



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년03월14일

(11) 등록번호 10-2647737

(24) 등록일자 2024년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/005 (2006.01) A61K 39/215 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01) C12N 7/00 (2006.01)

G01N 33/569 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)

A61K 39/215 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0183934

(22) 출원일자 2020년12월24일

심사청구일자 2020년12월24일

(65) 공개번호 10-2022-0092299

(43) 공개일자 2022년07월01일

(56) 선행기술조사문헌

US11119103 A

기술이전 희망 : 기술양도

(73) 특허권자

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

대한민국(국군의무사령부 사령관)

경기도 성남시 분당구 새마을로177번길 81 (율동)

(72) 발명자

홍민선

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 미래관 303호

전보영

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 미래관 423호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 9 항

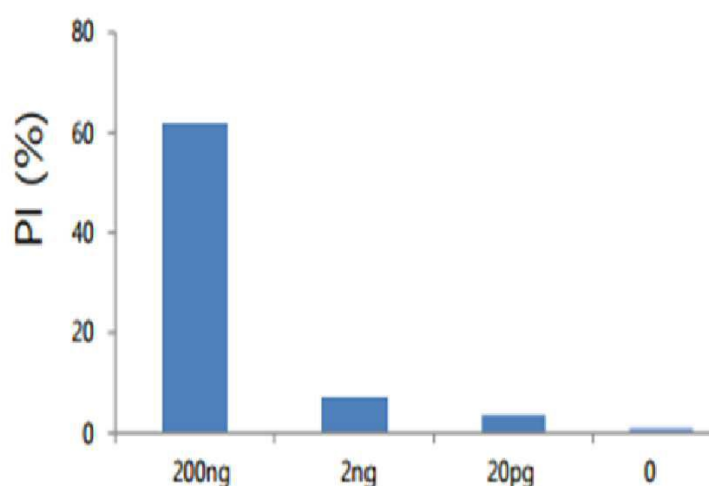
심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 코로나바이러스감염증-19 바이러스 유래 면역원성 폴리펩타이드 단편 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 COVID-19의 바이러스(SARS-CoV-2) 유래 폴리펩타이드 단편 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2에 대한 백신 조성물, 상기 폴리펩타이드를 이용한 SARS-CoV-2 감염 검출/진단 방법, 진단시약 및 키트에 관한 것이다. 본 발명의 폴리펩타이드는 바이러스 내 천연형 단백질과 비교하여 SARS-CoV-2감염 혈청 검출/진단 능력이 현저히 우수하며, 백신으로서 사용 가능성이 있고 또한 산업적 수준에서 생산성이 높으므로 산업상 이용 가능성이 크다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)

C12N 7/00 (2013.01)

G01N 33/56983 (2013.01)

C12N 2770/20022 (2013.01)

C12N 2770/20034 (2013.01)

G01N 2333/165 (2013.01)

(72) 발명자

권순환

대전광역시 유성구 자운로 90(자운동)

박재완

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 미래
관 319호

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 SARS-CoV-2(Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2)에 대한 면역원성(immunogenicity)을 가지는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리펩타이드.

청구항 3

제1항의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4

제3항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 5

제4항의 발현 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항의 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는, SARS-CoV-2 감염 진단용 조성물.

청구항 9

제1항의 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는, SARS-CoV-2에 대한 항체의 존재 여부를 판단하기 위한 진단 시약.

청구항 10

제9항의 진단 시약을 포함하는 코로나 바이러스 감염증-19(coronavirus disease 2019, COVID-19) 진단 키트.

청구항 11

- (a) 동물의 시료를 제1항의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 시료 중 제1항의 폴리펩타이드와 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 혈청 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 코로나바이러스감염증-19 바이러스 유래 면역원성 폴리펩타이드 단편 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한 폴리펩타이드, 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 SARS-CoV-2에 대한 백신 조성물과 상기 폴리펩타이드를 이용한 동물 면역화 방법, 및 상기 폴리펩타이드를 이용한 SARS-CoV-2 감염 검출/진단 방법, 진단시약 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 코로나 바이러스 감염증-19(coronavirus disease 2019, COVID-19)은, 코로나비리대(Coronaviridae)에 속하는 SARS-CoV-2(severe acute respiratory syndrome coronavirus-2) 감염에 의한 급성호흡기증후군으로, 2019년 12월 중국에서 최초 보고가 있는 후, 2020년 1월부터 본격적으로 중국을 넘어 전 세계로 퍼지기 시작해 3월 말까지 일부 국가 및 지역을 제외한 전 세계 대부분의 국가, 그리고 남극을 제외한 모든 대륙으로 확산되어 2020년 11월 25일 기준 전 세계 누적 확진자 6000만 명을 돌파 하였으며, 국내 누적 확진자 3만 명을 넘긴 제1급감염병 신종감염병증후군으로 지정된 법정감염병이다.
- [0005] 2020년 상반기에 주로 북반구의 국가를 휩쓴 이후 코로나19는 6월에 접어들면서 남반구에 위치한 국가에서까지도 확진자 수를 큰 폭으로 증대시켰고, 이는 과거 사스(SARS)나 메르스(MERS)와는 달리 2차, 3차 파동을 거치면서 코로나19 사태가 쉽게 종식되지 않을 수 있음을 시사하기도 한다. (비특허문헌 1)
- [0007] COVID-19는 전 인류의 건강을 위협하는 질병임에도 불구하고 이 질병에 대한 안정성이 입증된 백신은 없는 상태이다. 현재 임상시험 중인 상용화 될 가능성이 있는 대부분의 백신들은 RNA를 기반으로 한 백신으로, 그 보관 방법이 까다롭고 안정성이 입증되지 않아 안정성과 실효성에 대한 우려가 양산되고 있다. 또한, 비말(침방울) 및 접촉을 통한 전파가 이루어지는 SARS-CoV-2 특성상 감염환자의 일상생활과 진료과정에서 생길 수 있는 2차 감염발생에 대처하기 위해 신속하고 정확한 검사결과를 확인할 수 있는 기술이 요구되고 있는 실정이다.
- [0008] 코로나바이러스의 돌기 단백(spike protein)은 숙주 및 조직 친화성(tropism)을 결정하며 수용체 결합 단백을 통해 숙주 세포막의 Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)를 수용체로 이용하여 세포 내로 침투한다(비특허문헌 2).
- [0010] 코로나바이러스의 돌기 단백(spike protein)을 타겟팅한 백신, 치료제 및 진단키트에 대한 연구가 진행 중이나, 돌기 단백질을 발현하기가 어려울 뿐만 아니라 발현이 되어도 정제하는데 많은 어려움을 겪고 있다.
- [0012] 이에 상업적으로 보급될 수 있고 실효성 있는 COVID-19 바이러스 (SARS-CoV-2) 감염 예방 백신 및 COVID-19 바이러스 감염 진단 관련 기술 개발이 시급한 실정이나, 발현 및 분리, 정제의 어려움에 의해서 관련 기술에 대한 연구 및 개발이 미흡한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0014] (비특허문헌 0001) 박호정 et al., 코로나19의 백신개발 동향 및 백신비축 규모에 관한 소론. Environmental and Resource Economics Review. Volume 29, Number 2, June 2020 : pp. 273~292
- (비특허문헌 0002) 박수은 et al., Epidemiology, Virology, and Clinical Features of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19), Pediatr Infect Vaccine, 2020 Apr;27(1):1-10. Korean.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 이에 본 발명자들은 상업적으로 보급될 수 있는 SARS-CoV-2 바이러스 감염 예방 백신 및 SARS-CoV-2 감염 진단 방법을 제공하기 위하여 예의 노력한 결과, 본 발명에서 제공하는 특유의 서열로 구성되는 폴리펩타이드가 대장균 등에서의 발현이 가능하지 않았던 천연형 단백질의 단점을 개선하고, SARS-CoV-2 내의 천연형 단백질과 비교하여도 SARS-CoV-2 감염 혈청 검출/진단 능력이 현저히 우수할 뿐만 아니라, 백신으로서 사용 가능성이 있고 또한 대량 발현에 가능하여 산업적 수준으로 생산성이 높은 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 따라서 본 발명의 목적은, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한 폴리펩타이드를 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 다른 목적은, 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공하는 것이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 COVID-19 바이러스에 대한 백신용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 COVID-19 바이러스에 대한 항체의 존재 여부를 판단하기 위한 진단 시약 및 상기 진단 시약을 포함하는 진단 키트를 제공하는 것이다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 목적은, (a) 동물의 시료를 상기 본 발명의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 시료 중 상기 본 발명의 폴리펩타이드와 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 COVID-19 바이러스 감염 혈청 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0026] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한 폴리펩타이드를 제공한다.
- [0028] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 COVID-19 바이러스에 대한 백신용 조성물을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 COVID-19 바이러스에 대한 항체의 존재 여부를 판단하기 위한 진단 시약 및 상기 진단 시약을 포함하는 진단 키트를 제공한다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 동물의 시료를 상기 본 발명의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 시료 중 상기 본 발명의 폴리펩타이드와 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 COVID-19 바이러스 감염 혈청 검출 방법을 제공한다.
- [0036] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0038] 본 발명에서 용어 '항원'은 적당한 세포와 접촉하여 유입됨에 따라 민감성 및/또는 면역 반응성 상태를 유도시키고, 생체 내 또는 시험관 내에서 이와 같이 감각된 대상체의 면역 세포 및/또는 항체와 입증 가능한 방식으로 반응하는 모든 물질을 지칭한다. 본 발명에서 용어 '항원'은 '면역원'이라는 용어와 동일한 의미로 통칭되어 사용될 수 있으며, 바람직하게 숙주 면역 체계가 그 항원에 특이적인 분비성, 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 일으키도록 촉진할 수 있는 하나 또는 그 이상의 에피토프를 포함하는 분자를 의미한다. 또한 본 발명에서 용어 '항원성' 또는 '면역원성'은 상기 항원 또는 면역원의 성질을 뜻하는 것으로 분비성, 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 일으키는 성질을 의미한다.
- [0040] 상기 용어 '면역 반응'이란 동물 체내에 존재하는 자기방어체계로서, 외부로부터 침입해오는 각종 물질이나 생명체를 자기 자신과 구별해내어 이 침입자를 제거하는 생물학적 현상이다. 이러한 자기방어를 위한 감시 체계는 크게 두 가지 기작에 의해 이루어지는데 하나는 체액성 면역, 그리고 다른 하나는 세포성 면역이다. 체액성 면

역은 혈청 내에 존재하는 항체에 의해 이루어지는데, 항체는 침입한 외부 항원물질과 결합하여 그것을 제거하는 중요한 기능을 한다. 한편, 세포성 면역은 림프계에 속하는 몇 종류의 세포에 의해 이루어지는데 이러한 세포는 침입해온 세포나 조직을 직접 파괴하는 기능을 담당한다. 그리하여 체액성 면역은 주로 세포 외부에 존재하는 세균이나 바이러스, 단백질, 복합탄수화물과 같은 외부물질에 대해 효과적이며, 세포성 면역은 각종 기생충, 조직, 세포 내 감염, 암세포 등에 그 기능을 발휘한다. 이러한 이중 방어체계는 B 세포나 T 세포 등의 주로 두 종류 림프구에 의해 수행되는데 B 세포는 항체를 생산하고, T 세포는 세포성 면역에 가담하고 있다. 이러한 B 세포나 T 세포에 의한 면역 반응은 일단 체내로 침입한 항원에 대하여 반응을 하되, 반드시 같은 종류의 항원이 계속 존재하거나 반복 침입해 왔을 경우에 작용하는 면역체계이다. 따라서, 이러한 면역 반응은 특정 항원에 대한 특이한 반응이다. 이러한 항원특이적 면역 반응 이외에도 체내에는 어떤 항원에 대해 노출되어진 경험이 없는 경우라도 직접적으로 반응하여 공격세포를 파괴하는 일종의 자연 면역 반응도 있는데, 이러한 면역반응에는 neutrophil, macrophage, NK(natural killer) 세포 등이 관여하여 공격대상 세포의 종류에 별로 구애됨이 없이 다양한 기능을 발휘하는 것이 특징이다.

[0042] 바람직하게 본 발명에서 목적하는 면역반응은, 백신 중에 포함된 항원 또는 항원들에 대해 특이적으로 지시된 항체, B 세포, 헬퍼 T 세포, 서프레스 T 세포, 세포독성 T 세포 및 감마-델타 T 세포의 생산 또는 활성화, 숙주에서 치료학적 또는 보호 면역학적 반응을 나타내어 새로운 감염에 대한 내성이 증진되거나 질환의 임상적 중증도가 감소되는 효과중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는 보호 면역 반응일 수 있다.

[0044] 상기 보호는 감염된 숙주가 통상적으로 나타내는 임상적 징후의 감소 또는 부재, 보다 신속한 회복 시간 또는 보다 낮아진 지속시간 또는 감염된 숙주의 조직 또는 체액 또는 배설물에서 보다 낮은 바이러스 역가에 의해 입증된다.

[0046] 본 명세서 사용된 용어 ‘폴리펩타이드’ 및 ‘단백질’은 통상(종래)의 의미에 따라 사용되는 것으로, 즉 아미노산 잔기의 중합체를 의미한다. 폴리펩타이드는 특정의 길이로 한정되지 않지만, 본 발명의 문맥에서는 일반적으로 전장(full length) 단백질의 단편을 지칭하는 것일 수 있다. 상기 폴리펩타이드 또는 단백질은 번역후의 수식, 예를 들면 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등 및 해당 분야에 공지된 다른 수식(자연적으로 발생하는 수식 및 비자연적 발생의 수식)을 포함할 수 있다. 본 발명의 폴리펩타이드 및 단백질은 임의의 다양한 공지의 재조합 및/또는 합성의 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

[0048] 본 명세서에서 사용된 용어 ‘폴리뉴클레오티드’ ‘핵산’은 단일-가닥 또는 이중-가닥의 형태로 된 테옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다.

[0050] 본 명세서에 사용된 아미노산의 일문자(삼문자)는 생화학 분야에서의 표준 약어 규정에 따라 다음의 아미노산을 의미한다: A(Ala): 알라닌; C(Cys): 시스테인; D(Asp):아스파르트산; E(Glu): 글루탐산; F(Phe): 페닐알라닌; G(Gly): 글라이신; H(His): 히스티딘; I(Ile): 이소류신; K(Lys): 라이신; L(Leu): 류신; M(Met): 메티오닌; N(Asn): 아스파라긴; O(Ply)피롤라이신; P(Pro): 프롤린; Q(Gln): 글루타민; R(Arg): 아르기닌; S(Ser): 세린; T(Thr): 트레오닌; U(Sec): 셀레노시스테인, V(Val): 발린; W(Trp): 트립토판; Y(Tyr): 티로신.

[0052] 본 명세서에서 용어 ‘발현(expression)’이라 함은 세포에서 단백질 또는 핵산의 생성을 의미한다.

[0054] 본 발명자들은 SARS-CoV-2의 Sp0 단백질로부터, SARS-CoV-2 감염 혈청(즉, 혈청 내 SARS-CoV-2에 대한 항체) 검출/진단 측면, 백신으로서의 이용 가능성 측면 및 상업적 보급을 위한 대량생산 가능성 측면 등에 있어서 우수한 장점을 지니는 단편으로서 각각 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 신규하게 규명하였다. 상기 폴리펩타이드는 이들이 유래된 천연형 단백질 및 상기 단백질에서 유래된 다른 길이 및 서열구성의 폴리펩타이드(단편)과 비교하여도 전술한 측면들에 있어서 현저히 우수한 효과를 가지는 것이 특징이다.

[0056] 이에 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0058] 상기 본 발명의 폴리펩타이드는 SARS-CoV-2에 대한 면역원성(immunogenicity)인 것이 특징이다.

[0059] 본원에서 기재되는 폴리펩타이드는 당분야의 숙련자에게 공지된 임의의 적합한 절차, 즉 유전공학적 방법, 예컨대 재조합 기법에 의해 제조(제작)될 수 있다. 예를 들면, 통상적인 방법에 따라 상기 폴리펩타이드 또는 이의 기능적 동등물을 암호화하는 핵산을 제작한다. 상기 핵산은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 제작할 수 있다. 다른 방법으로 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예컨대, 자동 DNA 합성기(Biosearch 또는 Applied Biosystems 사에서 판매하는 것)을 사용하여 DNA 서열을 합성할 수도 있다. 제작된 핵산은 이에 작동가

능하게 연결되어 (operatively linked) 핵산의 발현을 조절하는 하나 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)(예: 프로모터, 인핸서 등)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시킨다. 생성된 형질전환체를 상기 핵산이 발현되기에 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하여, 배양물로부터 상기 핵산에 의해 발현된, 실질적으로 순수한 폴리펩타이드를 회수한다. 상기 회수는 당 업계에 공지된 방법(예컨대, 크로마토그래피)을 이용하여 수행할 수 있다. 상기에서 "실질적으로 순수한 폴리펩타이드(substantially pure polypeptide)"라 함은 본 발명에 따른 폴리펩타이드가 숙주세포로부터 유래된 어떠한 다른 단백질도 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다.

[0060] 본 발명의 폴리펩타이드 합성을 위한 유전공학적 방법은 다음의 문헌을 참고할 수 있다: Maniatis et al., Molecular Cloning; A laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, 1982; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Second(1998) and Third(2000) Editions; Gene Expression Technology, Method in Enzymology, Genetics and Molecular Biology, Method in Enzymology, Guthrie & Fink(eds.), Academic Press, San Diego, Calif, 1991; 및 Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:12073-12080, 1990.

[0062] 재조합 제조 방법 뿐만 아니라, 또한 본 발명의 폴리펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 대표적인 방법으로서 이들로 한정되는 것은 아니지만 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법이 포함된다.

[0063] 하나의 실시 양태에서, 일례로 본 발명의 폴리펩타이드는 고상 기법을 이용한 직접적 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다(Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154 (1963)). 고체상 펩타이드 합성(SPPS) 방법은 작은 다공성의 비드(beads)에 링커(linkers)라 불리는 기능성 유닛(functional units)을 부착하여 펩타이드 사슬을 이어 나갈 수 있도록 유도함으로써 합성을 개시할 수 있다. 액체상 방법과 달리 펩타이드는 비드와 공유 결합하여 TFA(trifluoroacetic acid)와 같은 특정 반응물에 의해 절단되기 전까지 여과(filtration) 과정에 의해 떨어져 나가는 것을 방지한다. 고체상에 부착된 펩타이드의 N-말단 아민과 N-보호 아미노산 유닛(N-protected amino acid unit)이 결합하는 보호(protection) 과정, 탈보호(deprotection) 과정, 다시 드러난 아민 그룹(amine group)과 새로운 아미노산이 결합하는 커플링(coupling) 과정의 사이클(cycle, deprotection-wash-coupling-wash)이 반복되면서 합성이 이루어지게 된다. 상기 SPPS 방법은 마이크로파(microwave) 기술을 함께 이용하여 수행할 수 있으며, 마이크로파 기술은 펩타이드 합성 과정에서 열을 가해줌으로써 각 사이클의 커플링과 탈보호에 요구되는 시간을 단축시킬 수 있다. 상기 열 에너지는 확장되는 펩타이드 사슬이 접히거나(folding) 집합체를 형성하는 것(aggregation)을 방지하고 화학적 결합을 촉진시킬 수 있다.

[0064] 또한 액체상 펩타이드 합성법에 의해 본 발명의 펩타이드를 제작할 수 있으며, 이의 구체적 방법은 하기의 문헌들을 참조로 한다: US 등록특허 제 5,516,891. 또한 본 발명의 펩타이드는 상기 고체상 합성법과 액체상 합성법을 혼합하는 방법 등의 다양한 방법으로 합성 가능하며, 본 명세서에 기술된 수단에 그 제조 방법이 제한되지 않는다.

[0065] 단백질 합성은 수동 기법을 이용해서 또는 자동화에 의해 수행될 수 있다. 자동화된 합성은, 예를 들어 Applied Biosystems 431A 펩티드 합성기(Perkin Elmer)를 이용해서 달성될 수 있다. 대안적으로, 다양한 단편이 별도로 화학적으로 합성되고 화학적 방법을 이용하여 조합되어 목적 분자를 제조할 수 있다.

[0067] 한편, 본 발명 폴리펩타이드의 범위에는 전술한 본 발명 폴리펩타이드의 기능적 동등물 및 그들의 염을 포함한다. 일례로 상기 "기능적 동등물"이란 전술한 본 발명의 폴리펩타이드와 적어도 80% 이상의, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%이상의 아미노산기 서열 상동성(즉, 동일성)을 갖는 것으로 예를 들면, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 것을 포함하며, 본 발명의 폴리펩타이드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩타이드를 말한다. 상기에서 '실질적으로 동질의 생리활성'이란, 이에 제한되지 않으나, 일례로 동물의 체내에서 SARS-CoV-2에 대한 보호성 면역반응을 유도하는 것일 수 있으며, 또 다른 일례로 SARS-CoV-2 감염 동물의 혈청을 검출/진단하는 능력 등을 의미하는 것일 수 있다.

[0068] 하나의 실시 양태에서, 본 발명에서 기능적 동등물은 전술한 본 발명 폴리펩타이드의 아미노산 서열 중 일부가 부가, 삽입, 치환(비보전적 또는 보전적 치환), 결실 또는 이들의 조합에 의해 생성된 것일 수 있다. 상기에서 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환일 수 있다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met).

분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 또한 상기 기능적 동등물에는, 본 발명 폴리펩타이드의 아미노산 서열상에서 아미노산의 일부가 결실된 변형체도 포함된다. 상기 아미노산의 결실 또는 치환은 바람직하게는 본 발명에서 제공하는 폴리펩타이드의 생리활성(케모카인 활성)에 직접적으로 관련되지 않은 영역에 위치해 있다. 아울러 상기 본 발명 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 양 말단 또는 서열 내에 몇몇의 아미노산이 부가된 변형체도 포함된다.

- [0069] 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 폴리펩타이드의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 폴리펩타이드의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩타이드 유도체도 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경 및 생리활성을 유지하면서 다른 단백질과 융합으로 만들어진 융합단백질 등이 이에 포함된다.
- [0070] 하나의 실시 양태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 경우에 따라 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [0072] 또한 본 발명은, 상기 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화(코딩)하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0074] 상기 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 폴리펩타이드를 암호화할 수 있는 한 폴리뉴클레오타이드의 염기 조합이 특별히 제한되지 않는다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 DNA, cDNA 및 RNA 서열을 모두 포함하여 단쇄 또는 이중쇄의 형태의 핵산분자로서 제공될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 이를 발현할 수 있는 벡터에 작동적으로 연결시켜 상기 본 발명의 폴리펩타이드를 제공할 수 있다. 본 발명은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터 또는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0078] 본 발명에서 용어 ‘발현벡터’ 또는 ‘재조합 벡터’란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 말한다.
- [0079] 상기 용어 ‘작동가능하게 연결된(operably linked)’는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩하는 핵산 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소들을 사용한다.
- [0081] 하나의 실시 양태에서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 등 과 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다.
- [0083] 시그널 서열에는 숙주가 에스케리치아 속(*Escherichia* sp.) 균인 경우에는 PhoA 시그널 서열, OmpA 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스속균인 경우에는 α -아밀라아제 시그널 서열, 서브틸리신 시그널 서열 등이, 숙주가 효모인 경우에는 MF α 시그널 서열, SUC2 시그널 서열 등이, 숙주가 동물세포인 경우에는 인슐린 시그널서열, α -인터페론 시그널 서열, 항체 분자 시그널 서열 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0085] 또한 본 발명은 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 즉, 본 발명은 상기 발현 벡터(재조합 벡터)로 형질전환된 형질전환체(숙주 세포)를 제공한다.
- [0087] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입할 수 있는 것으로 공지된 것이라면 어떤 방법이라도 사용가능하며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 미세사출법(microprojectile bombardment), 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화 칼슘(CaCl_2) 침전, 실리온 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로 박테리아 매개된 형질전환, PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포좀 매개법

(liposome-mediated method), 텍스트란 셀레이트, 리포펙타민, 열충격법 등이 포함되나, 이로 제한되지 않는다.

- [0088] 상기 용어 '형질전환체'는 '숙주세포' 등과 호환성 있게 사용될 수 있으며, 임의의 수단(예: 전기충격법, 칼슘 포스파타제 침전법, 미세주입법, 형질전환법, 바이러스 감염 등)에 의해 세포 내로 도입된 이중성 DNA를 포함하는 원핵 또는 진핵 세포를 의미한다.
- [0089] 본 발명에서 상기 형질전환체는 클로닝 분야에서 통상적으로 사용되는 모든 종류의 단세포 유기체, 예컨대 각종 박테리아(예컨대, Clostridia속, 대장균, 등) 등의 원핵세포 미생물, 효모 등의 하등 진핵세포 미생물과 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로 당업자가 목적하는 바에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용할 수 있다. 본 발명의 상기 형질전환체는 바람직하게 형질전환 미생물을 의미하는 것일 수 있다. 구체적으로, 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 숙주세포로는 에스케리치아 콜라이(대장균, *Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포일 수 있다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비자에(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로미세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라크라사(*Neurospora crassa*))등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0090] 본 발명의 형질전환체(또는 형질전환 미생물, 숙주세포)은 바람직하게 에스케리치아 콜라이(대장균, *Escherichia coli*)일 수 있다. 상기 본 발명의 에스케리치아 콜라이 균주로는 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 Rosetta2(DE3), C41(DE3), SoluBL21 등이 사용될 수 있다.
- [0092] 또한 본 발명은 전술한 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 COVID-19 바이러스에 대한 백신 조성물을 제공한다.
- [0094] 본 발명에서 용어 '백신' 또는 '백신 조성물'은 면역응답(immuno response)을 자극하는 조성물을 의미하는 것으로, 면역원성 조성물과 동일한 의미로서 본 명세서에서 혼용되어 사용된다. 상기 백신은 예방 백신과 치료 백신을 모두 포함한다. 예방 백신은 개체가 항원에 노출될 때 더 큰 면역 반응을 내재하게 하기 위해, 항원을 포함하는 물질에 노출되기 전에 면역 반응을 유도하고, 따라서 항원을 운반하는 물질 또는 세포에 저항하는 능력을 증가시키는 것을 의미한다. 치료 백신은 백신의 항원과 관련된 질환을 이미 가지고 있는 개체에 투여하는 방식으로 사용되는 것으로 상기 치료 백신은 항원을 운반하는 질환 또는 세포와 싸우기 위한 증가된 능력을 제공하여 항원에 대한 개체의 면역 반응을 증가시킬 수 있다.
- [0095] 하나의 실시 양태에서, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 COVID-19 바이러스 감염 예방용 백신 조성물을 제공하는 것일 수 있다.
- [0097] 본 발명의 상기 백신 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여되어 면역반응을 유도할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 경피, 근육내, 복막내, 정맥내, 피하내 경로로 백신을 접종하는 것일 수 있다. 바람직하게는, 1차 및 2차 접종 시 백신을 근육내 접종하는 것일 수 있다.
- [0099] 상기 백신은 당업계에 알려진 임의의 형태, 예를 들면, 액체 및 주사제의 형태 또는 현탁액에 적합한 고체 형태일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 제제는 또한 리포솜이나 가용 유리 내로 유화 또는 캡슐화되거나 에어로졸이나 스프레이 형태로도 제조될 수 있다. 이들은 경피(transdermal) 패치에 함유시킬 수도 있다. 액체 또는 주사제의 경우, 필요시 프로필렌 글리콜 및 용혈 현상을 방지하는데 충분한 양(예: 약 1%)의 염화나트륨을 함유할 수 있다.
- [0101] 본 발명의 백신 조성물은 전술한 본 발명의 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하며, 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및 보조제로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.
- [0103] 상기 담체(carrier)라 함은 세포 또는 조직 내로 목적물의 전달을 용이하게 하는 물질을 의미한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 일례로 비경

구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있다. 또한, 담체는 티탄 또는 중합체로 제조된 코팅 패치와 같은 건식 제제(dry formulation)를 포함할 수 있다. 백신에 적합한 담체는 기술분야의 당업자에게 공지되어 있으며, 단백질, 당 등을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기의 담체는 수용액, 또는 비-수용액, 현탁액 또는 에멀전일 수 있다.

[0105] 또한 본 발명의 조성물에는 면역원성을 증가시키기 위한 면역보조제로서 정형 또는 비정형 유기 또는 무기 고분자등이 사용될 수 있다. 면역보조제는 일반적으로 항원에 대한 화학적 물리적 결합을 통해 면역반응을 촉진시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이 연구에서 사용된 면역보조제로서는 비정형 알루미늄 겔, 오일 에멀전, 또는 이중 오일 에멀전 그리고 이뮤노졸 등이 사용되었다. 또한 면역반응의 촉진을 위해 다양한 식물 유래 사포닌, 레바미솔, CpG 다이뉴클레오타이드, RNA, DNA, LPS, 다양한 종류의 사이토카인 등이 사용되었다. 위와 같은 면역 조성물은 다양한 보조제와 면역반응 촉진 첨가물의 조합에 의해 최적의 면역반응 유도를 위한 조성으로 사용될 수 있다.

[0106] 이에 제한되지 않으나, 미네랄 염 보조제 (예를 들면, 알루미늄-, 칼슘-, 철-, 지르코늄-기반 염 보조제), 계면활성 (tensioactive) 보조제 (예를 들면, Quil A, QS-21, 기타 사포닌), 세균-유래 보조제 (예를 들면, N-아세틸 뮤라밀-L-알라닌-D-이소글루타민(MDP), 지질 다당류(LPS), 모노포스포릴 지질 A, 트레할로스 다이마이콜레이트 (TDM), DNA, CpGs, 세균 독소), 보조제 에멀전(예를 들면, FIA, Montanide, Adjuvant 65, Lipovant), 리포솜 보조제, 폴리머 보조제 및 담체, 사이토킨 (예를 들면, 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자), 탄수화물 보조제, 살아있는 항원 전달 시스템(예를 들면, 박테리아, 바이러스)등을 포함할 수 있다.

[0108] 또한 백신에 추가될 있는 조성물로는 안정제, 불활화제, 항생제, 보존제, 등이 사용될 수 있다. 백신의 투여 경로에 따라 백신 항원은 증류수, 완충용액 등과도 혼합하여 사용될 수 있다.

[0110] 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). 본원에 기재된 백신의 제형 및 투여 기술은 문헌 (Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 22판) 등을 참조로 하여 제공될 수 있다.

[0112] 또한 본 발명의 면역원성 복합 단백질을 포함하는 백신 조성물은 이를 필요로 하는 개체에 유효량으로 투여하여 면역화하는데 사용할 수 있다.

[0114] 상기 '개체(subject)' 는 동물, 바람직하게는 포유동물을 의미할 수 있다. 하나의 실시 양태에서, 상기 개체는 바람직하게 인간일 수 있다.

[0115] 따라서 하나의 실시양태에서, 본 발명은 제1항의 폴리펩타이드를 동물에 투여하는 것을 특징으로 하는, 동물의 SARS-CoV-2에 대한 면역력을 증진시키는 방법(즉, SARS-CoV-2 에 대해 동물을 면역화시키는 방법)을 제공한다.

[0117] 본 명세서에서 용어 '면역화(immunization)' 는 본 발명에 따른 면역원성 복합 단백질을 개체에 투여했을 때, 개체 내에서 상기 면역원성 복합 단백질에 대한 분비성, 체액성 및/또는 세포성 면역 반응이 유발되는 것으로, 이 같은 면역화를 통해 대상 질환(본 발명에서는 특히 SARS-CoV-2 감염)에 대한 예방 또는 치료 효과가 나타나게 된다.

[0119] 상기 '유효량' 은 본 발명의 상기 백신 조성물의 대상 질환(특히, SARS-CoV-2 감염)에 대한 예방이나 치료 효과를 나타내는 양으로, 투여된 개체에서 본 발명의 폴리펩타이드가 분비성, 체액성 및/또는 세포성 면역 반응을 유도하기에 충분한 양을 의미한다.

[0121] 본 발명의 폴리펩타이드의 총 유효량은 단일 투여량(single does)으로 개체에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 또한 투여 목적에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수도 있다. 상기 유효 용량은 대상 질환의 유형 및 중증도, 투여 경로 및 투여 횟수뿐 만 아니라 투여가 필요한 개체의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 각 개체에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 해당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 투여 목적에 따라 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 또한 본 발명에 따른 단백질을 투여한 후 면역 세포의 활성을 결정해주는 검정 방법(assay) 또는 널리 알려진 생체내 검정을 사용하여 요법의 효능을 모니터링함으로써 결정할 수도 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[0123] 전술한 본 발명의 폴리펩타이드는, 천연형 단백질 및 상기 단백질 유래 다른 길이/서열 구성의 폴리펩타이드들

과 비교하여도, 특이적으로 SARS-CoV-2 감염 혈청을 검출(진단)하는 효과가 현저하다. 본 발명에서 SARS-CoV-2 감염 혈청을 검출(진단)한다는 것은, 개체의 혈액, 혈장 또는 혈청 내에 존재하는 항-SARS-CoV-2 항체(COVID-19 바이러스에 대한 항체)와 상기 본 발명의 폴리펩타이드가 결합하여(항원-항체 복합체 형성) 상기 항체의 존재 유무 또는/및 존재량을 확인하는 것을 의미한다. 개체의 혈액, 혈장 또는 혈청 내에 항-SARS-CoV-2 항체의 존재가 검출 또는/및 확인되는 경우, 해당 개체는 SARS-CoV-2에 감염된 상태인 것으로 판정할 수 있다.

- [0124] 따라서 본 발명은, 전술한 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 COVID-19 바이러스 감염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0126] 또한, 본 발명은, 전술한 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 COVID-19 바이러스에 대한 항체의 존재 여부를 판단하기 위한 진단 시약 조성물 및 상기 진단 시약 조성물을 포함하는 진단 키트를 제공한다.
- [0127] 또한 본 발명은
- [0128] (a) 동물의 시료를 전술한 본 발명의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계; 및
- [0129] (b) 상기 시료 중 상기 본 발명의 폴리펩타이드와 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는 COVID-19 바이러스 감염 혈청 검출(진단) 방법을 제공한다.
- [0131] 특히, 본 발명의 폴리펩타이드는 SARS-CoV-2에 대한 특이성이 현저하여, SARS-CoV-2에 대해서 특이적으로 검출할 수 있다. 따라서 하나의 실시 양태에서, 바람직하게 본 발명은 전술한 본 발명의 폴리펩타이드를 유효성분으로 포함하는 COVID-19 바이러스에 대한 항체의 존재 여부를 판단하기 위한 진단 시약 조성물 및 이를 포함하는 진단 키트를 제공하는 것일 수 있으며, 또한 상기 (a) 및 (b) 단계를 포함하는 SARS-CoV-2 감염혈청 검출(진단) 방법을 제공하는 것일 수 있다.
- [0133] 본 명세서에서 용어 ‘시료’는 고형 시료 또는 체액성 시료일 수 있으며, 바람직하게는 혈청, 혈장, 근육 조직, 전혈, 림프액, 비장 또는 이들의 균질화물(homogenate) 일 수 있다.
- [0135] 시료와 항체 복합체의 형성은 비색법(colormetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 또는 섬광계수법(scintillation counting method)으로 검출할 수 있다.
- [0136] 상기 검출은 시료와 항체 복합체를 검출하기 위한 것으로 여러 가지 표지체를 사용하여 실시할 수 있다. 표지체로 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자 또는 방사성 동위원소를 사용할 수 있다.
- [0137] 검출 표지체로서 효소로는 아세틸콜린에스테라제, 알칼라인 포스파타제, β -D-갈락토시다제, 호스래디쉬 퍼옥시다제 및 β -라타마제 등을, 형광물로는 플루오레세인, Eu^{3+} , Eu^{3+} 킬레이트 또는 크립테이트 등을, 리간드로는 바이오틴 유도체 등을, 발광물로는 아크리디늄 에스테르 및 이소루미놀 유도체 등을, 미소입자로는 콜로이드 금 및 착색된 라텍스 등을, 방사성 동위원소로는 ^{57}Co , ^3H , ^{125}I 및 ^{125}I -볼톤(Bonton) 헌터(Hunter) 시약 등을 사용할 수 있다. 그러나 상기 예시된 것들 외에 면역학적 분석법에 사용할 수 있는 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.
- [0139] 본원에 따른 검출 또는 진단에 있어서, 당업계에 항원-항체 복합체를 검출하는 수단으로서 알려진 것이라면 그 방법 및 기구가 특별히 제한되지 않고 적용될 수 있다. 이에 제한되지 않으나, 예를 들면 항원-항체 복합체는 방사상 면역확산(Radial Immunodiffusion), 면역전기영동 또는 역전류 전기영동을 포함하는 면역침전분석, RIA(Radioimmunoassay), 경쟁적 간접면역형광법(competition indirect immunofluorescent assay), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 또는 면역크로마틱 분석(immunochromatic assay) 등의 방법으로 검출될 수 있다. 이런 방식의 검출은 특히 항원이 가용성 단백질로 제공되는 경우에 유리하며, 본원 발명의 폴리펩타이드는 이러한 특성을 만족한다. 본원에 따른 일구현예에서는 ELISA 방식이 사용된다. 본 발명은 상기 방법을 이용하는 진단 키트를 제공하는 것으로 이해될 수 있으며, 각 방법에 따른 키트 구성품이 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0141] 본원에 따른 일 구현 예에서, 항원(본 발명 폴리펩타이드)-항체 복합체의 검출을 위해, 항원(본 발명 폴리펩타이드)이 표지물질로 표지될 수 있다. 즉, 본 발명의 폴리펩타이드는 검출가능한 표지에 링크(예: 공유 결합 또는 가교)되어 제공될 수 있다. 상기 검출 가능한 표지는 발색효소(예: 퍼옥시다제(peroxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase)), 방사성 동위원소(예: ^{124}I , ^{125}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{35}S), 크로모포어(chromophore), 바이오틴(biotin), 발광물질 또는 형광물질(예: FITC, RITC, 로다민(rhodamine), 텍사스레드

(Texas Red), 플로레신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 퀀텀닷(quantum dots)), 자기공명영상조영제(예: 수퍼파라마그네틱 산화철(superparamagnetic iron oxides, SPIO), 울트라수퍼파라마그네틱 산화철(ultrasuperparamagnetic iron oxides, USPIO)), 금 입자(Gold particle) 등 일 수 있다. 유사하게, 상기 검출 가능한 표지는 SARS-CoV-2와 관련 없는 다른 항체 에피토프(epitope), 기질(substrate), 보조인자(cofactor), 저해제 또는 친화 리간드일 수 있다. 이러한 표지는 본 발명의 폴리펩타이드를 합성하는 과정 중에 수행할 수도 있고, 이미 합성된 폴리펩타이드에 추가로 수행될 수도 있다.

[0143] 본원에 따른 일 구현 예에서, 상기 항원(본 발명에 따른 폴리펩타이드)에 결합한 항체(1차 항체, 예를 들어 동물 혈청 내에 생성된 항체)를 검출하는 검출항체(2차 항체)가 표지될 수도 있다. 본원에 따른 방법에 사용될 수 있는 검출 항체(2차 항체)는, 진단 대상 동물에서 생성된 이뮤노글로불린(일례로, IgM, IgG)에 특이적으로 결합하며, 상기 검출항체는 시각적 또는 다양한 이미지 검출 장비를 이용하여 검출할 수 있는 물질로 표지될 수 있다. 이는 본 발명의 폴리펩타이드 표지물질에 대해 전술한 바를 참조로 하여 이해될 수 있다.

[0145] 하나의 구체적 실시 양태에서 본원에 따른 항원(본 발명 폴리펩타이드) 또는 검출항체(2차 항체)는 표지물질로서 호스라디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase)와 같은 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase), 글루코오스 옥시다아제(glucose oxidase), 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase), 유레아제(urease), 카탈라아제(catalase), 아스파르기나아제(asparaginase), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 말레이트 데하이드로지나아제(malate dehydrogenase), 스태필로코칼 뉴클레아제(staphylococcal nuclease), 트리오스 포스페이트 이소머라아제(triose phosphate isomerase), 글루코오스-6-포스페이트 데하이드로지나아제(glucose-6-phosphate dehydrogenase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 그리고 아세틸콜린 에스터라아제(acetylcholine esterase)와 같이 특정 기질(substrate)의 존재하에서 화학반응을 촉매하여 검출가능한 발색반응 또는 광을 방출할 수 있는 효소로 표지될 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0147] 다른 구체적 실시 양태에서, 본원에 따른 항원(본 발명 폴리펩타이드) 또는 검출항체는 광의 조사에 의해 조사된 광과 상이한 파장의 광을 방출하는 바이로루미네스스, 케미루미네스스, 일렉트로루미네스스, 일렉트로케미루미네스스 및 포토루미네스스에 사용되는 발색단으로 예를 들면 단백질로서 그린형광단백질; 유기화합물로서 플루오르세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate), 로다민(rhodamine), 파이코에리트린(phycoerythrin), 파이코시아닌(phycoerythrin), 알로파이코시아닌(allophycocyanin), 그리고 플루오르카민(fluorecamine)을 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0149] 또 다른 구체적 실시 양태에서, 본원에 따른 항원(본 발명 폴리펩타이드) 또는 검출항체는 다양한 방사선 동위원소 물질로 표지될 수 있다. 본원에서 표지물질의 검출은 예를 들어 방사선동위원소인 경우 신틸레이션 카운터(scintillation counter)에 의해 수행할 수 있으며, 예를 들어 표지물질이 형광물질인 경우, 스펙트로스코피, 포스포이미징 장치 또는 형광계측기 등과 같은 방법에 의해 수행할 수 있다. 효소로 표지된 경우, 적절한 기질의 존재하에서 효소에 의한 발색성 기질의 변환에 의해 나타나는 발색 산물을 측측을 함으로써 수행할 수 있다. 또한, 적당한 표준 혹은 대조군과 의 비교를 통해 효소반응에 의해 나타나는 발색 산물의 색 비교로서 탐지할 수 있다.

[0151] 구체적 실시 양태에서 본원에 따른 항원(본 발명 폴리펩타이드) 또는 검출항체를 표지하는 물질은 예를 들면 발색단; 알칼라인 포스파타아제, 바이오틴, 베타-갈락토시다아제 또는 퍼옥시다아제를 포함하는 효소; 방사선물질; 또는 콜로이드성 금입자 또는 착색 라텍스입자 등과 같은 나노입자를 포함하는 물질을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0153] 본 발명의 키트에는 본 발명의 폴리펩타이드 이외에 상기 폴리펩타이드와 항-SARS-CoV-2 항체의 결합 반응을 위한 적당한 완충용액 또는 배지 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0155] 또한 본 발명의 폴리펩타이드는 플레이트의 표면에 코팅된 형태로 제공될 수도 있다. 이 경우에는 상기 플레이트에 시료를 처리하여 적당한 조건에서 반응시킨 후, 플레이트의 표면상에서의 본 발명의 폴리펩타이드(항원)와 시료 내 항체의 결합을 관찰하여 SARS-CoV-2 감염 여부를 진단할 수 있다. 이러한 본 발명의 폴리펩타이드는 96 웰 마이크로웰플레이트와 같은 마이크로웰플레이트, 콜로이드성 금 입자 또는 착색 라텍스 입자를 포함하는 비드 또는 입자 또는 셀룰로스, 나이트로셀룰로스, 폴리에테르설폰, 폴리비닐리딘, 플루오라이드, 나일론, 하전나일론 및 폴리테트라플루오로에틸렌 등과 같은 멤브레인에 부착되어 제공될 수 있다. 상기 항원(본 발명의 폴리펩타이드)을 부착 또는 코팅하는 방법은 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들면 본원 실시예에 기재된 것을 참고할 수 있다.

[0157] 구체적 실시 양태에서 본 발명의 진단시약, 및 이를 포함하는 키트는 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), RIA (Radio Immuno Assay) 등과 같은 샌드위치 방식의 면역분석방식으로 사용될 수 있다. 이러한 방법은 고상의 기질 예를 들면 글라스, 플라스틱 (예를 들면 폴리스티렌), 폴리스카라이드, 나일론 또는 나이트로셀룰로스로 제작된 비드, 멤브레인, 슬라이드 또는 마이크로웰플레이트에 결합된 항원에 검체를 추가한 후, 직접 또는 간접 검출이 가능한 표지물질 예를 들면 상술한 바와 같은 3H 또는 125I와 같은 방사성 물질, 형광물질, 화학발광물질, 헵틴, 바이오틴, 디그옥시제닌 등으로 표지되거나 또는 기질과의 작용을 통해 발색 또는 발광이 가능한 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제, 말레이트 데하이드로게나아제와 같은 효소와 컨주게이션된 항체와의 결합을 통해 정성 또는 정량적으로 검출할 수 있다. 또한 면역분석 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984 등에 기재되어 있다. ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 등과 같은 상술한 물질로 표지된 2차 검출항체 및 검출에 사용되는 기질 등을 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0159] 본 발명에서 제공하는 특유의 서열로 구성되는 폴리펩타이드는 바이러스 내 천연형 단백질과 비교하여 발현 및 정제수율이 현저히 우수하고, SARS-CoV-2 내의 천연형 단백질과 비교하여도 SARS-CoV-2 감염 혈청 검출/진단 능력이 현저히 우수할 뿐만아니라, 백신으로서 사용 가능성이 있으며 또한 산업적 수준에서 생산성이 높다.

도면의 간단한 설명

[0161] 도 1은 천연형 Covid19-Sp0 단백질(서열번호 1) 단백질을 대장균에서 발현시킨 뒤, SDS-PAGE 전기영동 실시 후 Commassie 염색으로 폴리펩타이드를 확인한 결과(도 1의 1,2) 와 본 발명의 Covid19-Sp101 단편 폴리펩타이드(서열번호 2)를 대장균에서 발현시킨 뒤 SDS-PAGE 전기영동 실시 후 Commassie 염색으로 폴리펩타이드를 확인한 결과(도 1의 3) 및 상기의 Covid19-Sp101 단편 폴리펩타이드(서열번호 2)를 정제하여 SDS-PAGE 전기영동 실시 후 Commassie 염색으로 폴리펩타이드를 확인한 결과(도 1의 4)를 나타낸다.

도 2는 SARS-CoV-2 감염 여부 진단에 있어서, 본 발명의 Covid19-Sp101 단편 폴리펩타이드(서열번호 2)의 효과를 이의 시판용 키트(BIONOTE)를 이용하여 경쟁적(competitive)-ELISA를 진행한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0162] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0163] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0165] 실시예 1: COVID-19의 바이러스(SARS-CoV-2) Covid19-Sp0 단백질 유래 단편 폴리펩타이드 제작

[0166] SARS-CoV-2를 구성하는 일부 단백질의 절편 protein (Covid19-Sp0)의 연속적인 서열을 기초로 하여 다양한 폴리펩타이드 단편을 제작하였으며, 대표적인 예들을 표 1에 도시하였다. Covid19-Sp0 단백질의 활용을 위해 재조합 단백질로 대장균에서 발현 및 정제를 실시하였으나, 발현율이 너무 낮아 다음 단계인 정제가 불가능하였다. 이에 Covid19-Sp0 단백질의 전체 아미노산 서열(330번 내지 527번) 중 330번 내지 362번에 해당하는 아미노산 서열을 363번 내지 527번의 아미노산 서열의 다음에 비연속적으로 배치되도록 Covid19-Sp101의 단백질 서열을 디자인하고, 도출된 Covid19-Sp101 염기서열을 재조합 단백질 발현 플라스미드에 삽입하여 대장균 발현을 실시하였다.

표 1

pep. fragment 명칭	서열정보	서열번호
Covid19-Sp0	PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGNYLYRLFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYPYRVVLSFELLHAPATVCGP	서열번호1
Covid19-Sp101	MADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGNYLYRLFRKSNLKPFRDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYPYRVVLSFELLHAPATVCGPPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV	서열번호2

- [0170] 상기 단백질 및 폴리펩타이드들은, 간략하게 다음과 같은 방법으로 생산되었다. Covid19-Sp101 단편 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA는 마크로젠에 의뢰하여 합성하였다. 각 단편 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 pET49b백터(Novagen)의 BamH1, SalI restriction site 사이에 클로닝되었다. 각 폴리펩타이드들은 Escherichia coli 균주인 BL21 균주에서 과발현을 시도하였다. 상기 벡터로 형질전환된 E. coli 세포들을 100 µg/ml kanamycin이 포함된 Luria-Bertani(LB) 배지를 이용하여 37℃에서 OD600이 0.7이 될 때까지 성장 시켰고, 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)에 의해 단백질 발현이 유도되었다. IPTG 1000 µl를 넣은 후, 추가로 3시간 동안 배양한 다음, 5000rpm에서 20 분간 원심 분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 50ml의 1X PBS 버퍼에 재현탁 시킨 후, 초음파 처리로 깨우고 파쇄물을 14000rpm에서 20분간 원심 분리하여 침전물만 회수하였다. 회수된 세포를 50ml의 IB buffer(pH8.0 Tris 0.1M, pH8.0 Ethylenediaminetetraacetic acid 5mM, phenylmethanesulfonyl fluoride 0.1mM)에 재현탁 시킨 후, 초음파 처리로 용해화하고 최종적으로 Denaturation buffer(6M Guanidine Hydrochloric acid, pH8.0 Tris 0.1M 및 pH8.0 Ethylenediaminetetraacetic acid 2.5mM 조성의 Denaturation buffer를 사용)에 재현탁 시킨 후, 초음파 처리로 침전물을 용해화하였다. 5,000rpm으로 원심분리하여, Snake skin tube에 상층액을 넣어주고 20 mM HEPES pH 7.4 150 mM NaCl buffer 에 4 ℃ 14시간 넣어 주었다. 이것을 다시 5,000rpm으로 20분동안 원심분리시킨 후, 상층액을 Ni-NTA에 처리하여 1시간 30분 동안 결합시켰다(4℃). 50 mM Imidazole을 포함한 1X PBS 버퍼를 이용해 washing해준 후, 250 mM Imidazole 및 500 mM Imidazole을 포함한 1X PBS 버퍼를 이용해 용출시켰다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용해 폴리펩타이드를 확인하였으며 폴리펩타이드들은 pH7.4 HEPES 20mM 및 Sodium chloride 150mM를 포함하는 버퍼에 수용되었다 (4℃, overnight).
- [0171] **1-2. Covid19-Sp0 천연형 연속적인 절편(native consecutive sequence fragment) 단백질 대비 단편 폴리펩타이드 생산성 평가**
- [0172] 단편 폴리펩타이드들의 생산성을 정량적으로 비교 평가하였다. 그 결과, Covid19-Sp0 전장 단백질은 발현이 안 되거나, 발현 되어도 정제가 되지 않았다. 반면 Covid19-Sp101(서열번호 2)의 단편 폴리펩타이드는 Covid19-Sp0에 비해 상대적으로 높은 발현량을 보이며 정제가 가능했다. 구체적으로 본 발명의 Covid19-Sp101 (서열번호 2)의 단편 폴리펩타이드의 발현 및 정제의 최종 수율은 0.5 ~ 1 mg protein/1L(LB culture)이며, 정제까지(단백질을 수득하기까지) 소요되는 시간이 3일이었다.
- [0173] 실시 예 1-1의 조건으로 발현 및 정제하였을 때의 결과를 이를 도 1에 도시하였다.
- [0174] 도 1에서 보듯이, 발현이 거의 되지 않아 정제과정의 시도가 불가능한 Covid19-Sp0에 비해서 본 발명의 서열번호 2의 Covid19-Sp101은 안정적으로 잘 발현되어 순도높게 성공적으로 정제할 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0176] **2. 단편 폴리펩타이드의 ACE2 수용체 결합 능력 비교 평가**
- [0177] 상기 실시예 1-1에서 제작한 단편 폴리펩타이드의 SARS-CoV-2의 숙주세포 수용체(ACE2)와의 결합능력을 competitive-ELISA 방법으로 비교 평가하였다. 간략히 다음과 같은 방법으로 수행되었다.
- [0178] 먼저 실시예 1-1에서 제작한 Covid19-Sp101(서열번호 2) 폴리펩타이드 단편 샘플액에 완충액을 첨가하여 200ng/100ul, 2ng/100ul, 20pg/100ul로 희석한 후, 각각의 희석액 60ul와 HRP conjugated COVID19 RBD (BIONOTE) 30ul를 섞고 37℃에서 30분간 반응시켰다. 각각의 혼합액에 Biotin conjugate human ACE2 30ul를 첨가하고 37℃에서 30분 동안 반응시킨 후 혼합액을 StreptAvidin coated plate에 100ul/well씩 각각 분주하여 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 350ul의 ELISA wash buffer로 5회 세척 후, TMB substrate를 각 well에 100ul씩 첨가하여 빛을 차단시키고 15분 동안 반응시켰다. 각 well에 Stop solution 100 µl 씩 첨가하고, 450nm 에서 흡광도(Optical Density) 값을 측정하였다. ACE2와 COVID19 RBD의 결합에 대한 Covid19-Sp101 폴리펩타이드 단편의 저해능을 저해도(percent inhibition, PI)로 나타내었으며, 상기 반응의 결과 저해도의 계산은 $PI = ((1 - \text{sample OD} / \text{blank OD}) \times 100)$ 으로 계산하였다. 이와 같은 방법으로 수행한 결과는 도 2와 같다.
- [0179] 도 2에서 보는 바와 같이 Covid19-Sp101 재조합 단편 폴리펩타이드 단편이 시판용 키트에 포함되어 있는 RBD와 경쟁적으로 human ACE2와 결합하며, Covid19-Sp101 재조합 단편 폴리펩타이드 단편의 농도가 높을수록 더 높은 저해능을 보여준다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0181] 상기 결과를 통하여, 본 발명에 따른 COVID-19의 바이러스 재조합단백질을 백신용으로 사용하는 경우, SARS-CoV-2가 숙주 세포에 결합하는 것을 저해할 수 있는 것을 알 수 있다.

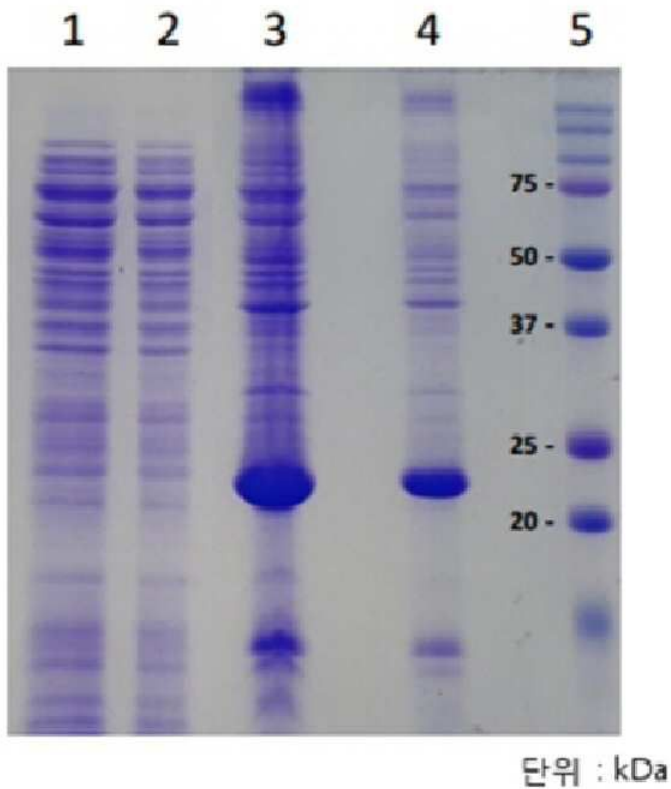
[0183] 상기 결과를 이상에서 본 발명에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

산업상 이용가능성

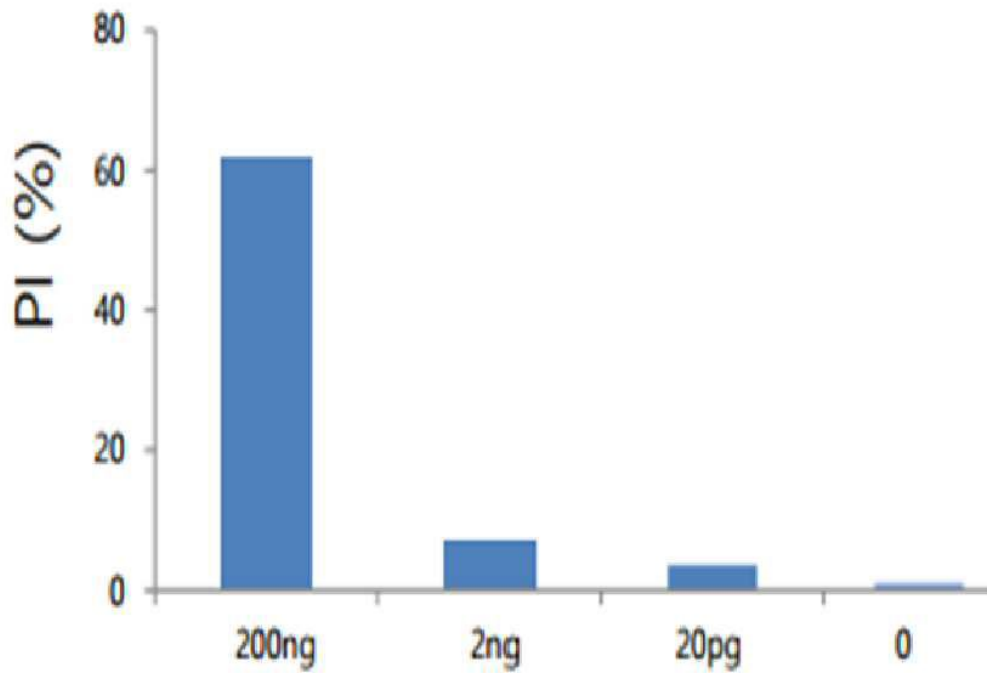
[0185] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 특유의 서열로 구성되는 폴리펩타이드는 바이러스 내 천연형 단백질과 비교하도 SARS-CoV-2 감염 혈청 검출/진단 능력이 현저히 우수할 뿐만아니라, 백신으로서 사용 가능성이 있으며 산업적 수준에서 생산성이 높으므로 산업상 이용가능성이 크다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY WONJU CAMPUS
Republic of Korea(Armed Forces Medical Command)
- <120> COVID-19 Virus-derived Immunogenic Polypeptide Fragment and Its
Use
- <130> NP20-0109
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 198
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Covid19-Sp0
- <400> 1

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

1 5 10 15

Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys

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

85 90 95
Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu
100 105 110
Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg
115 120 125
Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr
130 135 140
Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr
145 150 155 160

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

195

<210> 2

<211> 199

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Covid19-Sp101

<400> 2

Met Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe
1 5 10 15

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

20	25	30	
Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln			
35	40	45	
Ile Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu			
50	55	60	
Pro Asp Asp Phe Thr Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu			
65	70	75	80
Asp Ser Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg			
85	90	95	
Lys Ser Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr			
100	105	110	
Gln Ala Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr			
115	120	125	
Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr			
130	135	140	
Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro			
145	150	155	160
Ala Thr Val Cys Gly Pro Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly			
165	170	175	
Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg			
180	185	190	
Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val			
195			