. 본 발명의 추가 용도 및 방법

[0201] 본원에 기재된 조성물은 다양한 진단, 예후 및 치료 적용예에 사용될 수 있다. 진단 방법, 예후 방법, 치료 방법 또는 이들의 조합과 같은 본원에 기술된 임의의 방법에서, 방법의 모든 단계는 단일 행위자 또는 대안적으로 한 명 이상의 행위자에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 진단은 치료요법적 치료를 제공하는 행위자가 직접 수행할 수 있다. 대안적으로, 치료제를 제공하는 사람이 진단 검정이 수행되어야 함을 요청할 수 있다. 진단전문의 및/또는 치료 중재자는 치료 전략을 결정하기 위해 진단 검정 결과를 해석할 수 있다. 유사하게, 이러한 대안적 프로세스는 예후 검정과 같은 다른 검정에 적용될 수 있다.

[0202] a. 스크리닝 방법

[0203] 본 발명의 한 측면은 세포 및 비-세포 기반 검정을 포함하는 스크리닝 검정에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 검정은, 예컨대, 인간에서 코로나바이러스가 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 단독 또는 인간과 같은 다른 바이러스 요법과의 조합에 의한 치료에 반응할 가능성이 있는지 여부를, 코로나바이러스에 대한 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 결합 친화도를 결정하기 위한 비세포 검정을 사용하거나, 또는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드가 감염 및/또는 ADE에 미치는 금지 효과를 결정하기 위한 세포 배양 검정을 사용하여 식별하기 위한 방법을 제공한다.

[0204] 예를 들어, 직접 결합 검정에서, ACE2 융합 폴리펩타이드(또는 이들 각각의 표적 폴리펩타이드 또는 분자)는 복합체 중 표지된 단백질 또는 분자를 검출함으로써 결합이 결정될 수 있도록 방사성동위원소 또는 효소 표지와 커플링될 수 있다. 예를 들어, 표적은 ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C 또는 ^{3}H로 직접 또는 간접적으로 표지될 수 있으며, 방사성동위원소는 방사능방출의 직접 계수 또는 섬광 계수에 의해 검출된다. 대안적으로, 표적은, 예를 들어, 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제 또는 루시퍼라제에 의해 효소적으로 표지될 수 있고, 효소적 표지는 적절한 기질의 생성물로의 전환을 결정함으로써 검출된다. 바이오마커와 기질 사이의 상호작용의 결정은 표준 결합 또는 효소 분석 검정을 사용하여 달성할 수도 있다. 상기 기술된 검정 방법의 하나 이상의 실시양태에서, 단백질 또는 분자 중 하나 또는 둘 모두의 비복합체 형태로부터 복합체 형태의 분리를 용이하게 하고 검정의 자동화를 도모하기 위해 폴리펩타이드 또는 분자를 고정화하는 것이 바람직할 수 있다.

[0205] 표적에 대한 ACE2-Fc의 결합은 반응물을 함유하기에 적합한 임의의 용기에서 달성될 수 있다. 이러한 용기의 비제한적 예로는 마이크로타이터 플레이트, 테스트 튜브 및 마이크로원심분리기 튜브를 포함한다. 본원에 기술된 항체의 고정화된 형태는 또한 다공성, 미세다공성(평균 기공 직경이 약 1 미크론 미만임) 또는 거대다공성(평균 기공 직경이 약 10 미크론 초과임) 물질과 같은 고체상, 예컨대, 막, 셀룰로오스, 니트로셀룰로오스 또는 유리

섬유; 비드, 예컨대 아가로스 또는 폴리아크릴아미드 또는 라텍스로 제조된 것; 또는 폴리스티렌으로 제조된 것과 같은 접시, 플레이트 또는 웰의 표면에 접합된 항체를 포함할 수 있다.

[0206] 대안적인 실시양태에서, 코로나바이러스와 전체 길이 ACE2 폴리펩타이드 사이의 상호작용을 조정하는 작용제의 능력을 결정하는 것은 코로나바이러스의 감염성을 조정하는 본 발명에 포괄되는 ACE2-융합 폴리펩타이드의 능력을 결정함으로써 달성될 수 있다.

[0207] 본 발명은 또한 전술한 스크리닝 검정에 의해 식별된 ACE2-Fc에 관한 것이다. 따라서, 적절한 동물 모델에서와 같이, 본원에 기술된 바와 같이 식별된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 추가로 사용하는 것은 본 발명의 범위 내이다. 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같이 식별된 작용제는 이러한 작용제를 사용한 치료의 효능, 독성, 또는 부작용을 결정하기 위해 동물 모델에서 사용될 수 있다. 대안적으로, 본원에 기술된 바와 같이 식별된 항체는 동물 모델에서 이러한 작용제의 작용 기전을 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0208] b. 예측 의학

[0209] 본 발명은 또한 진단 검정, 예후 검정 및 모니터링 임상 시험이 예후(예측) 목적으로 사용되어 개체를 예방적으로 치료하는 예측 의학 분야에 관한 것이다. 따라서, 본 발명의 한 측면은 생물학적 샘플(예를 들어, 혈액, 혈청, 세포 또는 조직)의 정황에서 코로나바이러스의 양 및/또는 활성 수준을 결정하여, 바이러스에 감염된 개체가 본 발명에 포괄된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드로의 치료에 응답할 가능성이 있는지 여부를 결정하기 위한 진단 검정에 관한 것이다. 이러한 검정은 예후 또는 예측 목적용으로만 사용될 수 있거나, 또는 코로나바이러스 감염과 연관된 증상의 발병 전에 또는 발병 후에 개체를 예방적으로 치료하기 위해 치료적 개입과 커플링될 수 있다. 관련 기술분야의 기술자는 임의의 방법이 표, 도면, 실시예 및 본 명세서에 달리 기술된 것과 같은 본원에 기술된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 중 하나 이상(예를 들어, 조합)을 사용할 수 있음을 이해할 것이다.

[0210] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 기술된 바이오마커의 발현 또는 활성에 대한 작용제(즉, 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드)의 영향을 모니터링하는 것에 관한 것이다. 이러한 작용제 및 기타 작용제는 다음 섹션에서 더 자세하게 설명된다.

[0211] 관련 기술분야의 기술자는 또한 특정 실시양태에서 본 발명의 방법이 컴퓨터 프로그램 및 컴퓨터 시스템을 구현한다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 컴퓨터 프로그램은 본원에 기술된 알고리즘을 수행하기 위해 사용될 수 있다. 컴퓨터 시스템은 또한 본 발명의 방법을 구현하는데 있어서 컴퓨터 시스템에 의해 사용될 수 있는 복수의 바이오마커 신호 변화/프로필을 포함하는 본 발명에 포괄된 방법에 의해 생성된 데이터를 저장 및 조작할 수 있다. 특정 실시양태에서, 컴퓨터 시스템은 바이오마커 발현 데이터를 수신하고; (ii) 데이터를 저장하고; 및 (iii) 본원에 기술된 임의의 수의 방식(예를 들어, 적절한 대조군에 상대적인 분석)으로 데이터를 비교하여 암성 또는 전암성 조직으로부터 유익한 바이오마커의 상태를 결정한다. 다른 실시양태에서, 컴퓨터 시스템은 (i) 결정된 발현 바이오마커 수준을 임계값과 비교하고; (ii) 상기 바이오마커 수준이 임계값보다 유의미하게 조정(예를 들어, 초과 또는 미만)되었는지의 적응증, 또는 상기 적응증에 기초한 표현형을 출력한다.

[0212] 특정 실시양태에서, 그러한 컴퓨터 시스템은 또한 본 발명의 일부로 고려된다. 생물정보학 및/또는 컴퓨터 분야의 숙련된 기술자가 소유한 지식에 따라 본 발명의 분석 방법을 구현하기 위해 다양한 유형의 컴퓨터 시스템이 사용될 수 있다. 이러한 컴퓨터 시스템이 작동하는 동안 여러 소프트웨어 구성요소가 메모리에 로딩될 수 있다. 소프트웨어 구성요소는 관련 기술분야에서 표준인 소프트웨어 구성요소와 본 발명에 특별한 구성요소(예를 들어, Lin 등(2004) *Bioinformatics* 20, 1233-1240에 기술된 dCHIP 소프트웨어; 관련 기술분야에 공지된 방사형 기반 기계 학습 알고리즘(RBM)) 둘 모두를 포함할 수 있다.

[0213] 본 발명의 방법은 또한 사용될 특정 알고리즘을 포함하는 높은 수준의 처리 사양 및 방정식의 기호 입력을 허용하는 수학적 소프트웨어 패키지에서 프로그래밍 또는 모델링될 수 있으며, 이에 따라 사용자는 개별 방정식 및 알고리즘을 절차적으로 프로그램할 필요가 없다. 이러한 패키지로는, 예를 들어, Mathworks(매사추세츠주 나틱)의 Matlab, Wolfram Research(일리노이주 샴페인)의 Mathematica 또는 MathSoft(워싱턴주 시애틀)의 S-Plus를 포함한다.

[0214] 특정 실시양태에서, 컴퓨터는 바이오마커 데이터의 저장을 위한 데이터베이스를 포함한다. 이러한 저장된 프로은 이후 시점에 액세스하여 관심 있는 비교를 수행하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 대상체의 비-감염 조직에서 유래된 샘플의 바이오마커 발현 프로필 및/또는 동일한 종의 관련 집단에서 관심 있는 유익한 유전자좌의 집단-기반의 분포에서 생성된 프로필을 저장하고, 이후에 대상체의 감염 조직 또는 대상체가 감염된 것으로 의심되는 조직에서 유래된 샘플의 것과 비교할 수 있다.

[0215] 본원에 기술된 예시적인 프로그램 구조 및 컴퓨터 시스템 외에도, 다른 대안적인 프로그램 구조 및 컴퓨터 시스템은 숙련된 기술자에게 쉽게 자명할 것이다. 따라서, 취지 또는 범주에서 전술한 컴퓨터 시스템 및 프로그램 구조에서 벗어나지 않는 그러한 대안적인 시스템은 첨부된 청구범위 내에서 이해되는 것으로 의도된다.

[0216] c. 진단 검정

[0217] 본 발명은 부분적으로 생물학적 샘플이 본 발명에 포괄된 하나 이상의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드에 의한 치료에 응답할 가능성이 있는 코로나바이러스에 의해 감염되었는지 여부를 정확하게 분류하기 위한 방법, 시스템 및 암호를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 통계적 알고리즘 및/또는 경험적 데이터(예를 들어, 표, 도면, 실시예와 같은 본원에 기술된 바이오마커의 양 또는 활성, 및 본 명세서에서 달리 기술된 것)를 사용하여, 본 발명에 포괄된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드에 의한 치료에 응답하거나 응답하지 않을 코로나바이러스 감염과 연관되거나 감염의 위험이 있는 것으로서 샘플(예를 들어, 대상체 유래)을 분류하는 데 유용하다.

[0218] 본원에 기술된 코로나바이러스의 양 또는 활성을 검출하고, 이에 따라 샘플이 본 발명에 포괄된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 사용한 치료에 응답할 가능성이 있는지 여부를 분류하는 데 유용한 예시적인 방법은 테스트 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 단계 및 생물학적 샘플을 이 생물학적 샘플 내의 바이오마커의 양 또는 활성을 검출할 수 있는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 같은 단백질-결합제, 또는 올리고뉴클레오타이드와 같은 핵산-결합제와 같은 작용제와 접촉시키는 단계를 수반한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 사용되며, 여기서 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 이상의 그러한 항체 또는 항체 단편이 조합(예를 들어, 샌드위치 ELISA에서)으로 또는 직렬로 사용될 수 있다. 특정 경우에, 통계 알고리즘은 단일 학습 통계 분류기 시스템이다. 예를 들어, 단일 학습 통계 분류기 시스템은 예측 또는 확률 값 및 바이오마커의 존재 또는 수준에 기초하여 샘플을 분류하는 데 사용될 수 있다. 단일 학습 통계 분류기 시스템의 사용은 전형적으로 샘플을, 예를 들어, 민감도, 특이성, 양성 예측값, 음성 예측값 및/또는 적어도 약 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 전체 정확도에 의해 가능성 있는 면역요법 응답자 또는 진행자 샘플로서 분류한다.

[0219] 다른 적합한 통계 알고리즘은 관련 기술분야의 기술자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 학습 통계 분류기 시스템은 복잡한 데이터 세트(예를 들어, 관심 있는 마커의 패널)에 맞추고 이러한 데이터 세트를 기반으로 결정을 내릴 수 있는 기계 학습 알고리즘 기술을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분류 트리(예를 들어, 랜덤 포레스트)와 같은 단일 학습 통계 분류기 시스템이 사용된다. 다른 실시양태에서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 이상의 학습 통계 분류기 시스템의 조합이, 바람직하게는, 직렬로 사용된다. 학습 통계 분류기 시스템의 예로는 귀납적 학습(예를 들어, 랜덤 포레스트, 분류 및 회귀 트리(C&RT), 부스트된 트리 등과 같은 결정/분류 트리), 아마도 대략적으로 정확한(PAC) 학습, 연결주의 학습(예를 들어, 신경 네트워크(NN), 인공 신경 네트워크(ANN), 신경 퍼지 네트워크(NFN), 네트워크 구조, 다층 퍼셉트론과 같은 퍼셉트론, 다층 순방향 네트워크, 신경 네트워크의 응용, 베이즈 신뢰 네트워크에서의 학습 등), 강화 학습(예를 들어, 나이브 학습, 적응형 동적 학습, 및 시간차 학습과 같은 알려진 환경에서의 수동 학습, 알려지지 않은 환경에서의 수동 학습, 알려지지 않은 환경에서의 능동 학습, 행동 가치 함수 학습, 강화 학습의 응용 등), 및 유전자 알고리즘 및 진화 프로그래밍을 사용하는 것을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 다른 학습 통계 분류 시스템으로는 지원 벡터 머신(예를 들어, 커널 방법), 다변량 적응형 회귀 스플라인(MARS), Levenberg-Marquardt 알고리즘, Gauss-Newton 알고리즘, 가우시안 혼합, 경사 하강법 알고리즘 및 학습 벡터 양자화(LVQ)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법은 샘플 분류 결과를 임상의, 예를 들어 종양학자에게 보내는 것을 추가로 포함한다.

[0220] 또 다른 실시양태에서, 대상체의 진단에 이어서, 진단에 기초하여 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 치료적 유효량을 개체에게 투여한다.

[0221] 한 실시양태에서, 방법은 대조군 생물학적 샘플(예를 들어, 코로나바이러스 감염이 없거나, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드에 의한 바이러스 격리에 민감한 감염을 가진 대상체로부터의 생물학적 샘플, 치료 전 동안 대상체로부터의 생물학적 샘플, 또는 치료 동안 또는 치료 후 대상체로부터의 생물학적 샘플을 수득하는 것을 추가로 수반한다.

[0222] d. 예후 검정

[0223] 본원에 기술된 진단 방법은 게다가 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드에 응답할 가능성이 있거나 없을 가능성이 있는 코로나바이러스 감염을 갖거나 가질 위험이 있는 대상체를 식별하기 위해 활용될 수 있다. 이전의 진단 검정 또는 이하의 검정과 같은 본원에 기술된 검정은 코로나바이러스에 감염되었거나 감염될 위험이 있는 대상을 식별

하는 데 활용될 수 있다. 대안적으로, 예후 검정은 폐렴과 같은 코로나바이러스 감염과 연관된 장애를 갖거나 장애가 발병할 위험이 있는 대상체를 식별하기 위해 활용될 수 있다. 게다가, 본원에 기술된 예후 검정은 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드와 연관된 질병 또는 장애를 치료하기 위해 대상체가 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 투여받을 수 있는지 여부를 결정하는 데 사용될 수 있다.

[0224] e. 치료 방법

[0225] 본 발명은 COVID-19의 원인 인자인 SARS-CoV-2 감염을 포함하는 코로나바이러스 감염의 위험이 있는(또는 감염되기 쉬운) 대상체를 치료하는 예방적 및 치료적 방법 둘 모두를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 포괄된 ACE2-Fc 융합 단백질은 코로나바이러스에 감염되었거나 감염될 위험이 있는 대상체에게 투여된다. 투여된 ACE2-Fc 융합 단백질은 SARS-CoV-2 코로나바이러스의 세포 표면 수용체인 ACE2의 약리학적으로 최적화된 가용성 형태이며, SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인(RBD)에 결합하여 바이러스 감염의 경쟁적 저해제로서 기능하여, 세포-표면 ACE2에 대한 그의 부착을 방지한다. ACE2-Fc 융합 단백질은 COVID-19 환자에서 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)의 중증도를 유발하거나 악화시킬 수 있는 항체-의존적 면역증강(ADE)을 방해하는 Fc 단편을 포함한다.

[0226] Fc 융합체 형식이든 아니든 SARS-CoV-2에 대한 효소적 활성 ACE2의 치료적 사용의 단점은 혈역학적 부작용 및 전해질 이상에 대한 잠재성이다. 야생형 ACE2는 RAAS(레닌-안지오텐신-알도스테론 시스템) 경로의 구성요소인 안지오텐신 II를 분해하는 체외효소이며, 따라서, 혈압, 체액 및 체내 전해질 균형(주로 나트륨)을 조절하는 천연 RAAS 저해제이다. 야생형 ACE2를 활용하는 치료제는 특히 고용량에서 또는 상대적 체적 고갈 상태에 있는 급성 환자, 또는 신혈관 협착증 또는 심부전과 같은 RAAS 의존성을 초래하는 만성 상태를 가진 환자에서, RAAS 저해의 생리 효과를 반영하는 부작용을 유발할 것으로 예상된다. RAAS 저해로 인한 부작용으로는 저혈압, 혈액량 감소, 신장 손상을 초래할 수 있고, 혈압을 감소시킬 수 있으며, 잠재적으로 저나트륨혈증 또는 전해질 변화를 초래할 수 있다. 따라서, 중환자 집단인 COVID-19 환자의 ACE2 치료는 용량 제한적 부작용을 초래할 수 있으며, 이는 치료 및 예방 환경 모두에서 활성 ACE2 사용에 대한 우려를 제기한다.

[0227] 효소적 활성 재조합 ACE2 세포외 도메인(Fc 융합체 형식은 아님)은 병리학적 RAAS 활성화로 인한 고혈압 치료를 위해 개발되었다. 건강한 지원자를 대상으로 한 1상 무작위 용량 증량 연구에서는 혈압이나 심박수에 영향을 미치지 않았고 연구 용량에서 내약성이 우수했다(Haschke 등 (2013) *Clin Pharmacokinet.*, 52(9): 783-92). 그러나, 대부분이 중환자인 COVID-19 환자에서의 그의 생리학적 효과는 건강한 지원자에서의 효과를 반영하지 않을 수 있다. 더욱이, 바이러스의 경쟁적 저해에 필요한 용량은 앞서 언급한 RAAS 매개 고혈압에 대한 1상 시험에서 연구된 것보다 높을 가능성이 있어서, 중증이 아닌 COVID-19 환자도 혈역학적 부작용 및 저나트륨혈증을 경험할 수 있다는 우려가 제기된다.

[0228] 효소적으로 활성인 ACE2 약물의 부작용은 RAAS 시스템이 활성일 때 가장 분명할 것이다. 이것은 2가지 환경에서 발생할 수 있다: 1) 탈수 또는 패혈증과 같은 혈관내 체적 고갈 상태; 또는 2) 신장 동맥 협착증, 심부전 또는 간경화(간부전)와 같은 RAAS 활성화의 만성 상태(Atlas, S.A., (2007) *J. Manag. Care Pharm.*, 13(8 Suppl B):9-20); Hricik 등(1983) *N. Engl. J. Med.*, 308(7):373-6; Brown 등(1998) *Circulation*, 97(14):1411-20; Arroyo 등(2011) *Nat Rev Nephrol.*, 7(9):517-261). 이러한 만성 상태는 중증 COVID-19로 발달할 가능성이 더 높은 전문가를 포함한 노인 인구에서 일반적이다(Krishnamurthi 등 (2018) *PLoS One*, 13(3):e0193996; Eibner 등 (2016) *Rand Health Q.*, 5(4):13). 이러한 동반이환 상태는 종종 임상적으로 침묵적이기 때문에, 활성 ACE2에 노출되기 전에 개체가 이러한 소인 상태 중 하나를 갖고 있음이 분명하지 않을 수 있으며, 약물은 저혈압 또는 고칼륨혈증과 같은 위험한 전해질 이상을 촉발시킬 수 있다. 따라서, 이러한 우려는 치료적 및 예방적 환경 모두에서 활성 ACE2 사용과 관련이 있다.

[0229] 실제로, 효소적으로 활성인 재조합 ACE2 세포외 도메인(Fc 융합체 형식은 아님)은 RAAS의 병리학적 과활성화로 인한 고혈압 치료제로서 개발되었다(Haschke 등 (2013) *Clin Pharmacokinet.*, 52(9):783-92). 그러나, 이전에 명시된 바와 같이, RAAS 저해의 생리학적 효과는 RAAS 시스템이 활성일 때 가장 분명하게 나타날 것이며, 제어된 환경에서 건강한 지원자에서는 나타나지 않는다. 더욱이, 바이러스의 경쟁적 저해에 필요한 용량은 이 시험에서 연구된 것보다 더 높을 가능성이 있다. 따라서, 이 시험은 COVID-19 치료 또는 예방을 위한 효소적으로 활성인 ACE2의 안전성에 대한 우려를 경감시키지 못한다.

[0230] IgG Fc 도메인에 의해 부여된 연장된 반감기는 피하 투여를 허용한다. SARS-CoV-2 저해에 충분한 용량인 수백 밀리그램이 각 주사에 의해 투여될 수 있다. 피크 농도까지의 시간은 정맥 투여와 비교하여 피하 투여되는 생물학적 제제에서 더 길지만, 이것은 일반적으로 초기 부하 용량을 더 많이 투여한 다음, 유지 용량의 더 적은 투

여에 의해 설명된다. 반복 투여가 필요한 경우, 전형적으로 반감기에서 수행되므로 주사는 3일에 한 번 이하의 빈도로 필요할 것이다. 제품 배포와 관련하여 피하 주사용 FDA-승인된 Fc 융합 단백질은 주입 준비가 된 사전 충전된 주사기에서 종종 이용가능하다. 단백질 약물의 피하 주사를 위한 사전충전형 주사기는 전형적으로 냉장 보관 시 12-24개월 동안 안정적이며 운송을 위해 냉장 보관할 필요가 없다.

[0231] 본 발명은 효소적으로 비활성인 ACE2 세포외 도메인을 포함한다. ACE2에 2개의 점 돌연변이(H374N 및 H378N)의 내포는 그의 효소적 활성을 현저하게 감소시키는 것으로 알려져 있다(Imai 등 (2005) *Nature*, 436(7047):112-6). 결정적으로, 이러한 점 돌연변이는 SARS-CoV 또는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 결합에 영향을 미치지 않는다. 이러한 점 돌연변이를 포함하는 ACE2-NN-Fc 융합 단백질은 여전히 SARS-CoV 및 SARS-CoV-2 슈도바이러스에 의한 표적 세포의 감염을 강력하게 저해한다(Imai 등, Lei 등 (2020) *Nat. Commun*.11(1):2070). SARS-CoV-2에 대한 iACE2-Fc의 IC50은 0.1 μg/mL 미만 또는 0.5 나노몰 미만이었다.

[0232] 본 발명에 포괄된 ACE2-Fc 융합체를 투여함으로써 코로나바이러스 감염을 치료하거나 예방하는 것과 연관된 몇 가지 이점이 있다. 본 발명에 포괄된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 RAAS 저해제가 아닌 효소적으로 비활성인 ACE2 도메인을 사용하기 때문에 이러한 부작용을 일으키지 않는다. 따라서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 병원에서의 급성 환자 및 모니터링되지 않은 지역 환경에서의 만성 상태를 가진 개체 모두에게 투여하기에 안전하다. 이로써, 치료제 외에 예방제로도 사용할 수 있다. 부작용의 위험이 적기 때문에 효소적으로 비활성인 ACE2의 사용은 더 높은 피크 혈청 농도를 견딜 수 있게 한다. 고용량의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 코로나바이러스(예를 들어, SARS-CoV-2) 감염의 경쟁적 저해 및 ACE2의 경쟁적 저해를 개선하는 한편, 덜 빈번한 투여(즉, 투여 간격 증가)를 허용하여 비병원 환경에서 배포의 실현가능성을 개선한다.

[0233] 또한, 인간을 감염시키는 것으로 알려진 7개의 코로나바이러스 OC43, HKU1, 229E, NL63, MERS-CoV, SARS-CoV 및 SARS-CoV-2) 중 3개는 세계적으로 중요한 2가지 바이러스인, 2004년 중증급성호흡기증후군 발발의 원인 바이러스인 SARS-CoV, 및 COVID-19 유행의 원인 바이러스인 SARS-CoV-2를 비롯하여, ACE2를 활용하는 것으로 알려져 있다(SARS-CoV, SARS-CoV-2 및 NL63)(Li 등(2003) *Nature*, 426(6965):450-54.; Hoffman 등 (2020) *Cell*, 181(2):271-80 e8). 따라서, ACE2는 SARS-CoV-2가 세포를 감염시키는 주요 표면 수용체이기 때문에, 본 발명에 포괄된 ACE2-Fc 융합 단백질은 미래의 신종 코로나바이러스를 비롯하여, ACE2를 수용체로서 활용하는 임의의 코로나바이러스에 결합할 것이다. 이에 반해, 중화성 단클론 항체, 뿐만 아니라 SARS-CoV-2에 대한 백신은 미래의 신종 코로나바이러스 또는 특히 광범위한 치료 및 백신접종이 바이러스에 진화 압박을 발휘하는 경우, 집단에서 발생하는 SARS-CoV-2의 돌연변이 변이체에 대해 효과적이지 않을 수 있다. 이는 치료 중화 항체 및 백신접종에 의해 유도된 항체가 스파이크 단백질 수용체 결합 도메인(RBD) 상의 정해진 에피토프에 결합하기 때문이며, 이를 돌연변이시켜 ACE2 결합을 보존하면서 항체 결합을 회피하도록 할 수 있다. 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되는 ACE2-Fc 융합 단백질은 ACE2 자체의 약리학적으로 최적화된 형태이기 때문에, ACE2-Fc 융합 단백질에 대한 감소된 결합을 나타내는 돌연변이된 RBD를 가진 바이러스도 표적 세포에 대한 감소된 결합 및 감소된 감염성을 나타낼 것이다.

[0234] ACE2-Fc 융합 단백질의 불활성 ACE2 세포외 도메인은 폐내에서 내인성 ACE2의 활성을 방해하거나 영향을 미치지 않음을 강조하는 것이 중요하다. 가용성 ACE2-Fc 융합 단백질은 ACE2가 보호할 수 있는 ARDS의 중증도에 영향을 미치지 않는다(Imai 등(2005)).

[0235] 본 발명에 포괄되는 융합 단백질은 이를 필요로 하는 대상체에게 중화 항체를 투여하는 것을 포함하는 치료와 연관된 합병증을 피한다. 예를 들어, 항체-의존적 면역증강(ADE)은 이에 의해 중화 항체가 바이러스 증후군의 감염 및 염증을 역설적으로 악화시키는 현상이다. ADE는 뎅기열에서 가장 잘 특징지어지며, 여기서 1차 감염에서 발생된 내인성 중화 항체는 2차 감염에서, 전형적으로 항체가 부분적으로 중화시킨 바이러스의 상이한 혈청형이 있는 2차 감염일 경우, 바이러스 증후군을 악화시킨다(Tirado 등(2003) *Viral Immunol.*, 16(1):69-86; Takada 등(2003) *Rev Med Virol.*, 13(6):387-98, Khandia 등(2018) *Front Immunol.*, 9:597. 이 현상은 Fcɣ 수용체-의존적이다. 항체는 먼저 바이러스에 결합한 다음, 면역 세포 상의 Fcɣ 수용체에 결합하여, 바이러스 진입을 매개하고 면역 세포를 활성화한다(Wan 등 (2020) *J. Virol.*, 94(5). 이것은 면역 세포에서의 바이러스 복제 및 TNF-α 및 IL-6과 같은 염증성 사이토카인의 방출을 초래한다(Boonnak 등(2008) *J. Virol.*, 82(8):3939-51. 이들 사이토카인은 또한 조직 손상, 쇼크, 폐 병리 및 ARDS와 연관이 있다.

[0236] HIV 및 에볼라 바이러스, 뿐만 아니라 코로나바이러스에서도 ADE에 대한 증거가 있다(Wan 등 (2020); Beck 등 (2008) *Vaccine*, 26(24):3078-85; Takada 등 (2001) *J. Virol.*, 75(5):2324-30, Takada 등(2003) *J. Virol.*, 77(13):7539-44, Corapi 등(1992) *J. Virol.*, 66(11):6695-705; Hohdatsu 등(1998) *J. Vet.Med.Sci.*,

60(1):49-55; Vennema 등(1990) *J. Virol.*, 64(3):1407-9; Wang 등(2014) *Biochem Biophys Res Commun.*, 451(2):208-14; Kam 등(2007) *Vaccine*, 25(4):729-40; Jaume 등(2011) *J Virol.*, 85(20):10582-97. 스파이크 단백질 RBD에 결합하는 코로나바이러스 중화 항체는 Fcɣ 수용체 결합을 통해 ADE를 매개할 수 있고 막 융합 및 감염을 촉진하는 스파이크 단백질의 형태적 변화를 촉발할 수 있다(Corapi 등 (1992); Hohdatsu 등(1998); Vennema 등(1990); (Wang 등(2014); Kam 등(2007); Jaume 등(2011); (Wan 등, (2020) *J. Virol.*, 94(5): e02015-19); (Walls 등 (2019) *Cell*, 176(5):1026-39 e15).

[0237] 상관성이 있는 임상 데이터는 중증급성호흡기증후군(SARS) 및 COVID-19 둘 모두를 악화시키는 ADE의 역할을 뒷받침한다(Jaume 등(2011); Cao(2020) *Nat. Rev. Immunol.*, 20(5):269-70; Tetro (2020) *Microbes Infect.*, 22(2):72-73; Yuan 등 (2005) *Tissue Antigens*, 66(4):291-96; Bicheng Zhang 등 (2020) *medRxiv*; Zhao 등 (2020) *Clin. Infect. Dis.*, doi: 10.1093/cid/ciaa344); Yuan 등 (2005). IgG2에 동등하게 결합하여(H131) 내인성 IgG2에 의해 부분적으로 차단될 수 있는 FcɣRIIa 대립유전자는 방어적이었다. IgG1은 바이러스 감염에 의해 촉발된 주요 IgG 이소형이다. 달리 말하면, R131 FcɣRIIa 대립유전자에 대해 동형접합성인 환자는, 따라서, 항바이러스 IgG 항체에 결합할 가능성이 더 커져, 최악의 결과를 보였다. 이것과 FcɣRI 또는 FcɣRIIIa가 아닌 FcɣRIIa 수용체가 시험관내에서 SARS-CoV의 ADE에 충분하다는 발견은 IgG1 항체가 ADE를 통해 민감한 환자에서 SARS 과정을 악화시켰음을 나타낸다(Juame 등 (2011).

[0238] 보다 최근에 우한 대학교에서 200명 이상의 COVID-19 환자를 대상으로 한 연구에서는 SARS-CoV-2 반응성 IgG 수치가 높은 환자가 IgG 수치가 낮은 환자보다 중증 질환을 경험할 가능성이 더 높다는 것을 발견했다(Bicheng Zhang 등 (2020). 반대로, 이 연구에서 SARS-CoV-2 반응성 IgM 수치가 더 높은 환자는 IgM 수치가 더 낮은 환자보다 비-중증 질환을 앓을 가능성이 더 높았다. IgG는 Fcɣ 수용체에 결합할 수 있지만 IgM은 그렇지 않다. 이 연구는 또한 호중구 대 림프구 비율이 높을수록, 특히 IgG 수치가 높은 환자에서 중증 질환과 상관성이 있다는 것을 발견했다. 호중구는 FcɣRIIa의 높은 수치를 발현하는 것으로 알려져 있다. 더 높은 SARS-CoV-2 수치와 보다 중증 질환 사이의 연관성은 170명 초과 환자를 포함한 2차 연구(Zhao 등 (2020))에 의해 확인되었다. 이러한 발견을 요약하면, Fcɣ 수용체를 활성화할 수 있는 SARS-CoV-2 항체 수치가 더 높을수록, 보다 중증 COVD-19 질환과 상관성이 있고, 반대로 Fcɣ 수용체를 활성화할 수 없는 SARS-CoV-2 항체 수치가 더 높을수록, 덜 중증인 COVID-19와 상관성이 있다. 또한, FcɣRIIa를 발현하는 호중구 비율이 높을수록, 특히 SARS-CoV-2 항체 수치가 높고 호중구 비율이 높은 환자의 경우, 코로나19 악화와 상관성이 있다. 종합하면, 이러한 임상적 상관성은 ADE가 폐 염증 및 종종 ARDS에 의해 변함없이 특성화되는 COVID-19의 중증도에 기여할 수 있음을 시사한다.

[0239] ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 ADE의 위험을 완화하기 위해 Fcɣ 수용체 결합이 현저하게 약화된 Fc 도메인을 활용한다. 일부 실시양태에서, 최소량의 Fcɣ 수용체 결합을 나타내는 것으로 알려진 2개의 조작된 Fc 도메인은 IgG1 L234A L235A 치환(IgG1-LALA) 및 IgG4 S228P L235E 치환(IgG4-SPLE)을 포함한다. 예를 들어, IgG4-SPLE은 FcɣRIIa에 거의 결합을 나타내지 않는 반면, IgG1-LALA는 고농도에서 최소한의 FcɣRIIa 결합을 나타낸다(Schlothauer 등 (2016) *Protein Eng. Des. Sel.*, 29(10):457-66). 일부 실시양태에서, Fc 도메인 단편은 FcɣRIIa 결합을 최소화하기 위해 IgG4-SPLE 치환을 포함하는데, 그 이유는 상기에 언급한 바와 같이, 이것이 ADE와 가장 연관이 있는 Fcɣ 수용체이기 때문이다. 일부 실시양태에서, FcɣR 결합이 현저하게 약화된 조작된 IgG Fc 도메인이 사용된다. 예를 들어, S228P 및 L235E 점 치환을 보유하는 인간 IgG4 Fc 도메인이 사용될 수 있으며, 여기서 L235E 치환은 FcɣR 결합을 약화시킨다. FcɣRI 결합은 몇 자릿수 등급만큼 감소되고, FcɣRIIa, FcɣRIIb 및 FcɣRIII에 대한 결합은 무시해도 될 정도이다. Fc 신생아 수용체에 대한 결합이 보존되며, 이는 유리한 약동학이다. 따라서, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 Fcɣ 수용체에 대한 친화도가 낮아 ADE의 위험을 감소시킨다.

[0240] 일부 실시양태에서, IgG4-SPLE의 사용은 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 자체로부터의 ADE의 위험을 완화시킬 뿐만 아니라 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드가 내인성 면역병리학적 IgG 항체에 의해 매개되는 진행 중인 ADE를 방해하도록 할 것이다. 일부 실시양태에서, IgG1 Fc 도메인은 L234A, L235A 및 P329G 치환을 갖는 IgG1 Fc 도메인 단편; P329G 치환을 갖는 IgG1 Fc 도메인 단편; L234A 및 L235A 치환을 갖는 IgG1 Fc 도메인 단편; N297D 치환을 갖는 IgG1 Fc 도메인 단편; N297A 치환을 갖는 IgG1 Fc 도메인 단편; 및 N297Q 치환을 갖는 IgG1 Fc 도메인 단편으로부터 선택될 수 있다. IgG1 Fc 도메인은 ADE의 위험을 완화하고 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드가 내인성 면역병리학적 IgG 항체에 의해 매개되는 진행 중인 ADE를 방해하도록 하는 데 사용될 수 있다. 충분한 말초 조직 농도에서 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 RBD에 결합하는 이러한 내인성 항체와 성공적으로 경쟁하고 이를 차단한다. 이는 Fcɣ 수용체에 결합하여 ADE를 촉진할 수 있는 항체에 결합된 비리온의 수를 감소시킨다.

[0241] ADE의 병태생리학적 메커니즘를 방해하고 바이러스 감염의 직접적인 경쟁적 저해에 의해 폐 내의 비리온 수를 감소시킴을 통해, 본 발명에 포괄된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 COVID-19 환자에서 ARDS를 예방하고, 중증도를 감소시키고 및/또는 치료한다.

[0242] 본 발명에 포괄되는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 N-숙신이미딜(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이작용기성 유도체(예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르(예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드(예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예컨대, 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예컨대, 톨루엔 2,6디이소시아네이트) 및 비스-활성 불소 화합물(예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 다양한 이작용기성 단백질 커플링제를 사용하여 이종성 작용제와 접합될 수 있다. 예를 들어, 탄소 표지된 1-이소티오시아네이토벤질 메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 방사성뉴클레오타이드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트제이다(WO 94/11026).

[0243] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항바이러스 약물과 같은 치료 모이어티에 접합된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 특징으로 한다. 접합된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 치료적 유용성 외에도, 진단적 또는 예후적으로 임상 테스트 절차의 일부로서 샘플 내의 폴리펩타이드 수준을 모니터링하는데, 예를 들어, 주어진 치료 요법의 효능을 결정하는데 유용할 수 있다. 검출은 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 검출가능한 물질에 커플링(즉, 물리적 연결)함으로써 용이해질 수 있다. 검출가능한 물질의 예로는 다양한 효소, 보결분자단, 형광물질, 발광물질, 생물발광물질, 및 방사성물질을 포함한다. 적합한 효소의 예로는 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, β-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적합한 보결분자단 복합체의 예로는 플래그 태그, myc 태그, 헤마글루티닌(HA) 태그, 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적합한 형광 물질의 예로는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피코에리트린(PE)을 포함하고; 발광 물질의 예로는 루미놀을 포함하고; 생물발광 물질의 예로는 루시퍼라제, 루시페린, 및 에쿠오린을 포함하고, 적합한 방사성 물질의 예로는 ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S 또는 ^{3}H를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드와 관련하여 "표지된"이라는 용어는 방사성 제제 또는 형광단(예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 또는 피코에리트린(PE) 또는 인도시아닌(Cy5))과 같은 검출가능한 물질을 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드에 커플링시킴(즉, 물리적으로 연결)에 의한 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 직접적인 표지화, 뿐만 아니라 검출가능한 물질과의 반응성에 의한 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 간접적인 표지화를 포괄하는 것으로 의도된다.

[0244] 본 발명의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드 접합체는 주어진 생물학적 반응을 변형시키는데 사용될 수 있다. 치료 모이어티는 고전적인 화학 치료제에 제한되는 것으로서 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 약물 모이어티는 원하는 생물학적 활성을 소유하는 단백질 또는 폴리펩타이드일 수 있다. 이러한 단백질은, 예를 들어, 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소 또는 디프테리아 독소와 같은 효소적으로 활성인 독소 또는 이의 활성 단편; 종양 괴사 인자 또는 인터페론-γ와 같은 단백질; 또는 예를 들어, 림포카인, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF"), 또는 기타 사이토카인 또는 성장 인자와 같은 생물학적 반응 조정제를 포함할 수 있다.

[0245] 1. 예방적 방법

[0246] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에게 코로나바이러스에 결합하는 ACE2-Fc 융합 단백질을 투여하여 바이러스가 ACE2에 결합하고 세포로 진입하는 것을 저해함으로써, 대상체에서 코로나바이러스 감염을 예방하는 방법을 제공한다. 예방제의 투여는 코로나바이러스 감염의 특징적인 증상이 나타나기 전에 감염이 예방되거나, 대안적으로 감염 증상이 감소 또는 제거되도록 일어날 수 있다. Fc 단편을 포함하는 융합 단백질의 연장된 반감기로 인해, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 통원 환경에서 피하 주사에 의해 투여될 수 있다. 이를 통해, 현장 또는 지역사회 환경에서 COVID-19에 걸린 군 복무자, 전문가 또는 민간인을 치료할 수 있고, 감염 확산 속도를 감소시키고, 입원을 줄이고, 노출되거나 위험에 처한 개체를 예방할 수 있다.

[0247] 부가적으로, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 투여는 예방을 받은 대상체가 코로나바이러스에 노출되어 적응 면역반응을 발달시키는 경우, 항체 의존적 면역증강(ADE)을 감소시키거나 제거할 수 있다.

[0248] 2. 치료 방법

[0249] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명에 포괄된 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 투여함으로써 코로나바이러스에 감염

된 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다. 융합 폴리펩타이드는 내인성 ACE2에 대한 코로나바이러스의 결합을 경쟁적으로 저해하여 바이러스에 의한 세포의 추가 감염을 금지한다.

[0250] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "작용제" 및 "치료제"는 대상체에게 투여되거나 세포 배양물에 적용되어 내인성 ACE2 폴리펩타이드에 대한 코로나바이러스의 결합을 저해하고/하거나 코로나바이러스 감염의 항체 의존적 면역증강을 감소시키거나 제거할 수 있는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 포함하는 임의의 화합물 또는 조성물로서 광범위하게 정의된다.

[0251] 본 발명의 치료 방법은 표 1에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 ACE2 세포외 도메인, 표 2, 3 또는 4의 아미노산 서열을 갖는 힌지 폴리펩타이드, 또는 시스테인-프롤린, 또는 프롤린 아미노산 힌지, 및 표 5에 나타낸 아미노산을 갖는 Fc 도메인 단편을 포함하는 것을 비롯하여, 본 발명의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드와 코로나바이러스(예를 들어, SARS-CoV-2)를 접촉시키는 것을 수반한다.

[0252] 본 발명의 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는 내인성 ACE2에 대한 코로나바이러스의 결합을 경쟁적으로 저해하고, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드가 세포 내로 바이러스 진입의 양을 조정한다는 사실로 인해, 또한 세포 내 코로나바이러스 활성(즉, 바이러스 복제)의 총량을 조정한다. 부가적으로, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 치료 농도로 사용하는 것은 바이러스에 결합하기 위한 내인성으로 발현된 항-코로나바이러스 항체를 능가할 것이며, 이로써 대상체의 ADE를 감소시키거나 제거할 것이다.

[0253] 한 실시양태에서, 작용제는 코로나바이러스와 내인성 ACE2 또는 다른 결합 파트너와의 상호작용을 저해하거나 증강시킨다. 또 다른 실시양태에서, 작용제는 코로나바이러스를 격리하여, 내인성 항체가 바이러스에 결합하는 것을 방지한다. 내인성 항체가 코로나바이러스에 결합하는 것을 감소시키거나 제거함으로써, 감염의 항체 의존적 면역증강이 감소되거나 제거된다.

[0254] 일부 실시양태에서, DF-COV 화합물은 항체 및/또는 백신에 내성이 있는 코로나바이러스 변이체의 치료제로서 사용된다. 이러한 변이체가 현재 나타나고 있다. 공개적으로 이용가능한 데이터에서 "남아공 변이체"는 백신에 대한 약간의 내성, 뿐만 아니라 Eli Lilly의 밤라니비맙(bamlanivimab)에 대한 완전한 내성을 비롯하여, 여러 임상적으로-관련된 단클론 항체에 대한 현저한 내성을 입증한다. 부가적인 데이터는 이것이 "브라질 변이체"에도 존재하는 바이러스 S-단백질의 수용체 결합 도메인 중의 E484K 치환 때문임을 시사한다.

[0255] 이들 방법은 시험관내에서 수행될 수 있거나(예를 들어, 세포 배양물을 작용제와 접촉시킴으로써, 여기서 세포 배양물은 접촉 시에 코로나바이러스에 감염되거나 코로나바이러스에 노출될 것이다), 또는 대안적으로 생체내에서 작용제와 체액을 접촉시킴으로써(예를 들어, 대상체에게 작용제를 투여함으로써) 수행될 수 있다. 이와 같이, 본 발명은 세포 내로 바이러스 진입을 저해하는 작용제로부터 이익을 얻을 수 있는, 코로나바이러스에 감염되었거나 코로나바이러스에 감염될 위험이 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 코로나바이러스 감염의 항체 의존적 면역증강을 저해하거나 감소시키는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 투여하는 것을 수반한다.

[0256] 코로나바이러스 감염을 치료하기 위한 임의의 특정 치료제의 효과는 치료 중인 대상체로부터 수득한 2개 이상의 샘플을 비교하여 모니터링할 수 있다. 일반적으로, 치료를 시작하기 전에 대상체로부터 1차 샘플이 수득되고, 치료 동안 하나 이상의 샘플이 수득된다. 이러한 사용에서, 요법 전에 코로나바이러스 감염(예를 들어, COVID-19)에 걸린 대상체로부터 세포의 발현 기준선이 결정되고, 그 다음, 코로나바이러스 감염에 걸린 대상체로부터 세포 발현의 기준선 상태의 변화가 요법 과정 동안 모니터링된다. 대안적으로, 치료 동안 수득한 2개 이상의 연속 샘플이 전처리 기준선 샘플의 필요 없이 사용될 수 있다. 이러한 사용에서, 대상체로부터 수득한 1차 샘플은 바이러스 부하가 대상체에서 증가하는지 또는 감소하는지를 결정하기 위한 기준선으로서 사용된다.

[0257] 또한, ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드는, 예를 들어, 항바이러스제, 항말라리아제, 항염증제, 진통제(예를 들어, 아세트아미노펜, 이부프로펜 등), 및 소분자 치료제, 예를 들어, 비제한적으로 렘데시비르를 갖는 다른 요법과 조합으로 투여될 수 있다.

[0258] V. 키트

[0259] 본 발명은 또한 코로나바이러스 감염을 치료하기 위한 키트를 포괄한다. 본 발명에 포괄되는 키트는 또한 본원에 제공된 바와 같은 개시된 발명의 방법에서 개시된 발명의 키트 또는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 사용을 개시하거나 설명하는 설명서를 포함할 수 있다. 키트는 또한 키트가 설계된 특정 응용예를 용이하게 하기 위해 부가적인 구성요소를 포함할 수도 있다. 예를 들어, 키트는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드를 투여하는 수단(예를 들어, 주사기, 멸균 바이알 및/또는 멸균 시약)을 부가적으로 함유할 수 있다. 키트는 개시된 발명의 방법에 사용

하기 위해 공인된 완충액 및 기타 시약을 부가적으로 포함할 수 있다. 비제한적 예로는 담체 단백질 또는 세제와 같은 비특이적 결합을 감소시키는 작용제를 포함한다.

[0260] **실시예**

[0261] **실시예 1: 재료 및 방법**

[0262] *DF-COV 작제물의 설계 및 생산*

[0263] DF-COV-01 및 DF-COV-02는 다음과 같이 설계했다. 인간 안지오텐신 전환 효소 2(ACE2)의 아미노산 서열은 Universal Protein 데이터베이스(UniProt)에서 입수했다. DF-COV-01의 경우, 전체 ACE2 세포외 도메인인 아미노산 18-730을 사용했다. DF-COV-02의 경우, ACE2 세포외 도메인의 하위세트인 아미노산 18-615를 사용했다. DF-COV-01 및 DF-COV-02 둘 모두에 대해, 촉매적 히스티딘 374 및 378을 돌연변이(H374N 및 H378N)시켜 ACE2 세포외 도메인이 효소적으로 비활성이 되도록 했다. 이들 ACE2 세포외 도메인에 대한 서열은 UniProt으로부터 입수한 인간 IgG4 힌지 영역 및 Fc 도메인의 아미노산 서열의 아미노 말단에 첨부되었다. DF-COV-01 및 DF-COV-02 둘 모두에서, IgG4 힌지 영역 및 Fc 도메인은 FAB-암 교환, Fcɣ 수용체 결합, 및 C1q 결합을 감소시키는 것으로 알려진 점 치환을 포함했다: S228P 및 L234E(이하 IgG4-SPLE로 지칭됨). DF-COV-01 및 DF-COV-02에 사용되는 정확한 힌지 영역 및 Fc 도메인 서열을 이하에 별도로 나열된다. DF-COV-01을 작제하기 위해, 이하에 나열된 적절한 ACE2 세포외 도메인은 이하에 나열된 적절한 힌지 영역의 아미노 말단에 직접 첨부했다. DF-COV-02를 작제하기 위해, 이하에 나열된 적절한 ACE2 세포외 도메인을 이하에 나열된 적절한 힌지 영역의 아미노 말단에 첨부했고 단일 글리신 잔기를 ACE2 세포외 도메인과 힌지 영역 사이에 삽입했다. DF-COV-01 및 DF-COV-02를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 전산적 역전사 및 코돈 최적화에 의해 수득했다. 신호 펩타이드 MEWSWVFLFFLSVTTGVHS를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 중쇄 및 경쇄 뉴클레오타이드 서열 모두에 대해 5'에 직접 첨부했다.

[0264] 뉴클레오타이드 서열을 합성하고 pLEV123 발현 벡터(LakePharma, Inc.)에 클로닝하고 서열을 PCR 증폭에 이어 Sanger 시퀀싱으로 확인했다. 그런 다음, 벡터를 PCR로 증폭시키고 증폭된 DNA를 품질 평가를 위해 아가로스 겔에서 진행시키고, 이의 서열을 다시 Sanger 시퀀싱으로 확인한 후, 형질감염을 진행했다. 단백질 생산 및 정제는 LakePharma의 표준 작업 절차에 따라 수행했다. 요약하면, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포를 진탕 플라스크에 현탁액으로 파종하고 무혈청 화학 합성 배지를 사용하여 확장시켰다. 형질감염 당일, 확장된 세포를 새로운 배지와 함께 새로운 플라스크에 파종했다. 발현 벡터는 CHO 세포에 일시적으로 형질감염시켰다. 세포는 14일 동안 회분식 공급 배양물로서 유지시켰다. 일시적인 생산 실행으로부터 조절된 배지를 수확하고 원심분리 및 여과에 의해 정화시켰다. 결합 완충액으로 사전-평형화된 단백질 A 컬럼 상에 상청액을 부하했다. OD280 값(NanoDrop, Thermo Scientific)이 0인 것으로 측정될 때까지 세척 완충액을 컬럼을 통해 통과시켰다. 표적 단백질은 낮은 pH 완충액에 의해 용출되었고, 분획을 수집하고, 각 분획의 OD280 값을 기록했다. 표적 단백질을 함유하는 분획을 모으고, 0.2μm 멤브레인 필터를 통해 여과했다. 단백질 농도는 OD280 값과 계산된 흡광 계수로부터 계산했다. LabChip GXII(Perkin Elmer)를 사용하여 표적 단백질의 모세관 전기영동(CE-SDS) 분석을 수행하였다. 낮은 내독소 수준을 확인하기 위해, 정제된 산물의 이반복 샘플을 발색원성 Limulus Amebocyte Lysate 방법(Endosafe-MCS, Charles River Laboratories)을 사용하여 정량했다.

[0265] *SARS-CoV-02 스파이크 단백질 결합 검정*

[0266] SARS-CoV-2 스파이크 단백질(S-단백질)에 대한 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 결합은 효소-연결 면역흡착 검정(ELISA)으로 평가했다. Corning Costar 96-웰 ELISA 플레이트를 pH 9.5의 탄산염 완충액(15mM Na_2CO_3 및 35mM $NaHCO_3$) 중의 재조합 3량체화-안정화된, 사전융합-안정화된, SARS-CoV-2 S-단백질(LakePharma, Ref #46328) 5 μg/mL로 4℃에서 밤새 코팅시켰다. 플레이트를 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween(Gibco에서 구입한 인산염 완충 식염수 pH 7.4 및 Sigma에서 구입한 0.05% Tween 20이 보충됨)에서 3회 세척했다. 그 다음, 플레이트를 PBS 중 5% 중량/부피의 밀크에서 인큐베이션하여 차단시켰다. 그 다음, 플레이트를 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 3회 세척했다. PBS-BSA(0.5% 소 혈청 알부민을 포함하는 PBS) 중 DF-COV-01 또는 DF-COV-02의 연속 2배 희석액을 ELISA 플레이트의 적절한 웰에 3 반복으로 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션했다. 그 다음, 플레이트를 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 3회 세척했다. PBS-BSA에 1:5000으로 희석된 서양고추냉이 퍼옥시다제-접합 항-인간 IgG 2차 항체(Southern Biotech, 2014-05)를 모든 웰에 첨가하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션했다. 그런 다음, 이 플레이트를 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 3회 세척했다. 퍼옥시다제 기질(TMB

Microwell Peroxidase Substrate System, KPL Inc.)을 첨가한 후 50% 부피의 1M 인산 정지 용액을 첨가했다. SARS-CoV-2 S-단백질에 대한 DF-COV 결합 정도를 나타내는 450nm에서의 광학 밀도는 Molecular Devices SpectraMax M3 플레이트 판독기를 사용하여 각 웰에 대해 결정했다.

[0267] *FcγRIIa 결합 검정*

[0268] 재조합 인간 FcγRIIa에 대한 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 결합을 ELISA로 평가했다. Corning Costar 96-웰 ELISA 플레이트를 pH 9.5 탄산염 완충액 중의 재조합 인간 Fcγ RIIA/CD32a(H167) 단백질(R&D Systems, 9595-CD-050) 1 μg/mL로 4℃에서 밤새 코팅했다. 플레이트를 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 3회 세척했다. 그 다음, 플레이트를 PBS 중 5% 중량/부피 밀크에서 인큐베이션하여 차단했다. 그 다음, 플레이트를 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 3회 세척했다. PBS-BSA 중 DF-COV-01, DF-COV-02, 또는 인간 ACE2-IgG1 Fc(LakePharma, Ref #46672 및 #46673)의 연속 2배 희석액을 ELISA 플레이트의 적절한 웰에 3 반복으로 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션했다. 그 다음, 플레이트를 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 3회 세척했다. PBS-BSA에 1:5000으로 희석된 서양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 항-인간 IgG F(ab')2 2차 항체(Southern Biotech, 2042-05)를 모든 웰에 첨가하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션했다. 그런 다음, 이 플레이트를 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 3회 세척했다. 퍼옥시다제 기질(TMB Microwell Peroxidase Substrate System, KPL Inc.)을 첨가한 후, 50% 부피의 1M 인산 정지 용액을 첨가했다. FcγRIIa에 대한 작제물 결합 정도를 나타내는 450nm에서의 광학 밀도는 Molecular Devices SpectraMax M3 플레이트 판독기를 사용하여 각 웰에 대해 결정했다.

[0269] *ACE2 효소 활성 검정*

[0270] ACE2 효소 활성의 평가는 형광측정 효소 활성 검정으로 수행했다. DF-COV-01, DF-COV-02 또는 인간 ACE2-IgG1 Fc(LakePharma, Ref #46672 & #46673)의 2배 연속 희석액을 96-웰 Corning Costar 플레이트에서 0.1% BSA, 1M NaCl, 75mM Tris, 0.5mM ZnCl2, pH 7.5를 함유하는 반응 완충액 100μL에 희석했다. Mca-YVADAPK(Dnp)-OH Fluorogenic Peptide Substrate(R&D Systems, ES007)를 50μM의 농도로 첨가했다. 반응 진행은 37℃에서 유지되는 Molecular Devices SpectraMax M3 플레이트 판독기를 사용하여 형광(여기 322nm, 방출 381nm)으로 모니터링했다. 형광의 변화는 반응 속도를 계산하는 데 사용했다. 반응 속도를 사용하여 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 ACE2 효소적 활성을 야생형 ACE2-IgG1 Fc의 활성과 비교했다.

[0271] *위형 바이러스 중화 연구*

[0272] 위형 SARS-CoV 및 SARS-CoV-2는 HIV 엔벨로프 당단백질 발현을 방지하는 돌연변이 및 표적 세포에서 루시퍼라제 발현을 유도하는 루시퍼라제 유전자를 함유하는 복제-결손 HIV-1 백본을 사용하여 생성했다. HEK293-T 세포를 하나는 SARS-CoV 또는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질용 발현 벡터이고, 다른 하나는 Env 결함 HIV-1 게놈을 보유하는 것인 2개의 플라스미드로 공동형질감염시켰다. 바이러스 입자를 함유하는 상청액은 형질감염 48시간 후에 수확했고 Centricon 70 농축기를 사용하여 농축하고 -80℃에서 냉동 보관했다. 표적 세포는 인간 ACE2 발현 벡터(pcDNA-hACE2)로 293T 세포를 일시적으로 형질감염시켜 생성했다. ACE2-형질감염된 293T 세포는 형질감염 24시간 후 표적 세포로 사용된 세포였다. 인간 ACE2 수용체로 일시적으로 형질감염된 293T 세포에서 슈도바이러스의 적정을 수행하여 감염 검정에서 초당 50,000 카운트/초(cps)를 생성하는 데 필요한 바이러스의 부피를 결정했다. 슈도바이러스의 적절한 부피를 인간 ACE2를 발현하는 293T 세포에 첨가하기 전에 실온에서 1시간 동안 DF-COV-01, DF-COV-02 또는 무관련 Fc 융합체의 연속 희석액과 함께 사전-인큐베이션했다. 슈도바이러스를 함유하는 배지는 24시간 후에 새로운 완전 배지로 교체했다. 추가 24시간 후, BrightGlo 루시퍼라제 검정(Promega)을 사용한 루시퍼라제 검출에 의해 감염을 정량하고 Victor3 플레이트 판독기(Perkin Elmer)에서 판독했다.

[0273] *약동학 연구*

[0274] 시리아 햄스터의 무게를 재고 8 mg/kg의 DF-COV-01 또는 DF-COV-02를 피하 주사했다. 주사 후 4시간, 8시간, 24시간, 48시간 및 72시간에 복재 정맥에서 50 μL에서 100 μL 사이의 정맥혈을 채취했다. 이 복재 혈액 샘플로부터의 혈청을 추후 분석을 위해 동결시켰다. 혈청 샘플에서 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 농도는 ELISA에 의해 결정했다. Corning Costar 96-웰 ELISA 플레이트를 pH 9.5의 탄산염 완충액 중 재조합 3량체화-안정화된, 사전 융합-안정화된, SARS-CoV-2 S-단백질(LakePharma, Ref #46328) 5 μg/mL로 4℃에서 밤새 코팅했다. 플레이트를 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 3회 세척했다. 그 다음, 플레이트를 PBS 중 5% 중량/부피 밀크에서 인큐베이션하여 차단시켰다. 그 다음, 플레이트를 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 3회 세척했다. PBS-BSA(0.5% 소 혈청 알부민을 포함하는 PBS) 중 혈청 샘플의 연속 2배 희석

액을 ELISA 플레이트의 적절한 웰에 3 반복으로 첨가하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션했다. 이는 표준 곡선을 정의하기 위해 공지된 농도의 DF-COV-01 또는 DF-COV-02 샘플과 나란히 수행했다. 그 다음, 플레이트를 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 3회 세척했다. PBS-BSA에 1:5000으로 희석된 서양고추냉이 퍼옥시다제-접합 항-인간 IgG 2차 항체(Southern Biotech, 2014-05)를 모든 웰에 첨가하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션했다. 그런 다음, 이 플레이트를 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 3회 세척했다. 퍼옥시다제 기질(TMB Microwell Peroxidase Substrate System, KPL Inc.)을 첨가한 후 50% 부피의 1M 인산 정지 용액을 첨가했다. SARS-CoV-2 S-단백질에 대한 DF-COV 결합 정도를 나타내는 450nm에서의 광학 밀도는 Molecular Devices SpectraMax M3 플레이트 판독기를 사용하여 각 웰에 대해 결정했다. 표준 곡선의 직선 범위에 속하는 혈청 희석액의 OD 405는 적절한 희석 계수를 감안한 후, 각 시점에서의 DF-COV-01 또는 DF-COV-02의 혈청 농도를 계산하기 위해 활용했다.

[0275] *항체-의존적 면역증강 검정*

[0276] FcɣRIIa를 발현하지만 ACE2를 발현하지 않는 표적 세포의 감염을 촉진하는 시약의 능력은 항체-의존적 면역증강(ADE)을 촉진하는 능력의 모델로 사용될 수 있다. 위형 SARS-CoV-2 바이러스는 복제 결손 HIV-1 벡터가 리포터로서 루시퍼라제 대신 녹색 형광 단백질(GFP) 유전자를 함유하는 것을 제외하고는, 전술한 바와 같이 생산 및 정제했다. ADE를 촉진하는 시약의 능력을 평가하기 위해 위형 바이러스를 적당한 시약, 즉 SARS-CoV-02 수용체-결합 도메인(RBD) 특이적 중화 항체(Sino Biological, #40592-MM57 또는 Genscript, A02038), 무관련 이소형 대조군 항체, DF-COV-01, DF-COV-02, 또는 무관련 Fc 융합체의 연속 희석액과 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 그 다음, 이것을 인간 FcɣRIIa를 발현하도록 형질전환되고, 유세포 분석에 의해 ACE2를 발현하지 않는 것으로 입증된 Jurkat 세포의 배양물(Promega)에 첨가했다. 5% CO_2 분위기에서 37℃로 24시간 인큐베이션한 후, 슈도바이러스를 함유하는 배지를 새로운 완전 배지로 교체한다. 동일한 조건 하에서 추가 24시간 인큐베이션한 후, Celigo Imaging Cytometer를 사용하여 정량적 면역형광 현미경법으로 GFP 발현을 결정하여 감염을 정량한다. GFP 발현에 의해 측정되는 감염은 항체-의존적 면역증강(항바이러스 항체에 의해 매개되는 Fc-수용체 발현 표적 세포로의 바이러스 진입)을 나타낸다.

[0277] SARS-CoV-2 RBD-특이적 항체에 의해 촉진되는 ADE를 저해하는 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 능력을 평가하기 위해, 위형 바이러스를 전술한 바와 같이 생산 및 정제하고 다양한 몰비의 SARS-CoV-02 RBD-특이적 항체 및 DF-COV-01, DF-COV-02 또는 무관련 Fc 융합체와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 상기와 같이, 이것을 인간 FcɣRIIa를 발현하도록 형질전환되고 유세포 분석에 의해 ACE2를 발현하지 않는 것으로 입증된 Jurkat 세포의 배양물에 첨가했다. 5% CO2 분위기에서 37℃로 24시간 인큐베이션한 후 슈도바이러스를 함유하는 배지를 새로운 완전 배지로 교체한다. 동일한 조건에서 추가로 24시간 인큐베이션한 후, Celigo Imaging Cytometer를 사용하여 정량적 면역형광 현미경법으로 GFP 발현을 결정하여 감염을 정량한다. GFP 발현에 의해 측정된 감염은 ADE를 나타내며, DF-COV-01 또는 DF-COV-02를 포함하는 조건에서 감염 감소 정도는 무관련 Fc 융합체를 포함하는 조건과 비교했을 때 ADE 저해의 척도로서 제공한다.

[0278] 바이러스 진입을 ADE의 척도로서 평가하는 것 외에도, SARS-CoV-02 RBD-특이적 항체, 이소형 대조군 항체, DF-COV-01, DF-COV-02 또는 무관련 Fc 융합 단백질에 의해 옵소닌화된 위형 SARS-CoV-2의 면역 복합체에 의한 FcɣRIIa 활성화를 평가할 수 있다. DF-COV-01 및 DF-COV-02는 위형 바이러스의 SARS-CoV-02 RBD-특이적 항체 옵소닌화를 차단하고 FcɣRIIa 활성화를 매개하는 능력에 대해서도 평가될 수 있다. GFP 리포터를 발현하는 SARS-CoV-2 슈도바이러스는 전술한 바와 같이 생산되고 SARS-CoV-02 RBD-특이적 항체, 이소형 대조군 항체, DF-COV-01, DF-COV-02, 또는 무관련 Fc 융합 단백질의 연속 희석액과 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 바이러스 옵소닌화를 차단하고 그에 따른 FcɣRIIa 활성화를 차단하는 DF-COV-01 또는 DF-COV-02의 능력을 평가하는 실험을 위해 슈도바이러스를 다양한 몰비의 SARS-CoV-02 RBD-특이적 항체 및 DF-COV-01, DF-COV-02 또는 무관련 Fc 융합체와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 이러한 각 실험 조건에서 FcɣRIIa 활성화는 키트의 권장 프로토콜에 따라 수행되는 Promega FcɣRIIa-H ADCP Bioassay(G9901)를 사용하여 평가한다. FcɣRIIa 활성화의 척도로서 제공되는 발광은 각 웰마다 Molecular Devices SpectraMax M3 플레이트 판독기를 사용하여 결정한다.

[0279] *생체내 효능 연구*

[0280] 생후 6주에서 8주 사이의 수컷 및 암컷 햄스터를 케타민-자일라진 마취 하에 100 μL의 조절 배지(USA-WA01-2020 균주의 Vero 계대 3, BEI Resources) 중 103 내지 105 플라크 형성 단위/밀리리터(pfu/mL) 사이의 SARS-CoV-2로 비강내 점적에 의해 감염시켰다. 같은 날에 햄스터의 무게를 재고 8 mg/kg의 DF-COV-01, DF-COV-02,

또는 비히클 대조군으로서 동량의 PBS를 피하 주사했다. 구인두 면봉채집물을 공격 직전에 시작하여 3일 동안 연장하여 1일 1회 바이러스 수송 배지에 수집했다. 공격 후 3일차에 동물의 절반 및 7일차에 절반에 대해 안락사 및 부검을 수행했고, 이들 날에 각각 가장 높은 바이러스 역가 및 가장 심각한 폐 병리를 나타냈다. 이들 시점에서 바이러스 적정 및 조직병리학을 위해 폐를 포함한 여러 조직을 수집한다. 바이러스 역가는 Vero 세포 단층 플라크 검정에 의해 결정했다. Vero 세포 단층은 6-웰 Costar 조직 배양물 처리된 플레이트에서 10% 태아 소 혈청이 보충된 1mL Eagle's MEM 배지에서 80% 융합도(confluency)까지 성장시켰다. 바이러스 수송 배지에서 일련의 10배 희석 샘플을 96-웰 플레이트에 준비하고 각 샘플 100μL를 Vero 세포 단층을 함유하는 별도의 적절한 웰에 첨가했다. 접종물을 고르게 분배하기 위해 각 플레이트를 흔든 후, 이들 배양물을 5% CO_2 분위기에서 37℃로 60 내지 90분 동안 인큐베이션했다. 이어서, 접종물을 함유하는 배지를 제거하고 단층을 PBS로 세척했다. 10% 소 태아 혈청 및 42℃로 미리 냉각된 비등 1% 아가로스 용액이 보충된 Eagle's MEM 배지의 동일한 부피를 함유하는 아가로스 오버레이를, 각각 세척된 Vero 단층 위에 첨가하고 15분 동안 냉각한 다음, 5% CO_2 분위기에서 37℃로 4일 동안 인큐베이션했다. 그 다음, 플레이트를 유사하게 제조한 완전 MEM 배지/아가로스 오버레이에서 뉴트럴 레드의 1:10,000 희석액으로 염색했다. 5% CO_2 분위기에서 37℃로 밤샘 인큐베이션한 후 플라크를 계수했다. 접종물의 희석액을 사용하여 플라크 수를 초기 접종물 샘플의 밀리리터당 플라크 형성 단위의 수(pfu/mL)로 변환시켰다.

[0281] **실시예 2: 시험관내에서 SARS-CoV-2에 대한 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 결합 평가**

[0282] 재조합 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(LakePharma에서 생산)에 결합하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 능력을 시험관내에서 평가했다. 요약하면, DF-COV-01 및 DF-COV-02와 재조합 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 결합을 효소-연결 면역흡착법(ELISA)으로 검출했다. SARS-CoV-2 스파이크 단백질을 96웰 플레이트에 고정시켰다. 그런 다음, 플레이트를 밀크 단백질로 차단하고, 세척한 다음, DF-COV-01 또는 DF-COV-02의 연속 2배 희석액을 적절한 웰에 첨가했다. 플레이트를 다시 세척하고 DF-COV-01 또는 DF-COV-02의 결합을 퍼옥시다제-표지된 항인간 IgG 2차 항체로 검출했다. 비색용 퍼옥시다제 기질을 첨가한 후, 광학 밀도 플레이트 판독기를 사용하여 결합을 측정했다. 결합(광학 밀도)은 결합 곡선을 생성하기 위해 DF-COV-01 또는 DF-COV-02 농도의 함수로서 플로팅했다(**도 2a 및 2b**). 결합은 이전에 생성된 야생형 ACE2-Fc 융합체의 결합과 비교할 수 있다. 비특이적 Fc 융합(인간 PD-L1-Fc)은 음성 대조군으로서 제공할 수 있다.

[0283] **실시예 3: 시험관내에서 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 효소 활성의 평가**

[0284] DF-COV-01 및 DF-COV-02의 ACE2 효소 활성의 평가는 상업적으로 이용가능한 형광원성 ACE2 기질(Mca-YVADAPK(Dnp)-OH)을 활용한 형광측정 효소 활성 검정에 의해 수행한다. 이 검정은 이전에 기술된 바와 같이 수행된다(Imai 등 (2005) *Nature*, 436(7047):112-6). 간략하게, 반응은 37℃에서 0.1% BSA, 1M NaCl, 75mM 트리스, 0.5mM $ZnCl_2$를 함유하는 ACE2 효소 활성에 도움이 되는 pH 7.5 완충액에서 수행된다. 형광의 변화는 효소 활성을 나타내며 형광 플레이트 판독기를 사용하여 모니터한다. DF-COV-01 및 DF-COV-02의 ACE2 효소 활성은 이전에 생산된 야생형 효소 활성 ACE2-Fc 융합체와 비교한다. 비특이적 Fc 융합체는 음성 대조군으로서 제공한다.

[0285] 효소 활성에 대해, 다양한 농도의 DF-COV-01 또는 DF-COV-02 또는 대조군에 대한 반응 속도(형광 변화의 도함수)를 비교한다.

[0286] **실시예 4: DF-COV-01 및 DF-COV-02는 시험관내에서 천연 SARS-CoV-2 바이러스 및 SARS-CoV-2 슈도바이러스에 의해 iPSC(iAT2 세포)에서 유래된 인간 폐포 2형 세포의 감염을 저해한다**

[0287] 천연 SARS-CoV-2 바이러스 모델을 사용한 인간 2형 폐포 세포 감염 모델은 유도 만능 줄기 세포(iPSC)로부터 분화된 폐포 2형 세포(AT2)인 iAT2 세포를 활용한다. 이러한 세포 및 공기-액체 계면 2D 배양물을 이전에 기술된 바와 같이 제조한다(Kristine 등 (2020) *bioRxiv*, biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.03.132639v1).

[0288] **실시예 5: SARS-CoV-2에 감염된 iAT2 세포의 시험관내 예방적 및 치료요법적 치료.**

[0289] 2가지 연구를 수행한다: (1) SARS-CoV-2 감염과 동시에 DF-COV-01 또는 DF-COV-02가 투여되고 이후 iAT2 배양물에서 유지되는 예방적 연구, 및 (2) DF-COV-01 또는 DF-COV-02를 SARS-CoV-2 감염 1일 후 iAT2 배양물에 투여하고 그 후 iAT2 배양물에서 유지시킨 치료 연구. 두 실험 모두 바이러스 역가는 감염 후 4일째 정량적 RT-PCR에 의해 정량화한다. 바이러스 역가는 치료 없이 1일부터 4일까지 눈에 띄게 증가한다. 이 두 연구 각각에서 치료는 DF-COV-01 또는 DF-COV-02의 2배 연속 희석액 또는 음성 대조군으로 활용된 비특이적 Fc 융합체를 포함한다.

[0290] 배양물 중 바이러스 역가는 정량적 RT-PCR로 측정하고 iAT2 폐포세포의 감염은 바이러스 N 단백질에 대한 정량적 면역형광 현미경법으로 평가한다. 바이러스 역가 데이터를 기반으로 2개의 별도의 중화 곡선이 생성되고 N 단백질 발현이 면역형광에 의해 정량된다. 이러한 각 곡선에서 계산된 주요 데이터는 다음과 같다: (1) 이 시스템에서 DF-COV 바이러스 중화에 대한 IC50 및 (2) DF-COV가 바이러스를 완전히 또는 거의 완전히 중화시키는 농도.

[0291] **실시예 6: ACE2-형질도입된 293 세포의 SARS-CoV-2 슈도바이러스 감염의 DF-COV-매개 저해**

[0292] 비활성 ACE2 도메인 및 Fcɣ 수용체(예를 들어, FcɣIIa 수용체)에 결합하지 않는 Fc 도메인 단편을 포함하는 ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드와 RBD 항체 및 PDL-1 Fc 폴리펩타이드 사이의 바이러스 중화를 비교하기 위해 표준 슈도바이러스 중화 연구를 아래에 상세히 설명된 바와 같이 수행했다.

[0293] BioSafety Level(BSL)-2 조건 하에 DF-COV-01 또는 DF-COV-02에 의한 중화를 평가하기 위해 SARS-CoV-2의 전체 길이 스파이크 단백질을 발현하는 슈도바이러스를 사용한다. 슈도바이러스는 반딧불이 루시퍼라제를 발현하는 복제 결손 HIV-1 백본을 사용하여 생성했다. SARS-CoV-2 스파이크 단백질이 결여된 바이러스를 대조군으로 생성했다. 슈도바이러스를 사용하여 인간 ACE2(293A/ACE2)로 형질감염된 HEK293A 세포를 감염시켰다. 슈도바이러스의 2배 연속 희석액을 다양한 농도의 DF-COV-01 또는 DF-COV-02 또는 대조군으로서 비특이적 Fc-융합체와 함께 인큐베이션했다. 감염 후, 세포를 인큐베이션했고 바이러스 감염을 정량하기 위해 수확된 세포의 용해물에 대해 루시퍼라제 검정을 수행한다.

[0294] 슈도바이러스 감염의 대체물로서 발광은 DF-COV-01 또는 DF-COV-02 또는 바이러스 중화 곡선을 생성하기 위한 관련 대조군의 농도의 함수로서 플로팅했다(**도 3**). 이 곡선을 사용하여 이 시스템에서 DF-COV-01 또는 DF-COV-02 바이러스 중화에 대한 IC50 및 DF-COV-01 또는 DF-COV-02가 완전히 또는 거의 완전히 바이러스를 중화시킨 농도를 계산했다.

[0295] **실시예 7: FcɣRIIa에 대한 DF-COV 결합 및 IgG1 Fc에 대한 ACE2-Fc 결합의 비교**

[0296] ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 FcɣRIIa 결합은 이전에 기술된 바와 같은 표면 플라즈몬 공명을 사용하여 이전에 제조된 인간 IgG1 Fc 도메인을 갖는 ACE2-Fc의 결합과 비교한다(Schlothauer 등 (2016) *Protein Eng. Des. Sel.*, 29(10):457-66). 요약하면, 상업적으로 이용가능한 재조합 His-표지된 FcɣRIIa 세포외 도메인(R&D Systems)을 확립된 키트 프로토콜을 사용하여 항-His 포획 항체로 사전-코팅된 CM5 Biacore 칩에 고정시킨다. Biacore 분석 동안 100nM 농도의 His-표지된 FcɣRIIa를 HBS-P+ 진행 완충액에 적용한다. 이어서, DF-COV-01 또는 DF-COV-02 또는 IgG1 Fc를 갖는 ACE2-Fc를 100nM의 농도로 힙에 적용한다. 결합 및 해리 단계는 표준 프로토콜에 의해 모니터하고 결합 상수는 Biacore 평가 소프트웨어에 의해 계산하고 DF-COV 및 IgG Fc 도메인을 갖는 ACE2-Fc에 대한 FcɣRIIa 결합의 상대적 친화도를 비교하기 위해 활용한다. 이 프로토콜은 표면 플라즈몬 공명 대신 ELISA 분석을 사용하기 위해 수정될 수 있다.

[0297] **실시예 8: FcɣRIIa에 대한 DF-COV 결합 및 다클론 인간 IgG에 대한 ACE2-Fc 결합의 비교**

[0298] ACE2-Fc 융합 폴리펩타이드의 FcɣRIIa 결합을 ELISA로 다클론 인간 IgG의 결합과 비교했다. 요약하면, 재조합 인간 FcɣRIIa(R&D Systems)를 ELISA 플레이트에 고정시켰다. ELSIA 플레이트를 차단하고 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 3회 세척한 후, PBS-BSA 중 DF-COV-01, DF-COV-02 또는 다클론 인간 IgG(BioXCell)의 연속 희석액을 적절한 웰에 3반복으로 적용하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션했다. BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 ELISA 플레이트를 3회 세척한 후, 모든 웰을 PBS-BSA에 1:5000으로 희석된 서양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 항-인간 IgG F(ab')2 2차 항체(Southern Biotech)와 함께 실온에서 15분 동안 인큐베이션했다. 그런 다음 플레이트를 BioTek 405TS Microplate Washer를 사용하여 PBS-tween에서 3회 세척했다. 퍼옥시다제 기질(TMB Microwell Peroxidase Substrate System, KPL Inc.)을 첨가한 후, 50% 부피의 1M 인산 정지 용액을 첨가했다. FcɣRIIa에 대한 DF-COV 또는 인간 IgG의 결합 정도를 나타내는 450 nm에서의 광학 밀도는 Molecular Devices SpectraMax M3 플레이트 판독기를 사용하여 각 웰에 대해 결정했다(도 4a 및 도 4b).

[0299] **실시예 9: DF-COV-01 및 DF-COV-02는 시험관내에서 ADE를 차단한다**

[0300] ADE를 차단하는 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 능력을 평가하기 위해, 시험관내에서 ADE가 MERS-CoV 중화 항체에 의해 유도됨을 입증한 전술한 것과 유사한 모델 시스템을 이용한다(Wan 등(2020)). 먼저, SARS-CoV-2 RBD에 대한 중화 항체가 시험관내에서 ADE를 촉진할 수 있는지 여부를 결정한다. 이를 위해 FcɣRIIa를 발현하는 상업용

Jurkat 세포(Promega)를 표적 세포로서 사용한다. Jurkat는 Human Protein Atlas(www.proteinatlas.org/ENSG00000130234-ACE2/tissue/T-cells)를 사용한 T-세포 RNAseq 데이터 검색을 기반으로 할 때, ACE2를 발현하지 않으므로, 이러한 세포는 감염이 ADE에 의해 매개되지 않는 한, SARS-CoV-2 슈도바이러스에 의한 감염에 민감하지 않을 것이다. 이 세포는 녹색 형광 단백질(GFP) 리포터를 함유하는 SARS-CoV-2 슈도바이러스의 존재 하에 배양한다. Jurkat 세포에서 GFP 발현은 바이러스 진입을 나타낸다. 이러한 공동배양물에, SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 RBD에 결합하는 것으로 알려진 SARS-CoV-2 중화 항체의 다양한 농도가 첨가된다. 현재 상업적으로 이용가능한 몇 가지 SARS-CoV-2 RBD-특이적 중화 항체가 있으며 (www.genscript.com/antibody/A02038-SARS_CoV_2_Spike_S1_Antibody_HC2001_Human_Chimeric.html; www.sinobiological.com/antibodies/cov-spike-40592-mm57), 이 중 일부는 인간 IgG1 Fc 도메인을 갖는다. FcγRIIa-매개의 바이러스 진입을 통해 ADE를 유도하는 이들 항체의 능력은 유세포측정을 사용하여 Jurkat 표적 세포에서 GFP 형광을 측정함으로써 평가한다. 상업적으로 이용가능한 다양한 항체가 이 시스템에서 검정될 수 있다. FcγRIIa Jurkat 세포 단독 또는 항체가 아닌 슈도바이러스와 함께 인큐베이션한 FcγRIIa Jurkat 세포를 이용한 대조군 샘플과 비교한다.

[0301] 이러한 상업적으로 이용가능한 FcγRIIa Jurkat 세포의 사용은 FcγRIIa 활성화의 리포터로서 기능하도록 조작되었기 때문에 부가적인 이점이 있다. 면역 복합체에 의한 FcγRIIa 클러스터링은 이들 세포에서 루시퍼라제 리포터의 발현을 촉발한다. 따라서, GFP 발현을 측정하여 바이러스 진입을 평가하는 것 외에도, SARS-CoV-2 슈도바이러스와 중화 항체의 면역 복합체에 의한 FcγRIIa 활성화도 측정할 수 있다. FcγRIIa Jurkat 세포 단독 또는 항체가 아닌 슈도바이러스와 함께 인큐베이션된 FcγRIIa Jurkat 세포를 사용한 대조군 샘플에 대해 비교될 수 있다. FcγRIIa-의존성 바이러스 진입, 면역 복합체에 의한 FcγRIIa 활성화, 또는 둘 모두는 확실하게 측정될 수 있다. 이 시스템은 DF-COV-01 및 DF-COV-02를 사용한 치료가 유사한 사전제조된 IgG1 Fc 도메인을 갖는 ACE2-Fc보다 ADE(바이러스 진입 및/또는 FcγRIIa 활성화로 측정됨)를 더 적게 초래할 수 있고 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 RBD에 특이적인 중화 항체에 의해 유도된 ADE를 차단할 수 있음을 보여주기 위해 사용된다.

[0302] 슈도바이러스 진입은 유세포측정을 사용하여 표적 세포에서 GFP 발현에 의해 측정된다. FcγRIIa의 활성화는 플레이트 판독기를 사용하여 FcγRIIa 리포터로서 조작된 이러한 표적 세포의 발광에 의해 측정된다.

[0303] **실시예 10: SARS-CoV-2 감염의 생체내 모델에서 바이러스 역가를 감소시키고 폐 병리를 개선하는데 있어서 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 효능 결정**

[0304] SARS-CoV-2 바이러스 감염을 감소시키는 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 능력은 인간 질환의 많은 특징을 보여주는 햄스터 감염 공격 모델에서 평가한다. 이 모델을 검증하기 위해 BSL-3 동물 시설에서 약 50마리의 햄스터에게 SARS-CoV-2를 비강내 공격했다. 임상 질환은 일시적인 발열과 무기력으로 경미하지만, 심각한 증상은 없었다. 구강 면봉채집물은 공격 후 3일째에 감염성 바이러스를 일관되게 함유하여 바이러스 배출을 정량하는 수단을 제공한다. 바이러스의 기관 부담율은 3일째 기도에서 높지만, 공격 후 7일 또는 21일째에는 검출되지 않았다. 표 9는 공격 후 3일째에 10마리 햄스터로부터의 조직 및 구인두 면봉채집물 중의 역가를 제공한다.

표 9: 역가

PFU/그램 또는 면봉채집물	폐	비갑개	구강 면봉채집물
평균	4.13E+06	4.32E+07	8.56E+02
최소	5.70E+05	2.30E+07	3.10E+02
최대	6.90E+06	5.50E+07	1.50E+03

[0305]

[0306] 조직병리학적 평가는 공격 후 3일째 중등도의 중증 급성 기관지간질 폐렴을 나타냈고, 이는 감염성 바이러스의 결여에도 불구하고 7일째에 더 심각했다. 이러한 병변은 매우 일관적이었고, 폐 병변(예를 들어, 폐 섬유증)의 해결을 더 잘 특성화하기 위한 실험이 진행 중이다.

[0307] 생후 6주에서 8주 사이의 수컷 및 암컷 햄스터를 케타민-자일라진 마취 하에 100 μL 부피 중 10^3 내지 10^5 pfu 사이의 SARS-CoV-2(원래 BEI Resources로부터 얻은 USA-WA01-2020 균주의 Vero 계대 3)로 비강내 점적에 의해 감염시켰다. 매일 체중을 기록하고, 매일 2회 피하 이식된 Life Chips(Destron-Fearing)로부터 체온을

기록하고, 1일 2회 임상 평가 및 스코어링(4점 스케일)을 사용하여 바이러스 공격 전날부터 동물을 임상적으로 면밀히 모니터한다. 이 모니터링 및 생리학적 데이터는 독성을 평가하는 데 사용된다. SARS-CoV-2 감염은 햄스터에서 무증상이므로, 감염 단독으로부터의 스코어링 및 임상 평가에서 정상으로부터 벗어나지 않을 것으로 예상된다.

[0308] 연구 결과에 대한 데이터를 수집하기 위해, 공격 직전에 시작하여 3일 동안 연장하여 1일 1회 바이러스 수송 배지에 구인두 면봉채집물을 수집한다. 안락사 및 부검은 공격 후 3일 및 7일째 별도의 실험으로 수행하고, 그 날에 각각 가장 높은 바이러스 역가 및 가장 심각한 폐 병리를 나타낸다. 폐를 포함한 여러 조직을 이 시점에 바이러스 적정 및 조직병리학을 위해 수집한다.

[0309] DF-COV-01 또는 DF-COV-02는 바이러스 공격과 동시에 3개의 치료 그룹에서 각 치료 그룹마다 DF-COV-01 또는 DF-COV-02의 상승 용량으로 피하 투여한다. 투여량은 다른 수용체 Fc-융합체 및 항체를 유지하면서, 혈관외 분포 60% 및 혈관내 분포 40%로 추정되는 특정 농도의 약물이 동물의 세포외액에서 달성되도록 계산한다. 치료군에 대해 표적화된 특정 농도는 (1) 시험관내 슈도바이러스 중화를 위한 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 IC50에 대한 동등량, (2) 시험관내에서 슈도바이러스의 완전 또는 거의 완전한 중화를 달성하는 데 필요한 농도에 대한 동등량, 및 (3) 시험관내 슈도바이러스의 완전 또는 거의 완전한 중화를 달성하는 데 필요한 농도의 약간의 배수량(예를 들어, 2X 내지 10X)이다. 각 처리군은 6마리의 동물로 이루어진다. 비히클 대조군으로서 식염수로 처리된 6마리 동물의 대조군이 각 실험에 포함된다. 실험은 3일 및 7일 종점으로 반복한다. 3일차 종점 실험은 바이러스 역가에 대한 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 효과를 평가하는 데 사용한다. 7일차 종점 실험은 DF-COV-01 및 DF-COV-02가 폐 병리에 미치는 영향을 평가한다. 비갑개, 구인두 및 폐 바이러스 역가는 3일차에 치료군과 대조군 간에 비교한다. 치료군 및 대조군에서 3일 및 7일차 폐 조직병리학은 위원회-인증 수의 병리학자에 의해 평가된다.

[0310] 데이터는 가변성을 제어하기 위해 log10 변환으로 처리한다. 각 실험에 대해 전술한 바와 같은 각 처리군에 6마리의 동물을 무작위 배정하고(4개 그룹: DF-COV-01 또는 DF-COV-02 저용량, DF-COV-01 또는 DF-COV-02 중간 용량, DF-COV-01 또는 DF-COV-02 고용량, 또는 DF-COV-02 용량 및 비히클 대조군), 각 그룹에 동일 분산을 가정한다. 일원 분산 분석(ANOVA)을 수행하여, 0.10 양측 유의 수준에서 테스트하고 Dunnett의 접근 방식을 사용하여 테스트 다중도에 대한 p-값을 효율적으로 조정하기 위해 각 활성제를 비히클 대조군과 비교한다. 이 연구는 대조군과 상이한 적어도 하나의 치료군을 식별하는데 있어서 90% 초과의 검정력을 갖고 있다.

[0311] 1일 2회 임상 평가 스코어는 독성에 대해 평가할 수 있다. 스코어는 임계값화(thresholding)를 통해 이진 변수로 변환된다. 그룹당 6마리의 마우스를 이용 시, 대조군의 12%와 비교하여 처리된 동물의 88%에서 발생하는 독성을 검출하는데 83%의 검정력이 있다. 이러한 비교는 0.10 양측 유의 수준에서 수행되는 Fisher 정확 검정을 기반으로 한다.

[0312] **실시예 11: 비인간 영장류에서 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 독성 평가**

[0313] 순환 약물 수준을 측정하기 위한 혈액 샘플링과 함께 표준 14일 독성 연구 설계는 표 10에 개략된 바와 같다. 임상 시험에서 피하 투여 군 외에 정맥내 투여 군을 포함하는 옵션을 보존하기 위한 안전성 데이터를 제공하기 위해, 피하 및 정맥내 투여 경로 둘 모두를 별도의 그룹으로 활용한다.

표 10

치료 그룹	평가변수 그룹	회복 그룹	치료
IV 위약	3 수컷 + 3 암컷	3 수컷 + 3 암컷	14 일 동안 표시된 치료의 매일 투여. 순환 약물을 측정하기 위한 혈액 샘플은 1 일 및 14 일에 채취한다. 평가변수 그룹은 독성의 조직병리학적 평가를 위해 15 일에 종결시킨다. 회복 그룹은 추가 7 일 동안 관찰하고, 임의의 관찰되는 독성의 해결에 대한 조직학적 평가를 위해 22 일에 종결시킨다.
IV 저용량	3 수컷 + 3 암컷	3 수컷 + 3 암컷	
IV 중간 용량	3 수컷 + 3 암컷	3 수컷 + 3 암컷	
IV 고용량	3 수컷 + 3 암컷	3 수컷 + 3 암컷	
피하 위약	3 수컷 + 3 암컷	3 수컷 + 3 암컷	
피하 저용량	3 수컷 + 3 암컷	3 수컷 + 3 암컷	
피하 중간 용량	3 수컷 + 3 암컷	3 수컷 + 3 암컷	
피하 고용량	3 수컷 + 3 암컷	3 수컷 + 3 암컷	

[0314]

[0315] **실시예 12: DF-COV-02는 조직 노출이 DF-COV-01보다 우수하다.**

[0316] DF-COV-01 및 DF-COV-02의 효소 활성을 야생형 ACE2 세포외 도메인을 함유하는 상응하는 ACE2-Fc 융합체의 효소 활성과 비교했다. 결과는 매칭된 야생형 ACE2-Fc 융합체가 효소 활성을 나타내는 반면, DF-COV-01 및 DF-COV-02는 ACE2 효소 활성을 나타내지 않음을 보여주었다(**도 5**).

[0317] 위형 SARS-CoV-2 바이러스 입자를 중화하는 DF-COV-01 및 DF-COV-02의 능력은 루시퍼라제 및 GFP 리포터 유전자 둘 모두를 함유하는 바이러스 입자를 사용하고 ACE2 발현 293T 세포를 표적으로 사용하여 특성화했다. 루시퍼라제 발현(**도 6a**) 및 GFP 발현(**도 6b**) 결과는 모두 DF-COV-01 및 DF-COV-02 둘 모두가 ACE2-발현 293T 세포로의 바이러스 진입을 저해함을 보여주었고, DF-COV-01이 DF-COV-02보다 더욱 강력하게 중화한다.

[0318] 전술한 바와 같이, DF-COV-01이 DF-COV-02보다 우수한 시험관내 바이러스 중화 활성을 갖고 있지만, 놀랍게도 DF-COV-02는 특정 실험에서 DF-COV-01보다 생체내 SARS-CoV-2에 대해 우수한 활성을 갖는다(**도 7**). 이는 **도 8**의 약동학 곡선으로부터 계산된 더 큰 분포 부피에 의해 입증되는 바와 같이, DF-COV-02의 더 우수한 말초 조직 침투 때문인 것으로 여겨진다. 따라서, DF-COV-01과 같이 전체 ACE2 세포외 도메인을 활용하는 큰 ACE2-Fc 융합체는 일부 실험에서는 더 우수한 말초 조직 침투를 가져 바이러스 중화가 필요로 되는 조직에서 우수한 약물 노출을 갖는 더 작은 ACE2-Fc 융합체보다 열등하다. 이러한 조직 침투는 일부 상황에서 유용할 수 있다.

[0319] SARS-CoV-2 바이러스에 대한 DF-COV-01, DF-COV-02, DF-COV-03 및 DF-COV-04의 활성을 생체내에서 추가로 특성화했다. 이와 관련하여, **도 9a**는 구인두 바이러스 역가를 비교한다. **도 9b**는 비갑개 바이러스 역가를 비교한다. **도 9c**는 폐 역가를 비교한다. **도 9d**는 특정 일의 체중을 비교한 것이고, **도 9e**는 시간 경과에 따른 체중을 비교한 것이다. DF-COV-01은 구인두 역가, 비갑개 역가, 및 폐 역가를 감소시켰고, 햄스터에서 SARS-CoV-2 감염의 징후인 체중 손실에 대해 보호했다. 이러한 실험 결과에 따라, 일부 실시양태에서, DF-COV-01이 바람직한 작제물이다.

[0320] **실시예 13: 부가적인 작제물, DF-COV-03 및 DF-COV-04, 및 이들의 특성**

[0321] 부가적인 작제물로서, DF-COV-03 및 DF-COV-04를 설계하고 발현시켰다. 이들의 서열은 표 7에 제공된다. 다양한 작제물의 예시적인 도시로서, 도 10a 내지 도 12b가 제공되고, 여기서, 도 10a는 DF-COV-01을 도시하고, 도 10b는 DF-COV-02를 도시하며, 도 11은 DF-COV-03을 도시하고, 도 12a는 SARS-CoV-2 S-단백질 RBD에 ACE2 메탈로프

로테아제 도메인이 결합한 전체 길이의 SARS-CoV-2 S-단백질 구조의 오버레이를 도시한 것이며, 도 12b는 DF-COV-04를 도시한 것이다.

[0322] 놀랍게도, 결과는 DF-COV-04에서와 같이 ACE2와 Fc 도메인의 배향을 역전시키면 중화가 개선된다는 것을 보여주었다(**도 13**). 다시 놀랍게도, 결과는 **도 13**(및 **도 6**)에서 시험관내 바이러스 중화의 상대적 효력이 바이러스 S-단백질에 대한 결합 결합력과 상관성이 없다는 것을 보여주었다(**도 14**). DF-COV-01과 DF-COV-02는 둘 모두가 바이러스 S-단백질에 대해 동일한 결합력을 갖지만, DF-COV-01은 시험관내에서 DF-COV-02보다 더 강력하게 중화한다. DF-COV-03은 DF-COV-01보다 바이러스 S-단백질에 대한 더 높은 결합 결합력을 갖지만, 덜 강력하게 중화한다. 반대로 DF-COV-04는 DF-COV-02 및 DF-COV-03보다 더 강력하게 중화하지만, 더 낮은 결합 결합력을 갖는다.

[0323] **실시예 14: 작제물의 결합 친화도, 안정성 및 기능**

[0324] SARS-CoV-2 S-단백질에 대한 DF-COV-01, DF-COV-02, DF-COV-03 및 DF-COV-04의 결합 친화도는 DF-COV 화합물은 고정화시키고 SARS-CoV-2 S-단백질은 용액 중에서 생물층 간섭계(Octet)로 결정했다. DF-COV-01 및 DF-COV-02는 DF-COV-03 및 DF-COV-04보다 SARS-CoV-2 S-단백질에 대해 더 높은 친화도를 갖고 있었다(**도 15a 및 도 15b**).

[0325] 결과에 기초할 때, 일부 실시양태에서, DF-COV-01은 적어도 (1) 화합물 2 및 3보다 바이러스 S-단백질에 대해 더 높은 결합력을 갖고(도 15a 및 도 15b에서 측정되는 바와 같이), (2) 다른 화합물보다 슈도바이러스 중화 연구에 더 낮은 IC50을 갖고, (3) 다른 화합물보다 햄스터에서 더 긴 혈청 반감기를 가지며, (4) 햄스터 모델에서 다른 화합물보다 더 많이 구인두, 비갑개 및 폐 바이러스 역가를 낮추고 다른 화합물보다 더 많이 체중 손실에 대해 보호한다는 예상치 못한 발견으로 인해 바람직한 화합물이다.

[0326] 또한, DF-COV-01, DF-COV-02, DF-COV-03, DF-COV-04 각각은 진동 메쉬 분무기에 의해 분무되었고, 그 다음 마이크로원심분리기 튜브에 수집했다. 고정된 SARS-CoV-2 S-단백질에 대한 분무된 화합물의 결합을 분무 전에 채취한 샘플의 결합과 비교했다. 결합은 항-인간 IgG-HRP 2차 항체를 통해 검출했다. 4가지 DF-COV 화합물 모두에서, 분무된 샘플과 분무되지 않은 샘플 간에 S-단백질 결합 결합력의 유의미한 차이는 없었다(**도 16a** 내지 **도 16d**).

[0327] 결과에 기초할 때, 일부 실시양태에서, 투여 경로는 IV 또는 흡입(분무)을 통한 것이다. **도 16a** 내지 **도 16d**는 화합물이 분무될 때 안정하다는 것을 입증한다(분무 후 바이러스 S-단백질에 대한 결합력의 감소가 없음). 또한 화합물이 분무된 후 슈도바이러스를 중화할 수 있는 것으로 여겨진다.

[0328] **도 17**은 ACE2의 펩티다제 도메인(PD) 및 콜렉트린-유사 도메인(CLD)을 모두 함유하는 ACE2-Fc 융합체인 DF-COV-01이 CLD가 생략된 것 외에는 동일한 ACE2-Fc 융합체인 DF-COV-02보다 더 긴 반감기를 갖고 있다는 예상치 못한 발견을 입증한다. CLD 대신에 Fc 도메인으로부터 ACE2 PD를 분리하는 유연한 인공 링커를 함유하는 DF-COV-03도 CLD-함유 DF-COV-01보다 더 짧은 반감기를 갖는다. ACE2 PD가 Fc 도메인의 C-말단에 첨부되어 있고 유연한 인공 링커에 의해 분리되어 있는(ACE2 CLD는 포함되지 않음) DF-COV-04도 짧은 반감기를 갖고 있었다.

[0329] DF-COV-01은 ACE2 CLD(ACE2의 아미노산 616 내지 740)의 막근접(세포외) 부분을 포함하는 ACE2-Fc 융합체이다. 예상치 않게, DF-COV-01이 CLD가 생략된 것 외에는 동일한 ACE2-Fc 융합체인 DF-COV-02보다 훨씬 긴 혈청 반감기를 갖고 있는 것으로 결정되었다. DF-COV-01은 또한 CLD 대신에 유연한 인공 링커가 대체된 ACE2-Fc 융합체인 DF-COV-03, 및 ACE2와 Fc 도메인의 배향이 역전되었고 CLD가 또한 생략되어 있는 ACE2-Fc 융합체인 DF-COV-04보다 훨씬 더 긴 혈청 반감기를 갖고 있었다(이하 작업 실시예 참조). 부가적으로, DF-COV-01, -02, -03 및 -04의 일대일 비교에서 DF-COV-01은 폐 바이러스 역가를 감소시키고 감염으로 인한 체중 손실을 호전시켜 SARS-CoV-2 감염에 대한 생체내 효능을 입증한 유일한 ACE2-Fc 융합체였다.

[0330] 상기에 지적한 바와 같이, DF-COV 화합물의 혈청 반감기 간의 차이는 예상치 못한 것이었다. 이론에 얽매임이 없이, CLD의 존재는 DF-COV-01에서 2개의 ACE2 도메인의 이량체화를 촉진하고 ACE2 도메인 서로간의 결합이 이들을 Fc 도메인으로부터 거리를 두게 하여 Fc 신생아 수용체(FcRn)에 대한 그의 결합의 입체 장애를 감소시키는 것으로 여겨진다. FcRn은 피노사이토화된 단백질이 가수분해되는 내피 세포 및 체내의 다른 세포에서 리소좀으로부터 떨어져 결합하고 동반됨으로써 Fc 도메인 함유 분자의 반감기를 연장시킨다. 이 동반 활성은 또한 내피 및 상피 세포 층을 가로지르는 FcRn 함유 화합물의 효율적인 트랜스사이토시스를 가능하게 하는 것으로 여겨진다.

[0331] 극저온 전자 현미경법에 의해 수득된 전체 길이의 ACE2의 공개된 구조(예를 들어, PDB 구조 6M18 및 6M1D)는 전체 길이의 ACE2가 이량체로 존재함을 입증한다(Yan 등(2020) *Science* 367:1444-1448). 대조적으로, ACE2 펩티

다제 도메인(PD) 단독의 이전 구조는 이량체화를 검출하지 못했다(예를 들어, Towler 등 (2004) *J. Biol. Chem.* 279:17996-18007의 각각 CLD가 결여된 PDB 구조 1R42, 1R4L 및 2AJF). 전체 길이 ACE2의 이량체화는 연구에서 "넥(neck)" 도메인(아미노산 616-726)으로 지칭되는 막근접 CLD의 일부에 의해 매개되는 것으로 발견되었다. 분자 종의 하위세트에서 PD의 일부는 직접 이량체화를 매개하는 것으로 밝혀졌지만, 정제된 ACE2 PD를 사용한 연구에서 이량체화의 부재는 CLD의 존재가 이량체화에 필요하다는 것을 나타낸다.

[0332] 전체 길이의 ACE2의 이러한 구조는 유연한 암으로 생각될 수 있는 DF-COV-01의 두 ACE2 도메인이 서로 어느 정도 연관되어, DF-COV-01의 두 ACE2 도메인의 서로의 결합이 DF-COV-01 Fc 도메인에 대한 근접성을 제한할 수 있어 DF-COV-01 Fc 도메인의 입체 장애를 제한하도록 하는 "이량체"를 형성하는 것으로 여겨진다. 이러한 입체 장애의 부재는 FcRn 결합을 용이하게 하는 것으로 여겨진다.

[0333] 일관되게, CLD가 결여된 것 외에는 동일한 ACE2-Fc인 DF-COV-02는 DF-COV-01보다 훨씬 짧은 혈청 반감기를 갖고 있는 것으로 발견되었다. DF-COV-02의 ACE2 도메인에는 CLD가 결여되어 있으므로 서로 결합할 것으로 예상되지 않고, DF-COV-02의 Fc 도메인의 근접에서 자유롭게 약하게 결합하거나 공간을 점유하며, 이는 FcRn 결합을 입체적으로 방해할 것으로 여겨진다.

[0334] 더욱이, DF-COV-03은 DF-COV-01보다 훨씬 짧은 혈청 반감기를 갖고 있었다. DF-COV-02와 마찬가지로 CLD는 DF-COV-03에서 생략된다. 그러나, DF-COV-02와 달리, ACE2 PD와 Fc 도메인의 힌지 도메인 사이에는 유연한 인공 링커가 삽입되어 있다. 보다 유연한 IgG1 힌지 도메인은 또한 DF-COV-03에도 활용된다. 종합하면, 이것은 Fc 도메인으로부터 ACE2 PD를 분리하는 길고 유연한 아미노산 서열을 초래한다. Fc 도메인으로부터 PD를 분리하는 길고 유연한 서열이 이 위치에 CLD를 함유하는 DF-COV-01이 나타내는 더 긴 반감기를 부여하기에는 불충분하다는 사실은 CLD-함유 ACE2 도메인이 서로 결합하여 이들이 Fc 도메인에 대한 근접성 및 Fc 도메인의 입체 장애를 제한하는 경향으로 인한 것으로 여겨지는, ACE2-Fc의 혈청 반감기를 좌우하는데 있어서 CLD의 서열 동일성의 중요성을 강조한다. DF-COV-03의 ACE2 도메인은 Fc 도메인과 관련하여 배향 유연성을 허용하지만, Fc 도메인과 약하게 결합하거나 Fc 도메인의 근접에 공간을 점유하기에 자유로워, FcRn 결합을 입체적으로 방해한다.

[0335] ACE2 PD가 Fc 도메인의 C-말단에 첨부되고 유연한 인공 링커에 의해 분리된(ACE2 CLD는 포함되지 않음) DF-COV-04도 짧은 반감기를 갖고 있었다.

[0336] **도 18**은 DF-COV-01이 비히클 대조군과 상이한 일일 체중 추세에 의해 입증되고 체중 회복을 입증한 바와 같이, 질병 중증도의 척도인 체중 손실을 제한한 유일한 화합물임을 입증한다. Prism v9 소프트웨어 패키지에서 Geisser-Greenhouse 보정 및 Sidak의 다중 비교 테스트를 사용한 혼합-효과 모델이 활용되었다. 도 9에 제시되고 상기 적어도 실시예 12에서 논의된 실험으로부터의 데이터의 이러한 부가적인 분석은 ACE2의 CLD를 함유하는 ACE2-Fc 융합체인 DF-COV-01이 SARS-CoV-2 치료된 햄스터에서 질병 중증도를 호전시킬 수 있는 유일한 ACE2-Fc 융합체임을 추가로 입증한다. CLD가 생략된 달리 동일한 ACE2-Fc 융합체인 DF-COV-02는 질환 중증도를 약화시킬 수 없다. CLD 대신에 Fc 도메인으로부터 ACE2 펩티다제 도메인(PD)을 분리하는 유연한 인공 링커를 함유하는 DF-COV-03도 질환 중증도를 약화시킬 수 없었다. ACE2 PD가 Fc 도메인의 C-말단에 첨부되고 유연한 인공 링커에 의해 분리된(ACE2 CLD가 포함되지 않음) DF-COV-04도 DF-COV-01과 같은 SARS-CoV-2 S-단백질 삼량체에 대한 동등한 결합 친화도를 가짐에도 불구하고 질환 중증도를 약화시킬 수 없었다(**도 15a** 참조). 이 데이터는 DF-COV-01이 전신 투여 시 다른 DF-COV 화합물에 비해 우수한 항바이러스 활성이 있음을 시사한다. 다른 경로(예를 들어,흡입)로 투여되거나, 또는 더 높은 용량으로 전신으로 투여된다면, 다른 DF-COV 화합물은 항바이러스 활성을 입증할 수 있다.

[0337] **도 19a** 및 **도 19b**는 SARS-CoV-2 감염의 치료 모델에서 햄스터를 치료하는 DF-COV-01의 능력을 입증하며, 여기서 햄스터는 $1x10^4$ PFU의 SARS-CoV-2로 공격받은 후 12시간 후에 치료된다. 햄스터의 절반(20)은 복강내 주사에 의해 투여된 150 mg/kg의 DF-COV-01의 단일 용량에 의해 치료되었고, 나머지 절반(20)은 위약(PBS)의 복강내 주사에 의해 치료되었다. 일일 체중을 기록했다. DF-COV-01로의 치료는 위약에 비해 체중 손실의 통계적으로 유의미한 감소를 초래했고, 이는 질병 중증도가 호전되었음을 나타낸다. Geisser-Greenhouse 보정 및 Sidak의 다중 비교 테스트를 사용한 혼합-효과 모델을 활용했다(Prism v9 소프트웨어 패키지). 따라서, DF-COV-01은 감염에 대해 예방을 제공하기보다 질환을 치료하는 것으로 입증되었다. DF-COV-01은 SARS-CoV-2 감염으로 인한 체중 손실을 감소시켜 질환의 중증도를 호전시킴을 나타낸다.

[0338] DF-COV-01은 별도의 햄스터 그룹에 DF-COV-01, DF-COV-02, DF-COV-03, 또는 DF-COV-04의 등가량을 3일 동안 매일 투여한 실험에서 SARS-CoV-2에 대한 생체내 활성을 입증하는 유일한 화합물이었다. DF-COV-04가 SARS-CoV-2 S-단백질에 대해 DF-COV-01과 유사하게 높은 결합 친화도를 갖고 중화 연구에서 유사한, 사실 약간 더 높은

IC50을 가짐에도 불구하고 이 모델에서 활성을 입증하지 않았다는 사실은, 다른 DF-COV 화합물에 비해 DF-COV-01의 우월성은 단지 그의 높은 결합 친화도 및 중화 효력 외의 다른 요인, 아마도 더 높은 반감기로부터의 약물 노출, 또는 몇몇 다른 요인 때문인 것으로 여겨진다.

[0339] **실시예 15: 바이러스 변이체에 대한 결합 평가**

[0340] 슈도바이러스는 HIV 엔벨로프 당단백질 발현을 방지하는 돌연변이 및 표적 세포에서 루시퍼라제 발현을 유도하는 루시퍼라제 유전자를 함유하는 복제 결손 HIV-1 백본을 사용하여 생성한다. HEK293-T 세포는 2개의 플라스미드에 의해 공동형질감염된다: 하나는 슈도바이러스 스파이크 단백질(바이러스 변이체 유래)용 발현 벡터이고 다른 하나는 Env 결함 HIV-1 게놈을 보유한다. 바이러스 입자를 함유하는 상청액은 형질감염 48시간 후에 수확하고, Centricon 70 농축기를 사용하여 농축하고 -80℃에서 동결 보관한다. 표적 세포는 인간 ACE2 발현 벡터(pcDNA-hACE2)로 293T 세포를 일시적으로 형질감염시켜 생성한다. ACE2-형질감염된 293T 세포는 형질감염 24시간 후 표적 세포로 사용되는 세포이다. 슈도바이러스의 적정은 감염 검정에서 초당 50,000 카운트(cps)를 생성하는 데 필요한 바이러스의 부피를 결정하기 위해 인간 ACE2 수용체에 의해 일시적으로 형질감염된 293T 세포에서 수행된다. 슈도바이러스의 적절한 부피는 인간 ACE2를 발현하는 293T 세포에 첨가하기 전에 실온에서 1시간 동안 DF-COV-01, DF-COV-02 또는 무관련 Fc 융합체의 연속 희석액과 함께 사전-인큐베이션한다. 슈도바이러스를 함유하는 배지는 24시간 후에 새로운 완전 배지로 교체된다. 추가 24시간 후, 감염은 BrightGlo 루시퍼라제 검정(Promega)을 사용한 루시퍼라제 검출에 의해 정량화되고 Victor3 플레이트 판독기(Perkin Elmer)에서 판독된다.

[0341] 본원에서 수행되고 기술된 결합 실험에서, SARS-CoV-02 변이체의 재조합 S1 단백질에 대한 결합은 Octet® RED384 생물층 간섭계 시스템을 사용하여 평가했다. DF-COV-01, DF-COV-02, DF-COV-03 또는 DF-COV-04는 제조업체에서 권장하는 프로토콜에 따라 항인간 IgG Fc Capture(AHC) 바이오센서(Sartorius)에 고정시켰다. S1 단백질(Sino Biological)은 진행 완충액(PBS, 0.02% Tween 20, 2 mg/ml BSA)을 사용하여 1.23-100 nM로 희석하고 96-웰 플레이트로 옮겼다. DF-COV ACE2-Fc 화합물에 의해 고정된 센서를 희석된 S1 단백질이 들어있는 웰에 5분간 담가 결합을 측정한 후, 진행 완충액에 10분간 담가 해리를 측정했다. S1 단백질 또는 진행 완충액에 담긴 DF-COV 화합물이 없는 센서의 신호를 기준으로서 사용했다. 동역학 분석은 Octet® Data Analysis HT 버전 12.0 소프트웨어를 사용하여 수행했고, 곡선은 1:1 결합 모드를 사용하여 피팅시켰다.

[0342] SARS-CoV-02 변이체가 백신접종 환자의 단클론 항체 및 혈청에 의한 중화로부터 탈출하는 것은 RBD 내 돌연변이의 결과로서 바이러스의 수용체 결합 도메인(RBD)에 대한 이러한 항체의 결합 감소 또는 손실 때문인 것으로 입증되어 있다(Planas 등 (2021) *Nature* doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9). 따라서, 개별 SARS-CoV-2 변이체의 S-단백질 내에 RBD 돌연변이 및 기타 돌연변이를 포함하는 재조합 S1 단백질에 대한 결합 평가는 DF-COV 화합물이 결합하는지 여부를 결정하는 데 사용될 수 있으며 해당 SARS-CoV-2 변이체를 중화시킬 것으로 예상된다. 이러한 접근법을 사용하면, 알파(B.1.1.7) 및 베타(B.1.351) 코로나바이러스로부터의 재조합 S1 단백질을 사용하는 것을 포함하여, 대표적인 바이러스 변이체에 대한 결합을 평가했다. 유사한 결합 평가는, 예를 들어, 다른 코로나바이러스를 중화할 수 있는 단클론 항체에 의한 중화에 대해 내성이고; SARS-CoV-2를 중화할 수 있는 단클론 항체에 의한 중화에 내성인 SARS-CoV-2의 변이체이며; 코로나바이러스 백신에 의해 부여되는 면역에 내성이고; SARS-CoV-2 백신에 의해 부여된 면역에 내성인 SARS-CoV-2의 변이체이며; 이전 코로나바이러스 감염에 의해 부여된 자연 면역에 내성이고; 이전 SARS-CoV-2 감염에 의해 부여된 자연 면역에 내성인 SARS-CoV-2의 변이체이고; S-단백질에 E484 치환을 보유하고; S-단백질에 N501 치환을 보유하며; S-단백질에 K417 치환을 보유하고; S-단백질에 E484 및 N501 치환을 보유하고; S-단백질에 E484K 치환을 보유하고; S-단백질에 E484Q 치환을 보유하고; S-단백질에 N501Y 치환을 보유하고; 코로나바이러스가 S-단백질에 K417N 치환을 보유하고; S-단백질에 E484K 및 N501Y 치환을 보유하고; S-단백질에 E484, N501 및 K417 치환을 보유하고; S-단백질에 E484K, N501Y 및 K417N 치환을 보유하고; S-단백질에 L452 치환을 보유하고; S-단백질에 L452R 치환을 보유하고; S-단백질에 T478 치환을 보유하고; S-단백질에 T478K 치환을 보유하고; S-단백질에 L452 및 T478 치환을 보유하고; S-단백질에 L452R 및 T478K 치환을 보유하고; 20I/501Y.V1, "영국 변이체" 또는 알파 변이체로도 알려진 B.1.1.7 계통의 자손이고; 20I/501Y.V1, 또는 "영국 변이체" 또는 알파 변이체로도 알려진 B.1.1.7 계통이며; 20H/501Y.V2, "남아프리카 COVID-19 변이체" 또는 베타 변이체로도 알려진 B.1.351 계통의 자손이고(S-단백질 수용체 결합 도메인의 외부에 다른 치환 외에 E484K, N501Y 및 K417N 치환을 보유함)이고; 20H/501Y.V2, "남아프리카 COVID-19 변이체" 또는 베타 변이체로도 알려진 B.1.351 계통이고(S-단백질 수용체 결합 도메인의 외부에 다른 치환 외에 E484K, N501Y 및 K417N 치환을 보유함); 계통 P.1, "브라질 COVID-19 변이체", 또는 감마 변이체로도 알려진 B.1.1.248 계통의 자손이고(S-단백질 수용체 결합 도메인의 외부에 다른 치환 외에 E484K 및

N501Y 치환을 보유함); 계통 P.1, "브라질 COVID-19 변이체", 또는 감마 변이체로도 알려진 B.1.1.248 계통이고(S-단백질 수용체 결합 도메인의 외부에 다른 치환 외에 E484K 및 N501Y 치환을 보유함); B.1.617 계통의 자손이고; B.1.617.1 계통의 자손이며(E484Q 치환을 보유함); B.1.617.1 계통이고(E484Q 치환을 보유함); 델타 변이체로도 알려진 B.1.617.2 계통의 자손이고(수용체 결합 도메인의 내부 및 외부에 다른 S-단백질 돌연변이 외에 L452R 및 T478K 치환을 보유함); 델타 변이체로도 알려진 B.1.617.2 계통이고(수용체 결합 도메인의 내부 및 외부에 다른 S-단백질 돌연변이 외에 L452R 및 T478K 치환을 보유함);B.1.617.3 계통의 자손이고(E484Q 치환을 보유함); 및/또는 B.1.617.3 계통(E484Q 치환을 보유함)인 것을 제한 없이 포함하는 다양한 다른 바이러스 변이체에 적용될 수 있다.

[0343] **도 20a** 및 **도 20b**는 SARS-CoV-2 변이체에 대한 DF-COV 화합물의 결합 특성을 입증한다. B.1.1.7(알파), B.1.351(베타), 및 부모 B.1 계통(D614G)으로부터의 가용성 재조합 S1 단백질에 고정된 DF-COV-01, DF-COV-02, DF-COV-03 및 DF-COV-04의 결합은 생물층 간섭계(BLI)를 통해 평가했다. B.1.351 계통은 발표된 연구에서 이 변이체를 시험관내에서 중화할 수 없는 밤라니비맙(Ly-CoV555)을 포함하는 여러 치료용 단클론 항체의 결합을 저해하는 것으로 알려진 E484K 치환을 함유한다. 유사하게, REGN-COV2 칵테일의 두 항체 중 하나인 REGN10933은 발표된 연구에서 B.1.351에 대한 중화 효력의 현저한 감소를 입증하는 것으로 알려져 있다. B.1.351 계통은 또한 백신 내성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 4개의 DF-COV 화합물 모두 B.1.1.7 및 B.1.351 계통의 S1 단백질에 강렬하게 결합했다. 사실, 각각의 DF-COV 화합물에 대해 변이체 S1 단백질에 대한 결합 친화도는 부모 B.1 S1 단백질보다 더 높았다. 이러한 결과는 베타 변이체(B.1.351)가 바이러스 S-단백질의 수용체 결합 도메인 중 위치 E484 및 K417에서 아미노산 치환에 의해 유도되는 것으로 알려진(Wang 등 (2021) *Nature* 593:130-135, B.1.351 단클론 항체 내성을 기술함; Zhou 등 (2021) *Cell* 184:2348-2361, B.1.351 백신 내성을 기술함), 여러 단클론 항체에 내성이 있고 여러 백신에 내성이 있는 것으로 알려져 있기 때문에 중요하다. P.1 변이체와 같이 백신접종된 환자의 단클론 항체 및 혈청에 대한 내성을 입증하는 문제의 다른 변이체도 이러한 위치에 아미노산 치환을 갖고 있다(Wang 등 (2021) *Cell Host Microbe* 29:747-751).

[0344] **참고에 의한 포함**

[0345] 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참고로 포함되는 것으로 나타낸 것처럼 전체가 참고로 포함된다. 상충되는 경우, 본원의 모든 정의를 포함한 본 출원이 우선한다.

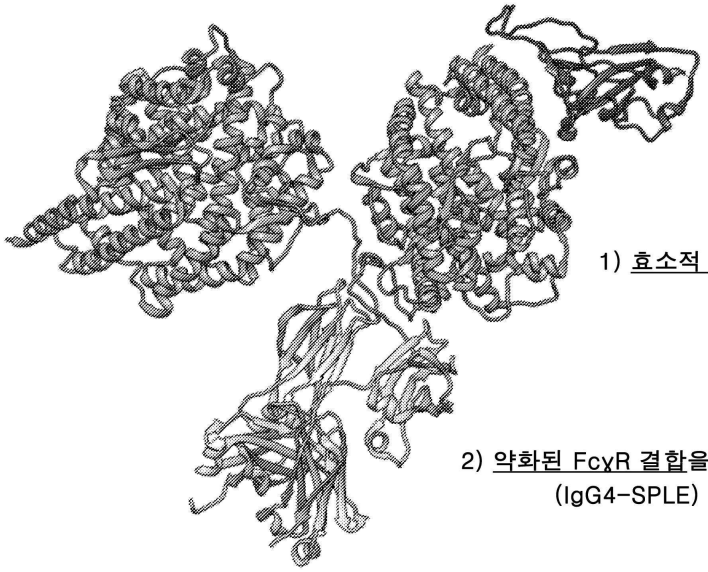
[0346] 공개 데이터베이스의 엔트리와 상관성이 있는 수탁번호를 참조하는 임의의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 서열, 예컨대, tigr.org의 World Wide Web에서 The Institute for Genomic Research(TIGR) 및/또는 ncbi.nlm.nih.gov.의 World Wide Web에서 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 의해 유지되는 것도 그 전체가 참고로 포함된다.

[0347] **등가물**

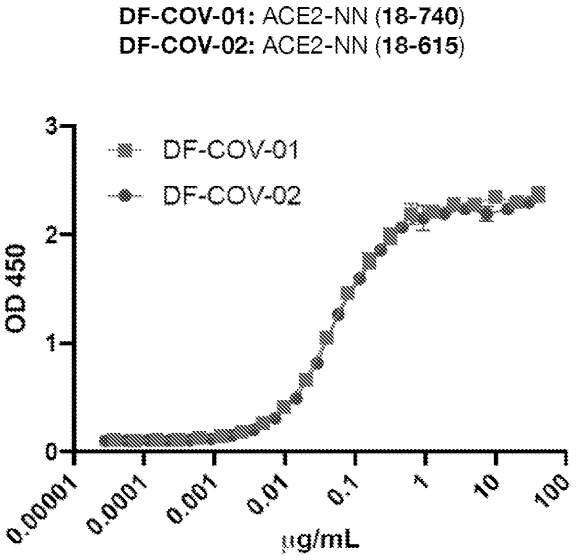
[0348] 관련 기술분야의 기술자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 본원에 기술된 본 발명의 특정 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 다음 청구범위에 포괄되는 것으로 의도된다.

도면

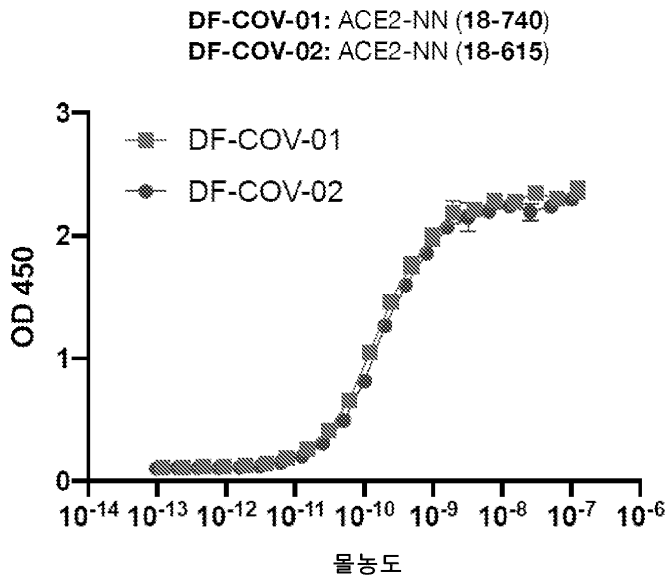
도면1


스파이크 단백질
1) 효소적 비활성 ACE2(ACE2-NN)
2) 약화된 FcγR 결합을 갖는 Fc 도메인
(IgG4-SPLE)

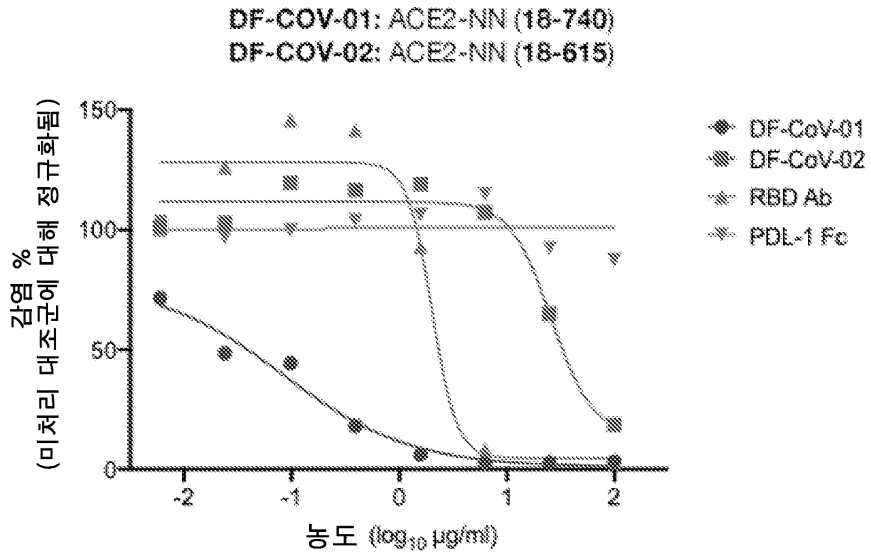
도면2a


DF-COV-01: ACE2-NN (18-740)
DF-COV-02: ACE2-NN (18-615)
DF-COV-01
DF-COV-02
OD 450
0
1
2
3
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
μg/mL

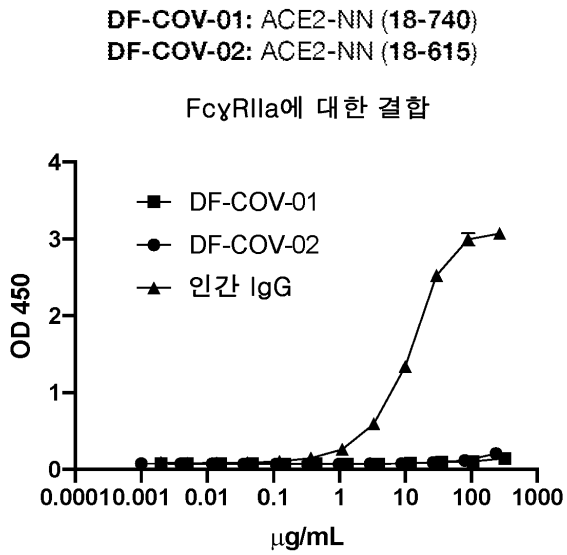
도면2b


DF-COV-01: ACE2-NN (18-740)
DF-COV-02: ACE2-NN (18-615)
DF-COV-01
DF-COV-02
OD 450
3
2
1
0
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
몰농도

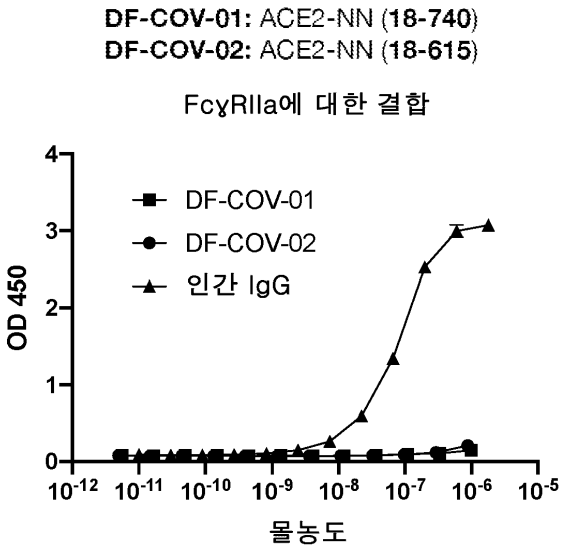
도면3


DF-COV-01: ACE2-NN (18-740)
DF-COV-02: ACE2-NN (18-615)
감염 % (미처리 대조군에 대해 정규화됨)
150
100
50
0
-2
-1
0
1
2
농도 (log10 μg/ml)
DF-CoV-01
DF-CoV-02
RBD Ab
PDL-1 Fc

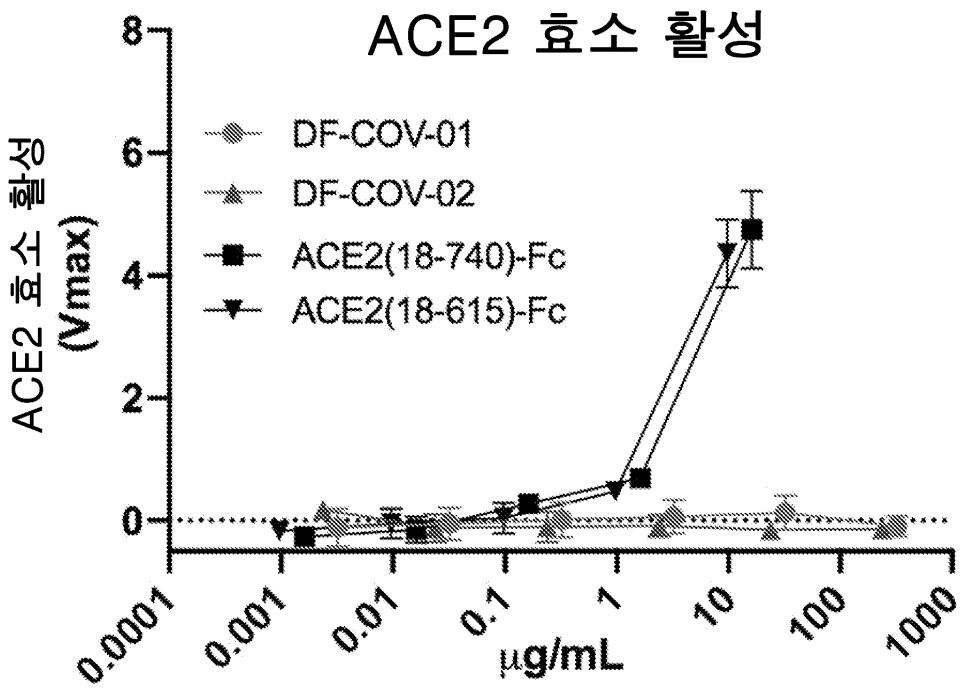
도면4a


DF-COV-01: ACE2-NN (18-740)
DF-COV-02: ACE2-NN (18-615)
FcγRIIa에 대한 결합
DF-COV-01
DF-COV-02
인간 IgG
OD 450
0
1
2
3
4
0.00010.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
μg/mL

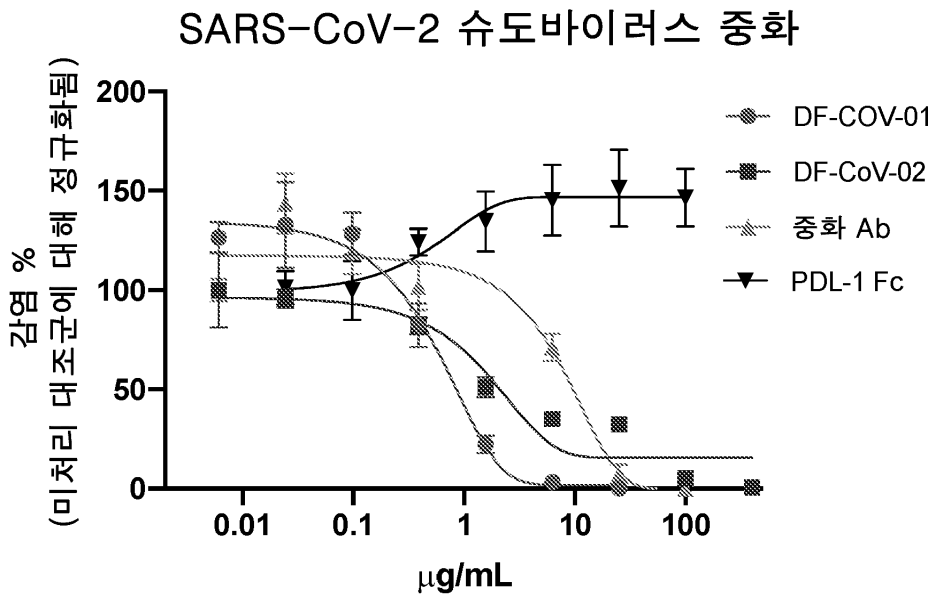
도면4b


DF-COV-01: ACE2-NN (18-740)
DF-COV-02: ACE2-NN (18-615)
FcγRIIa에 대한 결합
DF-COV-01
DF-COV-02
인간 IgG
OD 450
0
1
2
3
4
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
몰농도

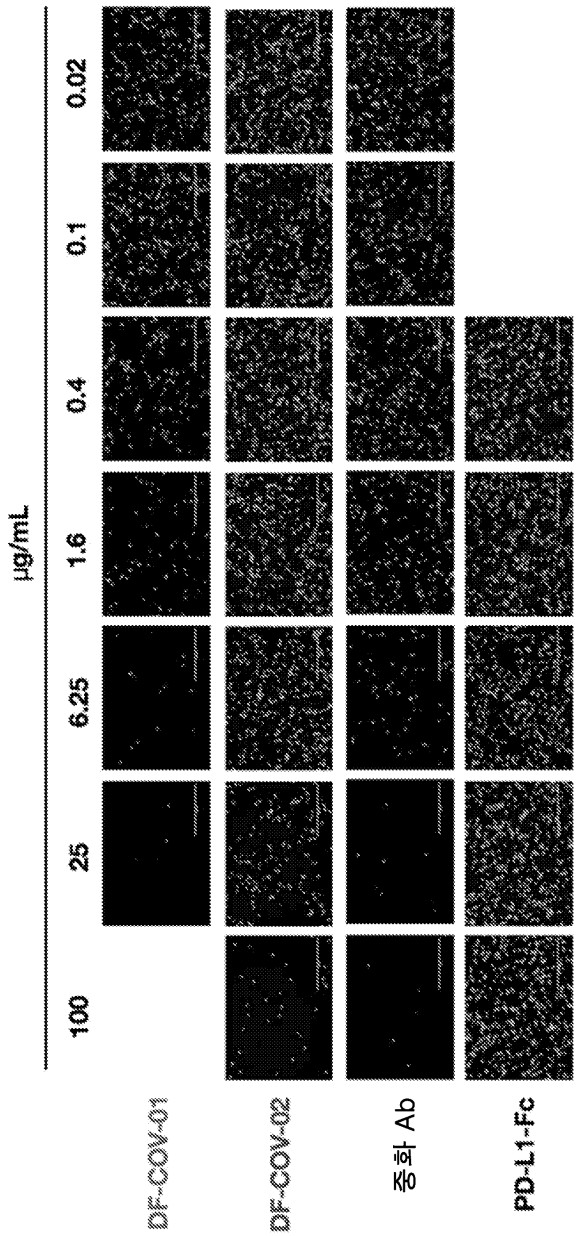
도면5


ACE2 효소 활성
ACE2 효소 활성 (Vmax)
DF-COV-01
DF-COV-02
ACE2(18-740)-Fc
ACE2(18-615)-Fc
8
6
4
2
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
μg/mL

도면6a

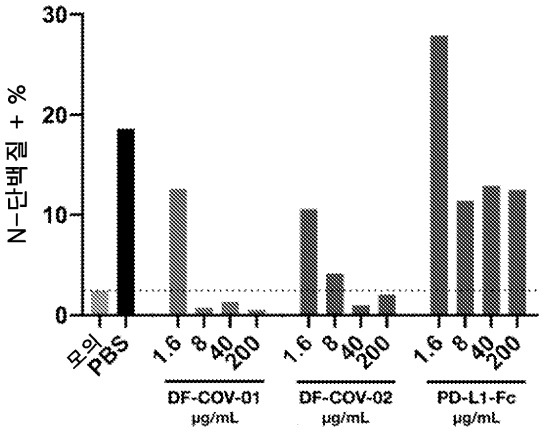

SARS-CoV-2 슈도바이러스 중화
감염 % (미처리 대조군에 대해 정규화됨)
DF-COV-01
DF-CoV-02
중화 Ab
PDL-1 Fc
200
150
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
μg/mL

도면6b

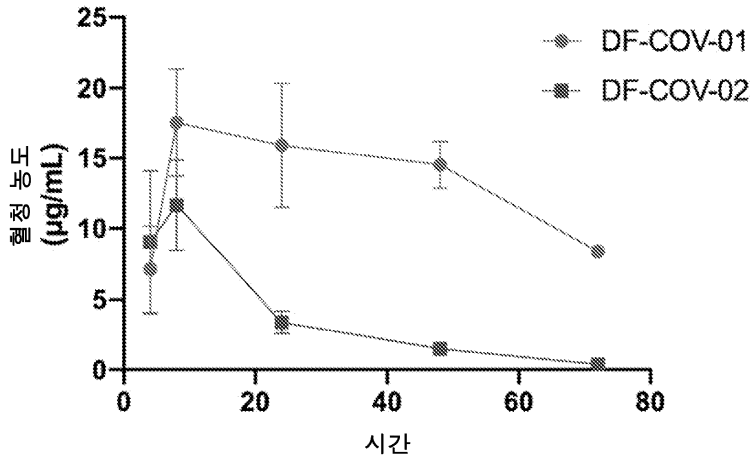


도면7

DF-COV는 iPSC-유래 기도 상피의 SARS-CoV-2 감염을 저해함



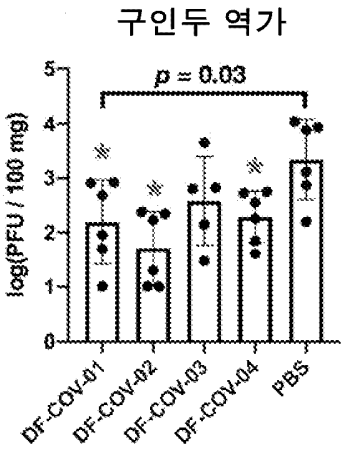
도면8



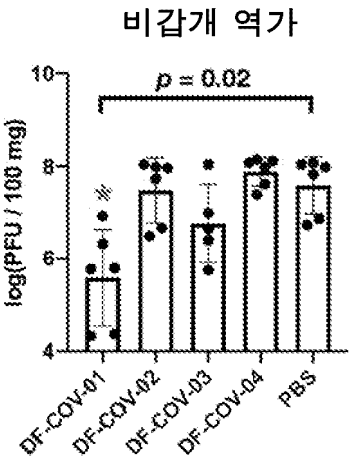
DF-COV-01
$t_{1/2}$ = 64.7 hrs
V_d = 68 mL

DF-COV-02
$t_{1/2}$ = 13.9 hrs
V_d = 96 mL

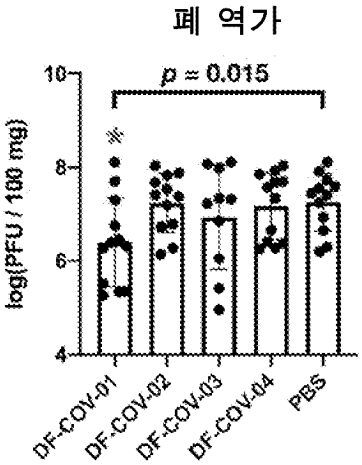
도면9a



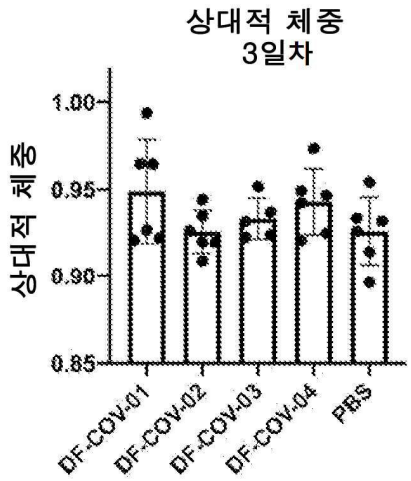
도면9b



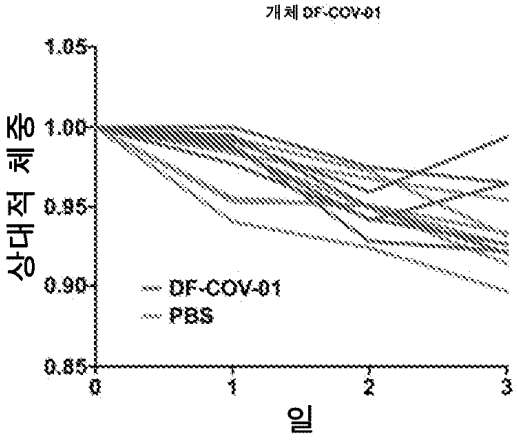
도면9c



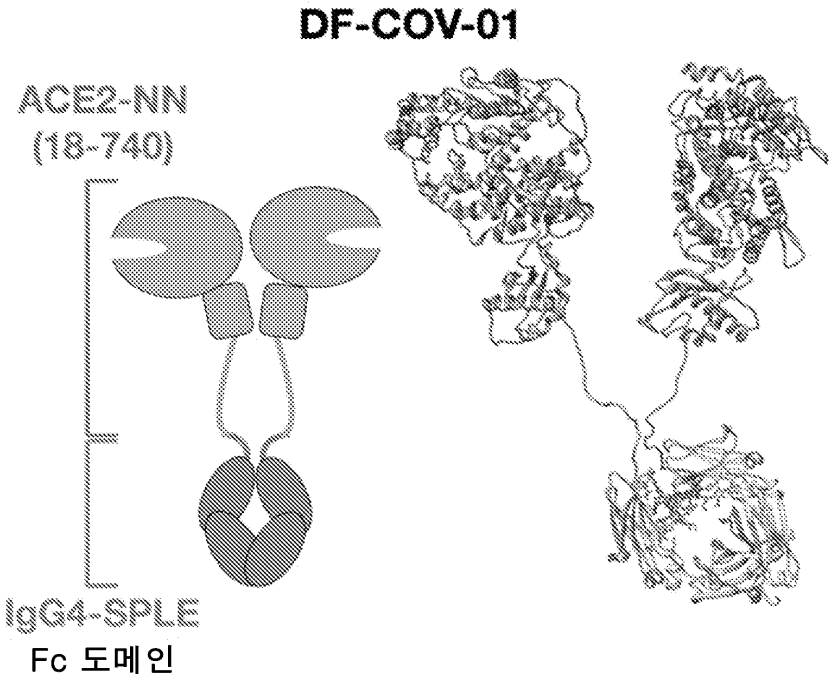
도면9d


상대적 체중
3일차
상대적 체중
1.00
0.95
0.90
0.85
DF-COV-01
DF-COV-02
DF-COV-03
DF-COV-04
PBS

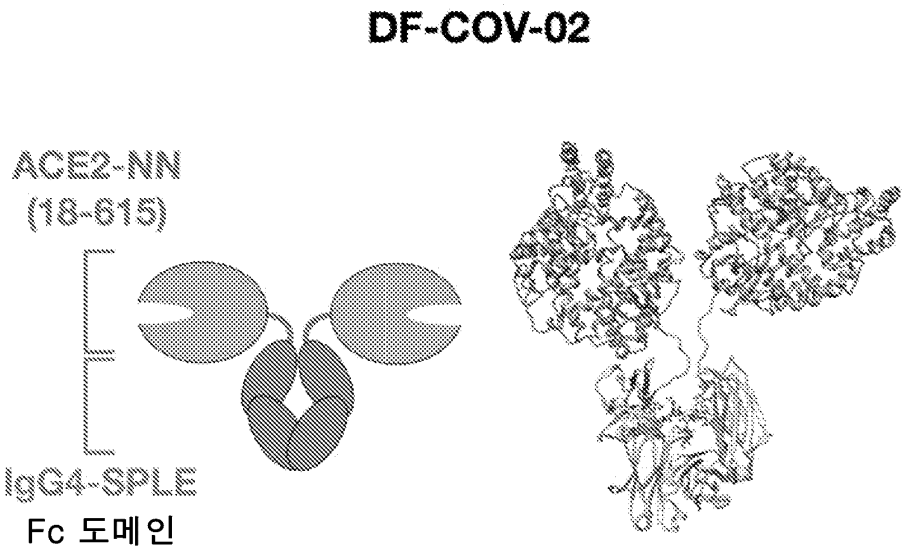
도면9e


개체 DF-COV-01
상대적 체중
1.05
1.00
0.95
0.90
0.85
DF-COV-01
PBS
0
1
2
3
일

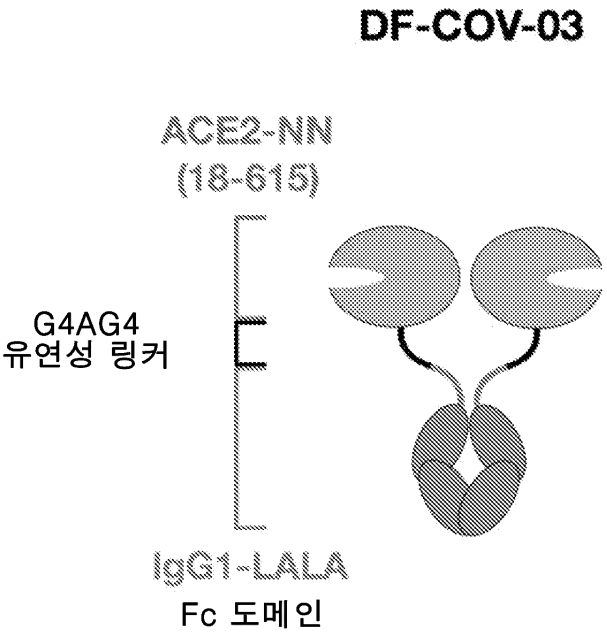
도면10a


DF-COV-01
ACE2-NN
(18-740)
IgG4-SPLE
Fc 도메인

도면10b


DF-COV-02
ACE2-NN
(18-615)
IgG4-SPLE
Fc 도메인

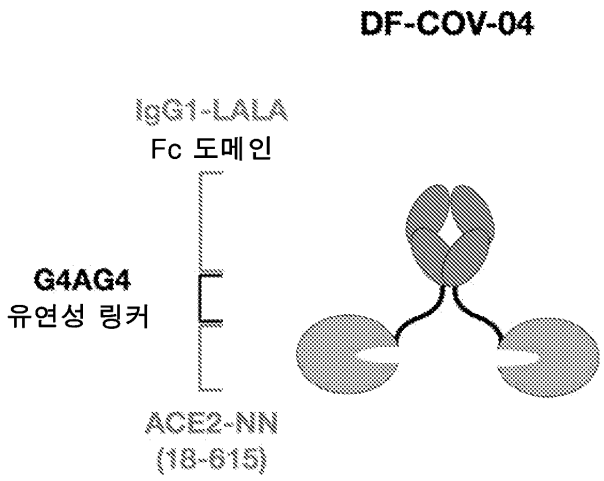
도면11



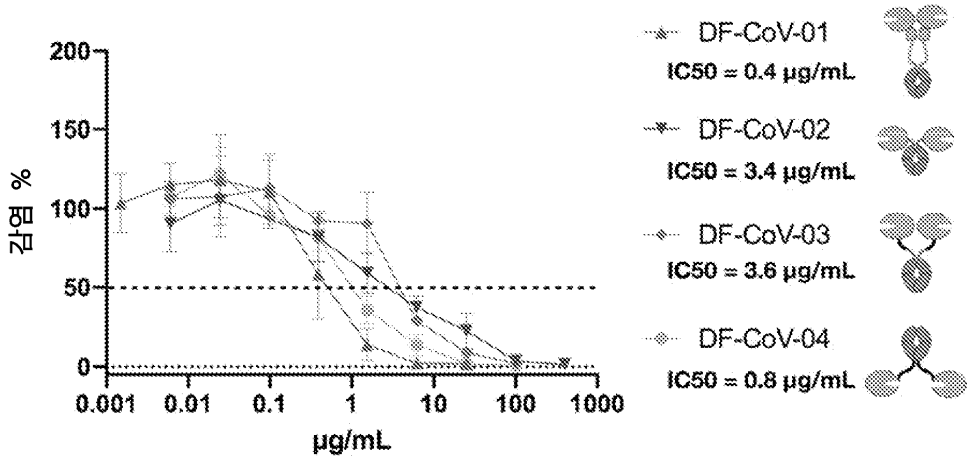
도면12a



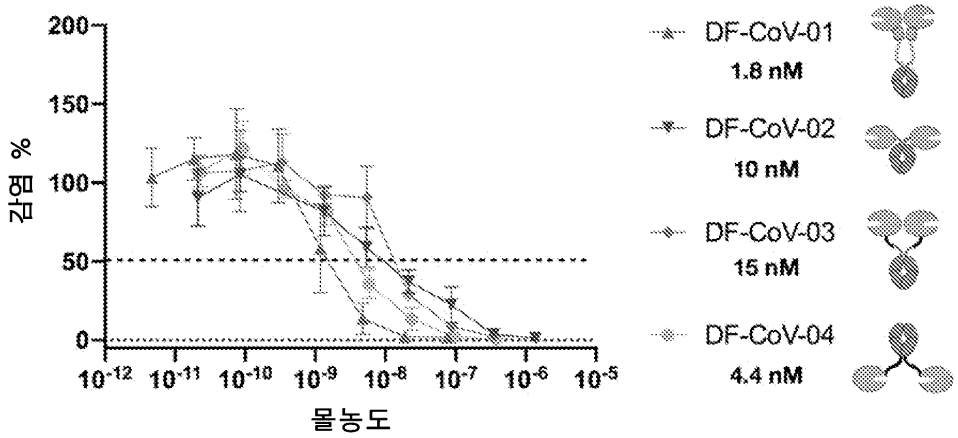
도면12b



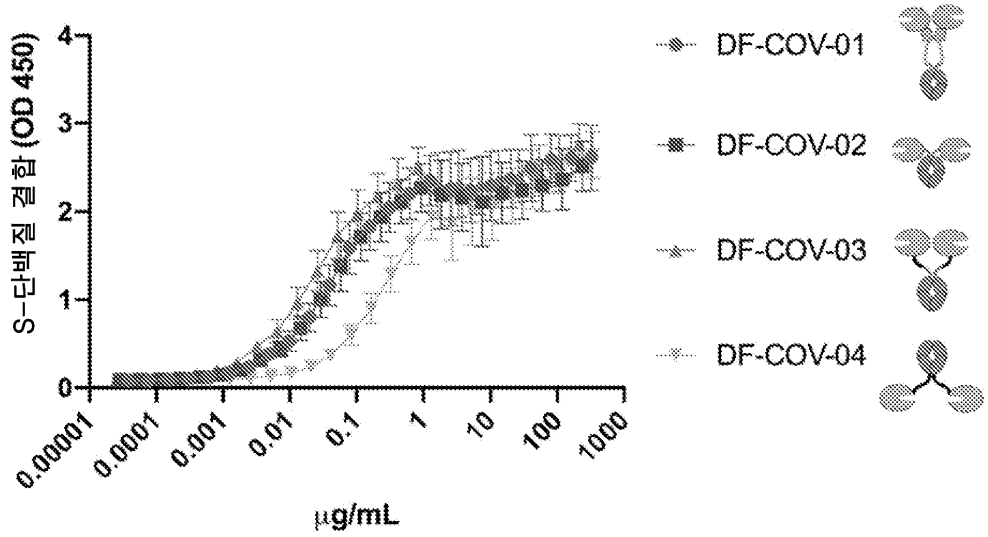
도면13a



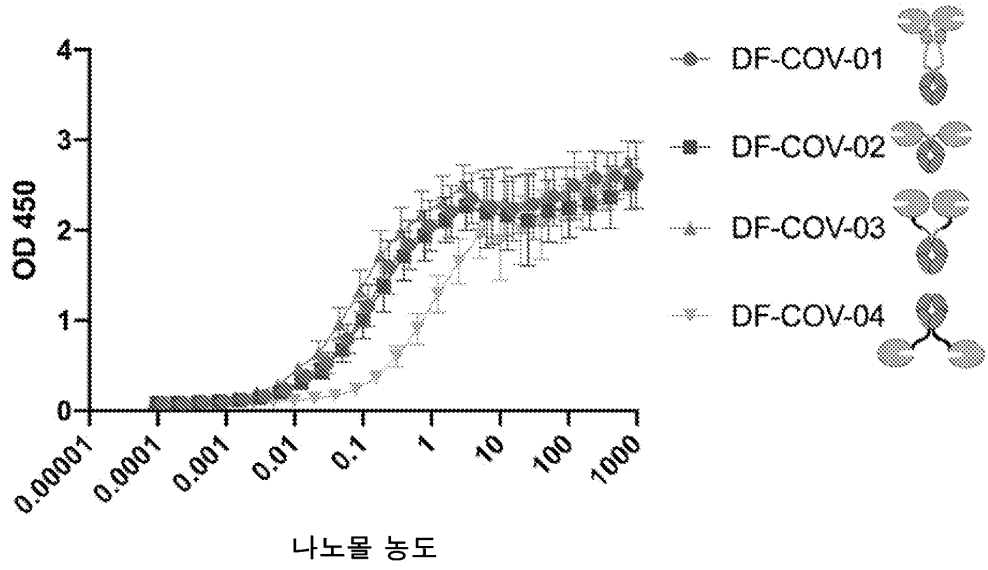
도면13b



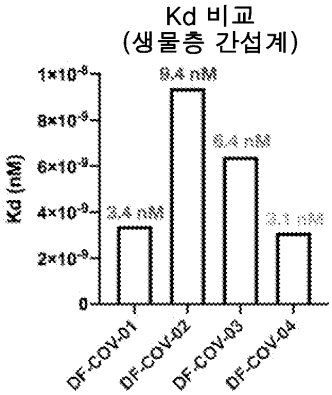
도면14a



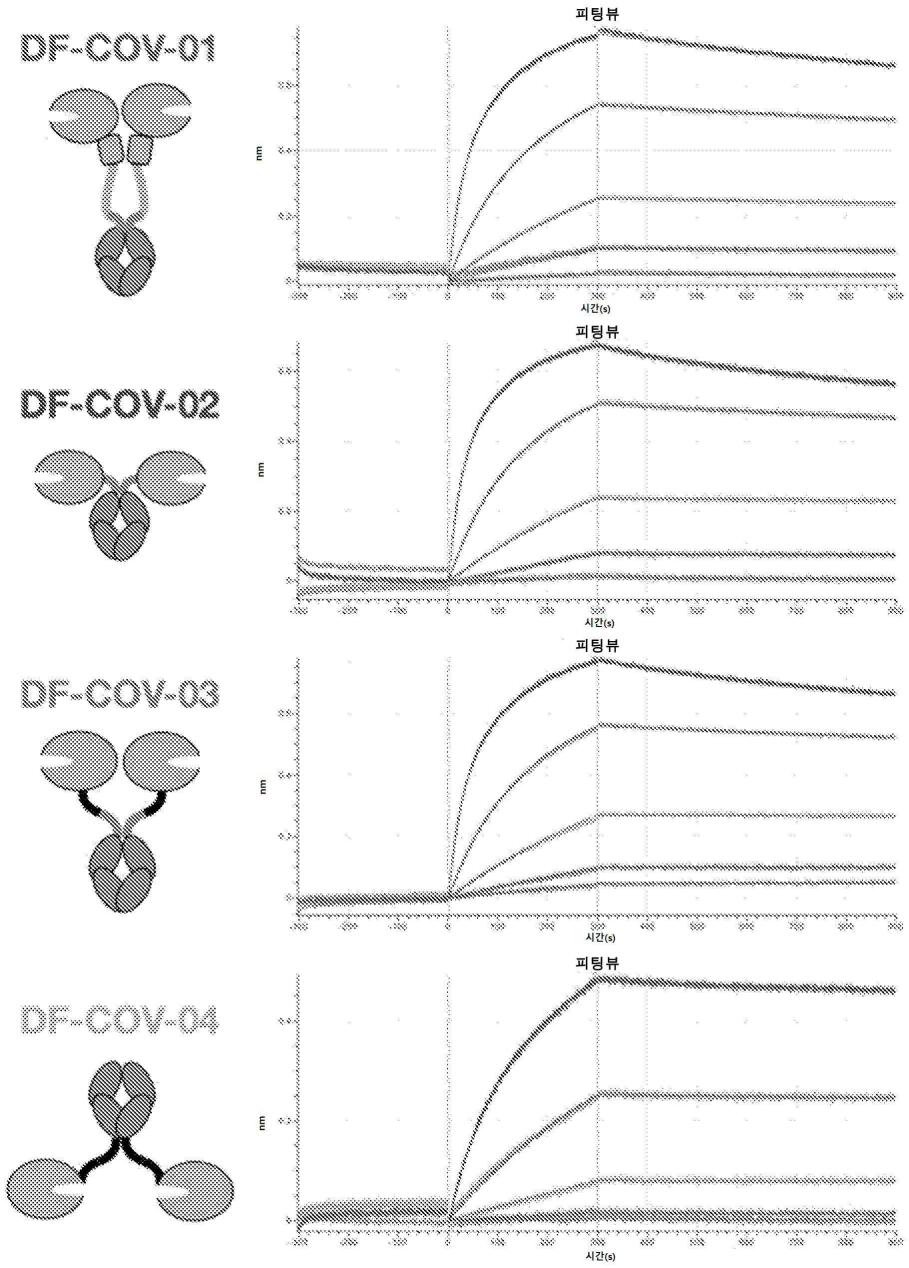
도면14b



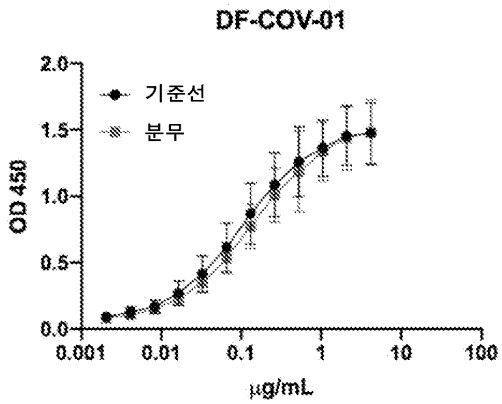
도면15a



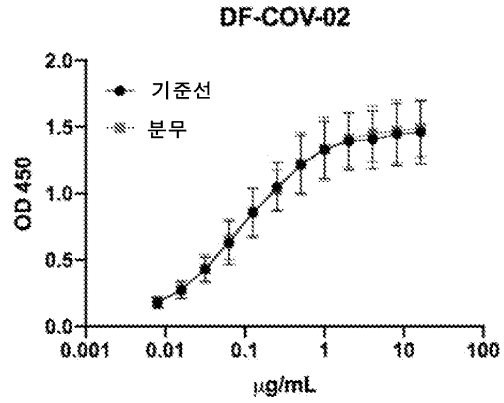
도면15b


DF-COV-01
피팅뷰
nm
시간(s)
DF-COV-02
피팅뷰
nm
시간(s)
DF-COV-03
피팅뷰
nm
시간(s)
DF-COV-04
피팅뷰
nm
시간(s)

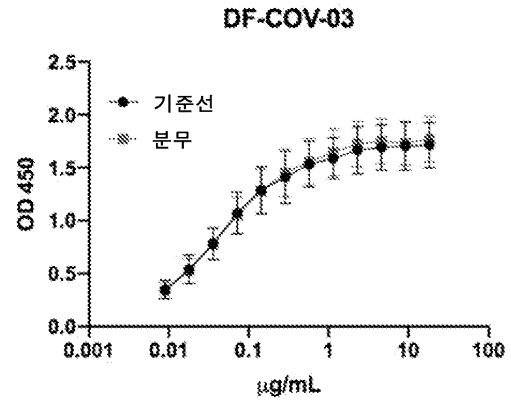
도면16a


DF-COV-01
기준선
분무
OD 450
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
μg/mL

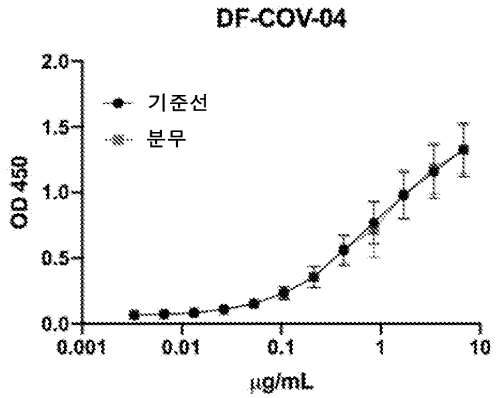
도면16b



도면16c

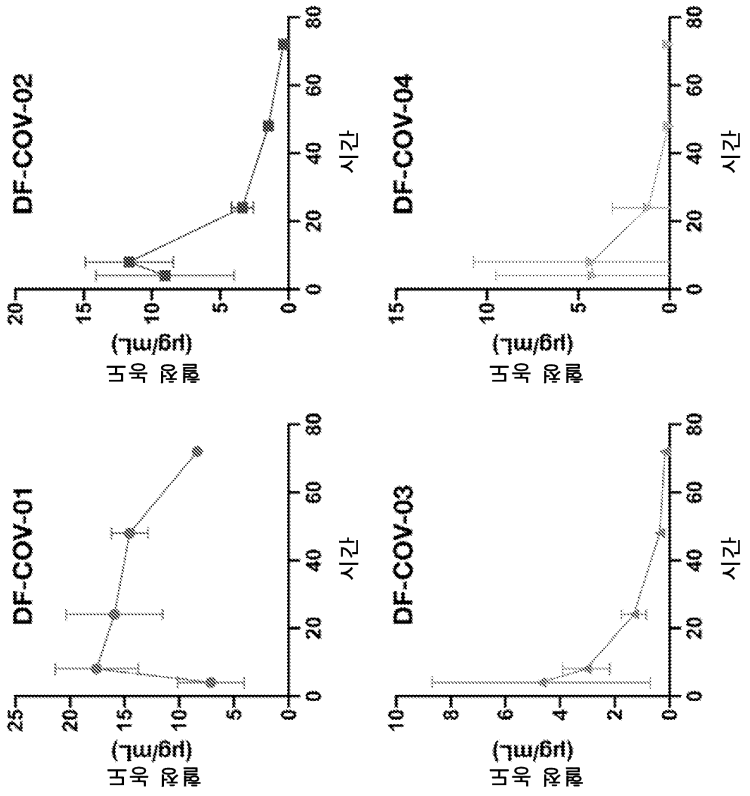


도면16d

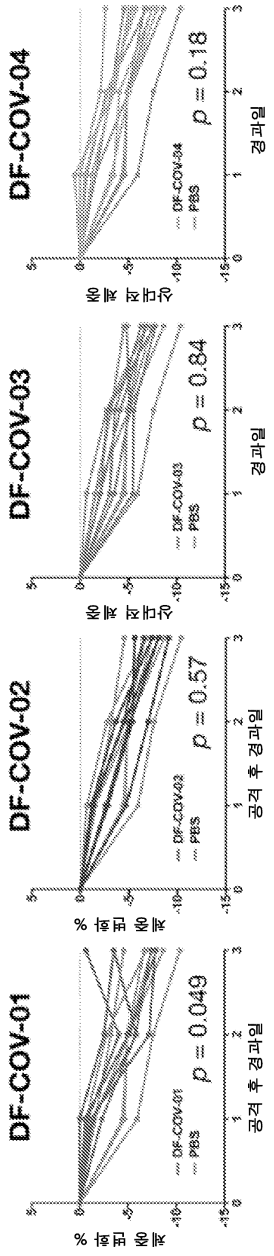


도면17

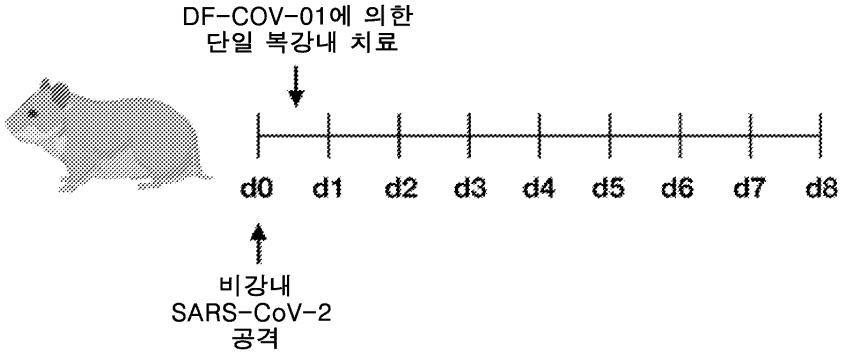
	$t_{1/2}$ (h)
DF-COV-01	51.6
DF-COV-02	15.5
DF-COV-03	13.0
DF-COV-04	6.7



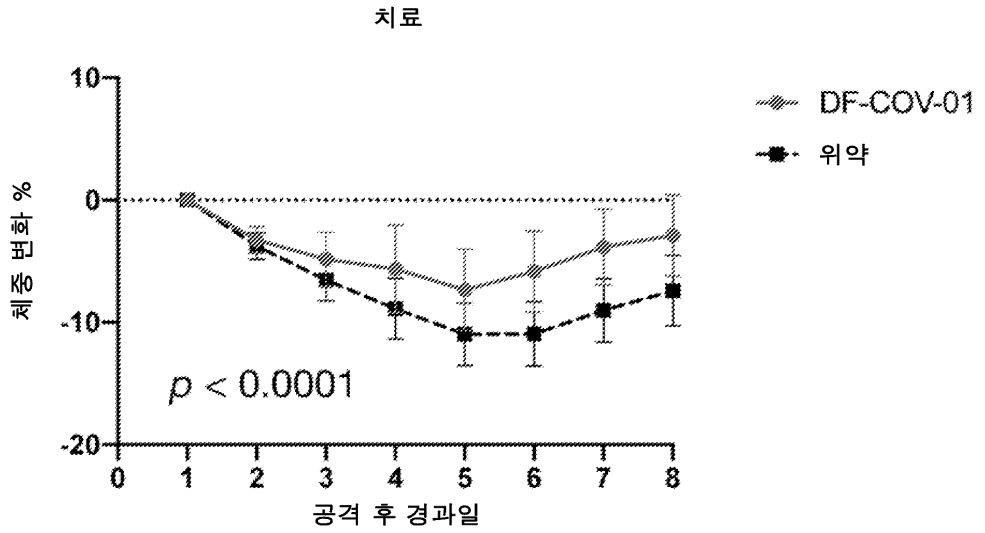
도면18


DF-COV-01
DF-COV-02
DF-COV-03
DF-COV-04
체중 변화 %
공격 후 경과일
p = 0.049
p = 0.57
p = 0.84
p = 0.18
DF-COV-01
DF-COV-02
DF-COV-03
DF-COV-04
PBS

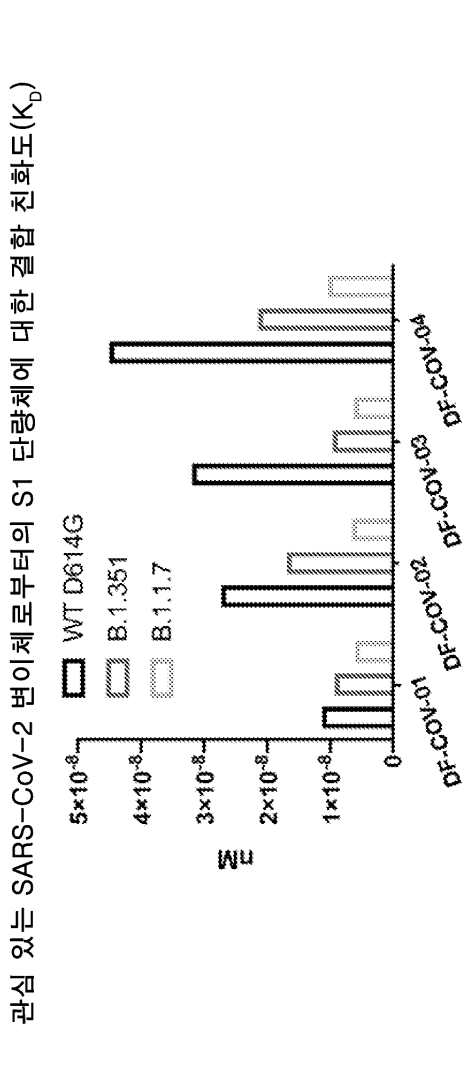
도면19a


DF-COV-01에 의한
단일 복강내 치료
d0
d1
d2
d3
d4
d5
d6
d7
d8
비강내
SARS-CoV-2
공격

도면19b



도면20a

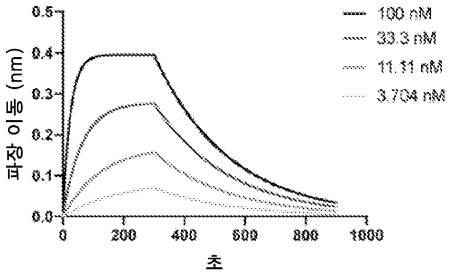


SARS-CoV-2 계통	DF-COV-01				DF-COV-02			
	KD (M)	k on (1/Ms)	k off (1/s)	KD (M)	k on (1/Ms)	k off (1/s)
B.1 (D614G)	1.13E-08	3.63E+05	4.09E-03	2.73E-08	2.56E+05	6.99E-03
B.1.1.7 (HV69-70 del, Y144 del, N501Y, A570D, D614G, P681H)	3.40E-09	8.96E+04	3.04E-04	9.39E-09	7.80E+04	7.32E-04
B.1.351 (K417N, E484K, N501Y, D614G)	9.31E-09	2.40E+05	2.24E-03	1.69E-08	2.05E+05	3.46E-03

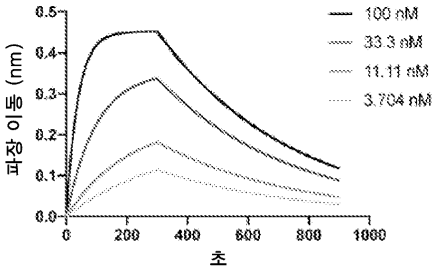
SARS-CoV-2 계통	DF-COV-03			DF-COV-04		
	KD (M)	k on (1/Ms)	k off (1/s)	KD (M)	k on (1/Ms)	k off (1/s)
B.1 (D614G)	3.19E-08	2.61E+05	8.33E-03	4.50E-08	1.31E+05	5.88E-03
B.1.1.7 (HV69-70 del, Y144 del, N501Y, A570D, D614G, P681H)	6.41E-09	7.35E+04	4.72E-04	3.11E-09	3.06E+04	9.52E-05
B.1.351 (K417N, E484K, N501Y, D614G)	9.59E-09	2.44E+05	2.34E-03	2.14E-08	1.29E+05	2.76E-03

도면20ba

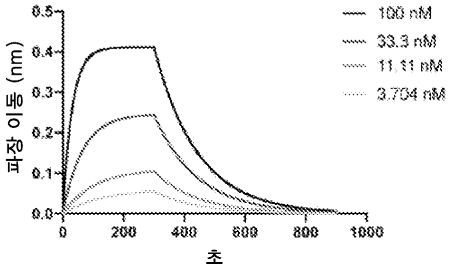
DF-COV-01에 대한 부모 B.1 (D614G WT) S1 결합



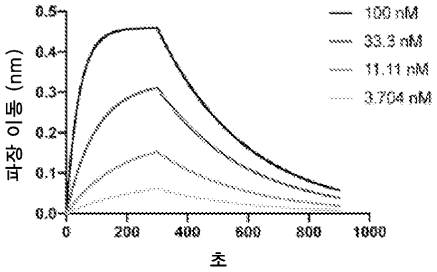
DF-COV-01에 대한 B.1.351 S1 결합



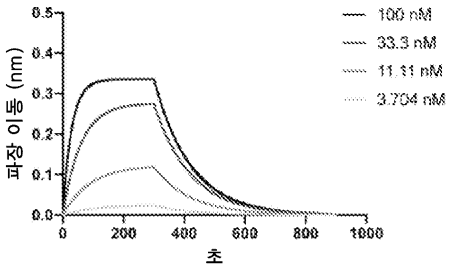
DF-COV-02에 대한 부모 B.1 (D614G WT) S1 결합



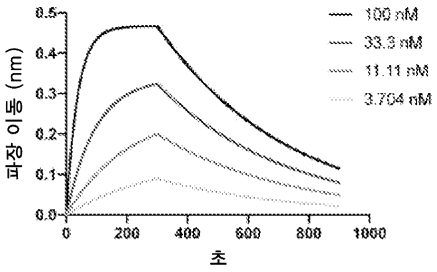
DF-COV-02에 대한 B.1.351 S1 결합



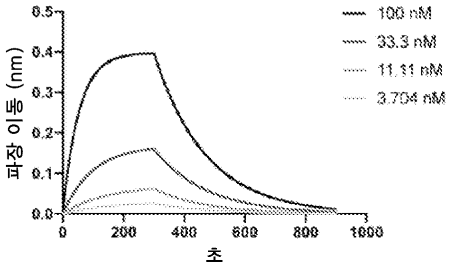
DF-COV-03에 대한 부모 B.1 (D614G WT) S1 결합



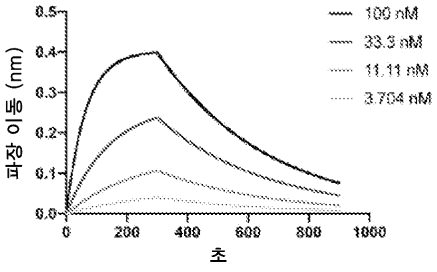
DF-COV-03에 대한 B.1.351 S1 결합



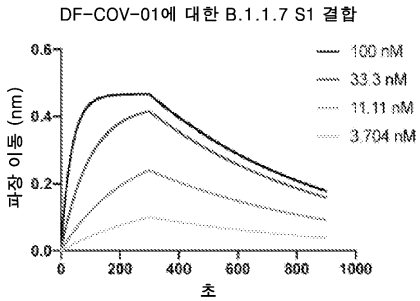
DF-COV-04에 대한 부모 B.1 (D614G WT) S1 결합

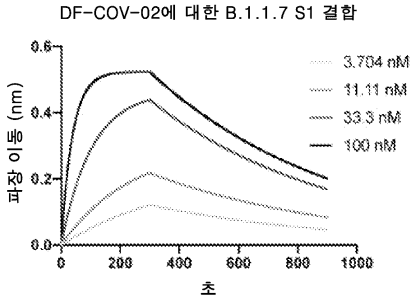


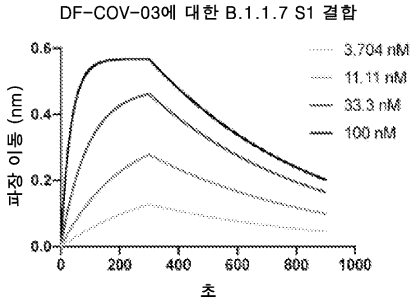
DF-COV-04에 대한 B.1.351 S1 결합

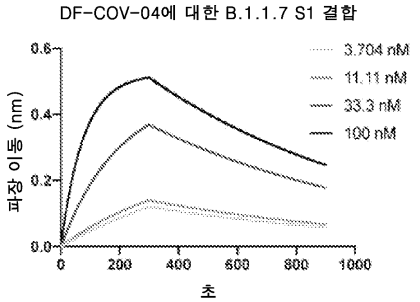


도면20bb









서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATMENT AND PREVENTION OF CORONAVIRUS INFECTION

<130> DFS-29925

<140> PCT/US2021/042372

<141> 2021-07-20

<150> 63/150,686

<151> 2021-02-18

<150> 63/053,817

<151> 2020-07-20

<160> 62

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 723

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400>

1

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu Glu
115 120 125

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

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

Asn Gly Val Asp Gly Tyr Asp Tyr Ser Arg Gly Gln Leu Ile Glu Asp
195 200 205
Val Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu His
210 215 220
Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile Ser
225 230 235 240
Pro Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly Arg
245 250 255

Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys Pro
260 265 270
Asn Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Val Asp Gln Ala Trp Asp Ala Gln
275 280 285
Arg Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu Pro
290 295 300
Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Pro Gly
305 310 315 320

Asn Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly Lys
325 330 335
Gly Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp Phe
340 345 350
Leu Thr Ala His Asn Glu Met Gly Asn Ile Gln Tyr Asp Met Ala Tyr
355 360 365
Ala Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn Gly Ala Asn Glu Gly Phe His
370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

Val Lys Asn Gln Met Ile Leu Phe Gly Glu Glu Asp Val Arg Val Ala
645 650 655
Asn Leu Lys Pro Arg Ile Ser Phe Asn Phe Phe Val Thr Ala Pro Lys
660 665 670
Asn Val Ser Asp Ile Ile Pro Arg Thr Glu Val Glu Lys Ala Ile Arg
675 680 685
Met Ser Arg Ser Arg Ile Asn Asp Ala Phe Arg Leu Asn Asp Asn Ser
690 695 700

Leu Glu Phe Leu Gly Ile Gln Pro Thr Leu Gly Pro Pro Asn Gln Pro
705 710 715 720
Pro Val Ser

<210> 2
<211> 691
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 2
Gln Ser Thr Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn
1 5 10 15
His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp Asn

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

85 90 95

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

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

210 215 220
Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile Ser
225 230 235 240
Pro Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly Arg
245 250 255
Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys Pro
260 265 270
Asn Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Val Asp Gln Ala Trp Asp Ala Gln

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

Met Ser Arg

690

<210> 3

<211> 598

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

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

Val Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu His
210 215 220
Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile Ser
225 230 235 240
Pro Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly Arg
245 250 255
Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys Pro
260 265 270

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

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

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

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

Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr Tyr
465 470 475 480
Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe Ile
485 490 495
Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala Leu
500 505 510
Cys Gln Ala Ala Lys His Glu Gly Pro Leu His Lys Cys Asp Ile Ser
515 520 525

Asn Ser Thr Glu Ala Gly Gln Lys Leu Phe Asn Met Leu Arg Leu Gly
530 535 540
Lys Ser Glu Pro Trp Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Val Gly Ala Lys
545 550 555 560
Asn Met Asn Val Arg Pro Leu Leu Asn Tyr Phe Glu Pro Leu Phe Thr

565 570 575

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

580 585 590

Trp Ser Pro Tyr Ala Asp

595

<210> 4

<211> 595

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

420 425 430
Leu Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe Lys
435 440 445
Gly Glu Ile Pro Lys Asp Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met Lys
450 455 460
Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr Tyr
465 470 475 480
Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe Ile

485 490 495
Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala Leu
500 505 510
Cys Gln Ala Ala Lys His Glu Gly Pro Leu His Lys Cys Asp Ile Ser
515 520 525
Asn Ser Thr Glu Ala Gly Gln Lys Leu Phe Asn Met Leu Arg Leu Gly
530 535 540
Lys Ser Glu Pro Trp Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Val Gly Ala Lys

545 550 555 560
Asn Met Asn Val Arg Pro Leu Leu Asn Tyr Phe Glu Pro Leu Phe Thr
565 570 575
Trp Leu Lys Asp Gln Asn Lys Asn Ser Phe Val Gly Trp Ser Thr Asp
580 585 590
Trp Ser Pro
595

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 5

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 6

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 7

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 8

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 9

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 10

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 11

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 12

Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 13

Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 14

<211

> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 14

Pro Pro Cys Pro

1

<210> 15

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 15

Pro Cys Pro

1

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 16

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1 5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 17

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 18

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 19

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 20

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 21

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1 5

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 22

Lys Thr His Thr Cys Pro
1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 23

Thr His Thr Cys Pro
1 5

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 24

His Thr Cys Pro
1

<210> 25

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 25

Thr Cys Pro

1

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 26

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 27

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 28

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 29

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 30

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 31

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 32
Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5

<210> 33
<211> 217
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 33
Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val

180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

210 215

<210> 34

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 34

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

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

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

100 105 110

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

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215

<210> 35
<211> 217
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400>
35
Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

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

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

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215

<210> 36
<211> 217
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 36
Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215

<210> 37
<211> 220
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 37

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

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

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

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

<210> 38

<211

> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 38

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
115 120 125

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
130 135 140

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
165 170 175

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
180 185 190

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
195 200 205

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215 220

<210> 39

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 39

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
115 120 125

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
130 135 140

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
165 170 175

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

180 185 190

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
195 200 205
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220
<210> 40
<211> 220
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 40
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

<210> 41
<211> 220
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 41
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

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

Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

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

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

<210> 42

<211

> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 42

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95
Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

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

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
180 185 190
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
195 200 205
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220
<210> 43
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 43
Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215

<210> 44

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
35 40 45

Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
130 135 140

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 45

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 46

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

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

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 47

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

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

290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 48
<211> 948
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 48
Gln Ser Thr Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe Asn
1 5 10 15
His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp Asn

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

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

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

660 665 670
Asn Val Ser Asp Ile Ile Pro Arg Thr Glu Val Glu Lys Ala Ile Arg
675 680 685
Met Ser Arg Ser Arg Ile Asn Asp Ala Phe Arg Leu Asn Asp Asn Ser
690 695 700
Leu Glu Phe Leu Gly Ile Gln Pro Thr Leu Gly Pro Pro Asn Gln Pro
705 710 715 720
Pro Val Ser Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu

725 730 735
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
740 745 750
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
755 760 765
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
770 775 780
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

785 790 795 800
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
805 810 815
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
820 825 830
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
835 840 845
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

850 855 860
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
865 870 875 880
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

885 890 895

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

900 905 910

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

915 920 925

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

930 935 940

Ser Leu Gly Lys

945

<210> 49

<211> 825

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

```
        115                 120                 125
Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu Arg
    130                 135                 140

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

Val Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu His
    210                 215                 220
Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile Ser
225                 230                 235                 240
Pro Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly Arg
                245                 250                 255
Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys Pro
            260                 265                 270

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

Gly Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp Phe
            340                 345                 350
Leu Thr Ala His Asn Glu Met Gly Asn Ile Gln Tyr Asp Met Ala Tyr
        355                 360                 365
```

Ala Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn Gly Ala Asn Glu Gly Phe His
370 375 380
Glu Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys His
385 390 395 400

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

Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr Tyr
465 470 475 480
Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe Ile
485 490 495
Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe Gln Glu Ala Leu
500 505 510
Cys Gln Ala Ala Lys His Glu Gly Pro Leu His Lys Cys Asp Ile Ser
515 520 525

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

Trp Ser Pro Gly Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
595 600 605
Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

610 615 620

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
625 630 635 640

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
645 650 655

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
660 665 670

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
675 680 685

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
690 695 700

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
705 710 715 720

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
725 730 735

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
740 745 750

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
755 760 765

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
770 775 780

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
785 790 795 800

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
805 810 815

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
820 825

<210> 50

<211> 2904

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400
> 50

atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa cgactggtgt ccactcccag 60

tcaacaatcg aggagcaggc aaagaccttc ctggacaagt ttaaccacga agcggaggac 120

ctgttctacc agagcagcct ggcgagctgg aattacaaca ccaacatcac cgaggagaac 180

gtgcagaaca tgaataacgc tggcgacaag tggagcgcct tcttgaagga gcaatccacc 240

ctggcccaga tgtacccgct gcaagagata cagaacctga ctgtgaagct gcaactgcag 300

gccctgcagc agaacggctc cagcgtgctg agcgaagaca agagcaaaag gctgaatacc 360

atattgaaca cgatgagcac catctacagc accggcaaag tatgcaaccc cgacaacccc 420

caagagtgtc tgttgttgga acccggcctg aacgagatta tggcgaactc cctggactac 480

aacgaacgcc tgtgggcatg ggagtcttgg aggtcagagg ttggcaagca actgaggccg 540

ttgtacgaag agtacgtggt gctgaagaac gaaatggcac gggccaatca ttatgaggac 600

tacggtgatt attggagggg cgactacgag gtgaacggcg tggacggcta cgactatagc 660

aggggccaac ttatagagga cgtagagcac acttttgagg aaatcaaacc cctgtacgag 720

cacttgcatg cctacgtacg cgccaaactg atgaatgcgt accccagcta catcagcccc 780

atcggctgcc tgcccgcaca cctgctcggc gacatgtggg gccgattctg gaccaatctg 840

tatagcctca ccgtgccctt tggccagaag ccgaacatag atgtgacgga tgctatggta 900

gaccaggcgt gggatgcaca gcgcatcttc aaggaggccg agaagttctt cgtgagcgtc 960

ggcttgccca acatgaccca gggtttctgg gagaactcaa tgctgactga ccccggcaac 1020

gtacagaaag ccgtatgcca cccaactgct tgggacctgg gtaagggaga cttccggatc 1080

ctcatgtgta ccaaggtgac catggatgac tttctcaccg cccacaatga aatgggcaac 1140

atccagtacg atatggccta cgcagcgcag ccattccttc tgaggaacgg tgccaacgag 1200

ggcttccatg aggcagtcgg agagatcatg agcctgtcag cggcgacccc taaacatctg 1260

aagagcatcg ggctgctgtc tccggacttt caagaggaca atgagactga gatcaacttc 1320

ctcctgaaac aggcgctgac cattgtaggc accttgccct tcacctacat gctggagaag 1380

tggcgatgga tggtgtttaa gggcgagatc ccgaaggacc agtggatgaa aaagtggtgg 1440

gagatgaaga gggagatcgt cggcgtagtt gagccggtcc cccacgacga aacctactgc 1500

gatcctgcca gcctgttcca cgtgagcaac gattacagtt ttatcaggta ctacaccagg 1560

acccctttacc aatttcagtt ccaggaggca ctgtgccagg ccgccaagca cgaaggcccc 1620

ctgcacaagt gcgacatcag caacagcacc gaggcgggtc aaaagctgtt taacatgctg 1680

aggctgggca agagcgagcc gtggaccctg gccctggaaa acgttgtggg cgcaaaaaac 1740
atgaacgtga ggcccctgct gaactacttc gagcccctgt tcacctggct gaaggaccag 1800
aacaagaaca gtttcgtggg ctggagtacc gattggagtc cctatgccga ccagagcatc 1860
aaggtgagga ttagcctcaa gagcgccctg ggcgacaagg cctatgaatg gaacgacaac 1920
gagatgtacc tgttcaggtc aagcgtggcc tacgccatga ggcagtactt cctgaaagtg 1980
aagaaccaga tgatactgtt cggcgaggag gacgtgaggg tggccaacct gaagcccagg 2040
atatcattca atttcttcgt gaccgctccc aagaacgtga gcgacatcat ccccaggacc 2100

gaggtggaga aggccatcag gatgagccgc agcaggatta acgacgcctt caggctgaac 2160
gataacagcc tggagttcct tggcatccag ccaaccctgg gaccacccaa ccagcctccc 2220
gttagcggac ccccctgtcc tccttgccct gctcctgaat ttgagggagg cccctccgtc 2280
ttcctgtttc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacacc cgaagtcacc 2340
tgcgtcgtgg tggatgtcag ccaggaagat cccgaggtgc agttcaactg gtacgtggac 2400
ggagtggagg tgcataacgc caaaaccaag cccagggaag agcagttcaa cagcacctat 2460
cgggtcgtgt ccgtgctcac cgtcctgcat caggattggc tcaacggcaa ggagtacaag 2520

tgcaaggtgt ccaacaaggg cctgccctcc tccatcgaga agaccatctc caaggctaag 2580
ggccaacctc gggagcccca agtgtatacc ctccctccca gccaggagga gatgaccaag 2640
aatcaagtga gcctgacctg cctcgtgaag ggattttacc cctccgacat cgctgtggaa 2700
tgggaaagca atggccaacc tgagaacaac tacaagacca cacccccgt gctggactcc 2760
gatggctcct tcttcctgta cagcaggctg accgtggaca aatcccggtg gcaagaggga 2820
aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gctctccaca accactacac ccagaagagc 2880
ctctccctga gcctcggcaa gtaa 2904

<210> 51
<211> 2535
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"
<400> 51
atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa cgactggtgt ccactcccag 60

tcaacaatcg aggagcaggc aaagaccttc ctggacaagt ttaaccacga agcggaggac 120

ctgttctacc agagcagcct ggcgagctgg aattacaaca ccaacatcac cgaggagaac 180

gtgcagaaca tgaataacgc tggcgacaag tggagcgcct tcttgaagga gcaatccacc 240

ctggcccaga tgtacccgct gcaagagata cagaacctga ctgtgaagct gcaactgcag 300

gccctgcagc agaacggctc cagcgtgctg agcgaagaca agagcaaaag gctgaatacc 360

atattgaaca cgatgagcac catctacagc accggcaaag tatgcaaccc cgacaacccc 420

caagagtgtc tgttgttgga acccggcctg aacgagatta tggcgaactc cctggactac 480

aacgaacgcc tgtgggcatg ggagtcttgg aggtcagagg ttggcaagca actgaggccg 540

ttgtacgaag agtacgtggt gctgaagaac gaaatggcac gggccaatca ttatgaggac 600

tacggtgatt attggagggg cgactacgag gtgaacggcg tggacggcta cgactatagc 660

aggggccaac ttatagagga cgtagagcac acttttgagg aaatcaaacc cctgtacgag 720

cacttgcatg cctacgtacg cgccaaactg atgaatgcgt accccagcta catcagcccc 780

atcggctgcc tgcccgcaca cctgctcggc gacatgtggg gccgattctg gaccaatctg 840

tatagcctca ccgtgccctt tggccagaag ccgaacatag atgtgacgga tgctatggta 900

gaccaggcgt gggatgcaca gcgcatcttc aaggaggccg agaagttctt cgtgagcgtc 960

ggcttgccca acatgaccca gggtttctgg gagaactcaa tgctgactga ccccggcaac 1020

gtacagaaag ccgtatgcca cccaactgct tgggacctgg gtaagggaga cttccggatc 1080

ctcatgtgta ccaaggtgac catggatgac tttctcaccg cccacaatga aatgggcaac 1140

atccagtacg atatggccta cgcagcgcag ccattccttc tgaggaacgg tgccaacgag 1200

ggcttccatg aggcagtcgg agagatcatg agcctgtcag cggcgacccc taaacatctg 1260

aagagcatcg ggctgctgtc tccggacttt caagaggaca atgagactga gatcaacttc 1320

ctcctgaaac aggcgctgac cattgtaggc accttgccct tcacctacat gctggagaag 1380

tggcgatgga tggtgtttaa gggcgagatc ccgaaggacc agtggatgaa aaagtggtgg 1440

gagatgaaga gggagatcgt cggcgtagtt gagccggtcc cccacgacga aacctactgc 1500

gatcctgcca gcctgttcca cgtgagcaac gattacagtt ttatcaggta ctacaccagg 1560

acccctttacc aatttcagtt ccaggaggca ctgtgccagg ccgccaagca cgaaggcccc 1620

ctgcacaagt gcgacatcag caacagcacc gaggcgggtc aaaagctgtt taacatgctg 1680

aggctgggca agagcgagcc gtggaccctg gccctggaaa acgttgtggg cgcaaaaaac 1740

atgaacgtga ggcccctgct gaactacttc gagcccctgt tcacctggct gaaggaccag 1800

aacaagaaca gtttcgtggg ctggagtacc gattggagtc ccggtgaatc caagtatgga 1860

ccccccctgtc ctccttgccc tgctcctgaa tttgagggag gcccctccgt cttcctgttt 1920

ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc tcccggacac ccgaagtcac ctgcgtcgtg 1980

gtggatgtca gccaggaaga tcccgaggtg cagttcaact ggtacgtgga cggagtggag 2040

gtgcataacg ccaaaaccaa gcccagggaa gagcagttca acagcaccta tcgggtcgtg 2100

tccgtgctca ccgtcctgca tcaggattgg ctcaacggca aggagtacaa gtgcaaggtg 2160

tccaacaagg gcctgccctc ctccatcgag aagaccatct ccaaggctaa gggccaacct 2220

cgggagcccc aagtgtatac cctccctccc agccaggagg agatgaccaa gaatcaagtg 2280

agcctgacct gcctcgtgaa gggattttac ccctccgaca tcgctgtgga atgggaaagc 2340

aatggccaac ctgagaacaa ctacaagacc acacccccg tgctggactc cgatggctcc 2400

ttcttcctgt acagcaggct gaccgtggac aaatcccggt ggcaagaggg aaacgtgttc 2460

agctgctccg tgatgcacga ggctctccac aaccactaca cccagaagag cctctccctg 2520

agcctcggca agtaa 2535

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 52

Gly Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 53

Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 54

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 54

Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 55

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 55

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
1 5 10 15

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
50 55 60

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
65 70 75 80

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
85 90 95

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
100 105 110

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

115 120 125

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

130 135 140

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

145 150 155 160

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

165 170 175

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

180 185 190

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

195 200 205

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215 220

<210> 56

<211> 834

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

Glu Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys His
385 390 395 400
Leu Lys Ser Ile Gly Leu Leu Ser Pro Asp Phe Gln Glu Asp Asn Glu
405 410 415
Thr Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly Thr
420 425 430
Leu Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe Lys
435 440 445

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

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

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

580 585 590

Trp Ser Pro Tyr Ala Asp Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Asp

595 600 605

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly

610 615 620

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

625 630 635 640

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

645 650 655

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

660 665 670

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

675 680 685

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

690 695 700

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

705 710 715 720

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

725 730 735

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

740 745 750

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

755 760 765

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

770 775 780

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

785 790 795 800

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

805 810 815

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

820 825 830

Gly Lys

<210> 57

<211> 836

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 57

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

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

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

290 295 300
Gln Met Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln
305 310 315 320
Leu Gln Ala Leu Gln Gln Asn Gly Ser Ser Val Leu Ser Glu Asp Lys
325 330 335
Ser Lys Arg Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser
340 345 350
Thr Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu

355 360 365
Glu Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu
370 375 380
Arg Leu Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu
385 390 395 400
Arg Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg
405 410 415
Ala Asn His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

Lys Arg Glu Ile Val Gly Val Val Glu Pro Val Pro His Asp Glu Thr

705 710 715 720

Tyr Cys Asp Pro Ala Ser Leu Phe His Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

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

785 790 795 800

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

805 810 815

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

820 825 830

Asp Trp Ser Pro

835

<210> 58

<211> 2562

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 58

atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa cgactggtgt ccactcccag 60

tcaacaatcg aggagcaggc aaagaccttc ctggacaagt ttaaccacga agcggaggac 120

ctgttctacc agagcagcct ggcgagctgg aattacaaca ccaacatcac cgaggagaac 180
gtgcagaaca tgaataacgc tggcgacaag tggagcgcct tcttgaagga gcaatccacc 240
ctggcccaga tgtacccgct gcaagagata cagaacctga ctgtgaagct gcaactgcag 300
gccctgcagc agaacggctc cagcgtgctg agcgaagaca agagcaaaag gctgaatacc 360
atattgaaca cgatgagcac catctacagc accggcaaag tatgcaaccc cgacaacccc 420
caagagtgtc tgttgttgga acccggcctg aacgagatta tggcgaactc cctggactac 480
aacgaacgcc tgtgggcatg ggagtcttgg aggtcagagg ttggcaagca actgaggccg 540

ttgtacgaag agtacgtggt gctgaagaac gaaatggcac gggccaatca ttatgaggac 600
tacggtgatt attggagggg cgactacgag gtgaacggcg tggacggcta cgactatagc 660
aggggccaac ttatagagga cgtagagcac acttttgagg aaatcaaacc cctgtacgag 720
cacttgcatg cctacgtacg cgccaaactg atgaatgcgt accccagcta catcagcccc 780
atcggctgcc tgcccgcaca cctgctcggc gacatgtggg gccgattctg gaccaatctg 840
tatagcctca ccgtgccctt tggccagaag ccgaacatag atgtgacgga tgctatggta 900
gaccaggcgt gggatgcaca gcgcatcttc aaggaggccg agaagttctt cgtgagcgtc 960

ggcttgccca acatgaccca gggtttctgg gagaactcaa tgctgactga ccccggcaac 1020
gtacagaaag ccgtatgcca cccaactgct tgggacctgg gtaagggaga cttccggatc 1080
ctcatgtgta ccaaggtgac catggatgac tttctcaccg cccacaatga aatgggcaac 1140
atccagtacg atatggccta cgcagcgcag ccattccttc tgaggaacgg tgccaacgag 1200
ggcttccatg aggcagtcgg agagatcatg agcctgtcag cggcgacccc taaacatctg 1260
aagagcatcg ggctgctgtc tccggacttt caagaggaca atgagactga gatcaacttc 1320
ctcctgaaac aggcgctgac cattgtaggc accttgccct tcacctacat gctggagaag 1380

tggcgatgga tggtgtttaa gggcgagatc ccgaaggacc agtggatgaa aaagtggtgg 1440
gagatgaaga gggagatcgt cggcgtagtt gagccggtcc cccacgacga aacctactgc 1500
gatcctgcca gcctgttcca cgtgagcaac gattacagtt ttatcaggta ctacaccagg 1560
acccttacc aatttcagtt ccaggaggca ctgtgccagg ccgccaagca cgaaggcccc 1620
ctgcacaagt gcgacatcag caacagcacc gaggcgggtc aaaagctgtt taacatgctg 1680
aggctgggca agagcgagcc gtggaccctg gccctggaaa acgttgtggg cgcaaaaaac 1740
atgaacgtga ggcccctgct gaactacttc gagcccctgt tcacctggct gaaggaccag 1800

aacaagaaca gtttcgtggg ctggagtacc gattggagtc cctatgccga cggcggaggt 1860

ggtgcaggag gcggtggaga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaagcc 1920

gcaggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 1980

cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 2040

ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 2100

cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 2160

aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 2220

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 2280

cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc 2340

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 2400

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 2460

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 2520

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 2562

<210> 59

<211> 2568

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 59

atggaatgga gctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa cgactggtgt ccactccgac 60

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagccg caggggggacc gtcagtcttc 120

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 180

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 240

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 300

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 360

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 420

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 480

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 540

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 600

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 660

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 720

tccctgtctc cgggtaaagg cggaggtggt gcaggaggcg gtggagccgg tggcggagga 780

cagtcaacaa tcgaggagca ggcaaagacc ttcctggaca agtttaacca cgaagcggag 840

gacctgttct accagagcag cctggcgagc tggaattaca acaccaacat caccgaggag 900

aacgtgcaga acatgaataa cgctggcgac aagtggagcg ccttcttgaa ggagcaatcc 960

accctggccc agatgtaccc gctgcaagag atacagaacc tgactgtgaa gctgcaactg 1020

caggccctgc agcagaacgg ctccagcgtg ctgagcgaag acaagagcaa aaggctgaat 1080

accatattga acacgatgag caccatctac agcaccggca aagtatgcaa ccccgacaac 1140

ccccaagagt gtctgttgtt ggaacccggc ctgaacgaga ttatggcgaa ctccctggac 1200

tacaacgaac gcctgtgggc atgggagtct tggaggtcag aggttggcaa gcaactgagg 1260

ccgttgtacg aagagtacgt ggtgctgaag aacgaaatgg cacgggccaa tcattatgag 1320

gactacggtg attattggag gggcgactac gaggtgaacg gcgtggacgg ctacgactat 1380

agcaggggcc aacttataga ggacgtagag cacacttttg aggaaatcaa acccctgtac 1440

gagcacttgc atgcctacgt acgcgccaaa ctgatgaatg cgtaccccag ctacatcagc 1500

cccatcggct gcctgcccgc acacctgctc ggcgacatgt ggggccgatt ctggaccaat 1560

ctgtatagcc tcaccgtgcc ctttggccag aagccgaaca tagatgtgac ggatgctatg 1620

gtagaccagg cgtgggatgc acagcgcatc ttcaaggagg ccgagaagtt cttcgtgagc 1680

gtcggcttgc ccaacatgac ccagggtttc tgggagaact caatgctgac tgaccccggc 1740

aacgtacaga aagccgtatg ccacccaact gcttgggacc tgggtaaggg agacttccgg 1800

atcctcatgt gtaccaaggt gaccatggat gactttctca ccgcccacaa tgaaatgggc 1860

aacatccagt acgatatggc ctacgcagcg cagccattcc ttctgaggaa cggtgccaac 1920

gagggcttcc atgaggcagt cggagagatc atgagcctgt cagcggcgac ccctaaacat 1980

ctgaagagca tcgggctgct gtctccggac tttcaagagg acaatgagac tgagatcaac 2040

ttcctcctga aacaggcgct gaccattgta ggcaccttgc ccttcaccta catgctggag 2100

aagtggcgat ggatggtgtt taagggcgag atcccgaagg accagtggat gaaaaagtgg 2160

tgggagatga agagggagat cgtcggcgta gttgagccgg tcccccacga cgaaacctac 2220

tgcgatcctg ccagcctgtt ccacgtgagc aacgattaca gttttatcag gtactacacc 2280

aggacccttt accaatttca gttccaggag gcactgtgcc aggccgccaa gcacgaaggc 2340

cccctgcaca agtgcgacat cagcaacagc accgaggcgg gtcaaaagct gtttaacatg 2400

ctgaggctgg gcaagagcga gccgtggacc ctggccctgg aaaacgttgt gggcgcaaaa 2460

aacatgaacg tgaggcccct gctgaactac ttcgagcccc tgttcacctg gctgaaggac 2520

cagaacaaga acagtttcgt gggctggagt accgattgga gtccctga 2568

<210> 60

<211> 805

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

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

> 61

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 61

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222

> (7)..(7)

<223> K(Dnp)

<400> 62

Tyr Val Ala Asp Ala Pro Xaa

1 5