



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월23일

(11) 등록번호 10-2181991

(24) 등록일자 2020년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/127 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01) G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/569 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/1274 (2013.01)

A61K 38/177 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0089655

(22) 출원일자 2017년07월14일

심사청구일자 2019년01월03일

(65) 공개번호 10-2018-0008338

(43) 공개일자 2018년01월24일

(30) 우선권주장

1020160090012 2016년07월15일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

Future Virology, 2016(published online: 3 February 2016), Vol.11, No.2, pp.95-99.\*

J. Virology, 2010, Vol.84, pp.361-371.\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

성균관대학교산학협력단

경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

권대혁

경기도 수원시 영통구 센트럴파크로 100, 6402동 2102호(이의동, 광교 센트럴타운 오드카운티)

공병재

경기 수원시 장안구 울전로80번길 27, 미소원룸 201호(울전동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이명진

전체 청구항 수 : 총 11 항

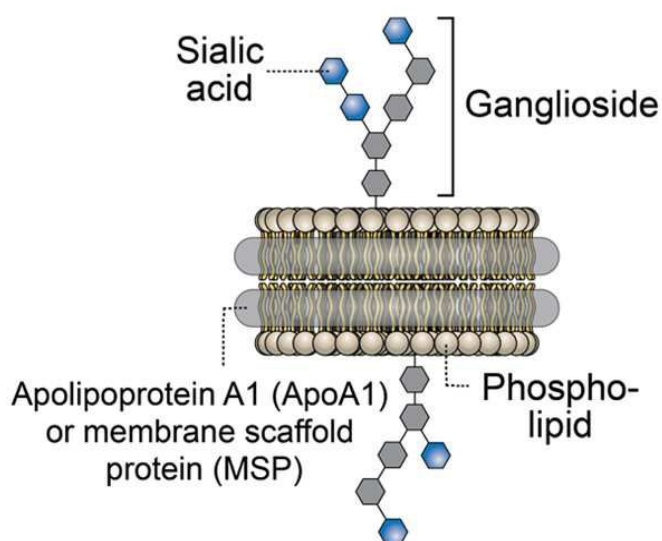
심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 나노천공자를 포함하는 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물

## (57) 요약

본 발명은 지질이중층 나노디스크와 상기 나노디스크를 둘러싼 막구조화 단백질을 포함하는 나노천공자 및 상기 나노천공자를 유효성분으로 포함하는 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 지질이중층 나노천공자를 사용하면, 바이러스의 변종여부에 상관없이 바이러스의 감염에 의하여 유발된 질환을 안전하게 예방 또는 치료할 수 있으므로, 안전하면서도 효과적인 바이러스 감염증의 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 39/12** (2013.01)

**G01N 33/566** (2013.01)

**G01N 33/56983** (2013.01)

(72) 발명자

**정우재**

서울특별시 송파구 올림픽로 99, 103동 1502호(잠실동, 잠실엘스)

**성백린**

서울특별시 성북구 대사관로 46(성북동)

**이석찬**

경기도 수원시 장안구 만석로 29, 712동 405호(천천동, 우방아파트)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

지질이중층 나노디스크(lipid bilayer nanodisc), 상기 나노디스크의 외주면을 둘러싼 막구조화 단백질, 및 바이러스의 표면 항원에 대한 수용체를 포함하는 나노천공자(nano-perforator)로서, 상기 나노천공자는 바이러스의 지질이중층 외피를 천공하는 것이고,

여기서 상기 지질은 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 및 포스파티딜세린(phosphatidylserine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이고, 상기 막구조화 단백질은 막구조화 단백질 1(Membrane scaffold protein 1, MSP1) 또는 이의 변이체이며, 상기 수용체는 ganglioside인 것인, 나노천공자.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 지질은 콜레스테롤을 더 포함하는 것인, 나노천공자.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 막구조화 단백질은 헬릭스(helix) 구조를 갖는 양친매성 단백질인, 나노천공자.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 수용체는 지질이중층 나노디스크에 삽입된 것인, 나노천공자.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 표면 항원은 헤마글루티닌(Hemagglutinin; HA) 및 뉴라미니다제(Neuraminidase;NA)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 나노천공자.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)은 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC)이고, 포스파티딜세린(phosphatidylserine)은 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (DOPS)인, 나노천공자.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 막구조화 단백질 1의 변이체는 서열번호 12의 아미노산 서열로 구성된 MSP1E3D1 또는 서열번호 17의 아미노산 서열로 구성된 아폴리포단백질 A1(Apolipoprotein A1, ApoA-1)인, 나노천공자.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 지질이중층 나노디스크에 포함된 지질 및 표면항원에 대한 수용체로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상과 상기 막구조화 단백질의 몰비(molar ratio)가 10:1 내지 800:1인, 나노천공자.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 상기 바이러스는 버니아비리데(Bunyaviridae) 과, 코로나비리데(Coronaviridae) 과, 필로비리데(Filoviridae) 과, 플라비비리데(Flaviviridae) 과, 헤파드나비리데(Hepadnaviridae) 과, 헤르페스비리데(Herpesviridae) 과, 오스소믹소비리데(Orthomyxoviridae) 과, 폭스비리데(Poxviridae) 과, 람도비리데(Rhabdoviridae) 과, 레트로비리데(Retroviridae) 과, 토가비리데(Togaviridae) 과 및 헤르페스비리데(Herpesviridae) 과로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상인 바이러스인 것인, 나노천공자.

## 청구항 11

제1항 및 제3항 내지 제10항 중 어느 한 항의 나노천공자를 포함하는, 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

## 청구항 12

삭제

## 청구항 13

삭제

## 청구항 14

(a) 목적하는 바이러스에 제1항 및 제3항 내지 제10항 중 어느 한 항의 나노천공자를 반응시키는 단계; 및

(b) 상기 나노천공자가 목적하는 바이러스에 대한 항-바이러스 활성을 나타내는지의 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 목적하는 바이러스의 표면 항원에 대한 수용체를 스크리닝하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 지질이중층 나노디스크 및 막구조화 단백질을 포함하는 나노천공자, 및 상기 나노천공자를 포함하는 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 지질이중층을 막구조화 단백질(membrane scaffold proteins)이 둘러싼 형태의 나노천공자를 포함하는 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학조성물, 상기 약학조성물을 투여하는 단계를 포함하는 바이러스 감염증을 예방 또는 치료하는 방법 및 상기 나노천공자를 사용하여 바이러스 표면항원에 대한 수용체를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)는 오르소믹소 계통(Family Orthomyxoviridae)에 속하는 RNA 바이러스로서 혈청형은 A형, B형, C형 등 3가지로 구분된다. 그 중 B형과 C형은 사람에서만 감염이 확인되고 있으며, A형은 사람, 말, 돼지, 기타 포유류 그리고 다양한 종류의 가금과 야생조류에서 감염이 확인되고 있다. A형 인플루엔자 바이러스의 혈청형은 바이러스 표면의 두 가지 단백질인 헤마글루티닌(Hemagglutinin; HA)과 뉴라미니다제(Neuraminidase;NA)의 종류에 따라 구분되는데, 지금까지 144종류(HA 단백질 16종과 NA 단백질 9종)가 알려져 있다. HA는 바이러스가 체세포에 부착하는 역할을 하며, NA는 바이러스가 세포 내로 침투할 수 있도록 한다.

[0004] 최근 관심이 집중되고 있는 신종 인플루엔자 A(H1N1) 바이러스는 "신종 플루" 또는 "신종 플루 바이러스"라고도 하는데, 이는 사람, 돼지 및 조류 인플루엔자 바이러스의 유전물질이 혼합되어 있는 새로운 형태의 바이러스이다.

[0005] 지금까지 개발된 바이러스 감염증 치료제로는 아만타딘(amantadine) 또는 리만타딘(rimantadine)계열의 M2 이온 채널 억제제(M2 ion channel inhibitor)와 오셀타미비르(oseltamivir, 상품명 타미플루) 또는 자나미비르(zanamivir, 상품명 리렌자) 계열의 뉴라미니데이즈(neuraminidase) 억제제가 알려져 있으나, 이들 치료제는 그 효과의 제한된다는 문제점이 있었다. 즉, 아만타딘 또는 리만타딘 계열의 유도체 화합물은 이에 대한 저항성 변종바이러스가 빠르게 생성되고, 일부 지역에서 검출된 H5N1 타입의 인플루엔자 바이러스는 아만타딘 또는 리만타딘 계열의 화합물에 대하여 내성을 나타내며, 인플루엔자 B 바이러스는 아만타딘 유도체에 민감하지 않다고 알려져 있다. 또한, 오셀타미비르 또는 자나미비르 계열의 유도체 화합물 역시 이에 대한 저항성 바이러스가 증가하고, 이러한 저항성 바이러스는 어린이에게서 빈번히 발생하고 있다고 알려져 있다.

[0006] 상기와 같은 기존 바이러스 감염증 치료의 문제점이 없는 새로운 치료제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 예를 들어, 한국등록특허 제1334143호에는 폴리갈라 카렌시움(Polygala karensium) 추출물 및 이로부터 분리된 잔존계 화합물을 함유하는 감기, 조류 인플루엔자, 돼지 인플루엔자 또는 신종플루의 예방 또는 치료용 조성물이 개시되어 있다. 그러나, 이들 제제는 항-바이러스 활성이 낮아서, 신종플루에 대한 효과적인 예방 또는 치료효과를 나타내지는 못하고 있다.

[0007] 따라서, 모든 변종 바이러스에 공통적으로 적용 가능하면서 기존의 바이러스 억제제들을 대체할 수 있는 새로운 항 인플루엔자제의 개발이 시급한 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 지질이중층 나노디스크 및 막구조화 단백질을 포함하는 나노천공자(nano-perforator)를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 나노천공자를 포함하는 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 상기 나노천공자의 항-바이러스 용도를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 바이러스 감염증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노천공자를 사용하여 바이러스 표면항원에 대한 수용체를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0014] 본 발명에 따라, 지질이중층을 막구조화 단백질이 둘러싼 형태의 지질이중층 나노천공자를 사용할 경우, 상기 인플루엔자 바이러스의 감염을 예방하거나 또는 감염된 인플루엔자 바이러스의 증식을 억제하여, 인플루엔자 바이러스 감염증을 예방 또는 치료하는 새로운 효과를 나타내고, 이러한 효과는 상기 지질이중층에 바이러스의 표면항원에 결합할 수 있는 수용체를 삽입할 경우, 더욱 향상됨을 확인할 수 있다. 또한, 본 발명자들은 상기 나노천공자가 지질이중층의 외피(envelope)을 가지는 바이러스의 구조적 안정성을 손상시켜서 항-바이러스 활성을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0015] 또한, 본 발명자들은 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스의 감염기작에 주목하였다. 상기 바이러스는 대체로 지질이중층의 외피에 표면 항원으로 사용되는 막 결합 단백질을 포함하고 있으며, 상기 막단백질을 통해 숙주세포에 감염되는 것으로 알려져 있다. 만일, 상기 바이러스의 막단백질에 대한 수용체가 지질이중층 부위에 삽입된 나노천공자를 사용한다면, 이러한 바이러스의 감염경로를 교란시킬 수 있을 것이다. 이를 확인하기 위하여, 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스의 일 예로서 인플루엔자 바이러스를 사용하고, 바이러스의 막단백질에 대한 수용체로서 인플루엔자 바이러스의 주요 표면항원으로 알려진 헤마글루티닌(HA)에 결합할 수 있는 호흡계(폐, 기관지) 상피세포의 막 수용체(receptor)의 시알산(sialic acid)을 포함하는 강글리오사이드를 포함하거나 또는 포함하지 않는 나노천공자를 사용하여, 상기 나노천공자가 인플루엔자 바이러스의 감염과정에 미치는 효과를 분석하였다. 그 결과, 상기 강글리오사이드를 포함하지 않는 나노천공자가 인플루엔자 바이러스에 대하여 항-바이러스 활성을 나타내었고, 상기 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자는 더욱 향상된 항-바이러스 활성을 나타냄을 확인하였다.

[0016] 본 발명에서 제공하는 지질이중층 나노천공자는 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스에 대하여 항-바이러스 활성을 나타낼 수 있으므로, 상기 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스의 감염증을 예방 또는 치료하는 효과를 나타낼 수 있고, 이러한 나노천공자의 항-바이러스 활성 예를 들어 바이러스 외피 천공 활성은 지금까지 전혀 알려지지 않다.

[0017] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 지질이중층 나노디스크(nanodisc)와, 상기 지질이중층의 외주면을 둘러싼 막구조화 단백질을 포함하는 나노천공자(nano-perforator)를 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 예에서 상기 나노천공자는 1 내지 50 nm, 더욱 바람직하게는 10 내지 20 nm의 직경을 가질 수 있으나 나노천공자로서의 기능을 할 수 있는 크기라면 이에 한정되지 않는다.

[0019] 본 발명에 따른 나노천공자는 바이러스 외피에 결합하여 바이러스가 세포 내 함입되어 엔도솜을 형성하는 것을 저해하고(1차 억제), 세포 내 바이러스가 함입되더라도, 함입된 바이러스의 외피에 구멍을 뚫는 '천공자(perforator)'로서 작용하여(2차 억제), 구멍에서 바이러스 내 RNA가 엔도솜으로 방출되어 엔도솜 내부의 pH에 의해 불활성화 되어 바이러스의 증식을 억제할 수 있어, 바이러스 감염을 2차적으로 억제하는 효과를 나타낼 수 있다.

[0020] 본 발명의 나노천공자는 바이러스 변이에 독립적으로 바이러스 증식을 억제할 수 있으며, 특히, 생체 내에서 특

이적인 반응을 유발하는 물질을 포함하지 않기 때문에 안전성을 확보할 수 있다는 점에서도 장점이 있다.

- [0021] 본 발명의 용어 "나노천공자(nano-perforator)"란, 지질이중층 나노디스크(nanodisc)와, 상기 지질이중층의 외주면을 둘러싼 막구조화 단백질을 포함하며, 바이러스 외피를 천공하는 기능을 수행할 수 있는 나노 스케일의 물질을 의미한다. 상기 나노천공자는 원반(disc) 형태를 갖는 단층(unilamellar)의 지질이중층, 즉 지질이중층 나노디스크를 포함하고, 상기 지질이중층의 외주면(outer circumference surface)을 하나 이상의 막구조화 단백질, 예를 들어 2개의 막구조화 단백질로 둘러싼 형태의 복합체일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 용어 "지질이중층 나노디스크(nanodisc)"란, 지질이중층을 포함하는 단층(unilamellar)의 원반(disc) 형태 물질을 의미하며, 상기 지질이중층의 양 면이 모두 외부에 노출된 열린 계(open system)를 갖는 것을 특징으로 한다. 즉, 본 발명에 따른 나노디스크 자체는 상기 지질이중층으로 내부 코어를 갖는 닫힌 공간을 형성하지 않는 것을 의미할 수 있다.
- [0023] 상기 지질이중층 나노디스크를 구성하는 지질은 인지질 또는 포스포리피드(phospholipid)일 수 있으며, 예를 들어 탄소수가 1 내지 50개, 바람직하게는 5 내지 30개인 지질 꼬리(tail)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0024] 상기 지질은 예를 들어, 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine), 포스파티딜세린(phosphatidylserine) 및 콜레스테롤로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상일 수 있으나, 이중층을 구성할 수 있는 지질이면 이에 한정되지 않는다.
- [0025] 상기 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)은 DOPC(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DLPC(1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DMPC(1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DPPC(1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPC(1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), C13PC, DDPC(1,2-Didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DSPC(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DEPC(1,2-Dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DLOPC(1,2-Dilinoeoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), EPC(Egg phosphatidylcholine), MSPC(1-Myristoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), PMPC(1-Palmitoyl-2-myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), PSPC(1-Palmitoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), SMPPC(1-Stearoyl-2-myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 또는 SPPC(1-Stearoyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)일 수 있으며, 상기 포스파티딜글리세롤은 DMPG(1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3[Phospho-rac-(1-glycerol)]), DPPG(1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3[Phospho-rac-(1-glycerol)]), DSPG(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3[Phospho-rac-(1-glycerol)]), POPG(1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3[Phospho-rac-(1-glycerol)]), DEPG(1,2-Dierucoyl-sn-glycero-3[Phospho-rac-(1-glycerol)]), DLPG(1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3[Phospho-rac-(1-glycerol)]), DOPG(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3[Phospho-rac-(1-glycerol)]) 또는 DSPG(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3[Phospho-rac-(1-glycerol)])일 수 있고, 상기 포스파티딜에탄올아민은, DMPE(1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DPPE(1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DSPE(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DOPE(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DEPE(1,2-Dierucoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), DLPE(1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) 또는 POPE(1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), 상기 포스파티딜세린은, DOPS(1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine), DLPS(1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoserine), DMPS(1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoserine), DPPS(1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoserine), DSPS(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoserine) 또는 POPS 일 수 있다.
- [0026] 상기 지질이중층 나노디스크를 구성하는 지질은, 상기 인지질에 추가하여, 중성지방, 예를 들면 트리글리세라이드, 콜레스테롤(cholesterol) 또는 이의 유도체, 및 당지질(saccharolipid), 예를 들어 강글리오사이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0027] 상기 지질이중층 나노디스크는 지질이중층의 양 면이 모두 외부에 노출된 열린 계를 갖는 원반 형태라는 점에서, 내부에 친수성 코어(core)를 포함하고 지질이중층의 양면 중 한 면만 외부에 노출된 닫힌 계(closed system)를 갖는 구(sphere) 형태의 리포솜(liposome)과 구별된다. 상기 리포솜은 지질이중층으로 내부 코어를 갖는 닫힌 공간을 형성할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 나노천공자는 상기 나노디스크의 외주면을 둘러싼 막구조화 단백질을 포함한다. 본 발명의 용어 "막구조화 단백질(membrane scaffold proteins)"이란, 양친매성 나선형 단백질(amphipathic helical protein)로서, 지질이중층의 외주면을 둘러싸서, 본 발명에서 제공하는 지질이중층을 포함하는 나노천공자의 형태를



구성할 수 있는 단백질을 의미한다. 본 발명에서, 지질이중층의 외주면을 둘러싸는 막구조화 단백질은 소수성 영역 및 친수성 영역을 포함하는 양친매성인 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 막구조화 단백질의 소수성 영역(예를 들어, 소수성 아미노산)이 지질이중층 나노디스크의 소수성 영역(예를 들어, 지질)과 결합하고 막구조화 단백질의 친수성 영역(예를 들어, 친수성 아미노산)이 외부로 노출되는 형태로 나노천공자를 형성할 수 있다. 예를 들어, 상기 막구조화 단백질은 헬릭스(helix) 구조를 갖는 양친매성 단백질일 수 있다.

[0030] 상기 막구조화 단백질의 예는 아포리포단백질로서(Yelena V.Grinkova, et al., Protein Engineering, Design & Selection, 23(11): 843-848, 2010), 아포리포단백질 A1 단백질 또는 상기 아포리포단백질 A1 단백질의 아미노산 서열로부터 유래된 변이체 단백질을 포함할 수 있다

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 막구조화 단백질은 본 발명의 나노천공자를 구성할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 아포리포단백질 또는 이의 변이체가 될 수 있고, 상기 아포리포단백질(Apolipoprotein, Apo)은 아포리포단백질 A1(ApoA-1), 아포리포단백질 A2(ApoA-2), 아포리포단백질 B(ApoB), 아포리포단백질 C(ApoC) 및 아포리포단백질 E(ApoE)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있다. 예를 들어 상기 ApoA-1은 서열번호 1의 아미노산 서열, 상기 ApoA-2는 서열번호 2의 아미노산 서열, 상기 ApoB는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 ApoC는 ApoC1 및 ApoC3로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있으며, 예를 들어 상기 ApoC1은 서열번호 4의 아미노산 서열, 상기 ApoC3은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0032] 상기 막구조화 단백질의 구체예로서, 아포리포단백질 A1 단백질의 변이체인 MSP1(Membrane scaffold protein 1)(서열번호 6), MSP1D1(서열번호 7), MSP1D2(서열번호 8), MSP1E1(서열번호 9), MSP1E2(서열번호 10), MSP1E3(서열번호 11), MSP1E3D1(서열번호 12), MSP2(서열번호 13), MSP2N1(서열번호 14), MSP2N2(서열번호 15), MSP2N3(서열번호 16), 등이 될 수 있다.

[0033] 상기 Apo-A1은 분자량 28 kDa의 243개의 아미노산으로 이루어진 단일 폴리펩타이드로 구성되고, 11개의 아미노산 혹은 22개의 아미노산으로 이루어진 8개의 반복단위 도메인을 가지며, HDL을 이루는 2차 구조의 알파-헬릭스의 비율이 60 내지 75%인 단백질을 의미한다. 상기 ApoA-I은 주로 주변조직으로부터 콜레스테롤을 제거하여 간 또는 다른 리포단백질로 운반하는 직접적인 역할을 수행하는 고밀도 리포단백질(HDL)의 구성요소로서 사용된다고 알려져 있다.

[0034] ApoE는 33 kDa의 299개의 아미노산으로 이루어진 단일 폴리펩타이드로 구성된 단백질이며 ApoA1과 마찬가지로 콜레스테롤의 운반에 관여한다.

[0035] 본 발명의 용어 "지질이중층의 외피(또는 막)를 가지는 바이러스"란, 바이러스 중에서 지질이중층의 외피를 갖는 바이러스를 의미하는데, 상기 지질이중층에는 상기 바이러스의 감염 및 증식에 관여하는 항원 단백질이 막결합 단백질 형태로 포함되어 있다. 상기 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스는 본 발명에서 제공하는 나노천공자가 항-바이러스 활성을 나타내는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 버니아비리데(Bunyaviridae), 코로나비리데(Coronaviridae), 필로비리데(Filoviridae), 플라비비리데(Flaviviridae), 헤파드나비리데(Hepadnaviridae), 헤르페스비리데(Herpesviridae), 오르소믹소비리데(Orthomyxoviridae), 포스비리데(Poxviridae), 람도비리데(Rhabdoviridae), 레트로비리데(Retroviridae), 토가비리데(Togaviridae), 또는 헤르페스비리데(Herpesviridae) 등의 과(family)에 속하는 바이러스가 될 수 있고, 다른 예로서, 버니아비리데(Bunyaviridae) 과에 속하는 시놈브레한타바이러스(Sin Nombre Hantavirus) 등; 코로나비리데(Coronaviridae) 과에 속하는 다양한 급성 호흡기 증후군에 관여하는 코로나바이러스(Coronavirus) 등; 필로비리데(Filoviridae) 과에 속하는 에볼라 바이러스(Ebola virus), 마르버그 바이러스(Marburg virus) 등; 플라비비리데(Flaviviridae) 과에 속하는 웨스트 닐 바이러스(West Nile virus), 옐로우 피버 바이러스(Yellow Fever virus), 뎅기 피버 바이러스(Dengue Fever virus), C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus) 등; 헤파드나비리데(Hepadnaviridae) 과에 속하는 B형 간염 바이러스(Hepatitis B) 등; 헤르페스비리데(Herpesviridae) 과에 속하는 헤르페스 심플렉스 1 바이러스(Herpes Simplex 1 virus), 헤르페스 심플렉스 2 바이러스(Herpes Simplex 2 virus) 등; 오르소믹소비리데(Orthomyxoviridae) 과에 속하는 인플루엔자 바이러스(Influenza virus) 등; 포스비리데(Poxviridae) 과에 속하는 스몰포스 바이러스(Smallpox virus), 백신니아 바이러스(Vaccinia virus), 몰루스컴 콘타지오섬 바이러스(Molluscum contagiosum virus), 멍키폭스 바이러스(Monkeypox virus) 등; 람도비리데(Rhabdoviridae) 과에 속하는 라비스 바이러스(Rabies virus) 등; 레트로비리데(Retroviridae) 과에 속하는 HIV(Human Immunodeficiency virus) 등; 토가비리데(Togaviridae) 과에 속하는 치쿱구니아 바이러스(Chikungunya virus) 등; 헤르페스비리데(Herpesviridae) 과에 속하는 수도라비에스 바이러스(Pseudorabies virus), HHV 바이러스 등이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 오르소믹소비리데 과에 속하는 인플루엔자 바이러스

가 될 수 있다. 예를 들면 상기 바이러스는 나노천공자에 포함되는 수용체(예를 들어, 강글리오사이드)에 친화력을 갖는 것을 특징으로 하는 바이러스일 수 있다.

- [0036] 본 발명의 용어 "인플루엔자 바이러스(Influenza virus)"란, 오르소믹소비리데 과에 속하는 RNA 바이러스로서 혈청형은 A형, B형, C형 등 3가지로 구분된다. A형 인플루엔자 바이러스의 혈청형은 바이러스 표면의 두 가지 단백질인 헤마글루티닌(Hemagglutinin; HA)과 뉴라미니다제(Neuraminidase; NA)의 종류에 따라 구분되는데, 지금까지 144종류(HA 단백질 16종과 NA 단백질 9종)가 알려져 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 나노천공자는 나노디스크에 더하여, 상기 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스의 표면 항원에 대한 수용체를 추가로 포함할 수도 있다. 본 발명의 나노천공자는 1종 또는 2종 이상의 수용체를 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 용어 "표면항원(surface antigen)"이란, 세포막항원이라고도 하며, 세포의 세포막에 존재하는 항원성을 나타내는 막결합 단백질을 의미한다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 표면항원은 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스의 지질이중층에 결합된 막결합 단백질을 의미하는 것으로 해석될 수 있는데, 상기 표면항원은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 인플루엔자 바이러스의 표면항원인 헤마글루티닌(Hemagglutinin; HA), 뉴라미니다제(Neuraminidase; NA) 등이 될 수 있다. 본 발명의 용어 "헤마글루티닌(hemagglutinin, HA)"이란, 인플루엔자 바이러스의 표면항원의 일종인 막투과 단백질로서, 트립신에 의해 절단될 수 있는 HA1 서브유닛과 HA2 서브유닛으로 구성된다. 상기 HA1 서브유닛은 시알산과 결합하고, 상기 HA2 서브유닛은 낮은 pH 조건에서 세포막 융합을 유발시킨다고 알려져 있다.
- [0041] 본 발명의 용어 "표면항원에 대한 수용체"란, 상기 표면항원과 결합할 수 있는 수용체로서, 상기 표면항원에 대한 항체가 될 수도 있고, 상기 표면항원이 결합할 수 있는 다른 세포막 결합 단백질이 될 수도 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 표면항원에 대한 수용체는 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스가 감염될 수 있는 숙주세포의 표면에 존재하고, 상기 바이러스의 표면항원과 결합할 수 있는 수용체를 의미하는 것으로 해석될 수 있다. 상기 수용체와 바이러스의 표면항원은 수소결합, 이온결합 등 다양한 상호작용에 의해 결합될 수 있으며, 예를 들어 바이러스의 헤마글루티닌의 HA1 서브유닛의 가장 바깥 면의 수용체결합부위(receptor binding site)와 시알산이 결합할 수 있다. 따라서 본 발명의 수용체는 대상 바이러스, 예를 들어 헤마글루티닌 및/또는 뉴라미니다제를 포함하는 바이러스에 특이적 또는 친화적으로 결합할 수 있도록 하는 수용체일 수 있다.
- [0043] 상기 표면항원에 대한 수용체 종류는 특별히 이에 제한되지 않으나, 시알산 및/또는 시알산 유사 기능을 갖는 작용기(예를 들어, 시알산 모사 펩타이드)를 포함하는 것일 수 있다. 상기 수용체는 시알릴올리고사카라이드(sialyloligosaccharide), 예를 들어, 강글리오사이드(ganglioside), 글리코프로테인(glycoprotein), 및 폴리시알산(polysialic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나 시알산을 포함하는 수용체라면 이에 한정되지 않는다.
- [0044] 상기 작용기는 수용체 자체가 지질이중층에 함입 또는 결합되거나 링커(linker)를 통하여 지질이중층에 함입 또는 결합될 수 있다.
- [0045] 상기 수용체는 수용체 자체 또는 수용체가 결합된 링커가 나노디스크 지질이중층의 지질과 수소결합, 이온결합, 공유결합, 이황화결합 등 다양한 상호작용에 의해 결합된 것일 수 있다.
- [0046] 상기 수용체의 일 예로서, 인플루엔자 바이러스의 표면항원인 헤마글루티닌과 결합할 수 있는 호흡기 세포의 세포막에 존재하는 시알산으로서, 예를 들어 상기 시알산을 포함하고 세포막에 결합된 강글리오사이드를 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 용어 "강글리오사이드(ganglioside)"란, 글리코스핑고리피드(glycosphingolipid)의 당 사슬(sugar chain)에 한 개 이상의 시알산이 특정 결합( $\alpha$ -2,3 결합 또는  $\alpha$ -2,6 결합)을 통해 연결된 형태의 화합물을 의미하며,  $\alpha$ -2,3 결합된 시알산을 포함하는 형태와  $\alpha$ -2,6 결합된 시알산을 포함하는 형태를 모두 포함할 수 있다. 예를 들어 본 발명의 강글리오사이드는 하나의 N-아세틸뉴라민산(N-Acetylneuraminic acid) 또는 시알산을 포함하는 GM1, GM2 및/또는 GM3, 두 개의 N-아세틸뉴라민산을 포함하는 GD1a, GD1b, GD2 및/또는 GD3, 세 개의 N-아세틸뉴라민산을 갖는 GT1b 및/또는 GT3, 네 개의 N-아세틸뉴라민산을 갖는 GQ1일 수 있다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 수용체, 예를 들어 강글리오사이드는 지질이중층 나노천공자의 지질이중층 나노디스크 부위에 삽입되어, 지질이중층의 외피를 갖는 바이러스의 HA와 결합하는 역할을 수행할 수 있다.



- [0049] 본 발명의 일 예에서, 상기 나노천공자에 포함된 지질 이중층을 구성하는 지질 및 표면항원 수용체로 이루어진 군에서 선택된 1 이상과 상기 막구조단백질의 몰비(molar ratio)([(지질이중층 나노디스크 지질의 몰 수) + (표면항원에 대한 수용체의 몰 수)] : 막구조단백질의 몰 수)가 10:1 내지 800:1, 바람직하게는 50:1 내지 500:1, 더욱 바람직하게는 50:1 내지 150:1, 예를 들어 65:1 또는 125:1가 되도록 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 몰비는 나노디스크의 지질과 막구조단백질의 몰비 또는 나노디스크의 지질 및 표면항원 수용체 몰비의 합과 막구조단백질의 몰비일 수 있다.
- [0050] 본 발명의 나노천공자에 포함되는 표면항원 수용체, 예를 들면 강글리오사이드는, 나노 디스크의 합계 몰수(예를 들어, 지질의 몰수 및 수용체 몰 수의 합) 100%를 기준으로, 0.01 내지 99몰%, 바람직하게는 1 내지 90몰%, 더욱 바람직하게는 15몰% 이상 또는 10 내지 50몰%로 포함될 수 있다.
- [0051] 본 발명에 따른 지질이중층에 수용체로서 강글리오사이드가 삽입된 나노천공자의 형태를 도 1에 예시적으로 도시하였다. 또한, 상기 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자가 지질이중층의 외피를 갖는 바이러스의 감염증을 예방 또는 치료하는 효과를 나타내는 작용 기작을 도 3을 참조하여 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0052] 상술한 바와 같이, 일반적으로 바이러스의 HA를 구성하는 HA1 서브유닛은 숙주 세포막의 시알산과 결합하여 세포 내 함입 과정을 통해 숙주 세포 내로 침입한다. 한편, 본원발명의 나노천공자, 예를 들어 수용체로서 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자를 바이러스가 감염된 세포에 처리하면, 상기 바이러스의 HA가 숙주의 세포막뿐 아니라 나노천공자의 지질이중층 나노디스크 및/또는 수용체에 결합할 수 있으며, 상기 나노천공자의 처리 양을 증가시키면, 상기 나노천공자에 결합되는 바이러스의 비율이 증가되어, 상기 바이러스가 숙주세포에 감염되는 것을 방지할 수 있다. 따라서, 상기 나노천공자는 숙주세포의 수용체를 모사한 '미끼(decoy)'로서 사용하여 바이러스의 세포 내 함입을 억제하는 침입 억제자(entry inhibitor)일 수 있다(1차 억제).
- [0053] 본원발명의 나노천공자, 예를 들어 표면항원 수용체로서 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자를 사용하여 숙주세포에 감염된 바이러스, 예를 들어 인플루엔자 바이러스의 세포 내 감염경로를 교란시켜서, 바이러스의 증식을 억제할 수 있다.
- [0054] 상기 바이러스의 세포 내 함입과정 중 후기 엔도솜 단계에서 유발되는 막 융합단계에서, 본 발명의 나노천공자와 결합된 바이러스는 바이러스의 외피와 숙주세포의 세포막 사이에서 막 융합이 나타나지 않고, 바이러스의 외피와 나노천공자의 지질이중층 사이에서 나타날 수 있다. 이러한 세포막 융합은 확률적으로 나타나게 되는데, 하나의 바이러스에 하나의 숙주세포막과 다수의 나노천공자가 결합된 경우, 바이러스의 외피와 숙주세포의 세포막 사이에서 막융합이 일어나기 보다는 바이러스의 외피와 나노천공자의 지질이중층 사이에서 막융합이 일어날 수 있다. 이처럼 엔도솜 내에서 바이러스의 외피와 나노천공자의 지질이중층 사이에서 막융합이 유발되면, 상기 막융합 부위를 통하여 바이러스의 내부에 존재하는 RNA가 엔도솜 내부로 방출되고, 엔도솜 내부의 낮은 pH로 인하여 방출된 RNA가 불활성화되어 최종적으로는 분해되는 결과를 초래한다. 따라서, 본 발명의 나노천공자는 바이러스 엔도솜 단계의 막 융합 단계에서 바이러스 외피를 천공하는 천공자(perforator)일 수 있다(2차 억제).
- [0055] 즉, 상기 나노천공자는 바이러스 외피에 결합하여 바이러스가 세포 내 함입되어 엔도솜을 형성하는 것을 저해하고(1차 억제), 세포 내 바이러스가 함입되더라도, 함입된 바이러스의 외피에 구멍을 뚫는 '천공자(perforator)'로서 작용하여(2차 억제), 바이러스 감염을 2차적으로 억제하는 효과를 나타낼 수 있다.
- [0056] 따라서, 표면항원 수용체, 예를 들면 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자를 상기 지질이중층의 외피를 갖는 바이러스가 감염된 세포에 처리하면, 상기 바이러스의 감염경로를 교란시켜서, 바이러스의 감염을 억제하게 되므로, 결과적으로는 바이러스의 증식을 억제하게 되고, 이로 인하여 바이러스의 감염에 의해 유발된 질환이 치료되는 효과를 나타내게 된다.
- [0057] 상기 설명한 바를 요약하면, 본 발명에서 제공하는 나노천공자는 지질이중층의 외피를 갖는 바이러스가 숙주세포에 감염되는 것을 억제하거나, 감염된 후에 증식되는 것을 원천적으로 억제하여, 바이러스의 감염에 의해 유발되는 질환을 예방 또는 치료하는 효과를 나타낼 수 있다. 이에 따라, 본 발명에서 제공하는 강글리오사이드를 포함하는 지질이중층 나노천공자는 숙주세포의 시알산을 매개로 숙주세포에 결합할 수 있는 바이러스라면, 변이 여부에 상관없이 동일한 효과를 나타낼 수 있고, 상기 바이러스의 초기 감염을 억제할 수 있으며, 숙주에 바이러스가 감염된 후에도, 상기 바이러스의 증식을 원천적으로 억제할 수 있다는 장점을 나타낼 수 있다. 따라서 본 발명의 나노천공자는 바이러스 변이에 독립적인 것을 특징으로 할 수 있다. 특히, 상기 나노천공자는 생체 내에서 특이적인 반응을 유발하는 물질을 포함하지 않기 때문에 안전성을 확보할 수 있다는 점에서도 장점이 있다.

- [0058] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 강글리오사이드를 지질이중층에 포함하거나 또는 포함하지 않는 나노천공자를 각각 제작하고, 상기 나노천공자의 항-바이러스 활성을 분석하였다. 그 결과, 강글리오사이드를 지질이중층에 포함하거나 또는 포함하지 않는 나노천공자 모두 인플루엔자 바이러스의 외피에 융합하여, 인플루엔자 바이러스의 RNA를 외부로 방출시켰으며(도 9a), 강글리오사이드를 지질이중층에 포함하거나 또는 포함하지 않는 나노천공자 모두 인플루엔자 바이러스에 대한 항-바이러스 활성을 나타내어, 인플루엔자 바이러스에 의하여 형성되는 플라크의 수준을 감소시킴을 확인하였다(도 5a, 5b 및 5c, 5d). 특히, 도 4, 도 5a에서 보듯이, 강글리오사이드를 지질이중층에 포함하거나 또는 포함하지 않는 나노천공자 모두 인플루엔자 바이러스에 대한 항-바이러스 활성을 나타내었으나, 강글리오사이드를 지질이중층에 포함하지 않는 나노천공자 보다는 강글리오사이드를 지질이중층에 포함하는 나노천공자가 더욱 향상된 항-바이러스 활성을 나타냄을 확인하였다.
- [0059] 따라서, 본 발명에서 제공하는 나노천공자는 항-바이러스 활성을 나타내고, 지질이중층에 강글리오사이드와 같은 바이러스의 표면 항원에 대한 수용체를 포함하는 경우에는 항-바이러스 활성이 더욱 향상됨을 알 수 있었다.
- [0060] 본 발명은 사용 양태에 따라 히스티딘(His), 금(Au), 형광 리피드, 및 바이오틴/아비딘(biotin/avidin)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 표지를 결합하여 사용할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 또 다른 양태로서, 지질이중층 나노디스크(lipid bilayer nanodisc)와, 상기 나노디스크의 외주면을 둘러싼 막구조화 단백질을 포함하는 바이러스 활성 저해제 또는 바이러스 복제 저해제를 제공한다.
- [0063] 상기 나노천공자에 관한 사항은, 상기 바이러스 활성 저해제 또는 바이러스 복제 저해제에 동일하게 적용될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 또 다른 양태로서 지질이중층 나노디스크와, 상기 지질이중층의 외주면을 둘러싼 막구조화 단백질을 포함하는 나노천공자를 포함하는, 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스의 감염에 의한 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학조성물 또는 상기 나노천공자의 바이러스 감염증 예방 또는 치료용도를 제공한다.
- [0066] 상기 나노천공자에 관한 사항은, 바이러스 감염과 관련되거나 바이러스 감염으로부터 기인한 1 이상의 증상의 치료, 예방, 개선 또는 발병의 지연용 약학 조성물 또는 바이러스 감염과 관련되거나 바이러스 감염으로부터 기인한 1 이상의 증상의 치료, 예방, 개선 또는 발병의 지연 용도에 동일하게 적용될 수 있다.
- [0067] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 나노천공자는 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스의 감염경로를 교란시키거나 또는 감염된 바이러스의 증식을 억제할 수 있으므로, 상기 나노천공자는 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스의 감염에 의하여 유발되는 다양한 감염증을 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 조성물은, 바이러스 변이에 독립적으로 적용될 수 있으며, 상기 나노천공자는 생체 내에서 특이적인 반응을 유발하는 물질을 포함하지 않기 때문에 안전성을 확보할 수 있다는 점에서도 장점이 있다.
- [0068] 본 발명의 용어 "바이러스 감염증"이란, 상기 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스의 감염에 의하여 발병되는 질환을 의미하는데, 일 예로서, 버니아비리데 과의 바이러스의 감염에 의하여 발병되는 신증후군성출혈열(유행성출혈열); 코로나비리데 과의 바이러스의 감염에 의하여 발병되는 코감기 등 호흡기 질환; 플라비비리데 과의 바이러스의 감염에 의하여 발병되는 C형 간염; 헤파드나비리데 과의 바이러스의 감염에 의하여 발병되는 B형 간염; 헤르페스비리데 과의 바이러스의 감염에 의하여 발병되는 대상포진; 오스소믹소비리데 과의 바이러스의 감염에 의하여 발병되는 독감 또는 인플루엔자 바이러스 감염증; 포크스비리데 과의 바이러스의 감염에 의하여 발병되는 천연두; 람도비리데 과의 바이러스의 감염에 의하여 발병되는 광견병 또는 수포성 구내염; 레트로비리데 과의 바이러스의 감염에 의하여 발병되는 후천성 면역결핍증 등이 될 수 있고, 다른 예로서, 오스소믹소비리데 과에 속하는 인플루엔자 바이러스의 감염에 의하여 발병되는 독감 또는 인플루엔자 바이러스 감염증이 될 수 있다.
- [0069] 본 발명의 조성물에 포함되는 나노천공자는 1종 또는 2종 이상의 표면항원 수용체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 2종 이상의 수용체가 하나의 나노천공자에 포함될 수 있다. 또한 상기 조성물은 1종 이상의 상이한 수용체를 포함하는 2종 이상의 나노천공자를 포함할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 용어 "치료(treat)"란 바이러스 감염에 의한 감염증의 증상을 개선시키거나 호의적으로 변화시키는 활성을 의미한다.
- [0071] 본 발명의 용어 "예방(prevention)"이란 질환 또는 장애, 또는 질환/장애에 의해 발생하는 1 이상의 증상의 발병, 재발 또는 전염의 예방을 의미하며, 잠재적 후보자에 대한 예방적 치료(prophylactic treatment)를 포함

할 수 있다.

- [0072] 상기 본 발명의 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 형태로 제조될 수 있고, 상기 담체는 비자연적인 담체가 될 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 약학적 조성물에 포함될 수 있는 다양한 담체, 부형제 및 희석제로 이루어지는 군에서 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 약학 조성물에 포함된 상기 나노천공자의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서 최종 조성물 총 중량을 기준으로 0.0001 내지 10 중량%, 다른 예로서 0.01 내지 3 중량%의 함량으로 포함될 수 있다.
- [0074] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 바이러스 감염증 치료용 제제와 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.
- [0075] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중증도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 성인 1인당 약 0.1 ng 내지 약 100 mg/kg, 바람직하게는 1 ng 내지 약 10 mg/kg로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0076] 본 발명의 바이러스 감염증 치료용 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등의 경로를 통해 투여될 수 있다. 다만, 경구 투여 시에는 위산에 의하여 상기 나노천공자가 변성 또는 파괴될 수 있기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 되어야 한다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 또 다른 양태로서, 지질이중층 나노디스크(nanodisc)와, 상기 지질이중층의 외주면을 둘러싼 막구조화 단백질을 포함하는 나노천공자(nano-perforator)를 포함하는, 바이러스 증식 억제용 조성물을 제공한다.
- [0078] 상기 나노천공자에 관한 사항은, 바이러스 증식 억제용 조성물에 동일하게 적용될 수 있다.
- [0079] 상기 바이러스 증식 억제는 나노천공자가 바이러스 외피와 결합하여 바이러스 외피를 천공하는 것일 수 있다.
- [0080] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스의 감염에 의한 바이러스 감염증이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 바이러스 감염증의 치료방법을 제공한다.
- [0081] 상기 바이러스 감염증은 상술한 바와 동일하다.
- [0082] 본 발명의 용어 "개체"란 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스의 감염에 의하여 바이러스 감염증이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 사람, 쥐, 가축 등을 포함하는 포유동물, 양식어류 등을 제한 없이 포함할 수 있다.
- [0083] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 나노천공자를 이용하여 목적하는 바이러스의 표면 항원에 대한 수용체를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0084] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 나노천공자는 그 자체로도 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스에 대한 항-바이러스 활성을 나타내지만, 상기 나노천공자의 지질이중층에 상기 바이러스의 표면 항원에 대한 수용체를 포함할 경우, 상기 수용체와 표면 항원의 반응을 통해 더욱 효과적인 항-바이러스 활성을 나타낸다. 따라서, 목적하는 바이러스의 표면 항원에 대한 수용체 후보물질이 포함된 나노천공자를 상기 목적하는 바이러스와 반응시킨 후, 상기 바이러스에 대하여 항-바이러스 활성을 나타내는지의 여부를 확인함으로써, 상기 후보물질이 목

적하는 바이러스의 표면 항원에 대한 수용체로서 사용할 수 있는지의 여부를 결정할 수 있다.

[0085] 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 목적하는 바이러스의 표면 항원에 대한 수용체를 스크리닝하는 방법은 (a) 목적하는 바이러스의 표면 항원에 대한 수용체 후보물질이 지질이중층에 삽입된 나노천공자와 목적하는 바이러스를 반응시키는 단계; 및 (b) 상기 나노천공자가 목적하는 바이러스에 대한 항-바이러스 활성을 나타내는지의 여부를 확인하는 단계를 포함한다.

[0086] 이때, 상기 (b) 단계에서 상기 나노천공자가 바이러스에 대한 항-바이러스 활성을 나타내는지의 여부를 확인하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 혈구응집반응 억제분석, RNA 방출분석, 플라크 감소분석 등의 공지된 방법을 단독으로 또는 조합하여 사용하는 방법이 될 수 있다.

### 발명의 효과

[0088] 본 발명에서 제공하는 나노천공자를 사용하면, 지질이중층의 외피를 가지는 바이러스의 감염에 의하여 유발된 질환을 안전하게 예방 또는 치료할 수 있으므로, 안전하면서도 효과적인 바이러스 감염증의 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0090] 도 1은 본 발명에서 제공하는 강글리오사이드를 포함하는 지질이중층 나노천공자의 형태 및 구조를 나타내는 개략도이다.

도 2a 및 도 2b는 본 발명에서 제공하는 강글리오사이드를 포함하는 지질이중층 나노천공자의 형태 및 구조를 크기배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 면역블러팅법(immunoblotting), 동적빛산란(dynamic light scattering) 및 전자현미경을 통해 분석한 결과를 나타내는 그림 및 사진이다.

도 3은 본 발명에서 제공하는 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자가 인플루엔자 바이러스의 증식을 억제하는 효과의 기작을 나타낸 개략도이다.

도 4는 본 발명에서 제공하는 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자를 사용하여 숙주세포에 감염된 인플루엔자 바이러스의 감염경로를 교란시켜서, 인플루엔자 바이러스의 증식을 억제하는 효과를 뉴트럴레드 염색약 흡수 억제 분석 (Neutral red uptake inhibition assay)결과로 나타내는 사진이다.

도 5a는 인플루엔자 바이러스의 플라크 형성에 미치는 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자의 효과를 리포솜과 비교하여 분석한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

도 5b는 인플루엔자 바이러스의 플라크 형성에 미치는 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자의 효과를 다양한 농도에서 분석한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

도 5c는 인플루엔자 바이러스의 플라크 형성에 나노천공자 내 강글리오사이드의 다양한 농도에 의한 효과를 분석한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

도 5d는 인플루엔자 바이러스의 플라크 형성에 미치는 나노천공자 내 지질 조성의 효과를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명에서 제공하는 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자가 인플루엔자 바이러스에 작용해 세포병변 효과의 감소에 미치는 효과를 나타내는 사진이다.

도 7은 본 발명에서 제공하는 나노천공자가 인플루엔자 바이러스에 강글리오사이드 수용체에 의존적으로 결합하는지를 면역블러팅법으로 확인한 모식도 및 사진이다.

도 8은 본 발명에서 제공하는 나노천공자가 인플루엔자 바이러스에 강글리오사이드 수용체에 의존적으로 결합하는지를 확인한 전자현미경 사진이다.

도 9a는 인플루엔자 바이러스 용액과 다양한 농도의 나노천공자(NP 또는 NPTG) 용액을 반응시켜서 얻어진 RNA 방출분석 결과를 나타내는 전기영동사진 및 그래프이다.

도 9b는 인플루엔자 바이러스 용액과 다양한 농도의 리포솜(LP 또는 LPTG) 용액을 반응시켜서 얻어진 RNA 방출 분석 결과를 나타내는 전기영동사진이다.

도 9c는 인플루엔자 바이러스 용액과 다양한 농도의 아포리포단백질로 이뤄진 나노천공자(NP 또는 NPTG) 용액을



반응시켜서 얻어진 RNA 방출분석 결과를 나타내는 전기영동사진 및 그래프이다.

도 10은 본 발명에서 제공하는 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자가 인플루엔자 바이러스 외피에 융합해 내부 바이러스 RNA-뉴클레오타이드 복합체가 빠져나올 수 있음을 확인한 면역전자현미경 사진이다.

도 11은 본 발명에서 제공하는 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자가 인플루엔자 바이러스 외피에 융합해 적혈구의 용혈 현상을 억제하는 효과를 나타내는 그래프이다.

도 12는 본 발명에서 제공하는 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자가 인플루엔자 바이러스의 세포 침입 시 수용체 의존적으로 결합해 세포 내로 함께 들어가 세포 내에서 기능할 수 있음을 나타내는 현미경 사진이다.

도 13은 가성광견병 바이러스에 의한 세포병변효과를 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0091] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### [0093] 실시예 1: MSP1E3D1 단백질 함유 나노천공자(NP) 제조

##### [0094] 실시예 1-1. 나노천공자 제조

[0095] 지질로서, POPC(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)를 클로로포름에 용해시켜 25 mg/ml 농도의 지질 용액을 준비하였다. 이후 0.5 ml의 소듐 콜레이트가 첨가된 PBS로 녹였을 때 지질의 농도가 10 mM이 되도록 25 mg/ml POPC 용액의 152.02  $\mu$ l를 유리 튜브에 옮겼다. 이후 질소가스를 가하고, 진공 상태에서 4시간동안 방치하여 용매를 제거하여, 리피드 필름(lipid film)을 수득하였다. 상기 수득한 리피드 필름에 소듐 콜레이트(sodium cholate)가 첨가된 PBS의 0.5 ml를 이용하여, 상기 리피드 필름을 수화시키고, 초음파를 55℃에서 15분간 처리하여, 리피드 필름이 분쇄된 리피드 필름 함유 현탁액을 수득하였다. 상기 수득한 현탁액에 막구조화 단백질로서 N말단에 his-tag가 부착된 MSP1E3D1(서열번호 12, 분자량 32.6 kDa)을 250  $\mu$ M 농도로 160  $\mu$ l를 가하고, 전체 혼합액과 동일한 양(660  $\mu$ l)의 바이오비드(bio-beads)를 처리(4℃, 12시간)함으로써, 자가조립과정을 통해 MSP1E3D1 단백질을 포함하는 나노천공자(NP)를 제조하였다.

##### [0097] 실시예 1-2. 다양한 지질 조성을 갖는 나노천공자 제조

[0098] 지질로서, POPC, DOPS 및 콜레스테롤이 55:15:30의 몰비로 포함된 지질용액을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법을 수행하여, 다양한 지질 조성을 갖는 지질이중층 나노천공자를 제조하였다.

#### [0100] 실시예 2: ApoA-1 단백질 함유 나노천공자(NP) 제조

[0101] 지질로서, POPC(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)를 클로로포름에 용해시켜 25 mg/ml 농도의 지질 용액을 준비하였다. 이후 0.5 ml의 소듐 콜레이트가 첨가된 PBS로 녹였을 때 지질의 농도가 10 mM이 되도록 25 mg/ml POPC 용액의 152.02  $\mu$ l를 유리 튜브에 옮겼다. 이후 질소가스를 가하고, 진공 상태에서 4시간동안 방치하여 용매를 제거하여, 리피드 필름(lipid film)을 수득하였다. 상기 수득한 리피드 필름에 소듐 콜레이트(sodium cholate)가 첨가된 PBS의 0.5 ml를 이용하여, 상기 리피드 필름을 수화시키고, 초음파를 55℃에서 15분간 처리하여, 리피드 필름이 분쇄된 리피드 필름 함유 현탁액을 수득하였다. 상기 수득한 현탁액에 막구조화 단백질로서 N말단에 his-tag가 부착된 ApoA-1(서열번호 17)(ApoA-1단백질 분자량 29.8 kDa) 250  $\mu$ M 농도로 307.6  $\mu$ l를 가하고, 전체 혼합액과 동일한 양(807.6  $\mu$ l)의 바이오비드(bio-beads)를 처리(4℃, 12시간)함으로써, 자가조립과정을 통해 ApoA-1 단백질을 포함하는 나노천공자를 제조하였다.

[0102] 상기 막구조단백질로 사용된 서열번호 17의 ApoA-1 단백질은 서열번호 1의 ApoA-1 단백질을 엔지니어링한 것으로서, 서열번호 17의 아미노산 서열에서 N말단으로부터 2 내지 7번째의 아미노산은 His-tag, 9 내지 14번째 아미노산은 Thrombin cleavage site, 16 내지 19번째 아미노산은 ASP-PRO acid labile bond이다.

#### [0104] 실시예 3. 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자(NPTG) 제조

##### [0105] 실시예 3-1. 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자 제조

[0106] 클로로포름에 POPC와, GM3, GM2, GM1, GD1a, GD1b 및 GT1b를 포함하는 강글리오사이드(Total ganglioside, Avanti polar lipids, Inc.)를 85:15의 몰비를 갖도록 용해시키는 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법을 수행하여, 강글리오사이드를 포함하는 지질이중층 나노천공자(NPTG)를 제조하였다.



- [0108] **실시예 3-2. 다양한 범위의 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자 제조**
- [0109] 클로로포름에 POPC와 GM3, GM2, GM1, GD1a, GD1b 및 GT1b를 포함하는 강글리오사이드(Total ganglioside, Avanti polar lipids, Inc.)를 100:0, 95:5, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40 및 50:50의 몰비를 갖도록 각각 용해시키는 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법을 수행하여, 강글리오사이드를 포함하는 지질 이중층 나노천공자(NPTG)를 제조하였다.
- [0111] **실시예 3-3. GD1a 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자 제조**
- [0112] 클로로포름에 POPC와 GD1a만을 포함하는 강글리오사이드(GD1a ganglioside, Enzo Life Sciences, Inc.)를 85:15의 몰비를 갖도록 용해시키는 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법을 수행하여, 강글리오사이드를 포함하는 지질 이중층 나노천공자(NPGD1a)를 제조하였다.
- [0114] **실시예 3-4. 다양한 지질 조성 및 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자 제조**
- [0115] 클로로포름에 POPC, DOPS, 콜레스테롤과, GM3, GM2, GM1, GD1a, GD1b 및 GT1b를 포함하는 강글리오사이드(Total ganglioside, Avanti polar lipids, Inc.)를 40:15:30:15의 몰비를 갖도록 용해시키는 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법을 수행하여, 다양한 지질 조성 및 강글리오사이드를 포함하는 지질 이중층 나노천공자(NPTG)를 제조하였다.
- [0117] **실시예 3-5. ApoA-1 단백질 및 강글리오사이드 포함하는 나노천공자 제조**
- [0118] 클로로포름에 POPC와, GM3, GM2, GM1, GD1a, GD1b 및 GT1b를 포함하는 강글리오사이드(Total ganglioside, Avanti polar lipids, Inc.)를 85:15의 몰비를 갖도록 용해시키는 것을 제외하고는, 실시예 1-1과 동일한 방법을 수행하여, 강글리오사이드를 포함하는 지질 이중층 나노천공자(NPTG)를 제조하였다.
- [0120] **실시예 4. 나노천공자 구조 확인**
- [0121] 실시예 1-1, 2, 3-1 및 3-5에서 제조된 나노천공자의 크기와 형태를 크기배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 면역블로팅법(immunoblotting), 동적빛산란(dynamic light scattering) 및 전자현미경을 통해 확인하였으며, 그 결과를 도 2a 및 도 2b에 나타냈다.
- [0122] 상기 제조된 나노천공자의 크기와 형태를 확인한 결과, 상기 나노천공자는 약 10 nm의 직경을 갖고, 내부에는 지질 이중층이 포함되며, 상기 지질 이중층이 원반(디스크)의 형태를 갖고 원반의 원주를 MSP1E3D1 단백질(도 2a, 실시예 1-1의 나노천공자 NP 및 실시예 3-1의 나노천공자 NPTG) 또는 ApoA-I(도 2b, 실시예 2의 나노천공자 NP 및 실시예 3-5의 나노천공자 NPTG)가 의해 둘러싼 형태를 갖는 구조물임을 확인하였다.
- [0123] 또한, 강글리오사이드가 삽입된 실시예 3-1 및 실시예 3-5의 나노천공자(NPTG)는 상기 지질 이중층 원반 면에 강글리오사이드가 삽입된 형태임을 확인하였다.
- [0125] **실시예 5: 나노천공자의 바이러스 증식 억제 활성**
- [0126] 실시예 5-1. 뉴트럴레드 염색약 흡수 억제 분석 (Neutral red uptake inhibition assay)
- [0127] 일반적으로, 세포에 뉴트럴레드 염색약을 처리하면 이 염색약이 비이온성 수동 확산에 의해 세포막을 투과하여 라이소좀(lysosome)에서 모이는데, 뉴트럴레드의 흡수는 세포가 ATP 생산을 통해 pH 기울기를 유지할 수 있는 능력에 의존한다. 세포가 뉴트럴레드를 흡수할 수 없을 정도의 바이러스를 처리한 조건에서 상기 NPTG를 가하여 반응시킬 경우, 나노천공자가 인플루엔자 바이러스의 외피에 융합, 바이러스 외피의 구조가 불안정하게 되고, 불안정한 외피로 인하여 바이러스의 RNA가 외피 외부로 방출된다. 세포가 뉴트럴레드 염색약을 흡수하였다면 이는 NPTG의 효과에 의해 세포의 생존율이 높아진 것이라고 분석할 수 있다.
- [0128] 이에, 실시예 1-1 및 실시예 3-1의 나노천공자가 인플루엔자 바이러스에 작용해 세포의 생존율을 높이는지 확인하기 위하여, 뉴트럴레드 염색약 흡수 억제 분석(neutral red uptake inhibition assay)을 수행하였다.
- [0129] 실험 전날 팍 찬 T-75 플라스크의 MDCK cell 중 절반을 96웰 플레이트의 각 웰에 200  $\mu$ l씩 분주하여 준비하고, 실험 당일, 세포의 배지를 제거한 후 PBS로 2회 워싱하였다. 이후 각 웰에 50개의 H3N2 Sydney 바이러스(NIBSC 구매) 50 PFU를 45분간 처리해 세포를 감염시키고 불지 않은 바이러스를 제거한 뒤 트립신과 실시예 1-1 및 실시예 3-1의 나노천공자가 농도별(1000 nM, 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 31.25 nM 및 15.625 nM)로 희석된 배지를 웰 당 200  $\mu$ l씩 분주하였다. 37°C의 온도에서 48시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 40  $\mu$ g/ml의 뉴트럴레드 염색약을 웰 당 100  $\mu$ l씩 처리하고 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 염색약을 제거하고,

200  $\mu$ l의 PBS로 1회 세척하였다. 그런 다음, 뉴트럴레드 디스테인 솔루션(50% 에탄올, 49% 증류수, 1% 아세트산)을 웰 당 200  $\mu$ l씩 처리한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(도 4). 대조군으로는 바이러스를 처리하지 않은 조건(cell only)과 바이러스만 처리하고 타미플루를 처리하지 않은 조건((-) control), 바이러스와 타미플루(Tamiflu)를 함께 처리한 조건((+) control)을 설정하였다.

[0130] 도 4는 본 발명에서 제공하는 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자가 인플루엔자 바이러스에 작용해 세포의 생존율에 미치는 효과를 나타내는 사진으로서, 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자(NPTG)뿐만 아니라 포함하지 않는 나노천공자(NP) 역시 양성대조군인 타미플루와 유사한 수준의 세포 생존 효과를 나타냄을 확인하였다. 즉, NP 및 NPTG는 낮은 농도에서도 바이러스 억제 효과가 매우 우수하며, 특히 NPTG의 경우 NP 대비 항바이러스 효과가 현저히 우수한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 대조군으로 처리된 타미플루와 비교해도 차이가 없을 정도임을 감안할 때 나노천공자는 항바이러스제로서 우수한 제제임을 확인할 수 있다.

[0132] **실시예 5-2. 플라크 감소 분석(Plaque reduction assay)**

[0133] 플라크(plaque)는 숙주 세포에 바이러스를 감염시키고 배양 플레이트(plate)에 아가로스-배지 혼합액을 덮어, 생성된 바이러스들이 널리 퍼지지 못하고 인접한 주변 세포들만을 감염시켜 죽임으로써 형성되는 빈 공간을 의미하는데, 상기 바이러스의 활성이 억제되면, 플라크의 형성이 억제되므로, 플라크의 수준이 감소되는지의 여부를 확인하여, 실시예 1 및 실시예 3에서 제조된 NP 또는 NPTG, 대조군으로서 리포솜(LP) 및 강글리오사이드를 15%의 함량으로 포함하는 리포솜(LPTG)가 인플루엔자 바이러스의 외피에 융합하여 항-바이러스 활성을 나타내는지의 여부를 확인하였다.

[0134] 상기 대조군으로 사용된 리포솜 및/또는 강글리오사이드를 포함하는 리포솜의 제조방법은 아래와 같다.

[0135] 포스파티딜콜린(PC) 단독(리포솜, LP) 또는 포스파티딜콜린 및 강글리오사이드를 85:15의 몰비로 포함(강글리오사이드 함유 리포솜, LPTG)하도록 클로로포름(chloroform)에 녹여 지질 용매를 유리 튜브에 넣고 질소 가스를 쏘여주어 200  $\mu$ l의 PBS로 녹였을 때 리피드의 농도가 10 mM이 되도록 하는 리피드 필름(lipid film)을 준비하였고 잔존하는 유기용매를 제거하기 위해 진공상태에 12-16시간 가량 둔다. 이후 0.2 ml의 PBS를 처리하고 볼텍싱(vortexing)으로 리피드 필름을 녹여내면 다양한 크기를 가지는 여러 겹(multi-lamellar)의 리포솜이 만들어지는데, 이 용액을 얼리고 녹이는 과정(Freezing and thawing)을 액체질소와 42도씨 water bath에서 최소 5번 반복 실시하면 다양한 크기의 단일 겹(uni-lamellar)의 리포솜이 만들어진다. 이후 크기를 일정하게 만들기 위해 익스트루전(extrusion)을 실시한다. 익스트루전은 2개의 유리 주사기(0.25 ml용 syringe) 사이에 100 나노미터의 크기를 가지는 막을 두고 주사기를 이용해 이 막을 최소 왕복 10회 통과시켜 직경이 약 100-120 nm 인 구 형태로서 단일막을 가지는 리포솜을 제조하고 4℃의 온도에서 보관하였다.

[0136] 플라크 감소 분석을 위하여, 6웰 플레이트의 각 웰에 MDCK 세포를  $1 \times 10^6$  개씩 접종하여 배양하고, 24시간 뒤 배양이 종료된 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 세척된 세포에 A/Puerto Rico/8/1934 H1N1인플루엔자 바이러스(NIBSC 구매) 100 PFU의 용액 0.5 ml를 가하고, 지속적으로 진탕하면서 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이어, 각 웰에서 배양액을 제거하고, 세포에 상기 실시예 1-1, 실시예 1-2, 실시예 3-1, 실시예 3-2 및 실시예 3-4의 나노천공자와, 대조군으로서 리포솜 LP 및 강글리오사이드 함유 리포솜LPTG를 각각 다양한 농도(4, 20, 100 또는 500  $\mu$ M)로 포함하는 아가로스 용액(HEPES 25 mM, sodium bicarbonate 22 mM, DMEM, 1% 아가로스, pH 7.4) 3 ml을 가한 다음, 이를 상온에서 1시간 동안 고형화시켰으며, 37℃의 이산화탄소 인큐베이터에서 3일 동안 배양하고, 형성된 플라크의 수준을 비교하였다. 이때, 대조군으로는 나노천공자 또는 리포솜을 포함하지 않는 아가로스 용액을 사용한 실험군을 사용하였다. 그 결과를 도 5a 내지 도 5b, 도 5c, 도 5d에 나타내었다.

[0137] 도 5a는 인플루엔자 바이러스의 플라크 형성에 미치는 나노천공자의 효과를 리포솜과 비교하여 분석한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 5a에서 보듯이, 대조군(Contrl)에서는 전체적으로 인플루엔자 바이러스에 의한 플라크가 형성된 반면, 수용체가 있는 실시예 3-1의 나노천공자 뿐 아니라 수용체를 포함하지 않는 실시예 1-1의 나노천공자를 처리한 경우 플라크의 수와 크기가 감소됨을 확인하였다. 이러한 효과는 같은 농도로 처리된 리포솜(LP) 및 수용체가 있는 리포솜(LPTG)의 효과와 비교해 더욱 월등함을 알 수 있었다. 플라크의 크기 억제 면에서 일부 효과를 보이는 LPTG와 비교해 NPTG는 플라크 크기를 80% 가량 억제시킬 뿐만 아니라 플라크의 수도 20% 가량 억제시키는 것을 확인하였다. 이로써 나노천공자라는 구조가 항바이러스 효능을 나타내는 매우 중요한 인자임을 확인하였다. 추가적으로 강글리오사이드를 포함하지 않는 실시예 1-1의 나노천공자(NP)의 경우 강글리오사이드를 포함하는 실시예 3-1의 나노천공자(NPTG)보다 그 효과는 약하지만 고농도로 처리했을 시 플라크의 수와 크기가 감소됨을 확인하였다.

- [0138] 도 5b는 인플루엔자 바이러스의 플라크 형성에 미치는 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자의 효과를 분석한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 5b에서 보듯이, 강글리오사이드를 포함하는 실시예 3-1의 나노천공자(NPTG)는 대조군(No NP)에서 플라크 형성이 전반적으로 이뤄진 것과 달리 농도 의존적으로 플라크의 수와 크기를 감소시킴을 확인하였다. 특히 실시예 3-1의 NPTG의 농도가 40 nM 수준에서도 플라크의 크기는 70%, 수는 20% 가량 억제를 시켰고 200 nM 수준에서는 플라크의 크기를 약 90%, 수를 50% 이상 감소시켜 저농도에서도 상당한 바이러스 활성 억제 효과를 가짐을 확인하였다.
- [0139] 도 5c는 인플루엔자 바이러스의 플라크 형성에 미치는 실시예 3-2의 나노천공자 내 수용체 농도의 효과를 분석한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 5c에서 보듯이, 같은 나노천공자 농도에서 나노천공자 내 강글리오사이드의 함유량이 높으면 높을수록 플라크의 크기와 수가 상당히 감소함을 확인하였다. 특히 대조군에 비해 강글리오사이드의 함유 몰비율이 5%만 되어도 플라크의 크기를 50%, 수를 30%가량 억제시킴을 확인하였다. 이러한 효과는 함유된 강글리오사이드의 농도에 의존적임을 알 수 있었고 함유 몰비율이 50%인 경우에는 가장 효과가 뛰어나 크기를 90% 이상, 수를 80%가량 억제시켜, 최종적으로 항바이러스 효과를 높이기 위해서는 최소 15% 이상의 강글리오사이드를 함유해야 함을 확인하였다.
- [0140] 도 5d는 인플루엔자 바이러스의 플라크 형성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 바이러스만 처리한 대조군 및 실시예 3-1 및 3-4의 나노천공자의 효과를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 5d에서 보듯이, 같은 농도의 나노천공자가 처리된 상황에서 수용체를 제외한 지질 조성이 단순히 POPC만으로 이루어진 실시예 3-1의 나노천공자 대비 POPC, DOPS 및/또는 cholesterol이 추가로 포함된 실시예 3-4의 나노천공자가 더 뛰어난 항바이러스 효과를 보임을 확인하였다. 게다가 이러한 효과는 상기한 다른 실험 결과에서와 같이 플라크의 크기만을 주로 억제시킨 것과 달리 플라크의 수 역시 상당히 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 이러한 효과는 나노천공자가 막 융합을 주 기전으로 하기 때문에 막 융합에 도움이 된다고 알려진 지질인 DOPS와 cholesterol의 효과에서 기인한 것으로 생각된다.
- [0141] 상기 실시예 5-1 내지 5-2의 결과를 종합하면, 본 발명에서 제공하는 나노천공자는 강글리오사이드를 포함하지 않더라도 고농도 하에서 인플루엔자 바이러스에 대한 항-바이러스 활성을 나타내고, 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자는 현저하게 우수한 수준으로 항-바이러스 활성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [0143] **실시예 6: 세포병변효과 감소 분석 (Cytopathic effect reduction assay)**
- [0144] 세포병변효과(Cytopathic effect)는 플레이트에 자라고 있는 숙주세포에 바이러스를 감염시키고 바이러스의 복제가 충분히 이뤄졌을 때 부착되어 있던 숙주세포가 죽어서 세포 형태가 달라지고 최종적으로 부유하게 되는 현상을 말한다. 상기 바이러스의 활성이 억제되면, 세포병변효과가 감소할 것이므로, 이를 통해 실시예 3에서 제조된 NPTG가 인플루엔자 바이러스의 외피에 융합하여 항-바이러스 활성을 나타내는지의 여부를 확인하였다.
- [0145] 구체적으로, 12웰 플레이트의 각 웰에 MDCK 세포를  $1.5 \times 10^5$  개씩 접종하여 배양하고, 24시간 뒤 배양이 종료된 세포를 PBS로 2회 세척하였다. FBS가 없는 incomplete MEM 배지를 이용해  $6 \times 10^5$  PFU/ml의 A/Puerto Rico/8/1934 H1N1바이러스(NIBSC 구매) 접종액을 준비하고 세척된 MDCK 세포에 바이러스 용액 0.25 ml을 가하고, 지속적으로 진탕하면서 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이어, 각 웰에서 배양액을 제거하고 세포에 500 nM 농도의 실시예 3-1의 나노천공자(NPTG)를 포함하는 용액 (1x antibiotics를 포함하는 MEM 배지, pH 7.4) 1 ml을 가한 다음, 37℃의 온도에서 1일 동안 배양하고, 세포병변효과의 억제 수준을 비교하였다. 이때, 대조군으로는 나노천공자를 포함하지 않는 바이러스만 처리된 조건 및 바이러스도 처리되지 않은 세포만 있는 조건을 함께 사용하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0146] 도 6은 인플루엔자 바이러스에 의한 세포병변효과에 대해 강글리오사이드를 포함하는 실시예 3-1의 나노천공자(NPTG)의 효과를 분석한 결과를 나타내는 사진이다. 도 6에서 보듯이, 대조군(control)에서는 바이러스에 감염되지 않은 건강한 MDCK 세포의 모습을 볼 수 있는 반면 여기에 바이러스가 감염된 조건(H1N1)에서는 세포병변효과(cytopathic effect)가 나타나 세포의 모양이 변성되고 세포가 죽어 떨어지는 현상을 확인하였다. 이러한 같은 조건 하에서 NPTG가 1  $\mu$ M 처리했을 때 바이러스에 의한 세포병변효과는 나타나지 않고 건강한 MDCK cell의 상태가 잘 유지됨을 관찰하였고 이로써 NPTG에 의한 바이러스 감염 억제 효과가 매우 우수한 것을 확인하였다.
- [0148] **실시예 7: 나노천공자 결합성 시험**
- [0149] **실시예 7-1: 비드 결합 분석 (Bead binding assay)**
- [0150] 나노천공자 단백질의 N-말단에 결합된 his-tag 를 이용해 나노천공자의 침입억제자 기능을 확인하고자 했다. NP

또는 NPTG에 니켈 이온이 결합된 아가로즈 비드를 처리하면 2가 양이온과 히스티딘 사이의 친화력에 의해 강한 결합이 가능하다. 이후 여기에 인플루엔자 바이러스를 처리해 충분히 반응시키면 NPTG 용액에만 바이러스가 헤마글루티닌을 통해 결합할 수 있을 것이고 최종적으로 고농도의 이미다졸을 함유한 용리(elution) 용액을 처리하여 얻은 용리액(elute)에는 바이러스가 존재해 이를 면역블러팅법을 이용해 확인할 수 있다.

[0151] 상기 원리를 이용하여, 실시예 1-1 및 실시예 3-1에서 제조된 NP 또는 NPTG를 이용해 인플루엔자 바이러스에 강글리오사이드 의존적으로 나노천공자가 결합할 수 있는지 여부와, 1차 억제 기능인 침입 억제자로 역할 할 수 있는지의 여부를 확인하였다.

[0152] 구체적으로, 50  $\mu$ l의 니켈 아가로즈 비드를 워싱 용액(5 mM의 이미다졸을 함유한 PBS, pH 7.4)으로 3회 세척해 준 뒤, 여기에 미리 준비해둔 50  $\mu$ M 농도의 실시예 1-1의 나노천공자(NP) 또는 실시예 3-1의 나노천공자(NPTG)를 200  $\mu$ l씩 처리하여 4℃의 온도에서 2시간 동안 반응시켜주었다. 반응이 끝난 후 결합하지 않은 나노천공자를 제거하기 위해 같은 워싱 용액으로 1회 세척을 실시하였고 여기에 준비한  $1 \times 10^8$  PFU/ml의 A/Puerto Rico/8/1934 H1N1인플루엔자 바이러스(NIBSC 구매) 0.8 ml을 처리하여 역시 4℃의 온도에서 2시간 동안 반응시켜주었다. 이후, 결합하지 않은 바이러스를 제거하기 위해 같은 워싱 용액으로 총 3회 세척을 진행하였으며 고농도의 이미다졸을 함유한 용리 용액(500 mM 이미다졸을 함유한 PBS, pH 7.4)을 0.1 ml 처리하여 용리액을 얻었다. 이 용리액에 바이러스가 존재하는지 확인하기 위해 바이러스 헤마글루티닌에 대한 마우스 1차 항체와 이에 결합할 수 있는 토끼 2차 항체를 이용해 면역블러팅법을 수행하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0153] 도 7은 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌에 나노천공자가 수용체인 강글리오사이드에 의존적으로 결합하여 침입억제자로 기능을 할 수 있는지를 확인하기 위해 분석한 결과를 나타내는 모식도와 사진이다. 면역블러팅의 양성대조군으로서 H1N1 바이러스를 함께 사용하였다. 강글리오사이드를 포함하지 않는 나노천공자(NP)와 달리 이를 포함하는 나노천공자(NPTG) 조건에서만 면역블러팅이 확인되었다. 이는 바이러스가 헤마글루티닌을 통해 강글리오사이드의 수용체에 결합할 수 있고, 결국 NPTG는 1차 억제 기능인 침입억제자로 역할 할 수 있음을 시사한다.

[0155] **실시예 7-2: 전자현미경 분석 (Transmission electron microscopy)**

[0156] 인플루엔자 바이러스에 나노천공자가 강글리오사이드에 의존적으로 결합하는지 확인하기 위한 또 다른 방법으로 전자현미경 분석을 실시하였다. 전자현미경은 빛 대신 전자를 사용해 물체의 확대상을 만드는 장치로 광학현미경으로는 보이지 않는, 즉 바이러스와 나노천공자와 같은 작은 물체를 볼 수 있도록 해준다. 바이러스와 NP 또는 NPTG가 혼합되어 있는 상태에서 전자현미경 분석을 수행하면 NP는 수용체가 없으므로 바이러스와 별개로 따로 존재하는 반면, NPTG는 수용체인 강글리오사이드가 존재하므로 헤마글루티닌과 결합할 수 있어 바이러스 둘레에 붙어 존재할 것이라고 예상하였다. 따라서, 실시예 1-1 및 실시예 3-1의 각 나노천공자(NP 또는 NPTG)가 인플루엔자 바이러스의 외피에 결합할 수 있는지 확인하기 위해 분석을 실시하였다.

[0157] 구체적으로, 40  $\mu$ M의 실시예 1-1의 나노천공자(NP) 또는 실시예 3-1의 나노천공자(NPTG)의 16.6  $\mu$ l 와 농도가  $1 \times 10^8$  PFU/ml인 A/Puerto Rico/8/1934 H1N1 인플루엔자 바이러스(NIBSC 구매) 100  $\mu$ l를 섞고 이들의 결합을 위해 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 전자현미경에 사용되는 그리드(grid)에 위 혼합액을 20  $\mu$ l씩 올리고 1분간 두어 그리드에 샘플들이 결합할 수 있도록 하였다. 결합하지 않은 샘플을 제거하기 위해 3M 종이를 이용해 흡수시켰고 이어 그리드를 물로 2회 세척한 뒤 염색을 위해 2% uranyl acetate를 1분간 처리하여 남은 염색액을 3M 종이에 흡수시켜 제거하였다. 이후 현미경 분석을 위해 전자현미경 Libra 120이 사용되었다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0158] 도 8은 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌에 나노천공자가 수용체인 강글리오사이드에 의존적으로 결합하여 침입억제자로 기능을 할 수 있는지를 확인하기 위해 분석한 결과를 나타내는 사진이다. 바이러스만 처리한 대조군(H1N1)에서는 알려진 바와 같이 바이러스의 직경이 100-200 nm 정도 되는 것을 확인할 수 있었고, H1N1+NP(실시예 1-1) 조건에서 나노천공자와 바이러스가 따로 떨어져 존재하는 것과 달리 H1N1+NPTG(실시예 3-1) 조건에서는 바이러스 주변을 나노천공자가 빙 둘러 감싸고 있는 것을 확인하였다. 이는 실시예 7-1에서와 유사하게, 바이러스 바깥 부분의 헤마글루티닌에 수용체인 강글리오사이드가 결합하였기 때문에 바이러스 주변에 나노천공자가 결합하여 존재하는 것임을 알 수 있고 이를 통해 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자는 실시예 7-1에서와 마찬가지로 충분히 침입억제자로 기능할 수 있음을 확인하였다.

[0160] **실시예 8: RNA 방출분석**



- [0161] 인플루엔자 바이러스에 본 발명의 나노천공자를 처리하여, 상기 나노천공자가 인플루엔자 바이러스의 외피에 융합되면, 상기 융합에 의하여 바이러스 외피의 구조가 불안정하게 되고, 불안정한 외피로 인하여 바이러스의 RNA가 바이러스의 외부로 방출된다. 이러한 바이러스를 센트리콘(centricon)에 적용하면, 센트리콘의 구멍보다 작은 크기의 RNA는 센트리콘을 통해 여과되지만, 상기 구멍보다 큰 크기의 바이러스 입자는 센트리콘을 통해 여과되지 않으므로, 실시예 1-1, 실시예 2, 실시예 3-1 및 실시예 3-5에서 제조된 각 나노천공자(NP 또는 NPTG)가 인플루엔자 바이러스의 외피에 융합되었는지의 여부를 확인하였다.
- [0162] 구체적으로,  $5 \times 10^7$  PFU/ml의 A/Puerto Rico/8/1934 H1N1인플루엔자 바이러스(NIBSC 구매)용액과 다양한 농도(1.3, 13, 130 또는 1300  $\mu$ M)로 실시예 1-1, 실시예 2, 실시예 3-1 및 실시예 3-5의 나노천공자를 혼합하여 전체 200  $\mu$ l의 볼륨이 되도록 한 후 37℃의 온도에서 0.5 시간 동안 반응시키고, 0.1 M의 시트릭산 8.66  $\mu$ l를 이용해 pH 5.0을 유지시킨 다음 다시 15분 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 시료를 센트리콘(centricon)에 가하여 원심분리(13,000 rpm, 5 min, 4℃)하여, 여과되지 않은 시료(R, retentate)와 여과된 시료(F, filtrate)를 각각 수득하였다. 이때, 대조군으로는 인플루엔자 바이러스 용액만을 사용한 것(V)을 사용하였다.
- [0163] 상기 수득한 각 시료를 대상으로 역전사 PCR(5  $\mu$ l의 template, 1  $\mu$ l의 sense primer(M gene), 7.4  $\mu$ l의 water 혼합액을 70℃에서 10분, 이후 여기에 4  $\mu$ l의 5x Reverse transcription buffer, 1.6  $\mu$ l의 dNTP, 1  $\mu$ l의 RTase를 넣고 42℃에서 1시간, 70℃에서 10분 반응시켰다)을 수행하여, 각 시료에 포함된 RNA에 상응하는 cDNA를 각각 수득하였다. 이어, 상기 수득한 cDNA를 주형으로 한 PCR(5  $\mu$ l의 template, 10  $\mu$ l의 water, 각각 0.5  $\mu$ l의 sense/antisense primer(M gene), 4  $\mu$ l의 5x rTaq DNA polymerase의 혼합액을 만들고 95℃에서 3분을 먼저 반응시키고, 이후 95℃, 10초/56℃, 10초/72℃, 10초의 3연속 반응을 총 30 사이클 진행한 뒤 마지막 72℃에서 5분간 반응시켰다)을 수행하고, 상기 PCR을 통해 얻어진 산물을 전기영동하여 확인하였다(도 9a). 한편, 비교군으로는 나노천공자 대신에 상기 실시예 5-2에서 제조된 리포솜(LP) 또는 강글리오사이드를 포함하는 리포솜(LPTG)를 사용하여 동일한 실험을 수행한 후 그 결과를 확인하였다(도 9b).
- [0164] 도 9a는 인플루엔자 바이러스 용액과 다양한 농도의 실시예 1-1의 나노천공자(NP) 및 실시예 3-1의 나노천공자(NPTG) 용액을 반응시켜서 얻어진 RNA 방출분석 결과를 나타내는 전기영동사진이고, 도 9b는 인플루엔자 바이러스 용액과 다양한 농도의 리포솜(LP 또는 LPTG) 용액을 반응시켜서 얻어진 RNA 방출분석 결과를 나타내는 전기영동사진이다. 도 9c는 인플루엔자 바이러스 용액과 다양한 농도의 실시예 2의 나노천공자(NP) 및 실시예 3-5의 나노천공자(NPTG) 용액을 반응시켜서 얻어진 RNA 방출분석 결과를 나타내는 전기영동사진
- [0165] 도 9a에서 보듯이, 나노천공자를 처리하지 않은 대조군(V)에서는 센트리콘을 통해 여과된 시료(F)에서 RNA가 검출되지 않았으나, 나노천공자를 처리한 실험군에서는 센트리콘을 통해 여과된 시료(F)에서 RNA가 검출되었다. 특히, 강글리오사이드를 포함하지 않는 나노천공자(NP)는 130  $\mu$ M 이상의 농도로 인플루엔자 바이러스 용액에 가하였을 때, 센트리콘을 통해 여과된 시료(F)에서 RNA가 검출되었으나, 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자(NPTG)는 1.3  $\mu$ M의 농도로 가한 경우에도 센트리콘을 통해 여과된 시료(F)에서 RNA가 검출되었다.
- [0166] 그러나, 도 9b에서 보듯이, 인플루엔자 바이러스 용액과 다양한 농도의 리포솜(LP 또는 LPTG) 용액을 반응시킨 경우에는 어떠한 경우에도 센트리콘을 통해 여과된 시료(F)에서 RNA가 검출되지 않음을 확인하였다.
- [0167] 또한, 도 9c에서 보듯이, 실시예 2 및 3-5로부터의 ApoA-1으로 제조한 나노천공자의 경우 인플루엔자 바이러스 용액과 다양한 농도로 반응되었을 때 1  $\mu$ M 이상의 농도에서 바이러스 외피와의 막융합을 통해 내부 바이러스 RNA의 방출을 유도, 검출 가능함을 확인하였다. ApoA-1 기반 나노천공자의 경우 약 10 nm의 작은 직경을 가지는 나노천공자임에도 수용체 없이도 충분히 바이러스의 외피에 손상을 가해 효과를 보임을 확인하였다.
- [0169] **실시예 9: RNA-뉴클레오단백질 복합체 방출 분석**
- [0170] 면역전자현미경법은 항체를 통한 면역반응을 이용하여 항원 분포를 검출하는 방법으로 사용되는 2차 항체로는 금(Au) 입자나 페리틴 등의 전자밀도가 큰 금속이나 과산화효소 등의 효소가 많이 쓰인다. 나노천공자가 바이러스의 외피에 융합하여 항-바이러스 활성을 나타내는 조건하(pH 5.0)에서 바이러스의 RNA-뉴클레오단백질 복합체가 바이러스의 밖으로 빠져 나오는데 이때 뉴클레오단백질을 검출하기 위해 이를 항원으로 인식하는 항체를 이용해 면역전자현미경법을 통해 분석하면 실제로 RNA가 밖으로 빠져 나왔는지 시각적으로 직접 확인할 수 있다.
- [0171] 상기 원리를 이용하여, 실시예 3-1에서 제조된 NPTG가 인플루엔자 바이러스의 외피에 융합하여 항-바이러스 활성을 나타내는지의 여부를 확인하였다.
- [0172] 구체적으로, 파라필름(parafilm)을 바닥에 깔고 그 위에 A/Puerto Rico/8/1934 H1N1바이러스(NIBSC 구



입)+NPTG(실시예 3-1) 혼합액을 0.1 ml 올린 뒤 이 위에 전자현미경용 그리드(grid)를 올리고 상온에서 20분간 두고 pH를 5.0으로 떨어뜨린 뒤 10분간 더 두었다. 이후 PBS를 이용해 2분간 1회 세척을 진행하였고 블로킹(blocking)을 위해 1% BSA를 함유한 PBS 용액을 그리드에 상온에서 30분간 처리하였다. 이어 바이러스 뉴클레오 단백질에 결합할 수 있는 1차 항체를 1% BSA를 함유한 PBS를 이용해 50 µg/ml의 농도로 준비해 그리드에 처리한 뒤 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 세척을 위해 역시 1% BSA를 함유한 PBS로 3분씩 총 2회 처리하였고 1차 항체를 인식 및 결합할 수 있는 금으로 표지된(gold-labeled) 2차 항체를 1:50으로 희석하여 그리드에 처리한 뒤 상온에서 45분간 두었다. 이어 PBS로 총 3회 세척을 진행하고 고정(fixation)을 위해 PBS를 이용해 만든 4% 포르말데하이드(formaldehyde)를 상온에서 10분간 처리한 후 연속해서 증류수로 2회 세척한 뒤 2% uranyl acetate를 이용해 전자현미경법에서 상기한 것과 같은 방법으로 염색 및 전자현미경 조작 및 분석을 진행하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0173] 도 10은 강글리오사이드를 포함하는 실시예 3-1의 나노천공자가 낮은 pH 하에서 인플루엔자 바이러스 외피에 융합하여 그 결과로서 바이러스의 RNA가 실제로 밖으로 방출될 수 있는지의 여부를 확인한 면역전자현미경 결과의 사진이다. 상기 나노천공자가 바이러스에 처리되고 pH가 떨어지면 외피에 손상이 가해져 내부의 바이러스 RNA-뉴클레오단백질 복합체가 밖으로 빠져 나와 이에 결합할 수 있는 항체에 의해 검은색 점으로 검출될 수 있음을 확인하였다. 이로써 나노천공자는 바이러스 감염 과정에서 세포 내 리소좀의 낮은 pH하에서 바이러스 외피에 물리적 손상을 주어 내부 RNA가 밖으로 빠져 나오게 하여 바이러스 감염 진행을 억제시킬 수 있음을 확인하였다.

[0175] **실시예 10: 용혈 억제 분석 (hemolysis inhibition assay)**

[0176] 나노천공자가 용혈현상을 억제한다면 바이러스와 적혈구 사이의 막융합과 경쟁해 이기는 것을 의미하고 이는 실제로 세포 내에서 바이러스막과 엔도솜막 사이의 막융합과 경쟁해 이긴다고 생각할 수 있다.

[0177] 상기 원리를 이용하여 실시예 1-1(NP) 및 실시예 3-1(NPTG)의 나노천공자, 그리고 추가적으로, 이용한 바이러스에 더 강하게 결합한다고 알려진 GD1a 강글리오사이드를 이용해 만든 실시예 3-3의 나노천공자 (NPGD1a)가 인플루엔자 바이러스의 외피에 융합하여 용혈현상을 억제하는지 여부를 확인하였다.

[0178] 구체적으로, 96웰 플레이트에 PBS를 이용하여 실시예 1-1(NP), 실시예 3-1(NPTG), 또는 실시예 3-3(NPGD1a)의 나노천공자를 1/2씩 연속희석(serial dilution)을 진행하여 100 µl씩 준비하였고 여기에 같은 양의 A/Puerto Rico/8/1934 H1N1바이러스를(NIBSC 구매) 각 웰에 처리하여 37℃의 온도에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 같은 양의, PBS로 희석하여 준비한 2%의 닭 적혈구(chicken red blood cell)를 추가로 더해준 뒤 같은 온도에서 10분간 더 반응시켰다. 이어서 1 N 아세트산을 이용해 pH를 5.0으로 낮추고 원심분리(400 x g; 8 분; 4℃)를 통해 닭 적혈구를 제거하였다. 상기 상층액 300 µl를 취해 새 96웰 플레이트에 옮긴 뒤 540 nm의 파장을 이용해 흡광도 분석을 진행하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0179] 도 11은 인플루엔자 바이러스에 의한 적혈구의 용혈현상 억제 정도를 다양한 농도로 처리하여 분석한 결과로 나타난 것으로서,

[0180] 강글리오사이드를 포함하지 않는 실시예 1-1의 나노천공자(NP)는 테스트한 농도 내에서는 적혈구 용혈현상을 전혀 억제하지 못하는데 비해 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자(실시예 3-1의 NPTG 또는 실시예 3-3의 NPGD1a)는 농도 의존적으로 적혈구 용혈현상을 억제함을 확인하였다. 특히 억제 효과의 정도는 실시예 3-3의 NPGD1a가 실시예 3-1의 NPTG보다 더욱 월등함을 확인하였는데 이는 GD1a 강글리오사이드가 바이러스에 더 강한 결합을 갖기 때문이라고 생각된다. 이로써 나노천공자는 바이러스 감염 과정에서 세포 내 리소좀의 낮은 pH하에서 엔도솜 막과 경쟁적 우위를 점하면서 바이러스 외피에 물리적 손상을 주어 이후 감염 과정을 억제시킬 수 있음을 확인하였다.

[0182] **실시예 11: 나노 천공자의 세포 내 침투 시험**

[0183] 공초점 현미경 분석을 이용해 강글리오사이드를 포함하는 나노천공자(NPTG 또는 NPGD1a)가 바이러스와 함께 실제로 세포 내부로 들어가 감염과정을 억제하는지의 여부를 확인할 수 있다.

[0184] 상기 원리를 이용하여 실시예 1-1(NP) 또는 실시예 3-1(NPTG)의 나노천공자, 그리고 추가적으로, 이용한 바이러스에 더 강하게 결합한다고 알려진 GD1a 강글리오사이드를 이용해 만든 실시예 3-3의 나노천공자(NDGD1a)가 침입하는 인플루엔자 바이러스의 외피에 결합하여 세포 내부로 함께 들어가는지 여부를 확인하였다.

[0185] 구체적으로, 실험에 사용된 A/PR/8/34인플루엔자 바이러스(NIBSC 구입)의 막을 리피드 친화적 특징을 가지는 형광 염색약인 SP-DiOC18로 표지하기 위해 바이러스에 SP-DiOC18을 섞고 상온에서 최소 12시간 반응시켰다. 이

후 바이러스 막에 삽입되지 않은 염색약을 제거하기 위해 PD-10 desalting column을 이용하였고 최종적으로 형광 표지된 바이러스를 얻어 사용까지 냉장에 보관하였다. 동시에, 나노천공자도 형광 검출하기 위해 상기 실시예 1-1, 3-1 및 3-3에서 리피드 필름을 만드는 과정에 형광 리피드인 Liss-Rhod phosphatidylethanolamine을 1% 넣어 같은 방법으로 나노천공자를 준비하였다. 준비된 바이러스와 각각 준비된 나노천공자를 냉장에서 2시간 동안 미리 섞어 반응시키고 이 혼합액을 전날 100 mm 세포배양 접시에 준비해둔 A549 세포에 처리하여 37℃의 온도에서 2시간 동안 감염시켜주었다. 이후 세포를 4%의 포름알데하이드(formaldehyde)를 이용해 15분간 처리하여 고정시켰다. PBS로 세척을 진행한 뒤, Gold antifade mountant로 마운팅하였고 Carl Zeiss LSM 공초점 현미경을 이용해 이미지를 얻고 분석하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0186] 도 12는 인플루엔자 바이러스가 세포를 침입할 때 나노천공자가 함께 처리되면 실제로 세포 내로 함께 들어갈 수 있는지를 확인한 현미경 사진이다.

[0187] 실험에 사용한 바이러스인 A/PR/8/34는 세포 내부에 세포 내 함입과정에 의해 침투해 들어가 표지한 형광에 의해 점으로 검출되는 것을 확인하였으며, 역시 형광 리피드로 표지된 나노천공자들(실시예 1-1의 NP, 실시예 3-1의 NPTG 또는 실시예 3-3의 NPGD1a) 역시 세포 내부로 들어가 점으로 나타나는 것을 확인하였다. 특히, 실시예 1-1의 NP에 의한 형광 점은 바이러스의 형광 점과 전혀 겹치지 않았지만 실시예 3-1의 NPTG와 실시예 3-3의 NPGD1a는 겹치는 점이 존재함을 확인하였고 이는 수용체 의존적으로 나노천공자가 바이러스와 결합해 실제로 세포 내부로 잘 들어감을 확인한 것이다. 이러한 정도는 실시예 3-1의 NPTG보다 실시예 3-3의 NPGD1a에서 더욱 컸으며 실시예 3-3의 NPGD1a의 경우 거의 모든 바이러스의 형광점과 겹치는 것으로 보아 GD1a 강글리오사이드가 바이러스 헤마글루티닌에 더욱 강하게 결합하였기 때문임을 다시 한번 확인하였다.

[0189] **실시예 12: 세포병변효과 감소 분석 (Cytopathic effect reduction assay)**

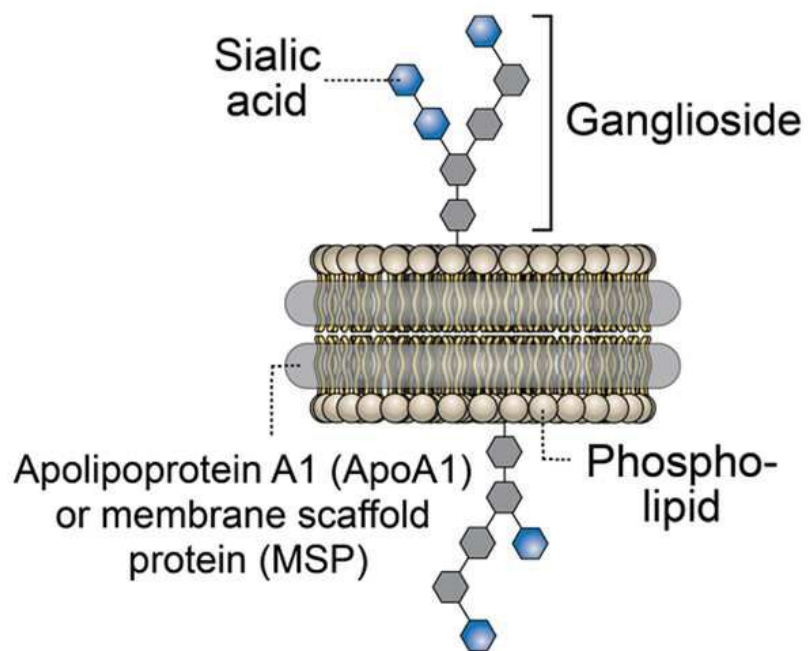
[0190] 실시예 1-1의 나노천공자가 가성광견병 바이러스(Pseudorabies virus;PRV) 감염에도 외피에 융합하여 항-바이러스 활성을 내는지 확인하기 위하여 세포병변효과 감소 효과를 살펴보았다.

[0191] 인플루엔자 바이러스로 MDCK 세포를 감염시키는 것 대신 가성광견병 바이러스로 HeLa 세포를 감염시킨 것 이외에는 실시예 6과 동일한 방법으로 세포병변효과 감소 분석을 실시하고 그 결과를 도 13에 나타내었다.

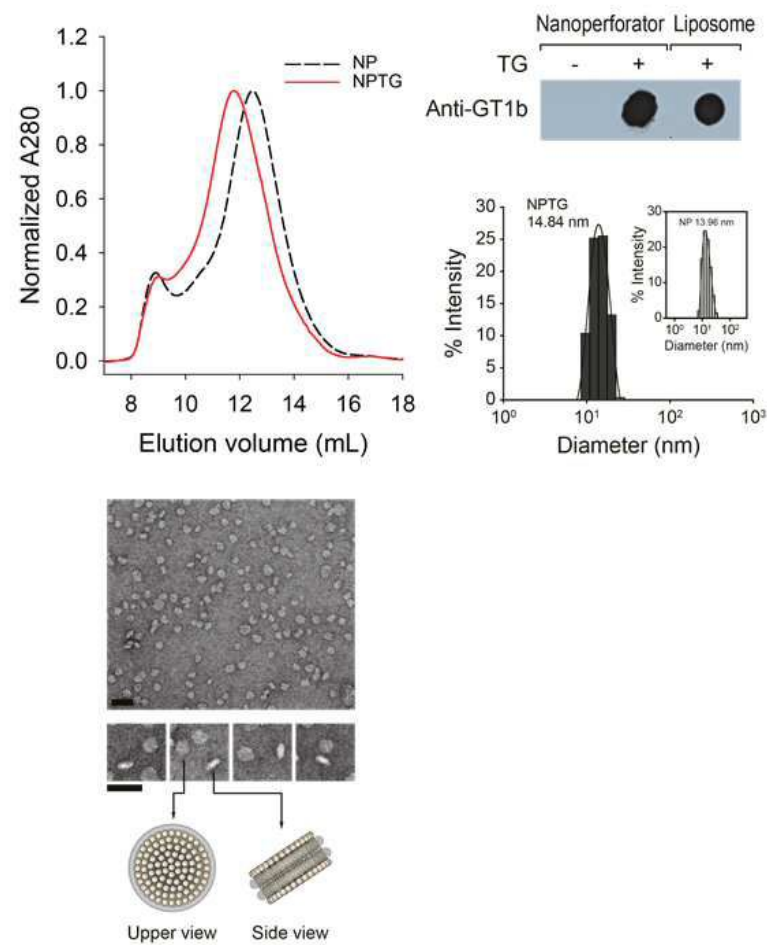
[0192] 도 13은 가성광견병 바이러스에 의한 세포병변효과에 대해 실시예 1-1의 나노천공자(NP)의 효과를 분석한 결과를 나타내는 사진이다. 도 13에서 보듯이, 대조군(Mock)에서는 바이러스에 감염되지 않은 건강한 HeLa 세포의 모습을 볼 수 있는 반면 여기에 바이러스가 감염된 조건(Positive)에서는 세포병변효과(cytopathic effect)가 나타나 세포의 모양이 변하며 다핵체(multi-nuclear cell, giant cell)를 형성(흰색 화살표)하고 결국 세포가 죽어가는 것을 볼 수 있다. 이러한 같은 조건하에서 실시예 1-1의 NP가 8  $\mu$ M 처리했을 때 가성광견병 바이러스에 의한 다핵체 형성이 상당히 억제됨을 관찰하였고, 이로써 본 발명의 나노천공자는 수용체 없이도 외피를 가지는 바이러스에 대한 우수한 항-바이러스 효과가 있음을 확인하였다.

도면

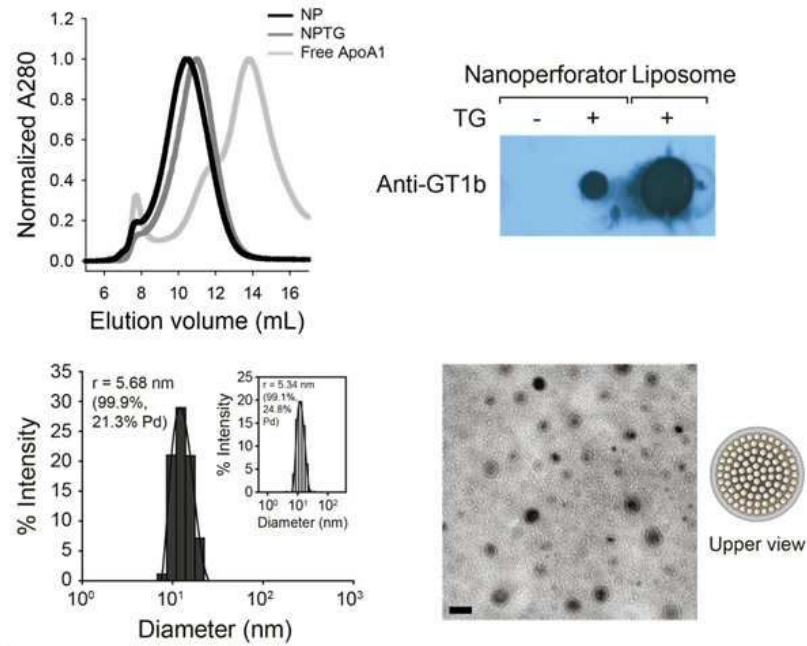
도면1



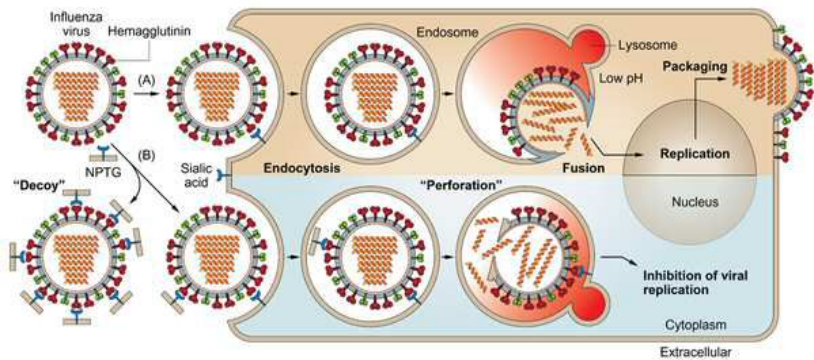
도면2a



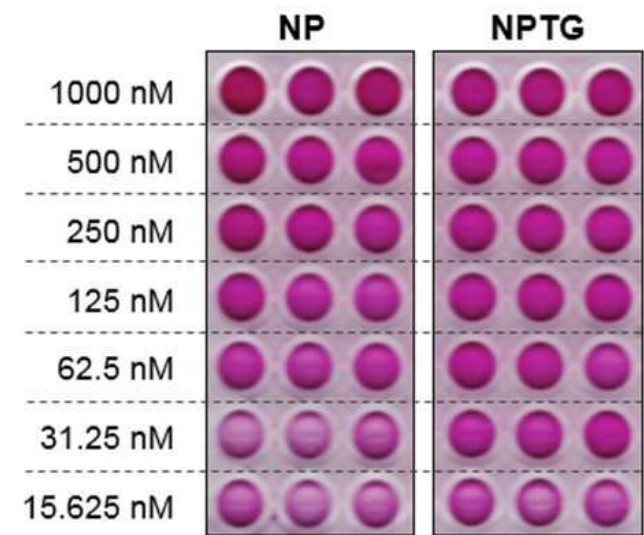
도면2b



도면3



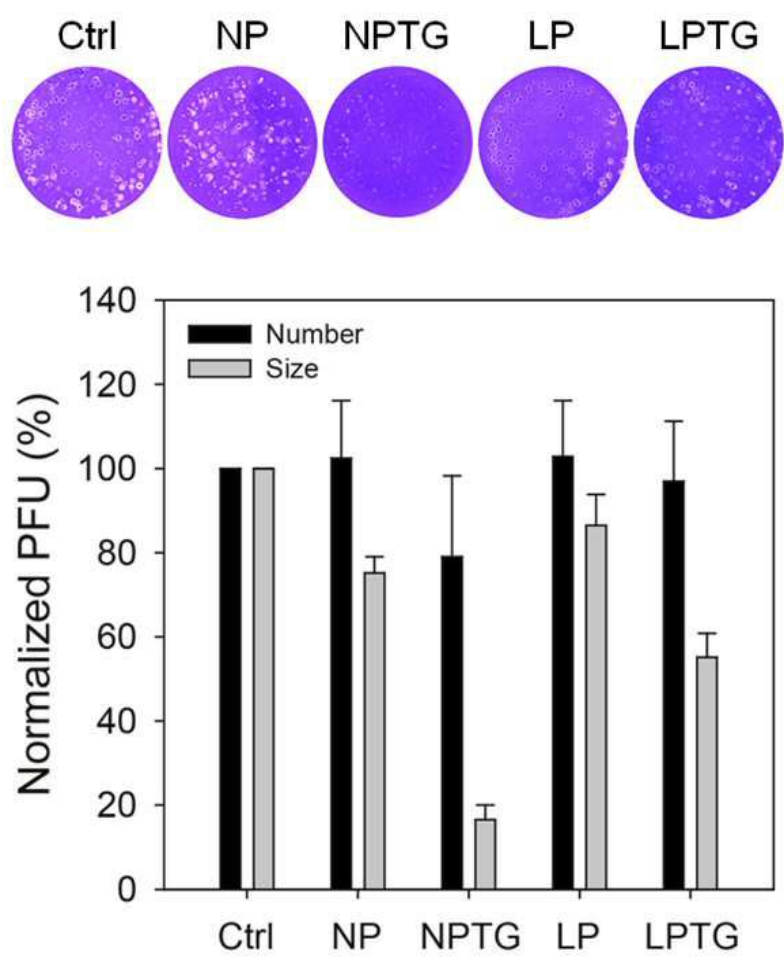
도면4



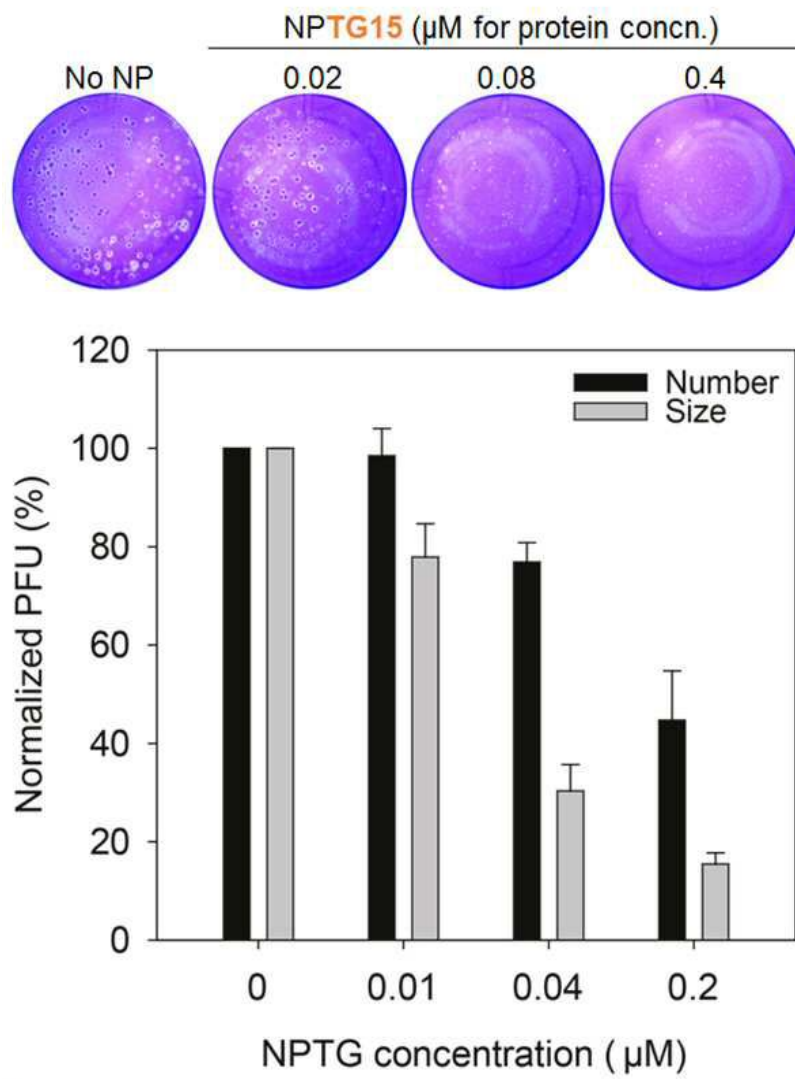
Cell line : MDCK  
Virus strain : A/sydney/5/97(H3N2)



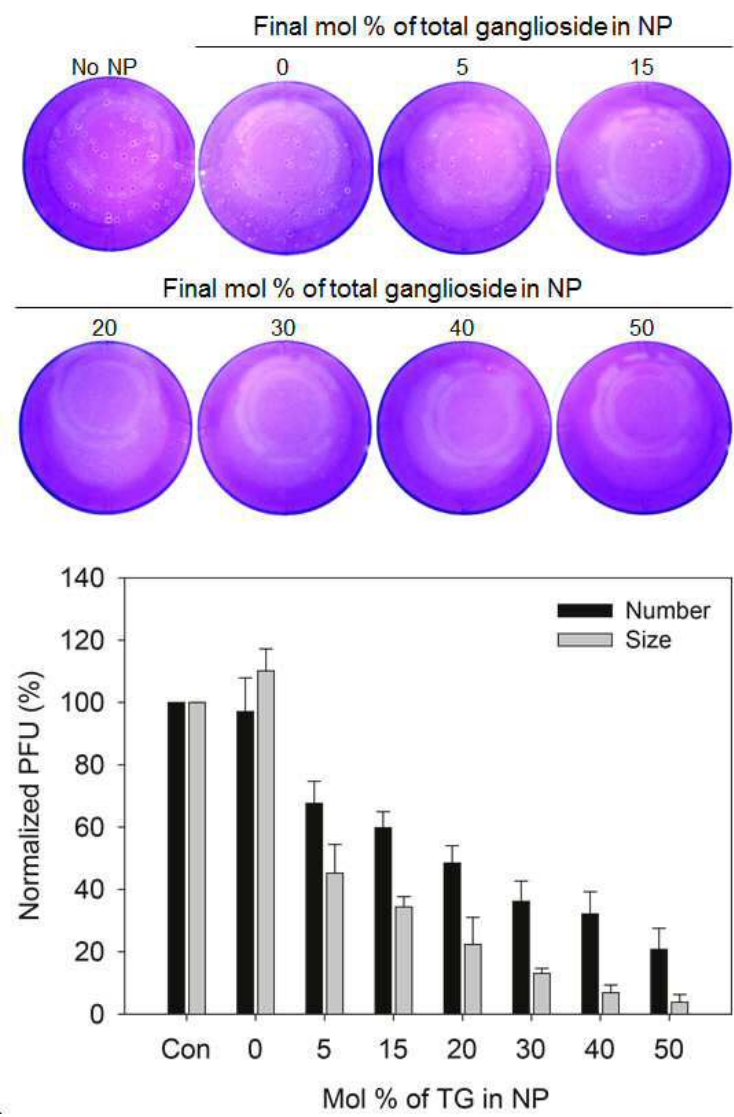
도면5a



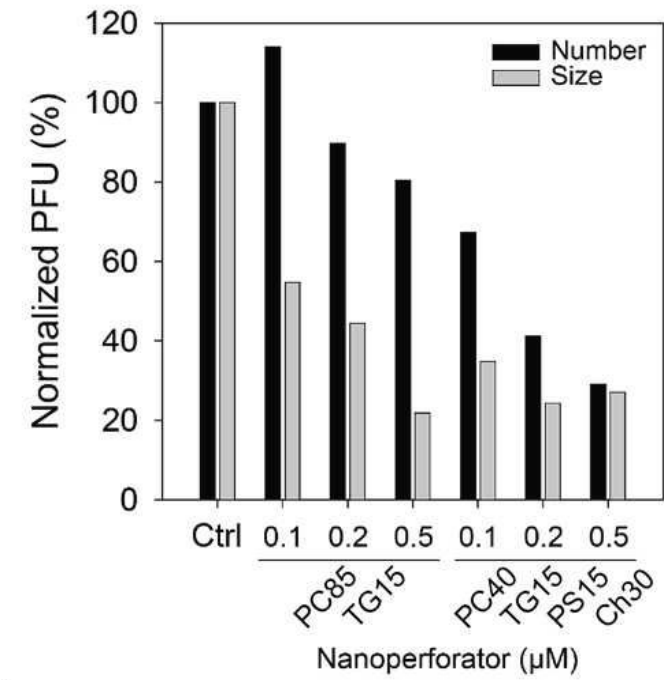
도면5b



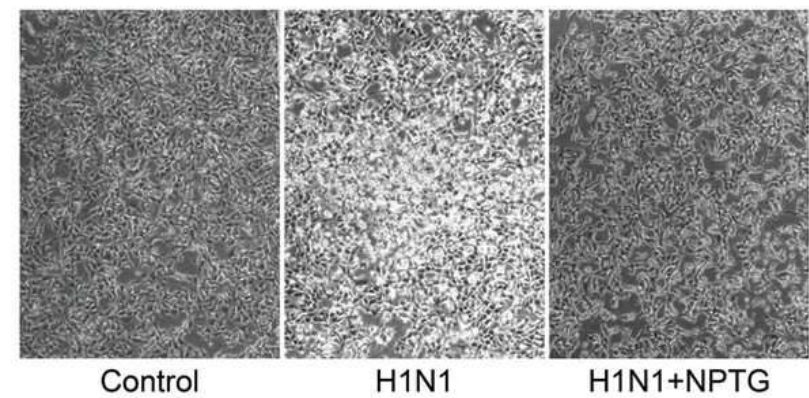
도면5c



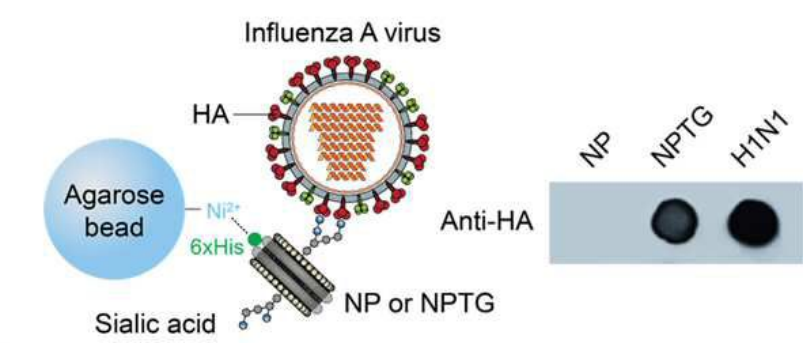
도면5d



도면6

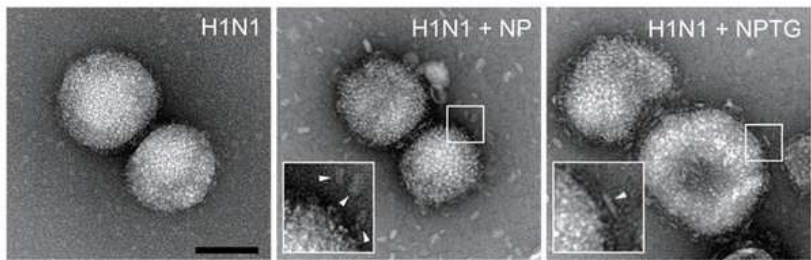


도면7

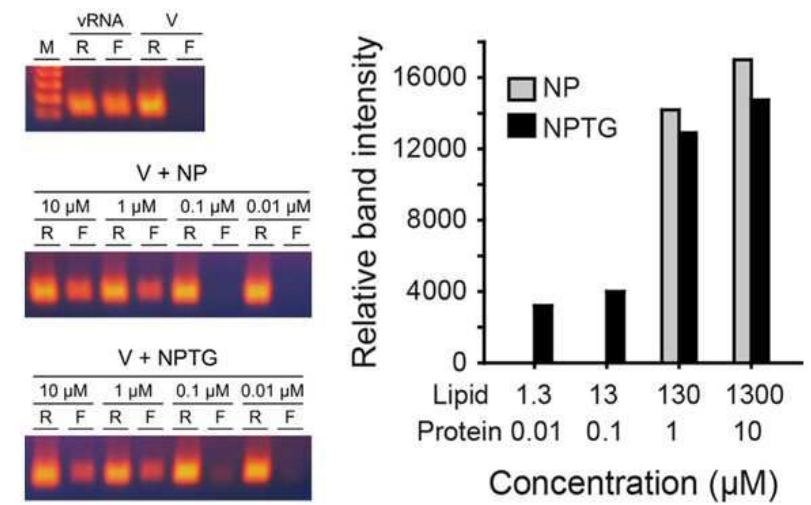




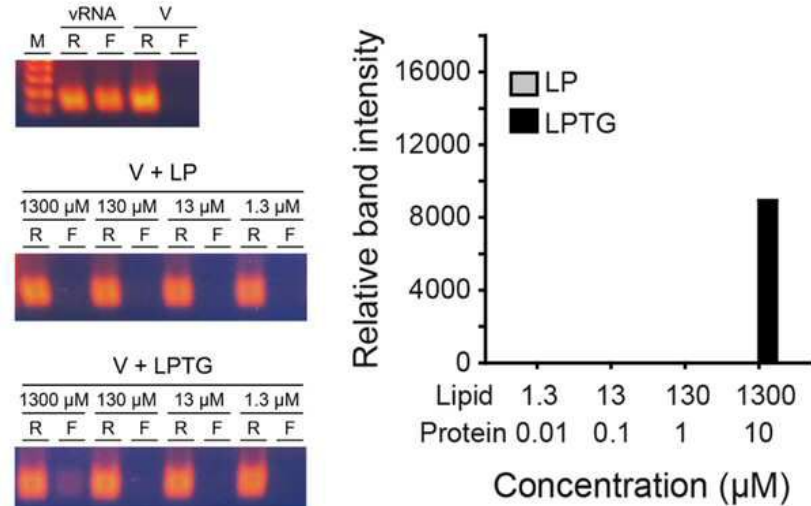
도면8



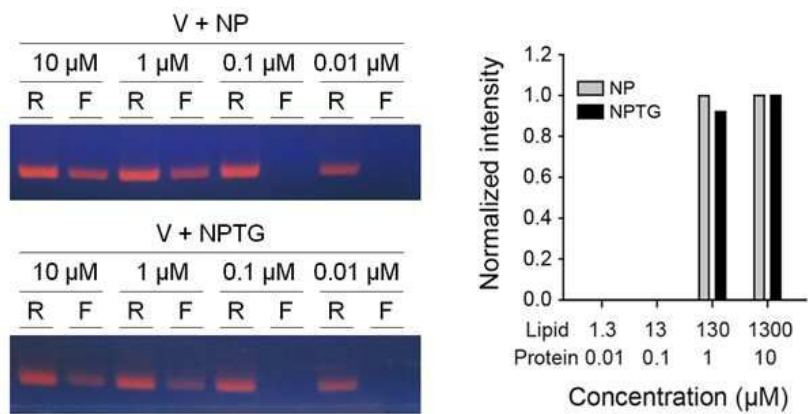
도면9a



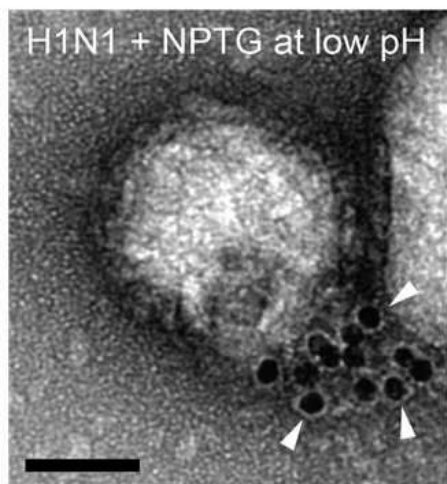
도면9b



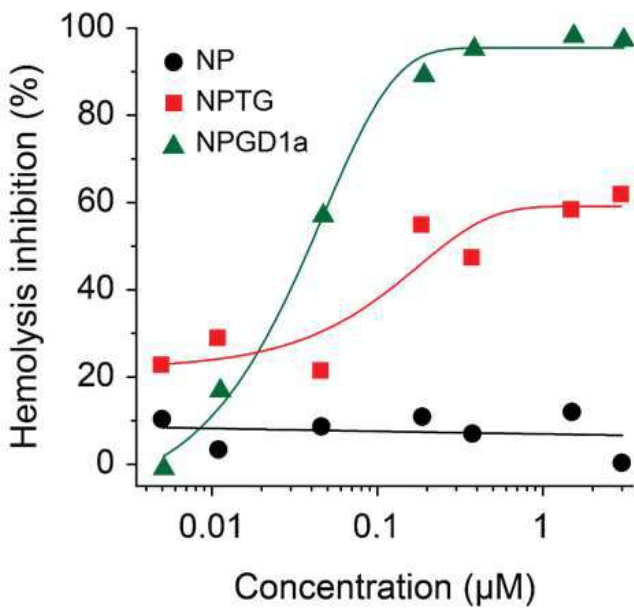
도면9c



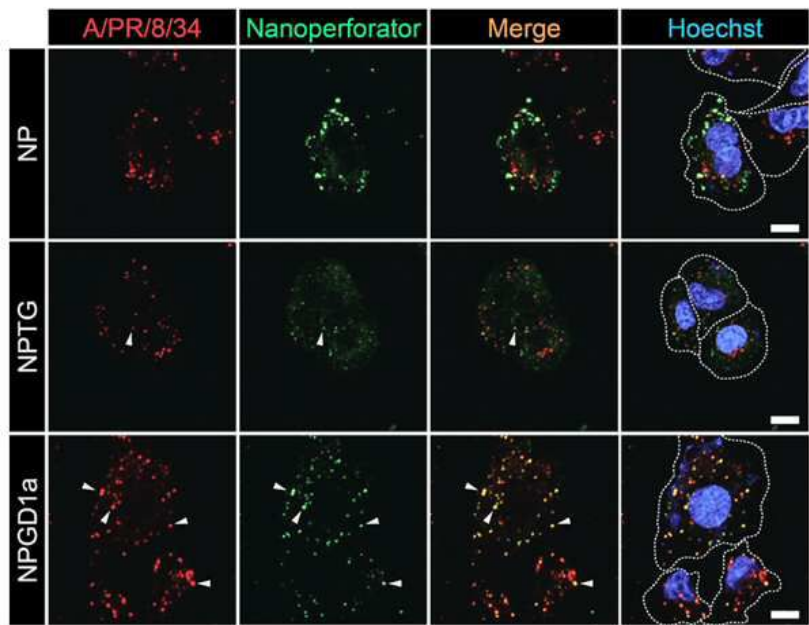
도면10



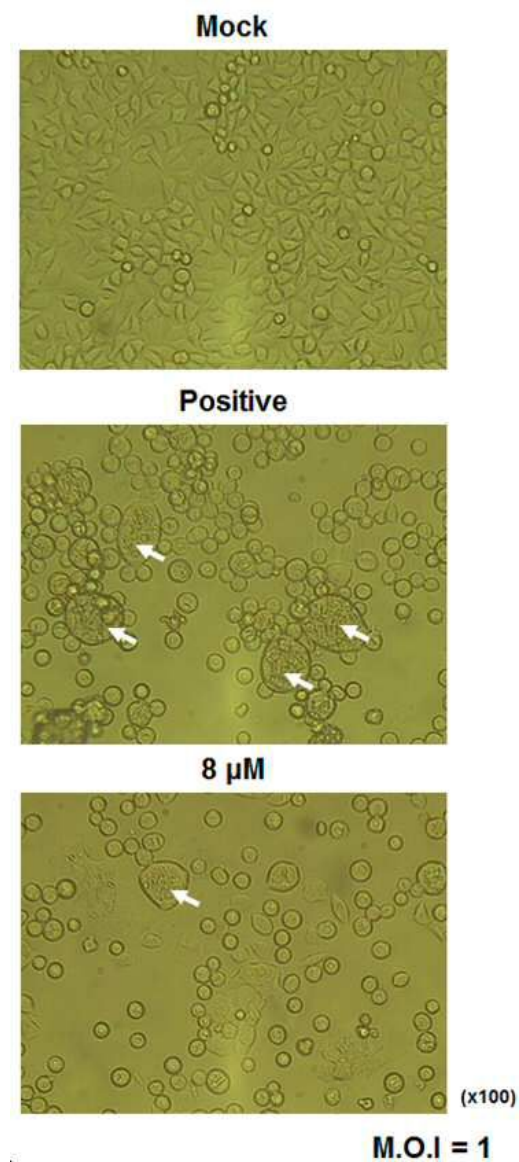
도면11



도면12



도면13



## 서 열 목 록

- <110> Research and Business Foundation SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY
- <120> Nano-perforator and a pharmaceutical composition comprising the same for preventing or treating viral infection
- <130> DPP20172335KR
- <150> KR 10-2016-0090012
- <151> 2016-07-15
- <160> 17
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 267
- <212> PRT



<213> Artificial Sequence

<220><223> ApoA-1

<400> 1

Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser

1 5 10 15

Gln Ala Arg His Phe Trp Gln Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp

20 25 30

Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp

35 40 45

Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp

85 90 95

Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys

100 105 110

Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe

115 120 125

Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu

130 135 140

Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu

145 150 155 160

Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala

165 170 175

Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp

180 185 190

Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn

195 200 205

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu

210 215 220

Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln

260 265

<210> 2

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ApoA-2

<400> 2

Met Lys Leu Leu Ala Ala Thr Val Leu Leu Leu Thr Ile Cys Ser Leu

1 5 10 15

Glu Gly Ala Leu Val Arg Arg Gln Ala Lys Glu Pro Cys Val Glu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Met Glu Lys Val Lys Ser Pro Glu Leu Gln Ala Glu Ala Lys Ser Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu Gly Thr Gln

85 90 95

Pro Ala Thr Gln

100

<210> 3

<211> 4563

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ApoB

<400> 3

Met Asp Pro Pro Arg Pro Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Pro Ala  
1 5 10 15  
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Gly Ala Arg Ala Glu Glu Glu Met Leu  
20 25 30  
Glu Asn Val Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Ala Thr Arg Phe Lys His  
35 40 45  
Leu Arg Lys Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu Ala Glu Ser Ser Ser Gly Val  
50 55 60  
Pro Gly Thr Ala Asp Ser Arg Ser Ala Thr Arg Ile Asn Cys Lys Val  
65 70 75 80  
Glu Leu Glu Val Pro Gln Leu Cys Ser Phe Ile Leu Lys Thr Ser Gln  
85 90 95  
Cys Thr Leu Lys Glu Val Tyr Gly Phe Asn Pro Glu Gly Lys Ala Leu  
100 105 110  
Leu Lys Lys Thr Lys Asn Ser Glu Glu Phe Ala Ala Ala Met Ser Arg  
115 120 125  
Tyr Glu Leu Lys Leu Ala Ile Pro Glu Gly Lys Gln Val Phe Leu Tyr  
130 135 140  
Pro Glu Lys Asp Glu Pro Thr Tyr Ile Leu Asn Ile Lys Arg Gly Ile  
145 150 155 160  
Ile Ser Ala Leu Leu Val Pro Pro Glu Thr Glu Glu Ala Lys Gln Val  
165 170 175  
Leu Phe Leu Asp Thr Val Tyr Gly Asn Cys Ser Thr His Phe Thr Val  
180 185 190  
Lys Thr Arg Lys Gly Asn Val Ala Thr Glu Ile Ser Thr Glu Arg Asp  
195 200 205  
Leu Gly Gln Cys Asp Arg Phe Lys Pro Ile Arg Thr Gly Ile Ser Pro  
210 215 220  
Leu Ala Leu Ile Lys Gly Met Thr Arg Pro Leu Ser Thr Leu Ile Ser  
225 230 235 240  
Ser Ser Gln Ser Cys Gln Tyr Thr Leu Asp Ala Lys Arg Lys His Val

				245				250				255			
Ala	Glu	Ala	Ile	Cys	Lys	Glu	Gln	His	Leu	Phe	Leu	Pro	Phe	Ser	Tyr
260				265				270							
Lys	Asn	Lys	Tyr	Gly	Met	Val	Ala	Gln	Val	Thr	Gln	Thr	Leu	Lys	Leu
275				280				285							
Glu	Asp	Thr	Pro	Lys	Ile	Asn	Ser	Arg	Phe	Phe	Gly	Glu	Gly	Thr	Lys
290				295				300							
Lys	Met	Gly	Leu	Ala	Phe	Glu	Ser	Thr	Lys	Ser	Thr	Ser	Pro	Pro	Lys
305				310				315				320			
Gln	Ala	Glu	Ala	Val	Leu	Lys	Thr	Leu	Gln	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Thr
325				330				335							
Ile	Ser	Glu	Gln	Asn	Ile	Gln	Arg	Ala	Asn	Leu	Phe	Asn	Lys	Leu	Val
340				345				350							
Thr	Glu	Leu	Arg	Gly	Leu	Ser	Asp	Glu	Ala	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Pro
355				360				365							
Gln	Leu	Ile	Glu	Val	Ser	Ser	Pro	Ile	Thr	Leu	Gln	Ala	Leu	Val	Gln
370				375				380							
Cys	Gly	Gln	Pro	Gln	Cys	Ser	Thr	His	Ile	Leu	Gln	Trp	Leu	Lys	Arg
385				390				395				400			
Val	His	Ala	Asn	Pro	Leu	Leu	Ile	Asp	Val	Val	Thr	Tyr	Leu	Val	Ala
405				410				415							
Leu	Ile	Pro	Glu	Pro	Ser	Ala	Gln	Gln	Leu	Arg	Glu	Ile	Phe	Asn	Met
420				425				430							
Ala	Arg	Asp	Gln	Arg	Ser	Arg	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Leu	Ser	His	Ala
435				440				445							
Val	Asn	Asn	Tyr	His	Lys	Thr	Asn	Pro	Thr	Gly	Thr	Gln	Glu	Leu	Leu
450				455				460							
Asp	Ile	Ala	Asn	Tyr	Leu	Met	Glu	Gln	Ile	Gln	Asp	Asp	Cys	Thr	Gly
465				470				475				480			
Asp	Glu	Asp	Tyr	Thr	Tyr	Leu	Ile	Leu	Arg	Val	Ile	Gly	Asn	Met	Gly
485				490				495							



Gln Thr Met Glu Gln Leu Thr Pro Glu Leu Lys Ser Ser Ile Leu Lys  
500 505 510

Cys Val Gln Ser Thr Lys Pro Ser Leu Met Ile Gln Lys Ala Ala Ile  
515 520 525

Gln Ala Leu Arg Lys Met Glu Pro Lys Asp Lys Asp Gln Glu Val Leu  
530 535 540

Leu Gln Thr Phe Leu Asp Asp Ala Ser Pro Gly Asp Lys Arg Leu Ala  
545 550 555 560

Ala Tyr Leu Met Leu Met Arg Ser Pro Ser Gln Ala Asp Ile Asn Lys  
565 570 575

Ile Val Gln Ile Leu Pro Trp Glu Gln Asn Glu Gln Val Lys Asn Phe  
580 585 590

Val Ala Ser His Ile Ala Asn Ile Leu Asn Ser Glu Glu Leu Asp Ile  
595 600 605

Gln Asp Leu Lys Lys Leu Val Lys Glu Ala Leu Lys Glu Ser Gln Leu  
610 615 620

Pro Thr Val Met Asp Phe Arg Lys Phe Ser Arg Asn Tyr Gln Leu Tyr  
625 630 635 640

Lys Ser Val Ser Leu Pro Ser Leu Asp Pro Ala Ser Ala Lys Ile Glu  
645 650 655

Gly Asn Leu Ile Phe Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Pro Lys Glu Ser Met  
660 665 670

Leu Lys Thr Thr Leu Thr Ala Phe Gly Phe Ala Ser Ala Asp Leu Ile  
675 680 685

Glu Ile Gly Leu Glu Gly Lys Gly Phe Glu Pro Thr Leu Glu Ala Leu  
690 695 700

Phe Gly Lys Gln Gly Phe Phe Pro Asp Ser Val Asn Lys Ala Leu Tyr  
705 710 715 720

Trp Val Asn Gly Gln Val Pro Asp Gly Val Ser Lys Val Leu Val Asp  
725 730 735

His Phe Gly Tyr Thr Lys Asp Asp Lys His Glu Gln Asp Met Val Asn  
740 745 750

Gly Ile Met Leu Ser Val Glu Lys Leu Ile Lys Asp Leu Lys Ser Lys

755 760 765

Glu Val Pro Glu Ala Arg Ala Tyr Leu Arg Ile Leu Gly Glu Glu Leu

770 775 780

Gly Phe Ala Ser Leu His Asp Leu Gln Leu Leu Gly Lys Leu Leu Leu

785 790 795 800

Met Gly Ala Arg Thr Leu Gln Gly Ile Pro Gln Met Ile Gly Glu Val

805 810 815

Ile Arg Lys Gly Ser Lys Asn Asp Phe Phe Leu His Tyr Ile Phe Met

820 825 830

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

835 840 845

Ser Ser Ser Gly Val Ile Ala Pro Gly Ala Lys Ala Gly Val Lys Leu

850 855 860

Glu Val Ala Asn Met Gln Ala Glu Leu Val Ala Lys Pro Ser Val Ser

865 870 875 880

Val Glu Phe Val Thr Asn Met Gly Ile Ile Ile Pro Asp Phe Ala Arg

885 890 895

Ser Gly Val Gln Met Asn Thr Asn Phe Phe His Glu Ser Gly Leu Glu

900 905 910

Ala His Val Ala Leu Lys Ala Gly Lys Leu Lys Phe Ile Ile Pro Ser

915 920 925

Pro Lys Arg Pro Val Lys Leu Leu Ser Gly Gly Asn Thr Leu His Leu

930 935 940

Val Ser Thr Thr Lys Thr Glu Val Ile Pro Pro Leu Ile Glu Asn Arg

945 950 955 960

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

965 970 975

Thr Ser Gly Ala Tyr Ser Asn Ala Ser Ser Thr Asp Ser Ala Ser Tyr

980 985 990

Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Arg Leu Glu Leu Glu Leu Arg Pro Thr

995	1000	1005	
Gly Glu Ile Glu Gln Tyr Ser Val Ser Ala Thr Tyr Glu Leu Gln Arg			
1010	1015	1020	
Glu Asp Arg Ala Leu Val Asp Thr Leu Lys Phe Val Thr Gln Ala Glu			
1025	1030	1035	1040
Gly Ala Lys Gln Thr Glu Ala Thr Met Thr Phe Lys Tyr Asn Arg Gln			
	1045	1050	1055
Ser Met Thr Leu Ser Ser Glu Val Gln Ile Pro Asp Phe Asp Val Asp			
1060	1065	1070	
Leu Gly Thr Ile Leu Arg Val Asn Asp Glu Ser Thr Glu Gly Lys Thr			
1075	1080	1085	
Ser Tyr Arg Leu Thr Leu Asp Ile Gln Asn Lys Lys Ile Thr Glu Val			
1090	1095	1100	
Ala Leu Met Gly His Leu Ser Cys Asp Thr Lys Glu Glu Arg Lys Ile			
1105	1110	1115	1120
Lys Gly Val Ile Ser Ile Pro Arg Leu Gln Ala Glu Ala Arg Ser Glu			
1125	1130	1135	
Ile Leu Ala His Trp Ser Pro Ala Lys Leu Leu Leu Gln Met Asp Ser			
1140	1145	1150	
Ser Ala Thr Ala Tyr Gly Ser Thr Val Ser Lys Arg Val Ala Trp His			
1155	1160	1165	
Tyr Asp Glu Glu Lys Ile Glu Phe Glu Trp Asn Thr Gly Thr Asn Val			
1170	1175	1180	
Asp Thr Lys Lys Met Thr Ser Asn Phe Pro Val Asp Leu Ser Asp Tyr			
1185	1190	1195	1200
Pro Lys Ser Leu His Met Tyr Ala Asn Arg Leu Leu Asp His Arg Val			
1205	1210	1215	
Pro Gln Thr Asp Met Thr Phe Arg His Val Gly Ser Lys Leu Ile Val			
1220	1225	1230	
Ala Met Ser Ser Trp Leu Gln Lys Ala Ser Gly Ser Leu Pro Tyr Thr			
1235	1240	1245	
Gln Thr Leu Gln Asp His Leu Asn Ser Leu Lys Glu Phe Asn Leu Gln			

1250                      1255                      1260  
 Asn Met Gly Leu Pro Asp Phe His Ile Pro Glu Asn Leu Phe Leu Lys  
 1265                      1270                      1275                      1280  
 Ser Asp Gly Arg Val Lys Tyr Thr Leu Asn Lys Asn Ser Leu Lys Ile  
                          1285                      1290                      1295  
 Glu Ile Pro Leu Pro Phe Gly Gly Lys Ser Ser Arg Asp Leu Lys Met  
                          1300                      1305                      1310  
 Leu Glu Thr Val Arg Thr Pro Ala Leu His Phe Lys Ser Val Gly Phe  
                          1315                      1320                      1325  
 His Leu Pro Ser Arg Glu Phe Gln Val Pro Thr Phe Thr Ile Pro Lys  
  
 1330                      1335                      1340  
 Leu Tyr Gln Leu Gln Val Pro Leu Leu Gly Val Leu Asp Leu Ser Thr  
 1345                      1350                      1355                      1360  
 Asn Val Tyr Ser Asn Leu Tyr Asn Trp Ser Ala Ser Tyr Ser Gly Gly  
                          1365                      1370                      1375  
 Asn Thr Ser Thr Asp His Phe Ser Leu Arg Ala Arg Tyr His Met Lys  
                          1380                      1385                      1390  
 Ala Asp Ser Val Val Asp Leu Leu Ser Tyr Asn Val Gln Gly Ser Gly  
                          1395                      1400                      1405  
  
 Glu Thr Thr Tyr Asp His Lys Asn Thr Phe Thr Leu Ser Cys Asp Gly  
                          1410                      1415                      1420  
 Ser Leu Arg His Lys Phe Leu Asp Ser Asn Ile Lys Phe Ser His Val  
 1425                      1430                      1435                      1440  
 Glu Lys Leu Gly Asn Asn Pro Val Ser Lys Gly Leu Leu Ile Phe Asp  
                          1445                      1450                      1455  
 Ala Ser Ser Ser Trp Gly Pro Gln Met Ser Ala Ser Val His Leu Asp  
                          1460                      1465                      1470  
 Ser Lys Lys Lys Gln His Leu Phe Val Lys Glu Val Lys Ile Asp Gly  
  
 1475                      1480                      1485  
 Gln Phe Arg Val Ser Ser Phe Tyr Ala Lys Gly Thr Tyr Gly Leu Ser  
 1490                      1495                      1500



Cys Gln Arg Asp Pro Asn Thr Gly Arg Leu Asn Gly Glu Ser Asn Leu  
 1505                      1510                      1515                      1520  
 Arg Phe Asn Ser Ser Tyr Leu Gln Gly Thr Asn Gln Ile Thr Gly Arg  
                          1525                      1530                      1535  
 Tyr Glu Asp Gly Thr Leu Ser Leu Thr Ser Thr Ser Asp Leu Gln Ser  
                          1540                      1545                      1550  
  
 Gly Ile Ile Lys Asn Thr Ala Ser Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Glu Leu  
                          1555                      1560                      1565  
 Thr Leu Lys Ser Asp Thr Asn Gly Lys Tyr Lys Asn Phe Ala Thr Ser  
                          1570                      1575                      1580  
 Asn Lys Met Asp Met Thr Phe Ser Lys Gln Asn Ala Leu Leu Arg Ser  
 1585                      1590                      1595                      1600  
 Glu Tyr Gln Ala Asp Tyr Glu Ser Leu Arg Phe Phe Ser Leu Leu Ser  
                          1605                      1610                      1615  
 Gly Ser Leu Asn Ser His Gly Leu Glu Leu Asn Ala Asp Ile Leu Gly  
  
                          1620                      1625                      1630  
 Thr Asp Lys Ile Asn Ser Gly Ala His Lys Ala Thr Leu Arg Ile Gly  
                          1635                      1640                      1645  
 Gln Asp Gly Ile Ser Thr Ser Ala Thr Thr Asn Leu Lys Cys Ser Leu  
                          1650                      1655                      1660  
 Leu Val Leu Glu Asn Glu Leu Asn Ala Glu Leu Gly Leu Ser Gly Ala  
 1665                      1670                      1675                      1680  
 Ser Met Lys Leu Thr Thr Asn Gly Arg Phe Arg Glu His Asn Ala Lys  
                          1685                      1690                      1695  
  
 Phe Ser Leu Asp Gly Lys Ala Ala Leu Thr Glu Leu Ser Leu Gly Ser  
                          1700                      1705                      1710  
 Ala Tyr Gln Ala Met Ile Leu Gly Val Asp Ser Lys Asn Ile Phe Asn  
                          1715                      1720                      1725  
 Phe Lys Val Ser Gln Glu Gly Leu Lys Leu Ser Asn Asp Met Met Gly  
                          1730                      1735                      1740  
 Ser Tyr Ala Glu Met Lys Phe Asp His Thr Asn Ser Leu Asn Ile Ala  
 1745                      1750                      1755                      1760

Gly Leu Ser Leu Asp Phe Ser Ser Lys Leu Asp Asn Ile Tyr Ser Ser

1765

1770

1775

Asp Lys Phe Tyr Lys Gln Thr Val Asn Leu Gln Leu Gln Pro Tyr Ser

1780

1785

1790

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

1795

1800

1805

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

1810

1815

1820

Gly Asn Leu Lys Gly Ala Tyr Gln Asn Asn Glu Ile Lys His Ile Tyr

1825

1830

1835

1840

Ala Ile Ser Ser Ala Ala Leu Ser Ala Ser Tyr Lys Ala Asp Thr Val

1845

1850

1855

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

1860

1865

1870

Ala Gly Leu Ala Ser Ala Ile Asp Met Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Asp

1875

1880

1885

Ser Leu His Phe Ser Asn Val Phe Arg Ser Val Met Ala Pro Phe Thr

1890

1895

1900

Met Thr Ile Asp Ala His Thr Asn Gly Asn Gly Lys Leu Ala Leu Trp

1905

1910

1915

1920

Gly Glu His Thr Gly Gln Leu Tyr Ser Lys Phe Leu Leu Lys Ala Glu

1925

1930

1935

Pro Leu Ala Phe Thr Phe Ser His Asp Tyr Lys Gly Ser Thr Ser His

1940

1945

1950

His Leu Val Ser Arg Lys Ser Ile Ser Ala Ala Leu Glu His Lys Val

1955

1960

1965

Ser Ala Leu Leu Thr Pro Ala Glu Gln Thr Gly Thr Trp Lys Leu Lys

1970

1975

1980

Thr Gln Phe Asn Asn Asn Glu Tyr Ser Gln Asp Leu Asp Ala Tyr Asn

1985

1990

1995

2000

Thr Lys Asp Lys Ile Gly Val Glu Leu Thr Gly Arg Thr Leu Ala Asp

2005	2010	2015	
Leu Thr Leu Leu Asp Ser Pro Ile Lys Val Pro Leu Leu Leu Ser Glu			
2020	2025	2030	
Pro Ile Asn Ile Ile Asp Ala Leu Glu Met Arg Asp Ala Val Glu Lys			
2035	2040	2045	
Pro Gln Glu Phe Thr Ile Val Ala Phe Val Lys Tyr Asp Lys Asn Gln			
2050	2055	2060	
Asp Val His Ser Ile Asn Leu Pro Phe Phe Glu Thr Leu Gln Glu Tyr			
2065	2070	2075	2080
Phe Glu Arg Asn Arg Gln Thr Ile Ile Val Val Leu Glu Asn Val Gln			
2085	2090	2095	
Arg Asn Leu Lys His Ile Asn Ile Asp Gln Phe Val Arg Lys Tyr Arg			
2100	2105	2110	
Ala Ala Leu Gly Lys Leu Pro Gln Gln Ala Asn Asp Tyr Leu Asn Ser			
2115	2120	2125	
Phe Asn Trp Glu Arg Gln Val Ser His Ala Lys Glu Lys Leu Thr Ala			
2130	2135	2140	
Leu Thr Lys Lys Tyr Arg Ile Thr Glu Asn Asp Ile Gln Ile Ala Leu			
2145	2150	2155	2160
Asp Asp Ala Lys Ile Asn Phe Asn Glu Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr			
2165	2170	2175	
Tyr Met Ile Gln Phe Asp Gln Tyr Ile Lys Asp Ser Tyr Asp Leu His			
2180	2185	2190	
Asp Leu Lys Ile Ala Ile Ala Asn Ile Ile Asp Glu Ile Ile Glu Lys			
2195	2200	2205	
Leu Lys Ser Leu Asp Glu His Tyr His Ile Arg Val Asn Leu Val Lys			
2210	2215	2220	
Thr Ile His Asp Leu His Leu Phe Ile Glu Asn Ile Asp Phe Asn Lys			
2225	2230	2235	2240
Ser Gly Ser Ser Thr Ala Ser Trp Ile Gln Asn Val Asp Thr Lys Tyr			
2245	2250	2255	
Gln Ile Arg Ile Gln Ile Gln Glu Lys Leu Gln Gln Leu Lys Arg His			

2260	2265	2270	
Ile Gln Asn Ile Asp Ile Gln His Leu Ala Gly Lys Leu Lys Gln His			
2275	2280	2285	
Ile Glu Ala Ile Asp Val Arg Val Leu Leu Asp Gln Leu Gly Thr Thr			
2290	2295	2300	
Ile Ser Phe Glu Arg Ile Asn Asp Val Leu Glu His Val Lys His Phe			
2305	2310	2315	2320
Val Ile Asn Leu Ile Gly Asp Phe Glu Val Ala Glu Lys Ile Asn Ala			
2325	2330	2335	
Phe Arg Ala Lys Val His Glu Leu Ile Glu Arg Tyr Glu Val Asp Gln			
2340	2345	2350	
Gln Ile Gln Val Leu Met Asp Lys Leu Val Glu Leu Ala His Gln Tyr			
2355	2360	2365	
Lys Leu Lys Glu Thr Ile Gln Lys Leu Ser Asn Val Leu Gln Gln Val			
2370	2375	2380	
Lys Ile Lys Asp Tyr Phe Glu Lys Leu Val Gly Phe Ile Asp Asp Ala			
2385	2390	2395	2400
Val Lys Lys Leu Asn Glu Leu Ser Phe Lys Thr Phe Ile Glu Asp Val			
2405	2410	2415	
Asn Lys Phe Leu Asp Met Leu Ile Lys Lys Leu Lys Ser Phe Asp Tyr			
2420	2425	2430	
His Gln Phe Val Asp Glu Thr Asn Asp Lys Ile Arg Glu Val Thr Gln			
2435	2440	2445	
Arg Leu Asn Gly Glu Ile Gln Ala Leu Glu Leu Pro Gln Lys Ala Glu			
2450	2455	2460	
Ala Leu Lys Leu Phe Leu Glu Glu Thr Lys Ala Thr Val Ala Val Tyr			
2465	2470	2475	2480
Leu Glu Ser Leu Gln Asp Thr Lys Ile Thr Leu Ile Ile Asn Trp Leu			
2485	2490	2495	
Gln Glu Ala Leu Ser Ser Ala Ser Leu Ala His Met Lys Ala Lys Phe			
2500	2505	2510	

Arg Glu Thr Leu Glu Asp Thr Arg Asp Arg Met Tyr Gln Met Asp Ile  
2515 2520 2525

Gln Gln Glu Leu Gln Arg Tyr Leu Ser Leu Val Gly Gln Val Tyr Ser  
2530 2535 2540

Thr Leu Val Thr Tyr Ile Ser Asp Trp Trp Thr Leu Ala Ala Lys Asn  
2545 2550 2555 2560

Leu Thr Asp Phe Ala Glu Gln Tyr Ser Ile Gln Asp Trp Ala Lys Arg  
2565 2570 2575

Met Lys Ala Leu Val Glu Gln Gly Phe Thr Val Pro Glu Ile Lys Thr  
2580 2585 2590

Ile Leu Gly Thr Met Pro Ala Phe Glu Val Ser Leu Gln Ala Leu Gln  
2595 2600 2605

Lys Ala Thr Phe Gln Thr Pro Asp Phe Ile Val Pro Leu Thr Asp Leu  
2610 2615 2620

Arg Ile Pro Ser Val Gln Ile Asn Phe Lys Asp Leu Lys Asn Ile Lys  
2625 2630 2635 2640

Ile Pro Ser Arg Phe Ser Thr Pro Glu Phe Thr Ile Leu Asn Thr Phe  
2645 2650 2655

His Ile Pro Ser Phe Thr Ile Asp Phe Val Glu Met Lys Val Lys Ile  
2660 2665 2670

Ile Arg Thr Ile Asp Gln Met Leu Asn Ser Glu Leu Gln Trp Pro Val  
2675 2680 2685

Pro Asp Ile Tyr Leu Arg Asp Leu Lys Val Glu Asp Ile Pro Leu Ala  
2690 2695 2700

Arg Ile Thr Leu Pro Asp Phe Arg Leu Pro Glu Ile Ala Ile Pro Glu  
2705 2710 2715 2720

Phe Ile Ile Pro Thr Leu Asn Leu Asn Asp Phe Gln Val Pro Asp Leu  
2725 2730 2735

His Ile Pro Glu Phe Gln Leu Pro His Ile Ser His Thr Ile Glu Val  
2740 2745 2750

Pro Thr Phe Gly Lys Leu Tyr Ser Ile Leu Lys Ile Gln Ser Pro Leu  
2755 2760 2765

Phe Thr Leu Asp Ala Asn Ala Asp Ile Gly Asn Gly Thr Thr Ser Ala

2770

2775

2780

Asn Glu Ala Gly Ile Ala Ala Ser Ile Thr Ala Lys Gly Glu Ser Lys

2785

2790

2795

2800

Leu Glu Val Leu Asn Phe Asp Phe Gln Ala Asn Ala Gln Leu Ser Asn

2805

2810

2815

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

2820

2825

2830

Lys Tyr Leu Arg Thr Glu His Gly Ser Glu Met Leu Phe Phe Gly Asn

2835

2840

2845

Ala Ile Glu Gly Lys Ser Asn Thr Val Ala Ser Leu His Thr Glu Lys

2850

2855

2860

Asn Thr Leu Glu Leu Ser Asn Gly Val Ile Val Lys Ile Asn Asn Gln

2865

2870

2875

2880

Leu Thr Leu Asp Ser Asn Thr Lys Tyr Phe His Lys Leu Asn Ile Pro

2885

2890

2895

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

2900

2905

2910

Leu Leu Lys Ala Gly His Ile Ala Trp Thr Ser Ser Gly Lys Gly Ser

2915

2920

2925

Trp Lys Trp Ala Cys Pro Arg Phe Ser Asp Glu Gly Thr His Glu Ser

2930

2935

2940

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

2945

2950

2955

2960

Asn Lys Ile Asn Ser Lys His Leu Arg Val Asn Gln Asn Leu Val Tyr

2965

2970

2975

Glu Ser Gly Ser Leu Asn Phe Ser Lys Leu Glu Ile Gln Ser Gln Val

2980

2985

2990

Asp Ser Gln His Val Gly His Ser Val Leu Thr Ala Lys Gly Met Ala

2995

3000

3005

Leu Phe Gly Glu Gly Lys Ala Glu Phe Thr Gly Arg His Asp Ala His



3010                      3015                      3020  
 Leu Asn Gly Lys Val Ile Gly Thr Leu Lys Asn Ser Leu Phe Phe Ser  
 3025                      3030                      3035                      3040  
 Ala Gln Pro Phe Glu Ile Thr Ala Ser Thr Asn Asn Glu Gly Asn Leu  
                          3045                      3050                      3055  
 Lys Val Arg Phe Pro Leu Arg Leu Thr Gly Lys Ile Asp Phe Leu Asn  
  
                          3060                      3065                      3070  
 Asn Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Ser Ala Gln Gln Ala Ser Trp Gln  
                          3075                      3080                      3085  
 Val Ser Ala Arg Phe Asn Gln Tyr Lys Tyr Asn Gln Asn Phe Ser Ala  
                          3090                      3095                      3100  
 Gly Asn Asn Glu Asn Ile Met Glu Ala His Val Gly Ile Asn Gly Glu  
 3105                      3110                      3115                      3120  
 Ala Asn Leu Asp Phe Leu Asn Ile Pro Leu Thr Ile Pro Glu Met Arg  
                          3125                      3130                      3135  
  
 Leu Pro Tyr Thr Ile Ile Thr Thr Pro Pro Leu Lys Asp Phe Ser Leu  
                          3140                      3145                      3150  
 Trp Glu Lys Thr Gly Leu Lys Glu Phe Leu Lys Thr Thr Lys Gln Ser  
                          3155                      3160                      3165  
 Phe Asp Leu Ser Val Lys Ala Gln Tyr Lys Lys Asn Lys His Arg His  
                          3170                      3175                      3180  
 Ser Ile Thr Asn Pro Leu Ala Val Leu Cys Glu Phe Ile Ser Gln Ser  
 3185                      3190                      3195                      3200  
 Ile Lys Ser Phe Asp Arg His Phe Glu Lys Asn Arg Asn Asn Ala Leu  
  
                          3205                      3210                      3215  
 Asp Phe Val Thr Lys Ser Tyr Asn Glu Thr Lys Ile Lys Phe Asp Lys  
                          3220                      3225                      3230  
 Tyr Lys Ala Glu Lys Ser His Asp Glu Leu Pro Arg Thr Phe Gln Ile  
                          3235                      3240                      3245  
 Pro Gly Tyr Thr Val Pro Val Val Asn Val Glu Val Ser Pro Phe Thr  
                          3250                      3255                      3260  
 Ile Glu Met Ser Ala Phe Gly Tyr Val Phe Pro Lys Ala Val Ser Met

3265	3270	3275	3280
Pro Ser Phe Ser Ile Leu Gly Ser Asp Val Arg Val Pro Ser Tyr Thr			
	3285	3290	3295
Leu Ile Leu Pro Ser Leu Glu Leu Pro Val Leu His Val Pro Arg Asn			
	3300	3305	3310
Leu Lys Leu Ser Leu Pro Asp Phe Lys Glu Leu Cys Thr Ile Ser His			
	3315	3320	3325
Ile Phe Ile Pro Ala Met Gly Asn Ile Thr Tyr Asp Phe Ser Phe Lys			
	3330	3335	3340
Ser Ser Val Ile Thr Leu Asn Thr Asn Ala Glu Leu Phe Asn Gln Ser			
3345	3350	3355	3360
Asp Ile Val Ala His Leu Leu Ser Ser Ser Ser Ser Val Ile Asp Ala			
	3365	3370	3375
Leu Gln Tyr Lys Leu Glu Gly Thr Thr Arg Leu Thr Arg Lys Arg Gly			
	3380	3385	3390
Leu Lys Leu Ala Thr Ala Leu Ser Leu Ser Asn Lys Phe Val Glu Gly			
	3395	3400	3405
Ser His Asn Ser Thr Val Ser Leu Thr Thr Lys Asn Met Glu Val Ser			
	3410	3415	3420
Val Ala Thr Thr Thr Lys Ala Gln Ile Pro Ile Leu Arg Met Asn Phe			
3425	3430	3435	3440
Lys Gln Glu Leu Asn Gly Asn Thr Lys Ser Lys Pro Thr Val Ser Ser			
	3445	3450	3455
Ser Met Glu Phe Lys Tyr Asp Phe Asn Ser Ser Met Leu Tyr Ser Thr			
	3460	3465	3470
Ala Lys Gly Ala Val Asp His Lys Leu Ser Leu Glu Ser Leu Thr Ser			
	3475	3480	3485
Tyr Phe Ser Ile Glu Ser Ser Thr Lys Gly Asp Val Lys Gly Ser Val			
3490	3495	3500	
Leu Ser Arg Glu Tyr Ser Gly Thr Ile Ala Ser Glu Ala Asn Thr Tyr			
3505	3510	3515	3520

Leu Asn Ser Lys Ser Thr Arg Ser Ser Val Lys Leu Gln Gly Thr Ser  
 3525 3530 3535  
 Lys Ile Asp Asp Ile Trp Asn Leu Glu Val Lys Glu Asn Phe Ala Gly  
 3540 3545 3550  
 Glu Ala Thr Leu Gln Arg Ile Tyr Ser Leu Trp Glu His Ser Thr Lys  
 3555 3560 3565  
  
 Asn His Leu Gln Leu Glu Gly Leu Phe Phe Thr Asn Gly Glu His Thr  
 3570 3575 3580  
 Ser Lys Ala Thr Leu Glu Leu Ser Pro Trp Gln Met Ser Ala Leu Val  
 3585 3590 3595 3600  
 Gln Val His Ala Ser Gln Pro Ser Ser Phe His Asp Phe Pro Asp Leu  
 3605 3610 3615  
 Gly Gln Glu Val Ala Leu Asn Ala Asn Thr Lys Asn Gln Lys Ile Arg  
 3620 3625 3630  
 Trp Lys Asn Glu Val Arg Ile His Ser Gly Ser Phe Gln Ser Gln Val  
  
 3635 3640 3645  
 Glu Leu Ser Asn Asp Gln Glu Lys Ala His Leu Asp Ile Ala Gly Ser  
 3650 3655 3660  
 Leu Glu Gly His Leu Arg Phe Leu Lys Asn Ile Ile Leu Pro Val Tyr  
 3665 3670 3675 3680  
 Asp Lys Ser Leu Trp Asp Phe Leu Lys Leu Asp Val Thr Thr Ser Ile  
 3685 3690 3695  
 Gly Arg Arg Gln His Leu Arg Val Ser Thr Ala Phe Val Tyr Thr Lys  
 3700 3705 3710  
  
 Asn Pro Asn Gly Tyr Ser Phe Ser Ile Pro Val Lys Val Leu Ala Asp  
 3715 3720 3725  
 Lys Phe Ile Ile Pro Gly Leu Lys Leu Asn Asp Leu Asn Ser Val Leu  
 3730 3735 3740  
 Val Met Pro Thr Phe His Val Pro Phe Thr Asp Leu Gln Val Pro Ser  
 3745 3750 3755 3760  
 Cys Lys Leu Asp Phe Arg Glu Ile Gln Ile Tyr Lys Lys Leu Arg Thr  
 3765 3770 3775

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

3780 3785 3790

Glu Val Asp Val Leu Thr Lys Tyr Ser Gln Pro Glu Asp Ser Leu Ile

3795 3800 3805

Pro Phe Phe Glu Ile Thr Val Pro Glu Ser Gln Leu Thr Val Ser Gln

3810 3815 3820

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

3825 3830 3835 3840

Asn Ala Val Ala Asn Lys Ile Ala Asp Phe Glu Leu Pro Thr Ile Ile

3845 3850 3855

Val Pro Glu Gln Thr Ile Glu Ile Pro Ser Ile Lys Phe Ser Val Pro

3860 3865 3870

Ala Gly Ile Val Ile Pro Ser Phe Gln Ala Leu Thr Ala Arg Phe Glu

3875 3880 3885

Val Asp Ser Pro Val Tyr Asn Ala Thr Trp Ser Ala Ser Leu Lys Asn

3890 3895 3900

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

3905 3910 3915 3920

Val Gln Phe Leu Glu Tyr Glu Leu Asn Val Leu Gly Thr His Lys Ile

3925 3930 3935

Glu Asp Gly Thr Leu Ala Ser Lys Thr Lys Gly Thr Phe Ala His Arg

3940 3945 3950

Asp Phe Ser Ala Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Lys Tyr Glu Gly Leu Gln

3955 3960 3965

Glu Trp Glu Gly Lys Ala His Leu Asn Ile Lys Ser Pro Ala Phe Thr

3970 3975 3980

Asp Leu His Leu Arg Tyr Gln Lys Asp Lys Lys Gly Ile Ser Thr Ser

3985 3990 3995 4000

Ala Ala Ser Pro Ala Val Gly Thr Val Gly Met Asp Met Asp Glu Asp

4005 4010 4015

Asp Asp Phe Ser Lys Trp Asn Phe Tyr Tyr Ser Pro Gln Ser Ser Pro

4020                      4025                      4030  
 Asp Lys Lys Leu Thr Ile Phe Lys Thr Glu Leu Arg Val Arg Glu Ser  
 4035                      4040                      4045  
 Asp Glu Glu Thr Gln Ile Lys Val Asn Trp Glu Glu Glu Ala Ala Ser  
 4050                      4055                      4060  
 Gly Leu Leu Thr Ser Leu Lys Asp Asn Val Pro Lys Ala Thr Gly Val  
  
 4065                      4070                      4075                      4080  
 Leu Tyr Asp Tyr Val Asn Lys Tyr His Trp Glu His Thr Gly Leu Thr  
 4085                      4090                      4095  
 Leu Arg Glu Val Ser Ser Lys Leu Arg Arg Asn Leu Gln Asn Asn Ala  
 4100                      4105                      4110  
 Glu Trp Val Tyr Gln Gly Ala Ile Arg Gln Ile Asp Asp Ile Asp Val  
 4115                      4120                      4125  
 Arg Phe Gln Lys Ala Ala Ser Gly Thr Thr Gly Thr Tyr Gln Glu Trp  
 4130                      4135                      4140  
  
 Lys Asp Lys Ala Gln Asn Leu Tyr Gln Glu Leu Leu Thr Gln Glu Gly  
 4145                      4150                      4155                      4160  
 Gln Ala Ser Phe Gln Gly Leu Lys Asp Asn Val Phe Asp Gly Leu Val  
 4165                      4170                      4175  
 Arg Val Thr Gln Glu Phe His Met Lys Val Lys His Leu Ile Asp Ser  
 4180                      4185                      4190  
 Leu Ile Asp Phe Leu Asn Phe Pro Arg Phe Gln Phe Pro Gly Lys Pro  
 4195                      4200                      4205  
 Gly Ile Tyr Thr Arg Glu Glu Leu Cys Thr Met Phe Ile Arg Glu Val  
  
 4210                      4215                      4220  
 Gly Thr Val Leu Ser Gln Val Tyr Ser Lys Val His Asn Gly Ser Glu  
 4225                      4230                      4235                      4240  
 Ile Leu Phe Ser Tyr Phe Gln Asp Leu Val Ile Thr Leu Pro Phe Glu  
 4245                      4250                      4255  
 Leu Arg Lys His Lys Leu Ile Asp Val Ile Ser Met Tyr Arg Glu Leu  
 4260                      4265                      4270  
 Leu Lys Asp Leu Ser Lys Glu Ala Gln Glu Val Phe Lys Ala Ile Gln

4275                      4280                      4285  
 Ser Leu Lys Thr Thr Glu Val Leu Arg Asn Leu Gln Asp Leu Leu Gln  
 4290                      4295                      4300  
 Phe Ile Phe Gln Leu Ile Glu Asp Asn Ile Lys Gln Leu Lys Glu Met  
 4305                      4310                      4315                      4320  
 Lys Phe Thr Tyr Leu Ile Asn Tyr Ile Gln Asp Glu Ile Asn Thr Ile  
 4325                      4330                      4335  
 Phe Ser Asp Tyr Ile Pro Tyr Val Phe Lys Leu Leu Lys Glu Asn Leu  
 4340                      4345                      4350  
 Cys Leu Asn Leu His Lys Phe Asn Glu Phe Ile Gln Asn Glu Leu Gln  
  
 4355                      4360                      4365  
 Glu Ala Ser Gln Glu Leu Gln Gln Ile His Gln Tyr Ile Met Ala Leu  
 4370                      4375                      4380  
 Arg Glu Glu Tyr Phe Asp Pro Ser Ile Val Gly Trp Thr Val Lys Tyr  
 4385                      4390                      4395                      4400  
 Tyr Glu Leu Glu Glu Lys Ile Val Ser Leu Ile Lys Asn Leu Leu Val  
 4405                      4410                      4415  
 Ala Leu Lys Asp Phe His Ser Glu Tyr Ile Val Ser Ala Ser Asn Phe  
 4420                      4425                      4430  
  
 Thr Ser Gln Leu Ser Ser Gln Val Glu Gln Phe Leu His Arg Asn Ile  
 4435                      4440                      4445  
 Gln Glu Tyr Leu Ser Ile Leu Thr Asp Pro Asp Gly Lys Gly Lys Glu  
 4450                      4455                      4460  
 Lys Ile Ala Glu Leu Ser Ala Thr Ala Gln Glu Ile Ile Lys Ser Gln  
 4465                      4470                      4475                      4480  
 Ala Ile Ala Thr Lys Lys Ile Ile Ser Asp Tyr His Gln Gln Phe Arg  
 4485                      4490                      4495  
 Tyr Lys Leu Gln Asp Phe Ser Asp Gln Leu Ser Asp Tyr Tyr Glu Lys  
  
 4500                      4505                      4510  
 Phe Ile Ala Glu Ser Lys Arg Leu Ile Asp Leu Ser Ile Gln Asn Tyr  
 4515                      4520                      4525



His Thr Phe Leu Ile Tyr Ile Thr Glu Leu Leu Lys Lys Leu Gln Ser  
 4530 4535 4540  
 Thr Thr Val Met Asn Pro Tyr Met Lys Leu Ala Pro Gly Glu Leu Thr  
 4545 4550 4555 4560  
 Ile Ile Leu

<210> 4  
 <211> 83  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> ApoC1  
 <400> 4  
 Met Arg Leu Phe Leu Ser Leu Pro Val Leu Val Val Val Leu Ser Ile  
 1 5 10 15  
 Val Leu Glu Gly Pro Ala Pro Ala Gln Gly Thr Pro Asp Val Ser Ser  
 20 25 30  
 Ala Leu Asp Lys Leu Lys Glu Phe Gly Asn Thr Leu Glu Asp Lys Ala  
 35 40 45  
 Arg Glu Leu Ile Ser Arg Ile Lys Gln Ser Glu Leu Ser Ala Lys Met  
 50 55 60  
 Arg Glu Trp Phe Ser Glu Thr Phe Gln Lys Val Lys Glu Lys Leu Lys  
 65 70 75 80  
 Ile Asp Ser

<210> 5  
 <211> 99  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> ApoC3  
 <400> 5  
 Met Gln Pro Arg Val Leu Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Arg Ala Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met

20 25 30

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

<210> 6  
 <211> 212  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> MSP1  
 <400> 6

Met Gly His His His His His His Ile Glu Gly Arg Leu Lys Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln  
 20 25 30  
 Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr  
 35 40 45  
 Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala  
 50 55 60  
 Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln  
 85 90 95  
 Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro  
 100 105 110  
 Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu

115                                      120                                      125  
 Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala  
 130                                      135                                      140  
 Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala  
 165                                      170                                      175  
 Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu  
 180                                      185                                      190  
 Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys  
 195                                      200                                      205  
 Leu Asn Thr Gln  
 210  
 <210>      7  
 <211>      212  
 <212>      PRT  
 <213>      Artificial Sequence  
 <220><223>      MSP1D1  
 <400>      7  
 Met Gly His His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr  
 1                                      5                                      10                                      15  
 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln  
 20                                      25                                      30  
 Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr  
 35                                      40                                      45  
 Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala  
 50                                      55                                      60  
 Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln  
 85                                      90                                      95  
 Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro

100                      105                      110  
 Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu  
 115                      120                      125  
 Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala  
 130                      135                      140  
 Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu  
 145                      150                      155                      160  
 Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala  
 165                      170                      175  
 Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu  
  
 180                      185                      190  
 Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys  
 195                      200                      205  
 Leu Asn Thr Gln  
 210  
 <210>      8  
 <211>      201  
 <212>      PRT  
 <213>      Artificial Sequence  
 <220><223>      MSP1D2  
 <400>      8  
 Met Gly His His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr  
 1                      5                      10                      15  
 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn  
  
 20                      25                      30  
 Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu  
 35                      40                      45  
 Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys  
 50                      55                      60  
 Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln

85 90 95

Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala

100 105 110

His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu

115 120 125

Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly

130 135 140

Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr

145 150 155 160

Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu

165 170 175

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

180 185 190

Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln

195 200

<210> 9

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MSP1E1

<400> 9

Met Gly His His His His His His Ile Glu Gly Arg Leu Lys Leu Leu

1 5 10 15

Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln

20 25 30

Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr

35 40 45

Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala

50 55 60

Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu

65 70 75 80

Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln

85

90

95

Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro

100

105

110

Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu

115

120

125

Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg

130

135

140

Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu

145

150

155

160

Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly

165

170

175

Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser

180

185

190

Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly

195

200

205

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

210

215

220

Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln

225

230

<210> 10

<211> 256

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MSP1E2

<400> 10

Met Gly His His His His His His Ile Glu Gly Arg Leu Lys Leu Leu

1

5

10

15

Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln

20

25

30

Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr

35

40

45

Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala

50

55

60

Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu

65

70

75

80

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

85

90

95

Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro

100

105

110

Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr

115

120

125

Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg

130

135

140

Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu

145

150

155

160

Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu

165

170

175

Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu

180

185

190

Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys

195

200

205

Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu

210

215

220

Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val

225

230

235

240

Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln

245

250

255

<210> 11

<211> 278

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> MSP1E3

<400> 11

Met Gly His His His His His His Ile Glu Gly Arg Leu Lys Leu Leu

1 5 10 15

Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln

20 25 30

Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr

35 40 45

Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala

50 55 60

Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro

100 105 110

Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu

115 120 125

Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu

165 170 175

Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp

180 185 190

Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg

195 200 205

Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu

210 215 220

Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu

225 230 235 240

Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val



245 250 255  
 Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr  
 260 265 270  
 Lys Lys Leu Asn Thr Gln

275  
 <210> 12  
 <211> 278  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> MSP1E3D1  
 <400> 12

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

50 55 60  
 Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln  
 85 90 95  
 Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro  
 100 105 110  
 Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu  
 115 120 125

Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln  
 130 135 140  
 Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu  
 145 150 155 160  
 Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu

165 170 175  
 Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp  
 180 185 190  
 Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg

195 200 205  
 Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu  
 210 215 220  
 Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu  
 225 230 235 240  
 Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val  
 245 250 255  
 Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr  
 260 265 270

Lys Lys Leu Asn Thr Gln

275  
 <210> 13  
 <211> 414  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> MSP2  
 <400> 13

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

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

85	90	95	
Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro			
100	105	110	
Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu			
115	120	125	
Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala			
130	135	140	
Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu			
145	150	155	160
Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala			
165	170	175	
Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu			
180	185	190	
Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys			
195	200	205	
Leu Asn Thr Gln Gly Thr Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val			
210	215	220	
Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln			
225	230	235	240
Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu			
245	250	255	
Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu			
260	265	270	
Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln			
275	280	285	
Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys			
290	295	300	
Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg			
305	310	315	320
Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro			
325	330	335	

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

405 410

<210> 14  
<211> 403  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> MSP2N1  
<400> 14

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

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

115 120 125

Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala  
 130 135 140  
 Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu  
 145 150 155 160  
 Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala  
 165 170 175  
 Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu  
 180 185 190  
  
 Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys  
 195 200 205  
 Leu Asn Thr Gln Gly Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu  
 210 215 220  
 Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu  
 225 230 235 240  
 Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys  
 245 250 255  
 Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met  
  
 260 265 270  
 Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu  
 275 280 285  
 Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu  
 290 295 300  
 Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg  
 305 310 315 320  
 Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala  
 325 330 335  
  
 Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr  
 340 345 350  
 His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys  
 355 360 365  
 Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser  
 370 375 380

Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu  
 385 390 395 400  
 Asn Thr Gln

<210> 15  
 <211> 392  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> MSP2N2  
 <400> 15

Met Gly His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln  
 20 25 30  
 Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr  
 35 40 45  
 Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala  
 50 55 60  
 Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln  
 85 90 95  
 Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro  
 100 105 110  
 Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu  
 115 120 125  
 Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala  
 130 135 140  
 Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu  
 145 150 155 160  
 Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala  
 165 170 175

Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu  
 180 185 190  
 Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys  
 195 200 205  
 Leu Asn Thr Gln Gly Thr Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu  
 210 215 220  
 Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu  
 225 230 235 240  
 Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys  
 245 250 255  
 Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg  
 260 265 270  
 Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu  
 275 280 285  
 Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His  
 290 295 300  
 Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg  
 305 310 315 320  
 Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala  
 325 330 335  
 Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu  
 340 345 350  
 Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu  
 355 360 365  
 Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu  
 370 375 380  
 Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln  
 385 390  
 <210> 16  
 <211> 397  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> MSP2N3

<400> 16

Met Gly His His His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr

1 5 10 15  
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln  
20 25 30  
Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr  
35 40 45  
Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala  
50 55 60  
Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu  
65 70 75 80

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

145 150 155 160  
Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala  
165 170 175  
Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu  
180 185 190  
Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys  
195 200 205  
Leu Asn Thr Gln Gly Thr Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu  
210 215 220

Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met



225                      230                      235                      240  
 Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp  
                          245                      250                      255  
 Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys  
                          260                      265                      270  
 Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu  
                          275                      280                      285  
 His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp  
  
                          290                      295                      300  
 Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr  
 305                      310                      315                      320  
 Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys  
                          325                      330                      335  
 Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu  
                          340                      345                      350  
 His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu  
                          355                      360                      365  
  
 Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu  
                          370                      375                      380  
 Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln  
 385                      390                      395  
 <210>    17  
 <211>    258  
 <212>    PRT  
 <213>    Artificial Sequence  
 <220><223>    engineered ApoA1  
 <400>    17  
 Met His His His His His His Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Ile Asp  
       1                      5                      10                      15  
 Asp Pro Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu Ala Thr Val  
  
                          20                      25                      30  
 Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln Phe

35                      40                      45  
 Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys Gln Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn  
 50                      55                      60  
 Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly  
 65                      70                      75                      80  
 Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly  
 85                      90                      95  
  
 Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val  
 100                      105                      110  
 Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu  
 115                      120                      125  
 Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly  
 130                      135                      140  
 Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly  
 145                      150                      155                      160  
 Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr  
  
 165                      170                      175  
 His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg  
 180                      185                      190  
 Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His  
 195                      200                      205  
 Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro  
 210                      215                      220  
 Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe  
 225                      230                      235                      240  
  
 Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn  
 245                      250                      255  
 Thr Gln

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 7

【변경전】

제1항에 있어서, 상기 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)은  
1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC)이고, 포스파티딜세린(phosphatidylserine)은  
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (DOPS)인, 나노천공자.

【변경후】

제1항에 있어서, 상기 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)은  
1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC)이고, 포스파티딜세린(phosphatidylserine)은  
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (DOPS)인, 나노천공자.