



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월25일
(11) 등록번호 10-2678790
(24) 등록일자 2024년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) A01K 67/027 (2024.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) A61P 31/14 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A01K 67/0275 (2024.01)

(21) 출원번호 10-2023-0143321(분할)
(22) 출원일자 2023년10월24일
심사청구일자 2023년10월24일
(65) 공개번호 10-2023-0153330
(43) 공개일자 2023년11월06일
(62) 원출원 특허 10-2022-0030971
원출원일자 2022년03월11일
심사청구일자 2022년03월11일

(56) 선행기술조사문헌
EP3963054 A1
Rha Min-Seok et al, Cellular & molecular immunology (2021.), vol 18.10, pp 2325-2333.
Maestre Lorena et al, PLoS One (2020.), vol 15.2, e0229743.
W02020223647 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

(72) 발명자
이원화
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 성균관대학교
화학관 330504호

(74) 대리인
공병욱

전체 청구항 수 : 총 6 항

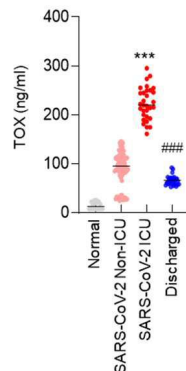
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 SARS-CoV-2 감염 질환 중증도 진단 또는 예후 예측용 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 SARS-CoV-2 감염 질환의 진단용 조성물, 진단용 키트, 진단을 위한 정보제공방법, 치료제의 스크리닝 방법 및 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명으로 SARS-CoV-2 감염 질환의 중증도 진단 또는 예후 예측이 가능할 것으로 기대되며, 본 발명의 마커인 TOX의 발현 및 활성을 조절하여 SARS-CoV-2 감염 질환 치료제 개발에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- A61P 11/00 (2018.01)
- A61P 29/00 (2023.02)
- A61P 31/14 (2018.01)
- C12Q 1/70 (2022.05)
- G01N 33/56983 (2013.01)
- A61K 2039/505 (2013.01)
- C07K 2317/21 (2013.01)
- G01N 2333/165 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129677
과제번호	2021R1C1C2006896
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	포스트 판데믹 질환 대비 예후 바이오마커 및 치료 후보물질 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	성균관대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2026.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

TOX 단백질 또는 TOX 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환으로 인한 폐혈증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 TOX 단백질 또는 TOX 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현 또는 활성 억제제는 TOX에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편인, SARS-CoV-2 감염 질환으로 인한 폐혈증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

TOX 단백질 또는 TOX 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환으로 인한 호흡기 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 TOX 단백질 또는 TOX 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현 또는 활성 억제제는 TOX에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편인, SARS-CoV-2 감염 질환으로 인한 호흡기 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

TOX 단백질 수준 또는 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 호흡기 손상 진단용 조성물.

청구항 8

TOX 단백질을 포함하는, 호흡기 손상 동물모델 제조용 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 SARS-CoV-2 감염 질환 중증도 진단 또는 예후 예측용 바이오마커에 관한 것으로, 구체적으로는 TOX의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환 중증도 진단 또는 이의 예후 예측용 조성물 등에

관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)는 2019년에 발생한 신종 코로나바이러스(coronavirus)로서, 이의 감염으로 인한 코로나바이러스 질환-2019(COVID-19)의 대유행은 전세계적으로 공중 보건에 심각한 위협이 되고 있다. 최근 통계에 따르면, 전세계 180개국에서 10만명 이상의 사망자와 약 2,000,000명 이상의 확진자가 발생했다. 확진자 수는 계속해서 증가하고 있으며, 전문가들은 전세계적으로 수십만명의 사망자가 발생할 것으로 예측하고 있다.
- [0004] 수많은 연구팀 및 글로벌 제약 회사가 SARS-CoV-2 치료 후보제에 대해 임상 시험을 수행하고 있다. 그러나, 이들 약물의 대부분은 SARS-CoV-2 감염의 치료를 위해 개발된 것이 아니라, 에볼라 바이러스(Ebola virus), 인체 면역 결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV), 중증 급성 호흡기 증후군(severe acute respiratory syndrome, SARS) 바이러스, 중동 호흡기 증후군(Middle East respiratory syndrome, MERS) 바이러스, 인플루엔자 A 바이러스(Influenza A virus), 및 ZIKA 바이러스 등 종래의 바이러스 치료를 위해 개발된 것에 불과하다.
- [0005] 다양한 임상 연구에 따르면 COVID-19 환자는 특히 사이토카인 방출 증후군(cytokine release syndrome, CRS) 및 심각한 호흡기 손상을 극복하는 것이 상당히 어려운 것으로 알려져 있다(Med, (2020) April 6 2020 및 Med, 6 April 2020 참조). 최근 미국의 생명공학 기업 Genentech가 중증 SARS-CoV-2 폐렴으로 입원한 환자를 치료하기 위한 Tocilizumab (Actemra)의 3상 임상 시험에 대한 FDA의 승인을 발표했다. 그러나, 바이러스의 감염이 해결되더라도 환자의 조직 손상은 완전히 회복되지 않을 뿐만 아니라, 급성 호흡 곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS) 또는 패혈증(sepsis)과 같은 더 심각한 질병이 발생할 수 있고, 심각한 경우 사망에 이를 수 있다.
- [0006] SARS-CoV-2 감염 질환의 중증도 예측은 환자의 치료 전략을 수립하는데 있어서 필수적이며, 특히 중환자실의 수요가 급증하는 감염성 질환 유행기에는 환자의 중증도 진단의 중요성이 환자의 생존에 매우 중요할 수 있다. 따라서, 신속하게 SARS-CoV-2 감염 및 이의 중증도를 진단할 수 있는 새로운 바이오마커의 발굴이 시급하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 국내공개특허 KR 10-2022-0004468 A

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 SARS-CoV-2 감염 질환의 중증도를 진단할 수 있는 바이오마커를 개발하고자 예의 연구를 진행하던 중, TOX 단백질의 발현 수준이 SARS-CoV-2 감염 질환의 중증도와 매우 밀접한 관련이 있다는 것을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은 TOX(Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box) 단백질 수준 또는 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 감염 질환 중증도 진단 또는 이의 예후 예측용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 TOX 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환 중증도 진단 또는 이의 예후 예측용 키트를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 TOX 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환의 중증도 진단 또는 이의 예후 예측에 필요한 정보제공방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 개체 내 TOX 단백질 수준 또는 mRNA 발현 수준을 감소시키는 물질을 선별하는 단계를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 TOX 단백질, TOX 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명자들은 COVID-19 중증 환자에서 얻은 생물학적 시료(혈액)에서 정상인에 비해 특이적으로 과발현되는 TOX를 확인하고, 이를 SARS-CoV-2 감염 질환 진단 마커로 확보하였다.
- [0017] 보다 구체적으로, 본 발명자들은 COVID-19 중증 환자에서 혈액 내 TOX 수준이 증가한 것을 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 패혈증 동물모델에 본 발명에 따른 TOX antibody의 처리 시 survival rate가 감소하고, 염증 관련 인자들의 수준이 감소한다는 것을 확인하였다.
- [0018] 따라서, 본 발명은 TOX(Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box) 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환 중증도 진단 또는 이의 예후 예측용 조성물/키트, TOX 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환의 중증도 진단 또는 이의 예후 예측에 필요한 정보제공방법, 개체 내 TOX 단백질 수준 또는 mRNA 발현 수준을 감소시키는 물질을 선별하는 단계를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환 치료제의 스크리닝 방법, 및 TOX 단백질, TOX 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0021] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 TOX(Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box) 단백질 수준 또는 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 감염 질환 중증도 진단 또는 이의 예후 예측용 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명에서 "SARS-CoV-2"는 2019년 12월에 발생한 신종 코로나바이러스(coronavirus)인 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)를 지칭하며, "COVID-19"는 SARS-CoV-2 바이러스 감염으로 인한 호흡기 감염질환을 지칭한다. 본 명세서에 있어서 "SARS-CoV-2 감염" 및 "COVID-19"는 호환되어 사용될 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명에서 "SARS-CoV-2 감염 질환"은 SARS-CoV-2 감염에 의해 발달한 질환을 지칭하며, 중증급성호흡기 증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS), 급성호흡곤란증후군(Acute respiratory distress syndrome, ARDS), 패혈증(sepsis), 패혈성 쇼크(septic shock), 폐렴 및 폐부종을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0024] 또한, 본 발명에서 SARS-CoV-2는 감염 과정에서 다양한 돌연변이를 일으켜 변종이 발생할 수 있으며, 이들 변종 또한 본 발명의 상기 SARS-CoV-2에 모두 포함이 될 수 있다.
- [0025] 상기 "패혈증"은 SARS-CoV-2 감염 질환의 합병증으로 나타나는 전신성 염증 반응 증후군으로, 원인을 조기에 신속하고 정확하게 진단하지 못할 경우에는 중증 패혈증(severe sepsis)이나 패혈성 쇼크, 폐, 신장, 간, 순환기 등의 기능 장애까지 초래되는 다장기 기능장애 증후군(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 과중성 혈관내 응고 증후군(DIC), 급성호흡곤란증후군 또는 급성 신부전으로 진행되어 사망할 수 있는 치명적인 질환이다.
- [0026] 따라서, 본 발명에서 상기 패혈증은 패혈증의 최종 단계와 관련된 패혈증, 중증 패혈증, 패혈증성 쇼크 및 패혈증에 수반하는 다장기 기능장애 증후군, 과중성 혈관내 응고 증후군, 급성호흡곤란증후군 또는 급성 신부전의 발병을 포함하나, 이에 제한되지 않으며 패혈증의 모든 단계를 포함한다.
- [0027] 본 발명에서, "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, SARS-CoV-2 감염 질환 상태의 동정, SARS-CoV-2 감염 질환의 단계 결정 또는 치료에 대한 SARS-CoV-2 감염 질환의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를 포함한다.
- [0028] 특히, 본 발명에서의 진단은 SARS-CoV-2 감염 질환의 중증도 진단을 의미하며, 상기 "중증도"란 SARS-CoV-2 감염 질환에 걸린 환자의 위중한 정도를 의미하는 것으로, 구체적으로는 합병증 유무, 사망 위험 정도, 중증 급성 호흡기 증후군 동반 여부 등을 의미하는 것일 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명에서 "예후"는 병의 발생, 진행, 회복, 재발, 및 약물 내성 등에 관한 예측을 의미하는 것으로, 전망 내지는 예비적 평가를 말한다. 본 발명에서 예후는 SARS-CoV-2 감염 질환의 발생, 재발, SARS-CoV-2 감염

질환으로 인한 사망, SARS-CoV-2 감염 질환으로부터의 생존(overall survival), 또는 무병생존(disease-free survival)을 의미할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0030] 본 발명에서 "발현"은 세포에서 단백질 또는 핵산이 생성되는 것을 의미한다. '단백질'은 '폴리펩타이드(poly peptide)' 또는 '펩타이드(peptide)'와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다. '폴리뉴클레오티드(polynucleotide)' 또는 '핵산'은 단일-또는 이중-가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다. 'mRNA'는 단백질 합성 과정에서 특정 유전자로부터 아미노산 서열을 특정하게 되는 리보솜으로 유전 정보(유전자 특이적 염기 서열)를 전달하는 RNA이다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, COVID-19 환자로부터 분리된 혈액에서 TOX 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 분석해 본 결과, 질환의 정도가 중증일수록 TOX 농도가 높은 것으로 확인되었다. 따라서, TOX 단백질 또는 mRNA의 발현 수준을 측정한다면 보다 정확하게 SARS-CoV-2 감염 질환의 중증도를 예측할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 TOX 단백질 수준을 측정하는 제제는 TOX 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체(antibody), 항체의 단편 또는 aptamer(aptamer)일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 용어 "항체"는 항원성 부위에 특이적으로 결합하는 면역글로불린(immunoglobulin)을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 TOX 이외에는 다른 종류의 단백질에는 반응하지 않고, TOX 단백질에만 특이적으로 결합하는 항체이다. TOX 항체는 TOX 유전자를 발현백터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 수득하고, 수득한 단백질로부터 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 제조할 수 있다. TOX 항원성 부위를 포함하는 TOX 단백질의 단편을 이용하여 TOX 단백질 특이적인 항체를 제조할 수도 있다.
- [0034] 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며, 다클론 항체(polyclonal antibody) 또는 단일클론 항체(monoclonal antibody)를 포함한다. 또한 항원-항체 결합성을 갖는 것이면 전체 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되며, TOX에 특이적으로 결합하는 모든 종류의 면역글로불린 항체가 포함된다. 예를 들어 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편, 즉 항원 결합 기능을 갖는 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 나아가 본 발명의 항체에는 TOX 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 인간화 항체, 키메라 항체 등의 특수 항체와 재조합 항체도 포함된다.
- [0035] 본 발명에서 TOX 단백질은 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 인간의 TOX 아미노산 서열을 포함하는 것으로서, 본 발명에서 TOX 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는, 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다. 상기 TOX 특이적인 항체를 TOX의 발현 수준을 측정하는 제제로 포함하는 본 발명의 진단 또는 이의 예후 예측용 조성물은 공지된 단백질을 감지하는 방법에 필요한 제제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 본 조성물을 이용하여 공지된 단백질을 감지하는 방법을 제한없이 사용하여 TOX 단백질의 수준을 측정할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 용어 "aptamer"는 특정 물질에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA(ssDNA) 또는 RNA를 말한다. aptamer는 특정 물질에 대한 친화도가 매우 높고 안정하고, 비교적 단순한 방법으로 합성할 수 있으며, 결합력을 높이기 위해 다양한 변형이 가능하고, 세포, 단백질, 및 작은 유기물질까지도 표적물질이 될 수 있기 때문에, 그 특이성 및 안정성이 이미 개발되어 있는 항체에 비해 매우 높은 특징이 있다. 본 발명에서 상기 aptamer는 TOX에 결합할 수 있는 것이라면 그 종류 및 형태가 특별히 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명의 다른 일 구현예에서, 상기 TOX mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는 TOX mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머(primer) 쌍, 프로브(probe) 또는 이의 조합일 수 있다.
- [0038] 상기 TOX mRNA는 인간을 포함하는 포유류에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 인간의 TOX mRNA 염기서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 TOX mRNA 특이적인 프로브 또는 프라이머 세트를 TOX의 발현 수준을 측정하는 제제로 포함하는 본 발명의 진단 또는 이의 예후 예측용 조성물은 공지된 RNA를 감지하는 방법에 필요한 제제를 추가로 포함할 수 있다. 본 조성물을 이용하여 공지된 RNA를 감지하는 방법을 제한없이 사용하여 피검체에서 TOX mRNA의 수준을 측정할 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 용어 "프라이머"는 DNA 합성의 개시점(starting point)으로 작용하는 짧은 단일가닥 올리고뉴클레오티드(single strand oligonucleotide)이다. 프라이머는 적합한 완충액(buffer)와 온도 조건에서 주형(template)인 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하고, DNA 중합효소가 프라이머에 주형 DNA에 상보적인 염기를 갖는 뉴클레오사이드 트리포스페이트를 추가하여 연결함으로써 DNA가 합성된다. 프라이머는 일반적으로 15

내지 30개의 염기서열로 이루어져 있으며, 염기 구성과 길이에 따라 주형 가닥에 결합하는 온도(melting temperature, Tm)가 달라진다.

- [0040] 상기 프라이머의 서열은 주형의 일부 염기 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서 TOX mRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 프라이머는 TOX 유전자 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, DNA 합성을 통해 TOX mRNA 또는 TOX cDNA의 특정 구간을 증폭하여 TOX mRNA의 양을 측정하려는 목적에 맞는 길이와 상보성을 갖는 것이면 충분하다. 상기 증폭 반응을 위한 프라이머는 증폭하고자 하는 TOX mRNA의 특정 구간의 양쪽 끝부분의 주형(또는 센스, sense)과 반대편(안티센스, antisense)에 각각 상보적으로 결합하는 한 세트(쌍)으로 구성된다. 프라이머는 당업자라면 TOX mRNA 또는 cDNA 염기서열을 참조하여 용이하게 디자인할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 상기 프라이머는 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 TOX mRNA 염기서열에 특이적으로 결합하는 한 세트 또는 한 쌍일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 용어 "프로브"는 특정 유전자의 mRNA나 cDNA(complementary DNA)에 특이적으로 결합할 수 있는 짧은 수는 개 내지 길게는 수백 개의 염기(base pair) 길이의 RNA 또는 DNA 등 폴리뉴클레오티드의 단편을 의미하며, 표지(labeling)되어 있어서 결합하는 대상 mRNA나 cDNA의 존재 유무, 발현양 등을 확인할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서는 TOX mRNA에 상보적인 프로브를 피검체의 시료와 혼성화 반응(hybridization)을 수행하여 TOX mRNA의 발현양을 측정함으로써 감염성 질환의 진단에 이용할 수 있다. 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 기술에 따라 적절하게 선택할 수 있다.
- [0043] 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 TOX mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.
- [0045] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명의 SARS-CoV-2 감염 질환 중증도 진단 또는 이의 예후 예측용 조성물은 SARS-CoV-2 감염 질환 중증도 진단 또는 이의 예후 예측용 키트로 응용, 제작될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 SARS-CoV-2 감염 질환 중증도 진단 또는 이의 예후 예측용 키트는 당분야에서 널리 사용되는 다른 구성 성분 또는 장치를 추가로 포함할 수 있다.
- [0047] 구체적인 예로서, 상기 TOX 유전자에 대한 특이적인 프라이머 쌍 및, 추가적으로 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase 억제제, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함하여 RT-PCR용 키트로 제작될 수 있다. 또 다른 예로서, DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 DNA 칩용 키트로 제작될 수 있다.
- [0048] 또 다른 예로서, 상기 유전자의 단백질에 대한 특이적인 항체 및, 추가적으로, 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소 및 그의 기질을 포함하는 ELISA용의 키트로 제작될 수 있다. 또 다른 예로서, 단백질 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 단백질 칩용 키트로 제작될 수 있다.
- [0049] 상기 예시한 키트 외에도, 상기 유전자를 검출할 수 있는 래피드 진단 키트로 제작되는 여러 형태의 진단 키트를 포함한다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환 중증도 진단 또는 이의 예후 예측에 필요한 정보제공방법을 제공한다.
- [0052] 피검체의 생물학적 시료에 존재하는 TOX(Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box) 단백질 수준 또는 mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 측정된 TOX 단백질 수준 또는 mRNA의 발현 수준을 정상 대조군과 비교하는 단계.
- [0053] 본 발명에서 생물학적 시료에 존재하는 TOX 단백질 수준 또는 mRNA의 발현 수준을 측정하고, 측정결과를 정상 대조군 시료의 수준과 비교하여, 상기 시료의 단백질 또는 mRNA 양이 증가하는 경우, 이를 SARS-CoV-2 감염 질

환 증증도가 높은 것으로 판정할 수 있다.

- [0054] 본 발명의 상기 방법에 따라 SARS-CoV-2 감염 질환의 증증도를 정확하게 판정한 후, 질환의 증증도에 따라 환자의 치료 전략을 수립하는 것이 가능할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 방법은 포유류 특히 인간을 대상으로 포함한다. 이때, 인간 대상체는 SARS-CoV-2 감염 질환이 발병했을 것으로 의심되는 사람, SARS-CoV-2 감염 질환 환자, 또는 의심되지 않는 사람으로 SARS-CoV-2 감염 질환 진단 여부가 필요한 사람을 포함한다.
- [0056] 본 발명에서 "생물학적 시료"는 SARS-CoV-2 감염 질환을 진단하거나 상기 질병의 치료 반응성을 예측하고자 하는 피검체로부터 채취된 것이라면 제한없이 사용할 수 있으며, 예를 들어 생검 등으로 얻어진 세포나 조직, 혈액, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액, 각종 분비물, 소변, 대변 등일 수 있다. 상기 시료는 검출 또는 진단에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 균질화(homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다.
- [0057] 본 발명에서 "단백질 수준 측정"이란 SARS-CoV-2 감염 질환의 진행 여부를 확인하기 위하여 생물학적 시료에서 본 발명의 TOX 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 단백질의 양을 측정하여 이루어진다. TOX 단백질의 수준은 TOX 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 검출하거나 측정할 수 있다. TOX 단백질 특이적인 항체는 본 발명의 진단 또는 이의 예후 예측용 조성물에서 서술한 바와 같다.
- [0058] TOX 단백질의 수준을 측정하는 방법은 당업계에서 공지되어 있는 방법은 제한 없이 사용할 수 있으며, 그 예로 웨스턴 블랏팅(western blotting), 닷 블랏팅(dot blotting), 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사능 면역분석법(RIA), 방사면역확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역 전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전법(immunoprecipitation), 보체 고정 분석법, 유세포 분석법(FACS) 또는 단백질 칩(chip) 방법 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명에서 "mRNA 발현 수준 측정"이란 SARS-CoV-2 감염 질환의 진행 여부를 확인하기 위하여 생물학적 시료에서 본 발명의 TOX mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정하여 이루어진다. TOX mRNA 수준은 TOX mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트나 프로브를 이용하여 생물학적 시료로부터 TOX mRNA나 cDNA를 증폭하거나, 프로브와 혼성화 반응(hybridization)을 이용하여 생물학적 시료 내 TOX mRNA의 존재와 발현량을 측정할 수 있다. TOX의 프라이머와 프로브는 본 발명의 진단 또는 이의 예후 예측용 조성물에서 서술한 바와 같다.
- [0060] TOX mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 당업계에서 공지되어 있는 통상적인 발현 수준 확인 방법을 제한 없이 사용할 수 있으며, 그 예로 역전사중합체연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA:RNase protection assay), 노던 블랏팅(northern blotting), DNA 마이크로어레이 칩(microarray chip), RNA 염기서열 분석(RNA sequencing), 나노스트링(nanostring)을 이용한 혼성화 방법, 조직 절편의 인시투 혼성화 방법(in situ hybridization) 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명에서 "검출"이란, 정량 및/또는 정성 분석을 포함하는 것으로, 존재, 부존재의 검출 및 발현량 검출을 포함하는 것으로 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자라면 본인의 실시를 위해 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다.
- [0062] 본 발명에서 "수준이 증가되어 있다"는 것은, 검출되지 않던 것이 검출된 것, 또는 정상적인 수준보다 상대적으로 검출량이 많아지는 것을 의미한다. 이의 반대적 용어의 의미는 당업자라면 상기 정의에 준하여, 반대 의미를 가지는 것으로 이해 가능하다.
- [0063] 본 발명에서 수준이 "증가"되어 있다는 것은, 대조군에 비해 1 내지 1.5배, 1.5 내지 2배, 2 내지 2.5배, 2.5 내지 3배, 3 내지 3.5배, 3.5 내지 4배, 4 내지 4.5배, 4.5 내지 5배, 5 내지 5.5배, 5.5 내지 6배, 6 내지 6.5배, 6.5 내지 7배, 7 내지 7.5배, 7.5 내지 8배, 8 내지 8.5배, 8.5 내지 9배, 9 내지 9.5배, 9.5 내지 10배, 또는 10배 이상 증가한 것을 의미할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0064] 본 발명에서 수준이 "감소"되어 있다는 것은, 대조군에 비해 1 내지 1.5배, 1.5 내지 2배, 2 내지 2.5배, 2.5 내지 3배, 3 내지 3.5배, 3.5 내지 4배, 4 내지 4.5배, 4.5 내지 5배, 5 내지 5.5배, 5.5 내지 6배, 6 내지 6.5배, 6.5 내지 7배, 7 내지 7.5배, 7.5 내지 8배, 8 내지 8.5배, 8.5 내지 9배, 9 내지 9.5배, 9.5 내지 10배, 또는 10배 이상 감소한 것을 의미할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0065] 상기 방법으로 측정된 피검체의 TOX 단백질 또는 mRNA 발현 수준을 동일한 방법으로 측정된 대조군의 TOX 단백질 또는 mRNA 발현 수준과 비교하였을 때, TOX 단백질 또는 mRNA 발현 수준이 증가되어 있는 경우, 상기 피검체를 SARS-CoV-2 감염 질환에 걸린 것으로 진단하거나 SARS-CoV-2 감염 질환의 예후가 좋지 않은 것(poor prognosis)으로 예측할 수 있다. 여기서, "예후가 좋지 않은 것으로 예측하는 것"이란, SARS-CoV-2 감염 질환 발병 가능성이 높은 것, SARS-CoV-2 감염 질환 증상이 심각해지는 것, SARS-CoV-2 감염 질환으로 인한 사망 가능성이 높은 것, 또는 SARS-CoV-2 감염 질환 재발 가능성이 높은 것 등을 예측하는 것을 의미할 수 있다.
- [0066] 본 발명에서 정상 대조군은 SARS-CoV-2 감염 질환을 진단받은 적이 없는 정상인으로부터 분리된 생물학적 시료 일 수 있다.
- [0068] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 개체 내 TOX(Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box) 단백질 수준 또는 mRNA 발현 수준을 감소시키는 물질을 선별하는 단계를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0069] 본 발명에서 개체 내 TOX 단백질 수준 또는 mRNA 발현 수준을 측정하고, SARS-CoV-2 감염 질환 치료용 후보물질 투여 시, 상기 단백질 수준 또는 mRNA 발현 수준이 기존 대비 감소되는 경우 상기 후보물질은 SARS-CoV-2 감염 질환 치료제로 이용될 수 있다.
- [0070] 본 발명에서 용어 "후보물질"은 생물학적 시료 내의 TOX 단백질 활성화에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 후보물질은 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), DNase, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 재조합 플라스미드(recombinant plasmid), 나노입자(nanoparticle), 단백질, 올리고펩타이드, 항체, 앵타머, 천연추출물 또는 화학물질을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0072] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 TOX(Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box) 단백질, TOX 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0073] 본 발명에서 "예방"이란 본 발명의 조성물의 투여에 의해 SARS-CoV-2 감염 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0074] 본 발명에서 "치료"란 본 발명의 조성물의 투여에 의해 SARS-CoV-2 감염 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0075] 본 발명에서 상기 TOX 단백질, TOX 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 발현 또는 활성 억제제는 TOX에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0076] 본 발명에서 용어 "항원 결합 단편"은 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab')₂, 화학적으로 연결된 F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 다이설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 또는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.
- [0077] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체로는 식염수, 완충 식염수, 물, 글리세롤, 폴리에틸렌글리콜, 식물성 오일, 이소프로필미리스테이트, 및 에탄올 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명에 따른 약학적 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면

활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조할 수 있다.

- [0079] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명에 따른 펩타이드에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함될 수 있다.
- [0080] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0081] 본 발명에 따른 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내, 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0082] 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0083] 본 발명에 따른 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0084] 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0086] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 SARS-CoV-2 감염 질환의 치료방법을 제공한다.
- [0087] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0088] 본 발명에서 "투여"란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0089] 본 발명에서 "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "호전"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

발명의 효과

- [0091] 본 발명은 SARS-CoV-2 감염 질환의 진단용 조성물, 진단용 키트, 진단을 위한 정보제공방법, 치료제의 스크리닝 방법 및 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명으로 SARS-CoV-2 감염 질환의 중증도 진단 또는 예후 예측이 가능할 것으로 기대되며, 본 발명의 마커인 TOX의 발현 및 활성을 조절하여 SARS-CoV-2 감염 질환 치료제 개발에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0093] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 COVID-19 환자 혈액 내 TOX 농도를 측정된 결과이다(***p<0.001).
- 도2는 본 발명의 일 실시예에 따라 치명률(생존 또는 사망)에 따른 COVID-19 혈액 내 TOX 농도를 측정된 결과이다(***p<0.001).

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 COVID-19 환자 혈액에서 분리한 PBMC에서 TOX mRNA 발현 수준을 측정된 결과이다 (*p<0.01, ##p<0.01).

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 COVID-19 환자 혈액에서 분리한 PBMC에서 TOX 단백질 분비량을 측정된 결과이다(*p<0.05, ##p<0.01).

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 COVID-19 환자 혈액에서 분리한 PBMC의 시간에 따른 세포 생존능 및 TOX 분비를 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 COVID-19 경증 환자와 COVID-19 중증 환자에서 혈중 TOX 농도의 발현 차이에 따른 폐 CT 사진을 비교한 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 COVID-19 환자 혈액에서 분리한 PBMC에서 다양한 사이토카인 생성 및 NF-κb 활성화 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 TOX 항체 처리에 따른 CLP-마우스 모델의 생존율을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0094] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0096] **준비에. 혈장 샘플 준비**

[0097] SARS-CoV-2에 감염(COVID-19)된 환자로부터 환자 정보 및 혈액 샘플을 확보한 후 혈액을 분석하였다. 구체적으로, COVID-19 경증(Non-ICU) 환자 85 명, COVID-19 중증(ICU) 환자 31 명, 입원 후 퇴원한 COVID-19(discharged) 환자 31 명, 및 정상 대조군 20 명을 대상으로 하였으며, COVID-19 경/중증은 중환자실(intensive care unit, ICU) 병동 수용 이력 여부에 따라 급성호흡곤란증후군(ARDS) 또는 패혈증으로 진행돼 중환자실에서 호흡기 집중치료를 받은 경우 중증으로 정의하였다. 혈장 샘플은 전혈 채취 후 48시간 이내에 2000 xg에서 5분 동안 원심분리하여 준비하였다. 연구 프로토콜은 대구 영남대학교 병원 임상 시험 심사위원회의 승인을 받았으며(IRB No. 2018-05-022, 2020-03-057, 2020-05-031-001), 모든 환자들에 대한 동의서를 받고 진행하였다.

[0099] **실시예 1. SARS-CoV-2 감염에 대한 바이오마커로서의 TOX 발굴**

[0100] SARS-CoV-2 감염이 세포 및 분자 변화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 먼저 다양한 COVID-19 중증도를 가진 환자(COVID-19 경증 환자, COVID-19 중증 환자, 및 입원 후 퇴원한 COVID-19 환자)를 가진 환자의 혈액을 분석하였다.

표 1

[0101] Comparison of laboratory findings of patients with SARS-CoV-2 infection

	SARS-CoV-2 Non-ICU (n=85)	SARS-CoV-2 ICU (n=31)	Discharged (n= 31)	P-value
White blood cell count, ×10 ⁹ /L	6.1±3.2	8.9±3.3	5.6±1.1	0.001
Neutrophil count, X 10 ⁹ /L	4.1±3.2	7.7±3.3	3.0±0.9	<0.001
Lymphocyte count, X 10 ⁹ /L	1.5±0.7	0.8±0.3	1.9±0.5	<0.001
Hemoglobin, g/dL	13.0±1.6	13.5±1.7	12.6±1.5	0.143
Platelets, X 10 ⁹ /L	245.0±107.9	186.7±64.9	258.6±75.0	0.069
Albumin, g/dL	3.9±0.5	3.0±0.3	4.0±0.4	<0.001
Alanine aminotransferase, IU/L	30.1±26.3	58.8±93.6	38.8±26.1	0.033
Aspartate aminotransferase, IU	37.5±26.6	100.3±97.0	28.4±9.3	<0.001
Total bilirubin, mg/dL	0.8±0.4	1.1±0.6	1.4±4.3	0.398
Blood urea nitrogen, mg/dL	14.6±9.0	20.0±11.4	10.8±3.1	0.001
Creatinine, mg/dL	0.8±0.5	1.0±0.3	0.7±0.2	0.107
Creatinine phosphokinase, IU/L	100.7±159.1	131.9±122.0	71.1±68.3	0.332

Lactate dehydrogenase, IU/L	555.5±184.0	1272.6±542.1	380.4±131.8	<0.001
C-reactive protein, mg/dL	4.2±6.7	17.7±9.5	0.4±1.1	<0.001

- [0102] Data are presented as mean ± standard error of the mean. (one-way ANOVA).
- [0103] 상기와 같이, SARS-CoV-2 감염에 대한 바이오마커를 탐색하는 과정에서, COVID-19 환자의 혈청에 전사인자 TOX가 존재한다는 것을 발견하였으며, TOX에 대하여 하기와 같이 추가 실험을 진행하였다.
- [0105] **실시예 2. SARS-CoV-2 감염 환자의 TOX 수준 확인**
- [0106] [ELISA]
- [0107] 재조합 TOX 단백질(Abcam, ab160644)을 1 µg/100 µL로 희석하여 Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96-웰 플레이트에 코팅하고 4°C에서 밤새 배양하였다. 사용 전, 플레이트는 PBST로 3회 세척하고 37°C에서 30분 동안 PBS 중 3% BSA로 차단하였다. 1차 항체(TOX antibody, Cell signaling Technology, #99036)(1:2000 희석)와 SARS-CoV-2 감염 환자 혈장 시료(20 µg)를 37°C에서 1시간 동안 미리 배양한 다음, 배양된 시료를 펩타이드가 코팅된 플레이트에 옮겨 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 플레이트를 PBST 5회 세척하고 2차 항체(Cell signaling Technology, #7074)(1:5000 희석)와 함께 37°C에서 30분 동안 배양한 후 PBST로 5회 세척하였다. 세척된 플레이트를 37°C에서 10분 동안 TMB ELISA 기질 100 µL/웰로 처리한 다음 정지 용액 100 µL/웰을 첨가하였다. ELISA 플레이트 리더(Tecan, Austria)로 450 nm에서 검출하였다.
- [0108] [PBMC 분리]
- [0109] 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)는 Blood. 2014 Jan 9;123(2):239-48를 참고하여 Percoll 밀도 구배(density gradient)(pH 8.5-9.5, Sigma-Aldrich, UK)로 분리하였다. 분리된 PBMC는 RPMI 1640 배지(Sigma-Aldrich)에 현탁시켰다. 트리판 블루 염색법으로 확인하였을 때, 95% 순도 및 97% 생존을 나타내었다.
- [0110] [Real-time PCR]
- [0111] total RNA 1 µg를 확장 역전사 중합효소(Roche)를 사용하여 무작위 6량체로 역전사하여 PBMC에서 cDNA를 생성하였다. Real-time PCR은 제조업체의 프로토콜에 따라 Roche Diagnostics GmbH의 LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I을 사용하여 수행되었다: 95°C에서 10분(Initial denaturation), 95°C에서 10분(Denaturation), 60°C에서 5분(Annealing), 72°C에서 15분(Elongation) 45 사이클. mRNA의 발현양은 해당 유전자 특이적 표준 곡선에 따라 측정되었다.
- [0112] [Time-course analysis]
- [0113] 분리된 PBMC를 24 시간 동안 배양하면서 TOX 분비량을 TOX ELISA로 분석하였으며, 세포 생존능(viability)을 WST-1 시약으로 분석하였다.
- [0114] [Computed tomography]
- [0115] 컴퓨터 단층 촬영(CT) 영상을 이용해 SARS-CoV-2 환자의 폐조직을 검사하였다.
- [0117] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, COVID-19 중증 환자(SARS-CoV-2 ICU)의 혈액에서 TOX 단백질 수준이 현저하게 증가하였다. 이때, TOX 단백질 수준은 퇴원한 환자에서 다시 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 2에 나타낸 바와 같이, 생존한 환자(Survival)의 혈장에서는 TOX 수준이 낮게 유지되었지만, 사망한 환자(Death)에서는 여전히 높은 수준의 TOX가 관찰되었다.
- [0118] 나아가, 도 3에 나타낸 바와 같이, COVID-19 중증 환자(SARS-CoV-2 ICU)의 혈액으로부터 분리된 PBMC에서 TOX mRNA 발현 수준이 현저하게 증가하였다. 마찬가지로, TOX mRNA 발현 수준은 퇴원한 환자에서 다시 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 4에 나타낸 바와 같이, COVID-19 중증 환자(SARS-CoV-2 ICU)의 혈액으로부터 분리된 PBMC에서도 TOX 단백질 수준이 현저하게 증가하였다. 마찬가지로, TOX 단백질 수준은 퇴원한 환자에서 다시 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 추가적으로, 도 5에 나타낸 바와 같이, COVID-19 중증 환자(SARS-CoV-2 ICU)의 혈액으로부터 분리된 PBMC에서 TOX가 증가함에 따라 세포 생존능이 감소함을 확인할 수 있었다.
- [0119] 끝으로, 도 6에 나타낸 바와 같이, 혈장 내 TOX 수치가 높은 COVID-19 환자는 TOX 수치가 낮은 환자에 비해 심

각한 폐 손상을 입었음을 확인하였다.

[0121] 이러한 결과는, TOX 단백질 수준과 COVID-19 질환의 중증도와의 상관관계를 시사한다.

[0123] **실시예 3. SARS-CoV-2 감염 환자의 염증 반응에 대한 TOX 효과 확인**

[0124] 상기 실시예 2에서 SARS-CoV-2 감염 질환 환자로부터 분리된 PBMC를 재조합 TOX 단백질과 37°C, 24 시간 동안 배양하였다. 상청액을 사이토카인 ELISA의 분석에 사용하였고, 용해물을 NF-κB 활성 분석에 사용하였다. 모든 실험은 적어도 3 회 독립적으로 수행되었다.

[0125] [Cytokine ELISA]

[0126] 혈장 내 사이토카인 농도는 시판되는 ELISA 키트를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 정량화되었으며, ELISA 플레이트 리더(Tecan)로 450 nm에서 검출하였다. 사용한 키트는 다음과 같다: Human IL-1β Quantikine ELISA 키트(DLB50, R&D Systems, USA), Human IL-4 Quantikine ELISA 키트(D4050, R&D Systems), Human IL-6 Quantikine ELISA 키트(D6050, R&D Systems), Human IL-10 Quantikine ELISA Kit(D1000B, R&D Systems), Human IFN-γ Quantikine ELISA Kit(DIF50, R&D Systems), 및 Human TNF-α Quantikine ELISA 키트(DTA00D, R&D Systems).

[0127] [NF-κB activity kit]

[0128] ELISA 기반 NF-κB 패밀러 전사 인자 분석 키트(43296; Active Motif, USA)를 사용하여 NF-κB 활성을 분석하였다. 구체적으로, 핵 추출물(2 μg)을 NF-κB 공통 올리고뉴클레오타이드(consensus oligonucleotides)가 고정된 96-웰 플레이트에서 37°C, 1 시간 동안 배양하였다. 포획된 복합체를 NF-κB 1차 항체와 함께 37°C, 1 시간 동안 배양한 후 HRP-결합 2차 항체와 37°C, 1 시간 동안 배양하였다. Tecan Spark 마이크로플레이트 리더로 450 nm에서 광밀도(optical density, OD)를 측정함으로써 항체를 검출하였다.

[0130] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, SARS-CoV-2 감염 질환 환자로부터 분리된 PBMC에 대한 TOX 처리는 IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IFN-γ 및 TNF-α를 포함한 다양한 사이토카인의 분비 및 NF-κB 활성화에 대해 억제 효과를 나타내었다.

[0131] 이러한 결과는, TOX 단백질이 SARS-CoV-2 감염에 의해 유발된 염증 반응을 감소시키는데 큰 효능이 있음을 시사한다.

[0133] **실시예 4. *in vivo* TOX 효과 확인**

[0134] CLP(Cecal ligation and puncture)로 복부 패혈증을 유발한 마우스에 대하여 TOX 항체(ab237009)를 투여하여 생존율을 확인하였다.

[0135] 구체적으로, C57BL/6 수컷 마우스(6주 내지 7주령, 무게는 18-20g)를 Orient Bio에서 구입하였으며, 12일의 순응 기간이 지난 후 사용하였다. 케이지당 5마리의 마우스를 온도 20-25°C, 습도 40-45%의 환경에서 12:12시간의 명암 주기(light/dark cycle)로 사육하였다. 마우스에게는 보통의 설취류 사료를 지급하였으며, 물을 자유롭게 공급하였다(*ad libitum*). 모든 동물은 KRIBB 제1305021호에서 발행한 실험실 동물의 관리 및 사용에 관한 지침에 따라 다루었다.

[0136] CLP-유도 패혈증 마우스 모델은 Nat Protoc 4, 31-36 (2009)을 참고하여 제조하였다. 2츠의 중간선 절개(midline incision)를 만들어 맹장 및 이와 인접한 소장을 노출시켰다. 그 후 맹장 끝에서부터 5.0 mm의 3.0-실크 봉합사(suture)를 사용해 단단히 결찰(ligated)시켰고, 22-게이지 바늘로 천공(punctured)을 만든 다음, 천공 부위에서 대변을 부드럽게 압출시켰다. 맹장은 복강 내로 되돌려 놓고, 4.0-실크 봉합사를 사용해 개복술 부위를 봉합하였다. 모의 수술(sham operations)을 위해 마우스의 맹장을 외과적으로 노출시켰으나, 결찰이나 천공은 내지 않고 복강으로 되돌려 놓았다.

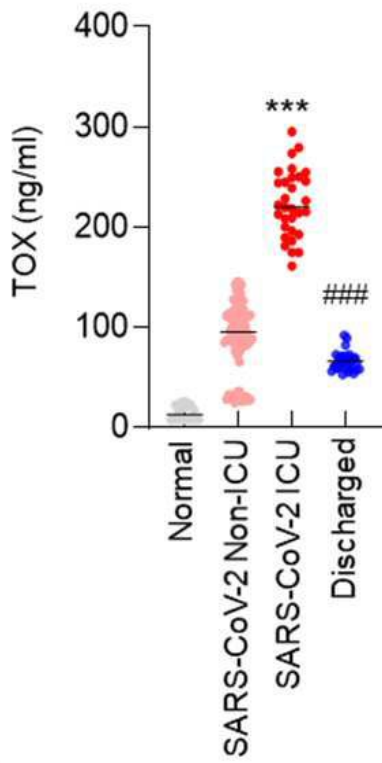
[0137] CLP 수술 후 12 시간, 36 시간 후에 TOX 항체를 2회(100 ng/ml 또는 200 ng/ml) 투여하고, 이후 6 시간 마다 생존율을 관찰하였다. 72 시간째 채혈하여 혈액 내 장기 손상 바이오마커를 확인하였다. 이때, 동시에 폐 조직의 손상을 확인하기 위하여 H&E 염색을 진행하였다.

[0138] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, TOX 항체를 투여한 쥐에서 생존율이 증가(45-55 %)하는 것을 확인할 수 있었다.

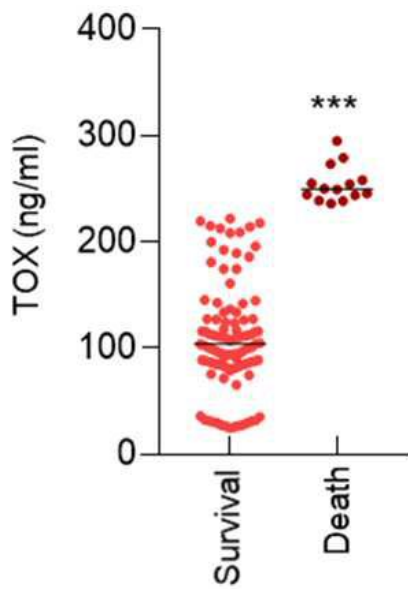
[0139] 이러한 결과는, TOX 단백질이 SARS-CoV-2 감염에 의해 유발된 패혈증을 치료하는데 효능이 있음을 시사한다.

도면

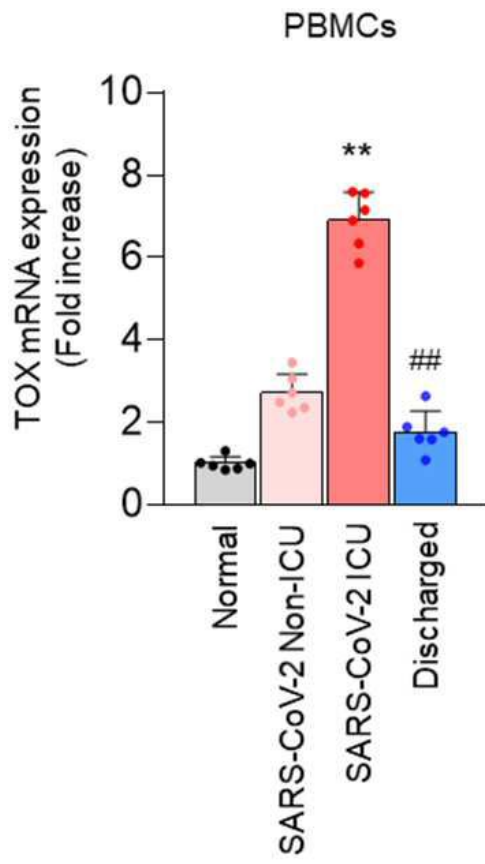
도면1



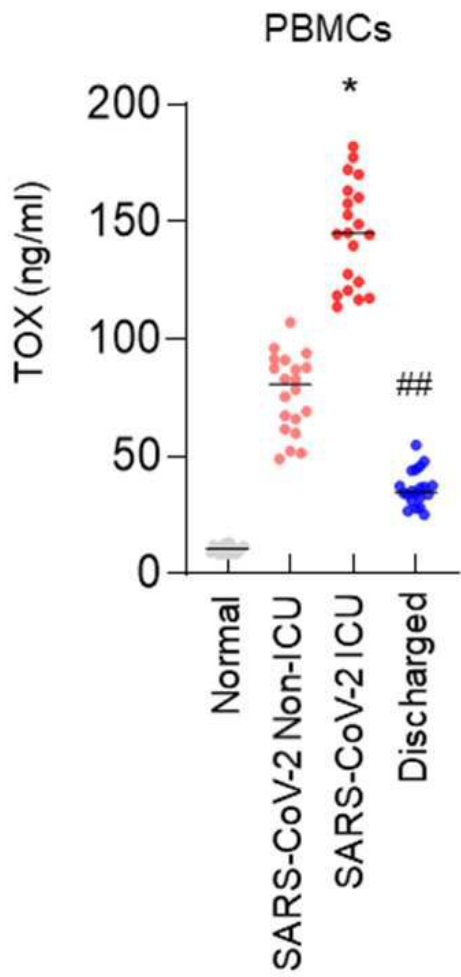
도면2



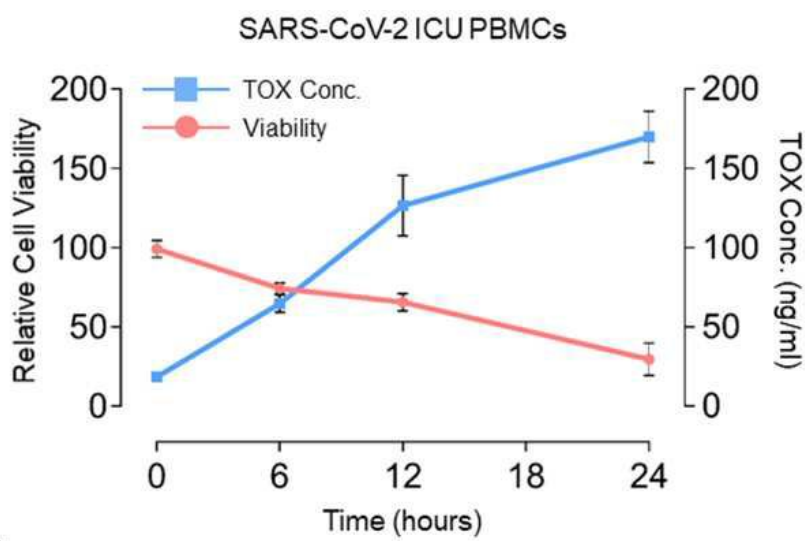
도면3



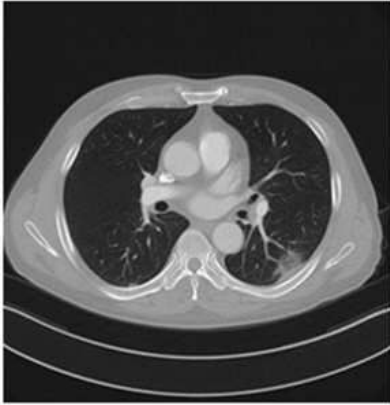
도면4



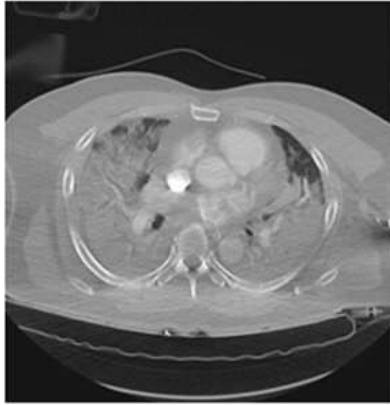
도면5



도면6

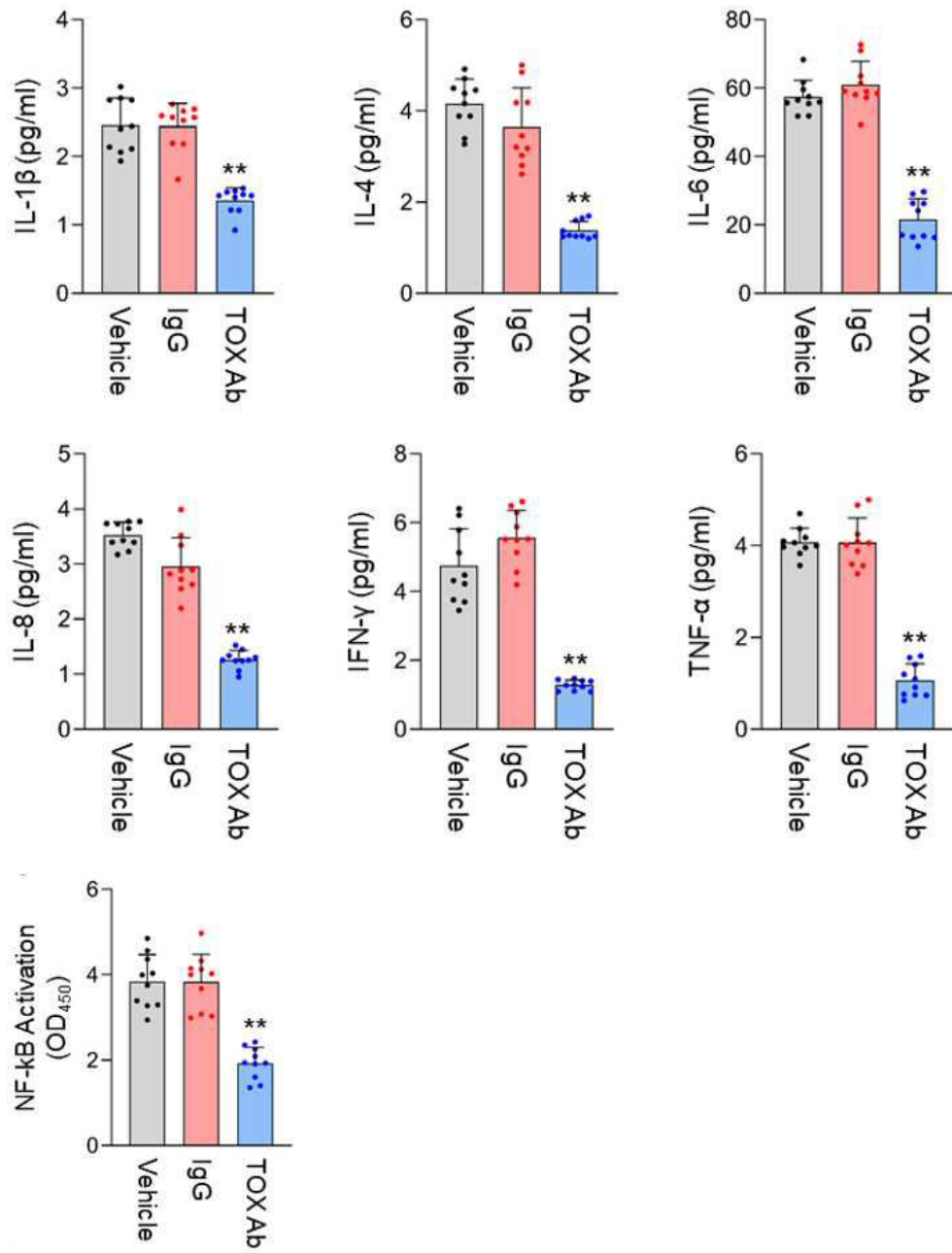


SARS-CoV-2 Non-ICU
Low TOX in plasma

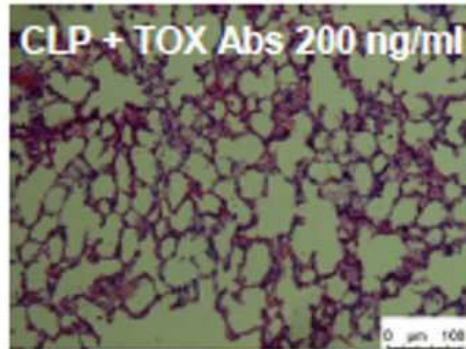
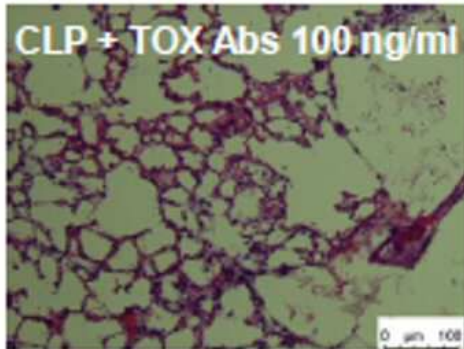
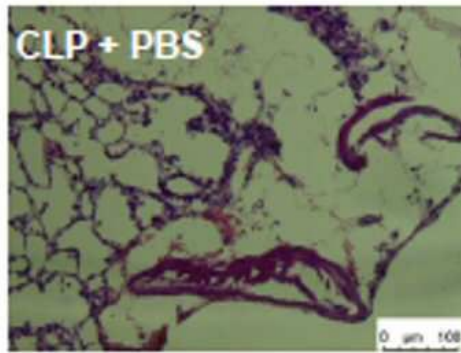
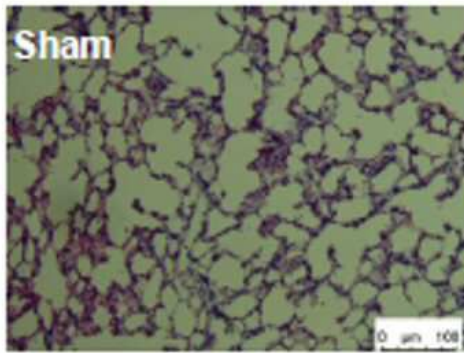
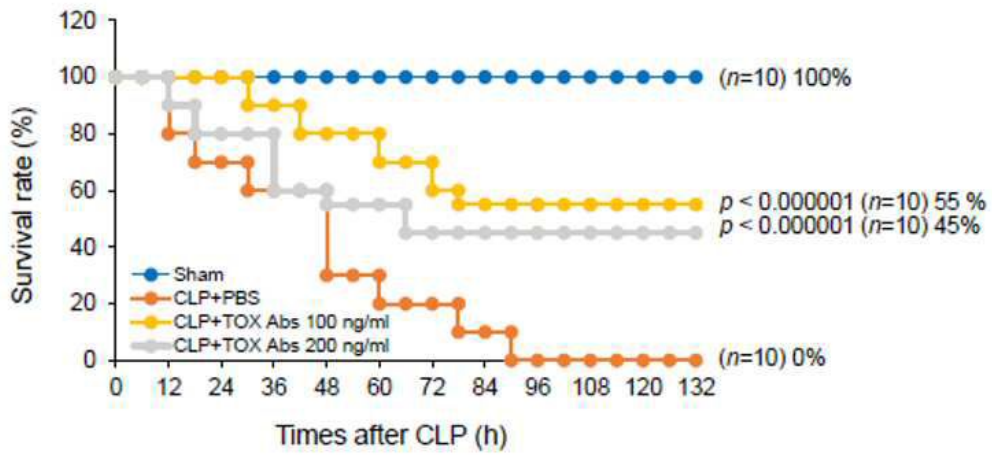


SARS-CoV-2 ICU
High TOX in Plasma

도면7



도면8



서열 목록

- <110> Research and Business Foundation SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY
- <120> Biomarker for diagnosing or predicting prognosis SARS-CoV-2 infectious disease
- <130> PN210564
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1

<211> 526
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TOX(Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box)
 <400> 1
 Met Asp Val Arg Phe Tyr Pro Pro Pro Ala Gln Pro Ala Ala Ala Pro
 1 5 10 15
 Asp Ala Pro Cys Leu Gly Pro Ser Pro Cys Leu Asp Pro Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 Asn Lys Phe Asp Gly Glu Asn Met Tyr Met Ser Met Thr Glu Pro Ser
 35 40 45
 Gln Asp Tyr Val Pro Ala Ser Gln Ser Tyr Pro Gly Pro Ser Leu Glu
 50 55 60
 Ser Glu Asp Phe Asn Ile Pro Pro Ile Thr Pro Pro Ser Leu Pro Asp
 65 70 75 80
 His Ser Leu Val His Leu Asn Glu Val Glu Ser Gly Tyr His Ser Leu
 85 90 95
 Cys His Pro Met Asn His Asn Gly Leu Leu Pro Phe His Pro Gln Asn
 100 105 110
 Met Asp Leu Pro Glu Ile Thr Val Ser Asn Met Leu Gly Gln Asp Gly
 115 120 125
 Thr Leu Leu Ser Asn Ser Ile Ser Val Met Pro Asp Ile Arg Asn Pro
 130 135 140
 Glu Gly Thr Gln Tyr Ser Ser His Pro Gln Met Ala Ala Met Arg Pro
 145 150 155 160
 Arg Gly Gln Pro Ala Asp Ile Arg Gln Gln Pro Gly Met Met Pro His
 165 170 175
 Gly Gln Leu Thr Thr Ile Asn Gln Ser Gln Leu Ser Ala Gln Leu Gly
 180 185 190
 Leu Asn Met Gly Gly Ser Asn Val Pro His Asn Ser Pro Ser Pro Pro
 195 200 205
 Gly Ser Lys Ser Ala Thr Pro Ser Pro Ser Ser Ser Val His Glu Asp

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

225 230 235 240
 Ser Asp Met Gly Lys Lys Pro Lys Thr Pro Lys Lys Lys Lys Lys Lys

245 250 255
 Asp Pro Asn Glu Pro Gln Lys Pro Val Ser Ala Tyr Ala Leu Phe Phe

260 265 270
 Arg Asp Thr Gln Ala Ala Ile Lys Gly Gln Asn Pro Asn Ala Thr Phe

275 280 285
 Gly Glu Val Ser Lys Ile Val Ala Ser Met Trp Asp Gly Leu Gly Glu

290 295 300

Glu Gln Lys Gln Val Tyr Lys Lys Lys Thr Glu Ala Ala Lys Lys Glu

305 310 315 320
 Tyr Leu Lys Gln Leu Ala Ala Tyr Arg Ala Ser Leu Val Ser Lys Ser

325 330 335
 Tyr Ser Glu Pro Val Asp Val Lys Thr Ser Gln Pro Pro Gln Leu Ile

340 345 350
 Asn Ser Lys Pro Ser Val Phe His Gly Pro Ser Gln Ala His Ser Ala

355 360 365
 Leu Tyr Leu Ser Ser His Tyr His Gln Gln Pro Gly Met Asn Pro His

370 375 380
 Leu Thr Ala Met His Pro Ser Leu Pro Arg Asn Ile Ala Pro Lys Pro

385 390 395 400
 Asn Asn Gln Met Pro Val Thr Val Ser Ile Ala Asn Met Ala Val Ser

405 410 415
 Pro Pro Pro Pro Leu Gln Ile Ser Pro Pro Leu His Gln His Leu Asn

420 425 430
 Met Gln Gln His Gln Pro Leu Thr Met Gln Gln Pro Leu Gly Asn Gln

435 440 445
 Leu Pro Met Gln Val Gln Ser Ala Leu His Ser Pro Thr Met Gln Gln

450 455 460

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

 515 520 525
 <210> 2
 <211> 4076
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TOX(Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box) mRNA
 <400> 2
 ctcttcttct taaacaaacc acaaacggat gtgaggaag gaagtggttt cttttactcc 60
 tgagcccaga cacctcactc tgttccgtct aagcttggtt tgctgaacac ttttttttaa 120
 aaaaggaaaa agaaaaggag ttgcttgatg tgagagtga atggacgtaa gattttatec 180
 acctccagcc cagcccccg ctgcgcccga cgctccctgt ctgggacctt ctcctgcct 240

 ggaccctac tattgcaaca agtttgacgg tgagaacatg tatatgagca tgacagagcc 300
 gagccaggac tatgtgccag ccagccagtc ctaccctggt ccaagcctgg aaagtgaaga 360
 cttcaacatt ccaccaatta ctctccttc cctcccagac cactcgctgg tgcacctgaa 420
 tgaagttgag tctggttacc attctctgtg tcaccccatg aaccataatg gcctgctacc 480
 atttcatcca caaaacatgg acctccctga aatcacagtc tccaatatgc tgggccagga 540
 tggaacactg ctttctaatt catttctgt gatgccagat atacgaaacc cagaaggaac 600
 tcagtacagt tccatcctc agatggcagc catgagacca aggggccagc ctgcagacat 660

 caggcagcag ccaggaatga tgccacatgg ccagctgact accattaacc agtcacagct 720
 aagtgtctcaa cttggtttga atatgggagg aagcaatggt cccacaact caccatctcc 780
 acctggaagc aagtctgcaa ctccctcacc atccagttca gtgcatgaag atgaaggcga 840
 tgatacctct aagatcaatg gtggagagaa gcggcctgcc tctgatatgg ggaaaaaacc 900
 aaaaactccc aaaaagaaga agaagaagga tcccaatgag cccagaagc ctgtgtctgc 960
 ctatgcgtta ttctttctgt atactcaggc cgccatcaag ggccaaaatc caaacgctac 1020

ctttggcgaa gtctctaaaa ttgtggcttc aatgtgggac ggtttaggag aagagcaaaa 1080

acaggctctat aaaaagaaaa ccgaggctgc gaagaaggag tacctgaagc aactcgcagc 1140

atacagagcc agccttgtat ccaagagcta cagtgaacct gttgacgtga agacatctca 1200

acctcctcag ctgatcaatt cgaagccgtc ggtgttccat gggcccagcc aggcccactc 1260

ggccctgtac ctaagttccc actatcacca acaaccggga atgaatctc acctaactgc 1320

catgcatect agtctcccca ggaacatagc cccaagccg aataacaaa tgccagtgac 1380

tgtctctata gcaaacatgg ctgtgtcccc tctcctccc ctccagatca gcccgcctct 1440

tcaccagcat ctcaacatgc agcagcacca gccgctcacc atgcagcagc cccttgggaa 1500

ccagctcccc atgcaggfcc agtctgcctt aactcaccc accatgcagc aaggatttac 1560

tcttcaacc gactatcaga ctattatcaa tctacatct acagctgcac aagttgtcac 1620

ccaggcaatg gagtatgtgc gttcgggggtg cagaaatcct ccccacaac cgggtggactg 1680

gaataacgac tactgcagta gtgggggcat gcagaggac aaagcactgt accttacttg 1740

agaatctgaa cacctcttct ttccactgag gaattcaggg aagtgtttc accatggatt 1800

gctttgtaca gtcaaggcag ttctccattt tattagaaaa tacaagttgc taagcactta 1860

ggaccatttg agcttgtggg tcaccactc tggaagaaat agtcatgctt ctttattatt 1920

tttttaatcc tttatggaca ttgtttttct tcttccctga aggaaattg gaccattcag 1980

attttatggt ggttttttgc tgtgaagtgc tgcgctctag taactgcctt agcaactgta 2040

gatgtctcgg ataaaagfcc tggattttcc attggttttc ataatgggtg tttatatgaa 2100

actactaaag actttttaaa tggcttgatg tagcagtcac agcaagtttg taaatagcat 2160

ctatgttaca ctctcctaga gtataaaatg tgaatgtttt tgtagctaaa ttgtaattga 2220

aactggctca ttccagttta ttgatttcac aataggggtt aaattggcaa acattcatat 2280

ttttacttca tttttaaac aactgactga tagttctata ttttcaaat atttgaaat 2340

aaaaagtatt cccaagtgat ttttaattaa aaacaaattg gctttgtctc attgatcaga 2400

caaaaagaaa ctagtattaa gggaagcgca aacacattta ttttgtactg cagaaaaatt 2460

gctttttgt atcacttttt gtgtaatggt tagtaaatgt catttaagtc cttttatgta 2520

taaaactgcc aaatgcttac ctggtatttt attagatgca gaaacagatt ggaacagct 2580

aaattacaac ttttaccatg ggctctgtct tattgtttct tcatactgtg tctgtattta 2640

atcttttttt atggaacctg ttgcccctat ttatgaaata ataatatag gtgtttgtaa 2700

gtaaatgtgt tagtatttga aagaggtttc ttgatgttt taacttttgc tggcaaaaaa 2760

aaattcacgc ttggtgtgaa tactttatta tttagttttt acagtaacat gaataaagcc 2820
 aaacctgctt ttcatttagc agcaaattaa agtaaccagt ccttatttct gcatttcttt 2880
 ggttgatgca aacaaaaaac tattatattt aagaacttta tttcttcata cgacataaca 2940
 gaattgccct ccaagtccaca caagctccaa gactaaacaa acagacaggt cctctgtctt 3000
 aaaaaggtta cttcttggtt ctcagctggt tctagtcaat tctgaaccac caccctccgc 3060
 ccccgcaaa aaagtaaaag tcaaaccaaa cttctcaag ctgcatgctt ttcacaaaat 3120
 ccagaaagca ttaagaatt gaactagggg ctggaagaag tgaaaggaa gcatctaaaa 3180

 atgaaagtg agtaaccaga tagcaaaaga aaagggaaag ccatccaaat ttgaaagctg 3240
 ttgatagaaa ttgagattct tgctgtcttt tgtgcctcta caagctacta ctcattccag 3300
 aattcctggg tctccaaga ggattcttaa ggtaccagag atttgctagg gaaccaaag 3360
 tgcttgagaa tctgcctgag ggcttgcata gctttcacat taaaaaaga aaaagctagc 3420
 agatttactc ctttttaggg gatcatatca agaaagttag tctggttgga aaccaagaga 3480
 atggctgatg tctcttctt ggaatatgtg aaataaattt agcagtttaa ctaaatacaa 3540
 atatatgcat tgtgtaatcc actcagaatt aaacagacaa aaggtatgct tgctttggaa 3600

 tgattttagg cattgtacaa ccttgaatca cttgagcatg taataactaa taaataatgc 3660
 agatccatgt gattattaaa atgactgtag ctgagagctc taatcttctt gtcttgaaac 3720
 tgtataagaa ctcatgtgat taagttcaca gtttattggt tgtctgttta gtattttaga 3780
 aatataccag cactactaat taactaatgt cttttattta ttatattatg ataaagtaaa 3840
 aatttcactt gcattaagtc taaactgaga agtaattac tgggaggaga atgagcagct 3900
 ttgactttga caggcggttt gtgcaggaaa gcacagtgcc gtgttgttta cagcttttct 3960
 agagcagctg tgcgaccagg gtagagagtg ttgaaattca ataccaaata cagtaaaaac 4020

 aaatgtaaat aaaagaaaac acatcatcaa taaaactggtt attatgcgtg accgta 4076