(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0113964
(43) 공개일자 2021년09월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/519 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/519 (2013.01)
A61P 31/12 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2021-0030663
(22) 출원일자 2021년03월09일
심사청구일자 2021년03월09일
(30) 우선권주장
1020200029184 2020년03월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박만성
서울특별시 강남구 삼성로 417, 104동 704호 (대치동, 대치포스코더샵아파트)
배준용
서울특별시 노원구 공릉로34길 62, 1014동 906호 (공릉동, 태강아파트)
이지은
서울특별시 송파구 가락로 187, 5동 105호(송파동, 한양아파트)
(74) 대리인
특허법인 무한

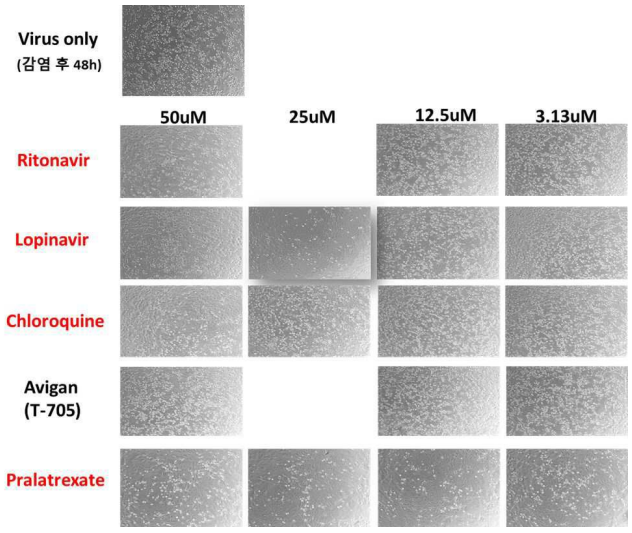
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **프랄라트렉세이트(Pralatrexate)를 유효성분으로 포함하는 항바이러스 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 일 실시예에 따르면, 프랄라트렉세이트(Pralatrexate) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 전구체 및 대사산물로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 항바이러스 조성물이 제공된다.

대 표 도 - 도1



명 세 서

청구범위

청구항 1

프랄라트렉세이트(Pralatrexate) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 전구체 및 대사산물로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 항바이러스 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항바이러스 조성물은 인플루엔자 바이러스, 신종코로나 바이러스 및 이 둘 모두에 대하여 항바이러스 활성을 갖는, 항바이러스 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스는 A/H1N1, A/H3N2 또는 이 둘 모두를 포함하는 것인, 항바이러스 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 신종코로나 바이러스는 SARS-CoV-2인, 항바이러스 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 항바이러스 조성물의 IC 50값은 0.020 μM 이상0.054 μM 이하인, 항바이러스 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 프랄라트렉세이트(Pralatrexate) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 전구체 및 대사산물로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 코로나바이러스(coronavirus)는 외피가 있는 비분절 양성가닥 RNA 바이러스(non-segmented positive-sense RNA virus)로 사람에서 호흡기 감염을 일으키는 주요 감염체 중 하나이다. 코로나바이러스는 낙타, 고양이, 박쥐를 포함하는 여러 종(species)의 포유류에 흔히 감염되는 바이러스로 드물게 동물 코로나바이러스가 인간을 감염시키기도 한다. 인간 코로나바이러스(human coronavirus, HCoV)는 건강한 사람에서는 '감기(common cold)'와 같은 경증의 감염을 유발하여 그리 중대 히 여겨지던 병원체로 여겨지지는 않았다. 그러나 21세기 들어 2종의 전염성이 강한 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(severe acuterespiratory syndrome-associated

coronavirus, SARS-CoV), 중동호흡기증후 군 코로나바이러스(middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)가 동물 숙주로부터 출현하여 사람 간 전파로 세계적 유행을 일으킨 바 있다.

[0004] 2019년 12월 중국 후베이성 우한시에서 최초로 동물-사람 간 전파(zoonotic transmission)를 통해 집단 폐렴이 유발된 이후, 현재 중국 국경을 넘어 전 세계에 신종 코로나바이러스(2019-nCoV) 감염증이 급속도로 전파되고 있다. 신종 코로나바이러스 (novel coronavirus, 2019-nCoV)는 메르스 코로나바이러스(MERS-CoV), 사스 코로나바이러스(SARS-CoV)와 마찬가지로 베타 코로나바이러스 (betacoronavirus)에 속하며, 자연숙주로서 박쥐에서 기원한 것으로 보고 있다.

[0005] 아직 신종 코로나바이러스에 특이적인 치료법이나, 감염 억제를 위해 사용할 수 있는 특이적인 항바이러스제는 없으며, 백신도 아직 없다. 전파속도로 볼 때 백신 개발 전에 치료제의 개발이 필요하며, 현재 후보 백신에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 신종 코로나바이러스 환자의 치료는 일차적으로 지지적 치료(supportive treatment)를 시행하며, 입원 시 엄 격한 격리와 예방조치를 시행한다. 에볼라바이러스 감염 치료제인 렘데시비르(remdesivir), HIV 감염 치료제인 로피나비어/리토나비어(lopinavir/ritonavir), 그리고 베타-인터페론(beta-interferon)과 같은 항바이러스제는 인-비트로(in vitro) 및 MERS-CoV의 마우스 모델 상에서는 활성을 보였으나, 임상 사용은 매우 제한적인 상황이다. 현재 2019-nCoV 감염 치료제로 국내 1번 확진자의 증례와 같이 항바이러스제 로피나비어/리토나비어 조합을 포함한 약물을 사용한 사례들이 제시되고 있으며, 최근 단백질 유전체에 근거한 분자모델링을 통해 2019-nCoV 바이러스의 폐 세포 감염 과정을 막을 수 있는 약물로 바리시티닙(baricitinib)을 제시한 논문이 발표된 바 있다(약학정보원 학술정보센터, 신종코로나바이러스의 이해, 2020).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 기존 승인 약물 중 신종 코로나바이러스에 대한 항바이러스 활성을 나타내는 물질을 스크리닝하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 프랄라트렉세이트(Pralatrexate) 프랄라트렉세이트(Pralatrexate) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 전구체 및 대사산물로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 항바이러스 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 프랄라트렉세이트(Pralatrexate) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 전구체 및 대사산물로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 항바이러스 조성물이 제공된다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 항바이러스 조성물의 유효성분인 프랄라트렉세이트 (Pralatrexate)는 신종코로나바이러스(SARS-CoV-2)의 유전자 복제를 현저히 감소시킴으로써 신종코로나바이러스(SARS-CoV-2)에 대해 뛰어난 항바이러스 효과를 나타낸다.

[0014] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 리토나비어(Ritonavir), 로피나비어(Lopinavir), 클로로퀸(Chloroquine), 파비피라비어(Favipiravir, Avigan), 프랄라트렉세이트(Pralatrexate)의 세포병변 효과 기반 분석(Cytopathic effect-based assay) 결과를 나타낸다.

도 2는 리토나비어(Ritonavir), 로피나비어(Lopinavir), 클로로퀸(Chloroquine), 프랄라트렉세이트(Pralatrexate)를 처리한 그룹과 약물을 처리하지 않은 그룹에서 관찰되는 플라크 개수를 비교한 플라크 감소 분석(Plaque reduction assay) 결과를 나타낸다.

도 3은 SARS-CoV-2를 10배로 단계 희석하여 프라이머 및 프로브 세트에 대해 도출한 표준 곡선(standard curve)을 나타낸다.

도 4는 세포에 SARS-CoV-2를 감염시키고 24시간, 48시간 경과 후 리토나비어(Ritonavir), 로피나비어(Lopinavir), 클로로퀸(Chloroquine), 프랄라트렉세이트(Pralatrexate)를 50μM, 12.5μM, 3.13μM로 각각 처리한 다음 qRT-PCR의 Ct 값을 비교한 것이다.

도 5는 세포에 SARS-CoV-2를 감염시키고 24시간, 48시간 경과 후 리토나비어(Ritonavir), 로피나비어(Lopinavir), 클로로퀸(Chloroquine), 프랄라트렉세이트(Pralatrexate)를 처리한 경우의 바이러스 역가(Virus titer)와 fold change 값을 비교한 것이다.

도 6은 MDCK 세포에서 프랄라트렉세이트(Pralatrexate)와 오셀타미비르에 대한 인플루엔자 바이러스 항바이러스 활성 실험 결과이다.

도 7a는 베로(Vero)세포에서의 0.78μM 내지 100μM 프랄라트렉세이트 처리한 IC50값에 대한 결과이다.

도 7b는 베로(Vero)세포에서의 0.025μM 내지 0.1μM 프랄라트렉세이트 처리한 IC50값에 대한 결과이다.

도 8a, b는 같은 농도에서 칼루-3(Calu-3)세포에서의 SARS-CoV-2 에 대한 프랄라트렉세이트 효과에 대한 결과이다.

도 8c, d는 같은 감염역가 (MOI)의 칼루-3(Calu-3) 세포에서 SARS-CoV-2 복제 동역학에 대한 프랄라트렉세이트의 항 바이러스 효과에 대한 결과이다.

도9는 프랄라트렉세이트 유효 성분 조성물의 약물첨가시간(time of drug addition, hpi) 평가 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0018] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0019] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0021] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 프랄라트렉세이트(Pralatrexate) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 전구체 및 대사산물로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 항바이러스

조성물이 제공된다.

[0023] 상기 조성물은, 신종코로나바이러스(SARS-CoV-2)에 대한 항바이러스 조성물일 수 있다.

[0024] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 베로(Vero) 세포, 칼루-3(Calu-3)세포, MDCK 세포 및 바이러스의 준비

[0027] 베로(Vero) 세포, 칼루-3(Calu-3)세포, MDCK 세포는 한국 셀라인은행에서 구입하였고, 질병관리본부(KDCA)로부터 A/Korea/01/2009 (2009 유행성 인플루엔자 변형, H1N1 아형), SARS-CoV-2 (BetaCoV/korea/KCDC03/2020, NCCP no. 43326)를 제공하였고, 그 밖에 A/Perth/16/2009(H3N2 아형), B/Bisbane/60/2008(빅토리아 계통), B/Wisconsin/01/2010(야마가타 계통) 등 계절성 인플루엔자 바이러스는 플라크 방법으로 순수 분리하여 사용하였다.

[0028] 모든 바이러스의 유전자 정보는 사용 전 상업적 시퀀싱을 통해 확인하였다.

[0030] 실시예 1. 세포 병변 효과(CPE) 분석을 이용한 항바이러스 효능 평가

[0031] Vero세포(2×10^4/well)를 질병관리본부로부터 분양 받은 신종코로나바이러스(nCoV/Korea/KCDC03/2020_Vero P1 72H)를 감염 역가 MOI 0.1 (2×10^3 PFU/100ul)로 하여 감염시켰다. 약물을 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하고, 상기 세포에 리토나비어(Ritonavir), 로피나비어(Lopinavir), 클로로퀸(Chloroquine), 파비피라비어(Favipiravir, Avigan), 프랄라트렉세이트(Pralatrexate)를 각각 50uM, 25uM, 12.5uM, 3.13uM의 농도로 처리하여 24시간 단위로 세포 병변 효과가 얼마나 억제되는지 분석하였다.

[0032] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 프랄라트렉세이트(Pralatrexate)를 처리한 세포에서 가장 적은 세포 병변이 관찰되었다.

[0034] 실시예 2. 플라크 분석(Plaque assay)

[0035] SARS-CoV-2의 감염성 바이러스 역가를 결정하기 위해 플라크 분석을 수행하였다.

[0036] 대상 세포에, 신종코로나바이러스에 1시간 동안 감염시킨 후, 접종물을 버리고 세포를 2 % 아가로스를 함유하는 세포배양배지(DMEM-F12)로 덮었다. 그 후, 37 ℃ 5 % 이산화탄소(CO_2)조건에서 72 시간 후, 세포를 크리스탈 바이올렛 (Georgia Chemicals Inc., Norcross, GA, USA)으로 염색하였다.

[0038] 실시예 2-1. 베로 세포(Vero cell) 플라크 감소 분석을 이용한 항바이러스 효능 평가

[0039] 베로 세포(Vero) 2×10^4/웰(well)을 질병관리본부로부터 분양 받은 신종코로나바이러스(nCoV/Korea/KCDC03/2020_Vero P1 72H)를 감염 역가 MOI 0.1 (2×10^3 PFU/100ul)로 하여 감염시켰다. 약물을 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하고, 상기 세포에 리토나비어(Ritonavir), 로피나비어(Lopinavir), 클로로퀸(Chloroquine), 프랄라트렉세이트(Pralatrexate)를 각각 50uM, 12.5uM, 3.13uM의 농도로 처리하여 플라크 형성 감소 정도를 비교하였다.

[0040] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 프랄라트렉세이트(Pralatrexate)와 클로로퀸(Chloroquine)에서 플라크 감소 효과가 우수한 것으로 확인되었고, 프랄라트렉세이트(Pralatrexate)는 클로로퀸(Chloroquine)과 달리, 낮은 농도에서도 플라크 형성 효과가 뛰어난 것으로 나타났다.

[0042] 실시예 2-2. MDCK 세포에서 플라크 감소 평가

[0043] 상기 실시예 2-1의 베로(vero) 세포에서의 플라크 감소 활성을 통한 항바이러스 활성을 구체적으로 뒷받침하기

위하여 추가 실험을 진행하였다.

[0044] 두번째로 **MDCK 세포**의 합류 단층(confluent monolayer)에 인플루엔자 바이러스를 10^2 pfu 접종하였다. 인플루엔자 바이러스를 1시간 동안 감염시킨 후, 접종물을 버리고 세포를 2 % 아가 로스 및 연속적으로 2 배 희석한 프랄라트렉세이트를 함유하는 세포배양배지(DMEM-F12)로 덮었다. 그 후, 37 ℃ 5 % 이산화탄소(CO_2)조건에서 72 시간 후, 세포를 크리스탈 바이올렛 (Georgia Chemicals Inc., Norcross, GA, USA)으로 염색하였다.

[0045] 오셀타미비르 카복실레이트를 대조군으로 실험하였다.

[0046] 그 결과, 하기의 표1 및 도6에서처럼 프랄라트렉세이트는 오셀타미비르 카복실레이트처럼 인플루엔자 바이러스에 대한 플라크 감소가 이루어져 인플루엔자 바이러스 항바이러스 활성을 가지는 것을 확인하였다.

[0047] 특히, 도6을 참조할 때, MDCK세포에서의 인플루엔자 바이러스 아형에 대한 항바이러스 활성이 있는 것을 확인할 수 있다.

표 1

[0049] 계절성 인플루엔자 바이러스에 대한 프랄라트렉세이트 IC50 값 (IC50 values (μM) against seasonal influenza viruses)

	바이러스			
Chemical	A/H1N1	A/H3N2	B/Victoria	B/Yamagata
프랄라트렉세이트	0.068	0.379	0.009	0.042
오셀타미비르	85.01	453.7	7.126	0.527

[0051] 실시예 3. 실시간 RT-PCR 기반 바이러스 억제 효능 평가

[0052] 베로(Vero) 세포 (2×10^4/well)에, SARS-CoV/Korea/KNIH/2020_Vero P1 72H을 감염 역가 MOI 0.1 (2×10^3 PFU/100ul)로 하여 감염시키고, 감염된 세포에 리토나비어(Ritonavir), 로피나비어(Lopinavir), 클로로퀸(Chloroquine), 프랄라트렉세이트(Pralatrexate)를 처리한 다음 24시간, 48시간 경과한 후 qRT-PCR을 수행하였다. qRT-PCR을 통해 도출된 Ct 값, 바이러스 역가, 폴드체인지(Fold Changes) 값을 통해 각 물질의 바이러스 억제 효능을 평가하였다.

[0053] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 4종의 화합물 중 프랄라트렉세이트(Pralatrexate)에서 감염 후 24시간이 경과하였을 때 모든 농도에서 약 99%의 유전자 복제 감소율을 나타냈고, 48시간이 경과하였을 때에도 저농(3.13uM) 에서 약 98%의 RNA level 감소가 확인되었다.

[0055] 실시예 4. 실시간 RT-PCR 기반 저해 농도(Inhibitory Concentration 50, IC50) 값 평가

[0056] 12-웰 플레이트(well plate) (SPL Life Sciences, 포천, 대한민국)에 0.9 x 10^6 cells / 웰 베로(vero) 세포 또는 1 x 10^6 cells /웰 칼루-3(Calu-3)세포를 미리 시딩(seeding)하였다.

[0057] 24 시간 후, 세포를 인산완충생리식염수(PBS)로 1 회 세척하고, 베로 세포(Vero) 또는 칼루-3(Calu-3)세포에 대해 각각 0.01 또는 0.1 MOI로 SARS-CoV-2를 감염시켰다.

[0058] 37 ℃ 5 % 이산화탄소(CO_2)에서 1 시간 배양 후, 접종 물을 버리고 세포를 인산완충생리식염수 (PBS)로 1 회 세척하였다.

[0059] 그 후, 세포는 본 발명에 따른 프랄라트렉세이트를 유효성분으로 포함하는 항바이러스 조성물의 두 배 되는 희석액으로 처리하였다.

[0060] 24 시간(time of drug addition, hpi) 및 48 시간(hpi)에서 세포 상층 액에서 추출된 바이러스 RNA를 qRT-PCR로 정량화하였다(맥스웰 RSV 바이러스 총 핵산 정제 키트 (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 RNA 추

출을 위해 130μl 세포 상청액을 수확).

[0061] SARS-CoV-2 RdRp 영역은 정방향 (5'- GTGARATGGTCATGTGTGGCGG) 및 역방향 (5'- CARATGTTAAASACACTATTAGCATA) 프라이머 및 프로브 (5'-FAM- CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC - BHQI)를 사용하여 증폭시켰다 (Corman et al., 2020).

[0062] IC50 값은, GraphPad Prism 9 (GraphPad)를 사용하여 계산하였으며, RdRp 영역을 대상으로 하는 정량적 실시간 RT-PCR에서 SARS-CoV-2의 알려진 바이러스 역가 (10^0-10^6 플라크 형성 단위)에 해당하는 주기 임계 값 (CT 값)을 기반으로 표준 곡선을 생성하였다.

[0063] 그 결과, 하기 표1 및 도 7a에서, 0.78 μM 내지 100 μM 프랄라트렉세이트 처리된 베로 세포에서의 IC50값은 양쪽이 동일 프랄라트렉세이트 농도로 평가된 것을 확인하였고, 도 7b에서 SARS-CoV-2의 복제역학에 대한 프랄라트렉세이트(0.025 μM, 0.05 μM, 0.1μM)의 항바이러스 효과 있음을 세포배양배지 치료로 평가 확인하였다.

[0064] 또한, 하기 도 8a, b 는 칼루-3(Calu-3)세포에서의 SARS-CoV-2 에 대한 프랄라트렉세이트 효과에 대한 것이다. 같은 농도의 프랄라트렉세이트 또는 하이드록시클로로퀸(hydroxychloroquine)에 대해 세포독성을 평가하였으며, 도 8c, d는 칼루-3(Calu-3)세포에서 SARS-CoV-2의 복제 동역학에 대한 프랄라트렉세이트 또는 하이드록시클로로퀸(hydroxychloroquine) (1.56uM 내지 50uM)의 항 바이러스 효과를 평가했다.

[0065] 실시예 4, 도7 및 도8을 종합하여 볼 때, 본 발명에 따른 프랄라트렉세이트를 유효성분으로 포함하는 항바이러스 조성물은 베로 세포에서 0.028 uM 이하의 IC 50값을 가질 때 항바이러스 활성을 가지며, 칼루-3(Calu-3)세포에서 0.054 uM 이하의 IC 50값을 가질 때 항바이러스 활성을 가지는 것을 보여, 대조군으로 사용한 하이드로클로로퀸에 비해 IC 50값이 현저히 낮은 것을 확인하였다.

[0067] 실시예 5. 세포 생존 가능성 실험

[0068] 본 발명에 따른 프랄라트렉세이트를 유효성분으로 포함하는 항바이러스 조성물의 세포독성을 실험하기 위해, 세포확산 시약 (WST-1)을 사용하여 측정하였다.

[0069] 세포는 96 웰의 평탄한 TC 처리 배양 마이크로플레이트(Thermo Fisher Scientific)에서 2 x 10^4 cells/well(베로세포) 또는 7 x 10^5 cells/well(칼루-3 세포(Calu-3))의 밀도로 씨딩되었고 37 ºC, 5% CO_2에서 세포배양배지(DMM)으로 배양되었다.

[0070] 다음날 2%의 인산완충생리식염수 (FBS) 세포배양매체를 버리고 인산완충생리식염수(PBS)로 한 번 세척하였다. 그리고 나서, 본 발명에 따른 프랄라트렉세이트를 유효성분으로 포함하는 항바이러스 조성물의 두 배 되는 연쇄적인 희석액을 각각의 웰에 추가하였다.

[0071] 다이메틸 설폭사이드(DMSO)를 대조군으로 사용하였고, 바이러스 감염 후 24시간(hpi)과 48시간(hpi)에서 각 웰에 10μl 세포확산 시약 (WST-1)을 추가하고, 이어서 37 É에서 2시간 배양, 5 % 이산화탄소(CO_2)를 수행하였다.

[0072] 그 후, 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 세포 생존 가능성을 결정했다. 50% 세포독성 농도(CC50)는 그래프패드 프리즘 9(GraphPad)를 사용하여 계산하였다.

[0073] 그 결과, 하기의 표2에서, 본 발명에 따른 프랄라트렉세이트를 유효성분으로 포함하는 항바이러스 조성물은 베로 세포(vero cell)에서 0.028 uM 이하의 IC 50값을 가질 때 항바이러스 활성을 가지며, 칼루-3(Calu-3) 세포에서 0.054 uM 이하의 IC 50값을 가질 때 항바이러스 활성을 가지는 것을 보여, 대조군으로 사용한 하이드로클로로퀸에 비해 IC 50값이 현저히 낮은 것을 확인하였다.

표 2

[0075] 신종코로나바이러스에 대한 프랄라트렉세이트 항바이러스 활성 및 세포 독성 프로파일(Antiviral and cytotoxic profiles of pralatrexate against SARS-CoV-2 in cells)

Chemical	대상세포	시간 (hpi)	IC_{50} (μM)	[a] CC_{50} (μM)	[b] SI value
프랄라트렉세이트	베로(Vero)	24	0.020	> 100	> 5,000
프랄라트렉세이트	베로(Vero)	48	0.028	> 100	> 3,571
프랄라트렉세이트	칼루-3 (Calu-3)	48	0.054	> 100	> 1,851
하이드록시클로로퀸	칼루-3 (Calu-3)	48	107.8	> 100	0.93

[0076] cf) 세포독성 억제 농도값([a]CC50, 50% cytotoxic concentration)

[0077] 선택적 지수 값([b] SI, selective index)

[0079] 실시예 6. 조성물의 약물첨가시간(time of drug addition, hpi) 평가

[0080] SARS-CoV-2의 복제 동역학에 대한 프랄라트렉세이트 (12.5 uM)의 첨가 시간 효과를 칼루-3(Calu-3) 세포에서 평가하였다.

[0081] MOI 0.1로 감염 후, 각 표시된 시점에서 프랄라트렉세이트를 세포 상청액에 첨가하였다. 세포 상청액은 첨가 시간으로부터 48 시간 후 수집되었고, Vero 세포에서 플라크 분석에 의한 바이러스 역가 측정에 사용하였다.

[0082] 그 결과, 하기의 도 9와 같이 1 시간(hpi) 이후부터 항바이러스 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 48시간(hpi) 미만, 바람직하게는 37시간(hpi) 이하까지 SARS-CoV-2의 복제 동역학에 대한 항바이러스 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[0084] 종합적으로 볼 때, 프랄라트렉세이트는 처음에는 계절성 인플루엔자 바이러스에 효과적인 오셀타미비르 유사 후보 약물이었으나, 4 가지 인플루엔자 바이러스에 대한 프랄라트렉세이트의 50 % 억제 농도 (IC50)는 오셀타미비르보다 훨씬 낮았으며, 특히 A/H1N1 및 A/H3N2 아형에 대한 프랄라트렉세이트는 훨씬 더 나은 효능을 나타내는 것으로 나타났다(표1).

[0085] 신종코로나바이러스에 대한 효과 분석을 위해, SARS-CoV-2에 대한 세포 기반 분석을 사용하여 프랄라트렉세이트를 조사했다. 베로 세포에서 프랄라트렉세이트는 바이러스 RNA 합성을 방해하는 것으로 나타났다(도7).

[0086] 또한 더 높은 농도에서 프랄라트렉세이트는 약간의 세포 독성을 보였지만, 24 시간(hpi)에서 세포 독성없이 0.1 uM 미만으로 SARS-CoV-2의 바이러스 RNA 복제를 감소시켰다. 48 시간(hpi)에서 프랄라트렉세이트는 여전히 SARS-CoV-2에 대한 효능을 보였으며 IC50 값은 0.020 uM 내지 0.028 uM 로 측정되었고 (도7a 및 표 2), 프랄라트렉세이트는 SARS-CoV-2의 복제를 효과적으로 억제했다 (도7b).

[0087] 베로 세포(Vero)에서 0.1 uM 프랄라트렉세이트는 통계적 유의성 (**, P <0.01 및 ***, P <0.001)으로 24 시간(hpi)에서 거의 2 개 로그 척도로 바이러스 복제를 감소시켰으며, 48 시간(hpi)에서도 여전히 바이러스 복제를 억제할 수 있었으나, 72 시간(hpi)에서 감소하는 것으로 나타났다(도7b).

[0088] 실시예5에서 대조군인 하이드록시클로로퀸과 비교하여 인간 폐 상피 칼루-3(Calu-3) 세포에서 프랄라트렉세이트의 항-SARS-CoV-2 효능을 평가한 결과, 두 약물 모두 칼루-3(Calu-3) 세포에서 세포 독성을 나타내지 않았다.

[0089] 그러나, 프랄라트렉세이트만이 SARS-CoV-2의 RNA 합성을 성공적으로 억제 한 반면 하이드록시클로로퀸은 효능을 나타내지 않았다 (도 8a 및 b).

[0090] 이러한 결과를 고려할 때, 프랄라트렉세이트와 하이드록시클로로퀸의 IC50 값은 각각 0.054 uM 및 107.8 uM으로 결정되고, 프랄라트렉세이트의 선택적 지수 (SI) 값은 하이드록시클로로퀸보다 1,800 배 이상 높은 것을 확인할 수 있었다 (표 2).

[0091] SARS-CoV-2의 복제에 대한 프랄라트렉세이트의 효과는 칼루-3(Calu-3) 세포에서도 조사되었고(도8d), 하이드록시클로로퀸과 비교할 때, 48 시간(hpi) 및 72시간(hpi)에서 SARS-CoV-2 복제에 대해 P <0.001 값을 가지며, 유의하게 더 높은 억제 효과를 나타낸 것을 확인하였다(도8c)

[0092] 실시예 6에 따른 약물첨가시간에서 감염 후 세포 상청액에 첨가될 때, 프 랄라트렉세이트는 시간 의존적 방식으로 항-SARS-CoV-2 효능을 나타냈다.

[0093] 9시간(hpi) 이전에 처리하면 인산완충생리식염수(PBS) 처리 대조군의 바이러스 복제 역가에 비해 거의 90 %로 바이러스 복제를 억제할 수 있으며, 11시간(hpi) 또는 13시간(hpi) 처리에서도 프랄라트렉세이트는 도9에서 확인한 바와 같이 SARS-CoV-2의 복제를 억제할 수 있다.

[0094] 신종코로나바이러스의 치료적 측면에서, 24시간(hpi) 내지 48시간(hpi) 사이의 세포 독성 변화 (도 7a)와 24시간(hpi) 내지 48시간(hpi) 사이의 바이러스 복제에 대한 억제 효과 (도 7b)를 고려할 때, 프랄라트렉세이트를 SARS-CoV-2의 감염 초기 단계에 투여하면 바이러스 감염 증상을 억제하는데 도움이 될 수 있을 것이다.

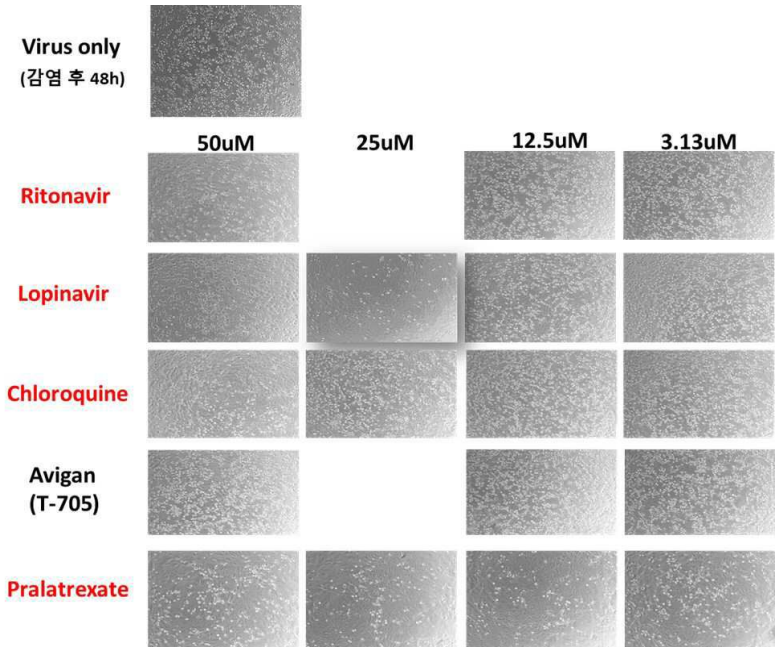
[0095] 실시예 6에 따른 약물첨가시간 분석 결과도 이 제안을 뒷받침할 수 있다 (도9).

[0097] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

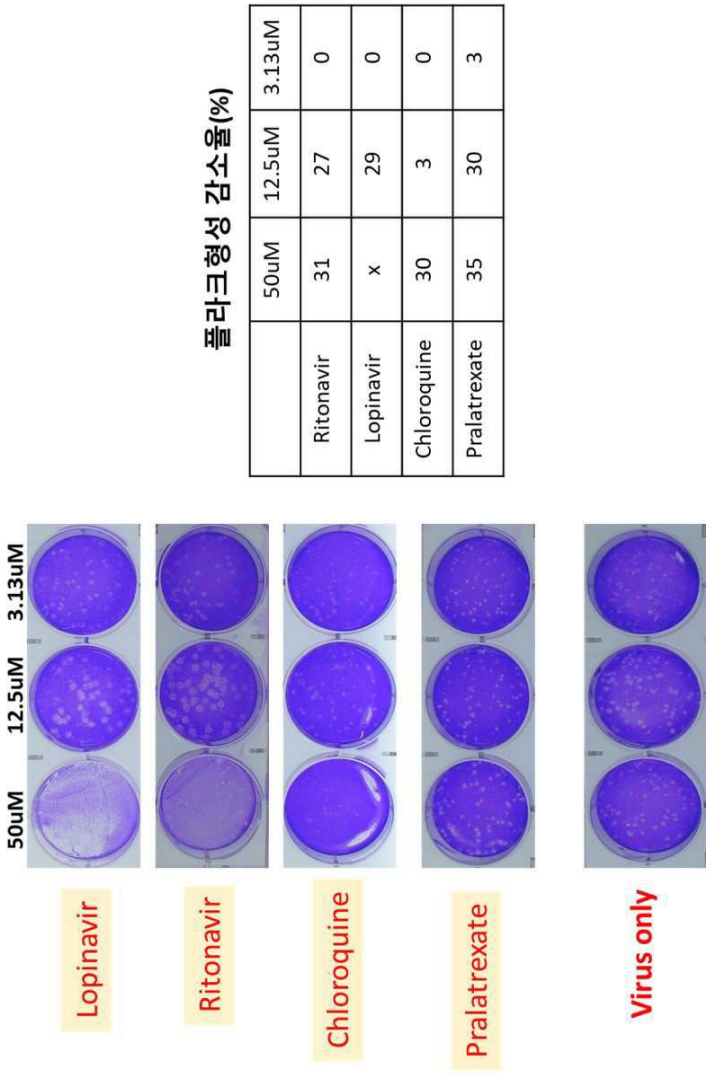
[0098] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

도면1



도면2

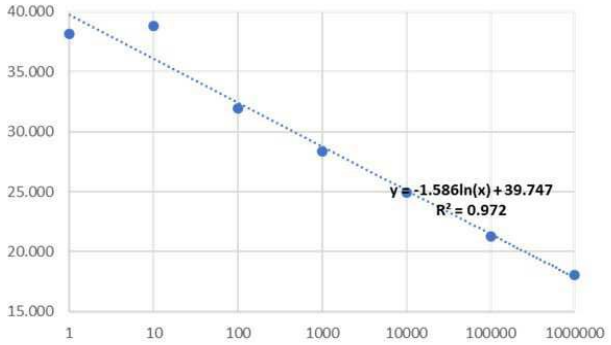


플라크형성 감소율(%)

	50uM	12.5uM	3.13uM
Ritonavir	31	27	0
Lopinavir	x	29	0
Chloroquine	30	3	0
Pralatrexate	35	30	3

<qRT-PCR을 통한 표준곡선 분석>

Log_{10}(PFU)	No.	CT	Ct Mean	Ct SD
SARS-CoV-2 1X10^{6}	#1	15.625	15.418	0.294
	#2	15.210		
SARS-CoV-2 1X10^{5}	#1	18.135	18.055	0.114
	#2	17.974		
SARS-CoV-2 1X10^{4}	#1	21.134	21.285	0.214
	#2	21.436		
SARS-CoV-2 1X10^{3}	#1	24.932	24.966	0.048
	#2	25.000		
SARS-CoV-2 1X10^{2}	#1	28.162	28.344	0.258
	#2	28.527		
SARS-CoV-2 1X10^{1}	#1	31.705	31.919	0.302
	#2	32.132		
SARS-CoV-2 1X10^{0}	#1	37.039	38.841	2.547
	#2	40.642		
SARS-CoV-2 1X10^{-1}	#1	37.927	38.122	0.276
	#2	38.317		



공개특허 10-2021-0113964

도면4

24h

Control	Target gene	Ct Mean	Ct SD
PBS	RdRp	Undetermined	
P.C	RdRp	17.058	0.0975

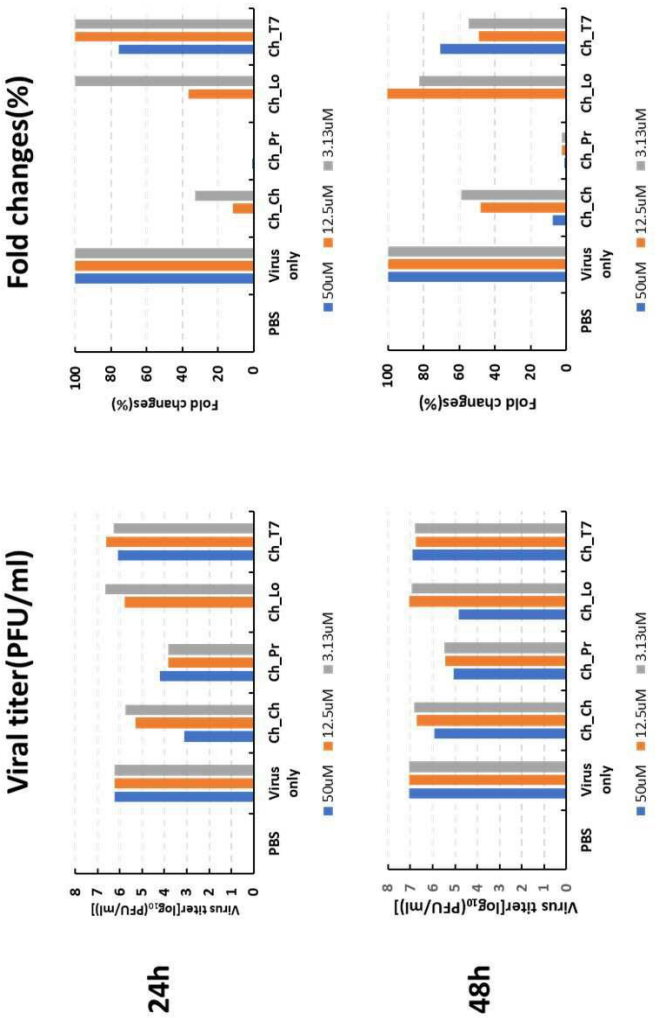
	Sample Name	Target Name	50uM		12.5uM		3.13uM	
			Ct Mean	Ct SD	Ct Mean	Ct SD	Ct Mean	Ct SD
1	Ch	RdRp	28.355	1.251	20.443	0.014	18.816	0.036
2	Pr	RdRp	24.36	0.48	25.726	0.27	25.828	0.497
3	Lo	RdRp	cell cytotoxicity		18.658	0.181	15.436	0.07
4	T7	RdRp	17.506	0.215	15.663	0.102	16.922	0.154

48h

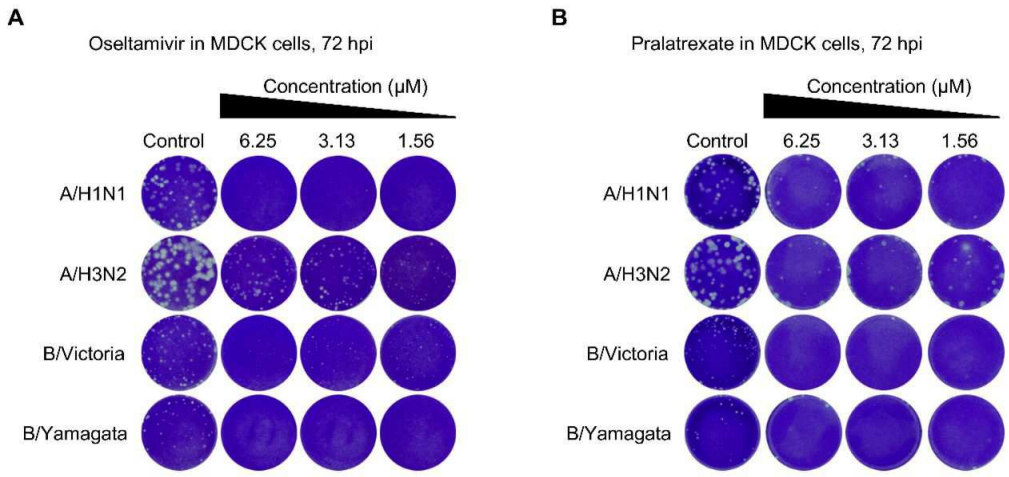
Control	Target gene	Ct Mean	Ct SD
PBS	RdRp	Undetermined	
P.C	RdRp	14.040	0.144

	Sample Name	Target Name	50uM		12.5uM		3.13uM	
			Ct Mean	Ct SD	Ct Mean	Ct SD	Ct Mean	Ct SD
1	Ch	RdRp	18.085	0.064	15.356	0.219	14.874	0.188
2	Pr	RdRp	21.287	0.304	19.847	0.029	19.713	0.120
3	Lo	RdRp	cell cytotoxicity		14.036	0.169	14.348	0.189
4	T7	RdRp	14.588	0.326	15.164	0.115	14.993	0.135

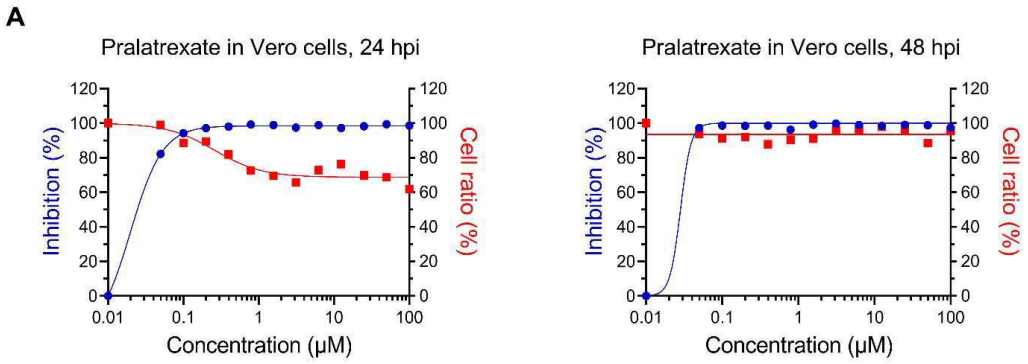
도면5


Fold changes(%)
Viral titer(PFU/ml)
24h
48h
PBS
Virus only
Ch_Ch
Ch_Pr
Ch_Lo
Ch_T7
50uM
12.5uM
3.13uM

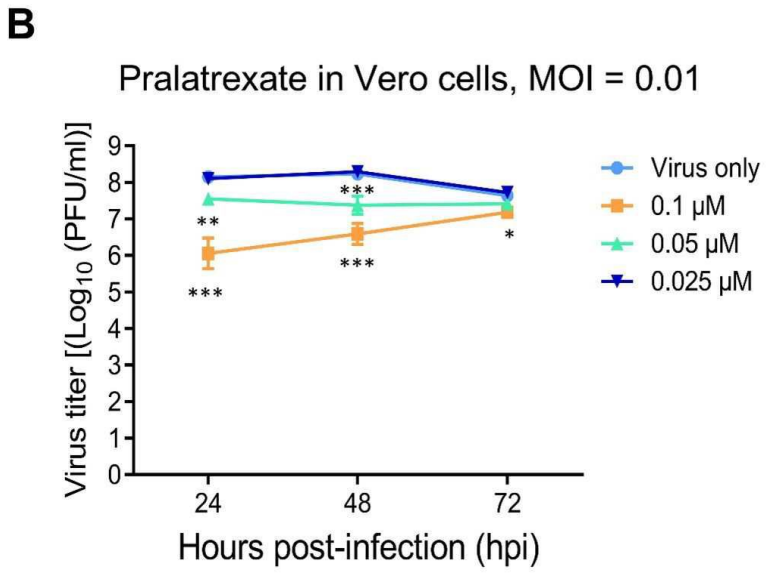
도면6


A
Oseltamivir in MDCK cells, 72 hpi
Concentration (μM)
Control
6.25
3.13
1.56
A/H1N1
A/H3N2
B/Victoria
B/Yamagata
B
Pralatrexate in MDCK cells, 72 hpi
Concentration (μM)
Control
6.25
3.13
1.56
A/H1N1
A/H3N2
B/Victoria
B/Yamagata

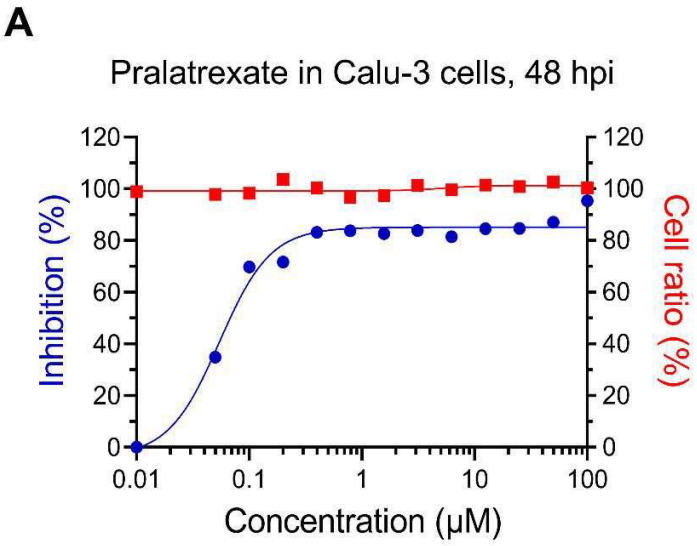
도면7a


A
Pralatrexate in Vero cells, 24 hpi
Pralatrexate in Vero cells, 48 hpi
Inhibition (%)
Cell ratio (%)
Concentration (μM)
0.01
0.1
1
10
100
0
20
40
60
80
100
120

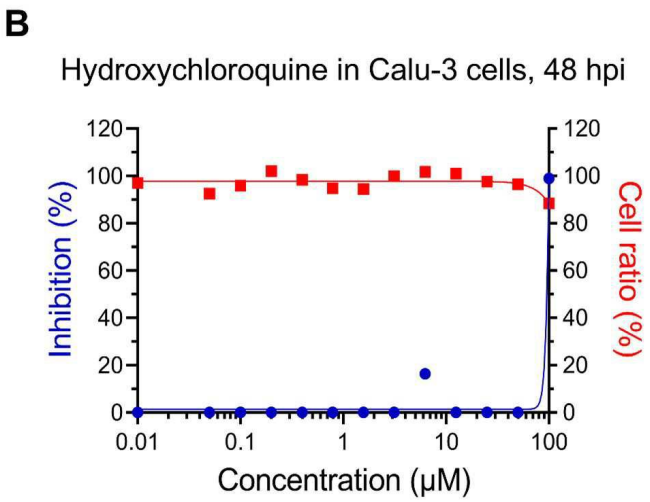
도면7b


B
Pralatrexate in Vero cells, MOI = 0.01
Virus titer [(Log10 (PFU/ml)]
Hours post-infection (hpi)
24
48
72
Virus only
0.1 μM
0.05 μM
0.025 μM
**
***
***
***
*

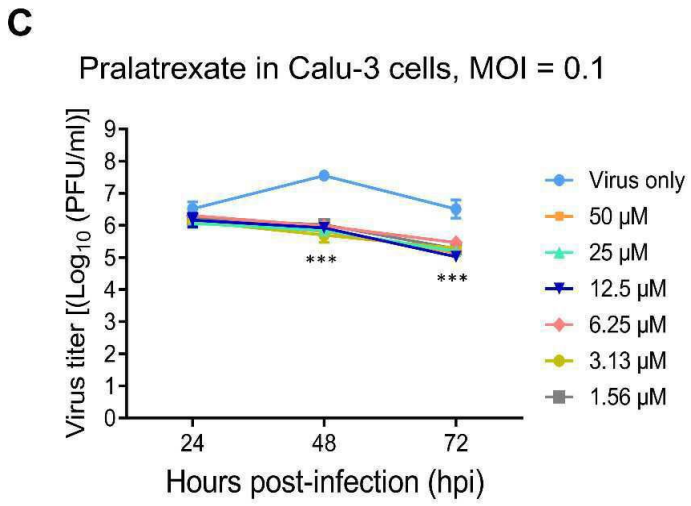
도면8a


A
Pralatrexate in Calu-3 cells, 48 hpi
Inhibition (%)
Cell ratio (%)
Concentration (μM)
0.01
0.1
1
10
100
0
20
40
60
80
100
120

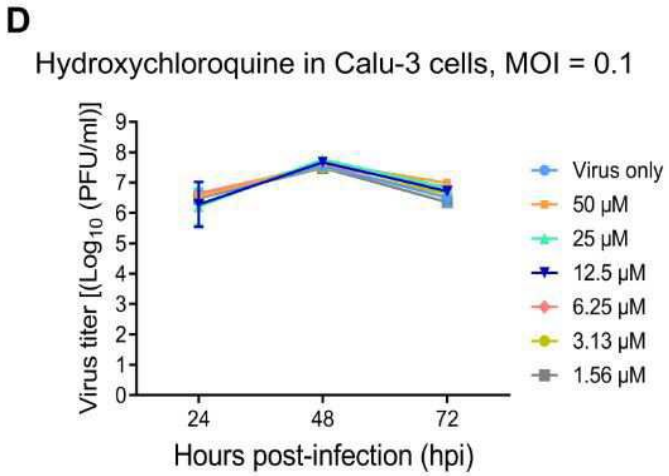
도면8b


B
Hydroxychloroquine in Calu-3 cells, 48 hpi
Inhibition (%)
Cell ratio (%)
Concentration (μM)
0.01
0.1
1
10
100
0
20
40
60
80
100
120

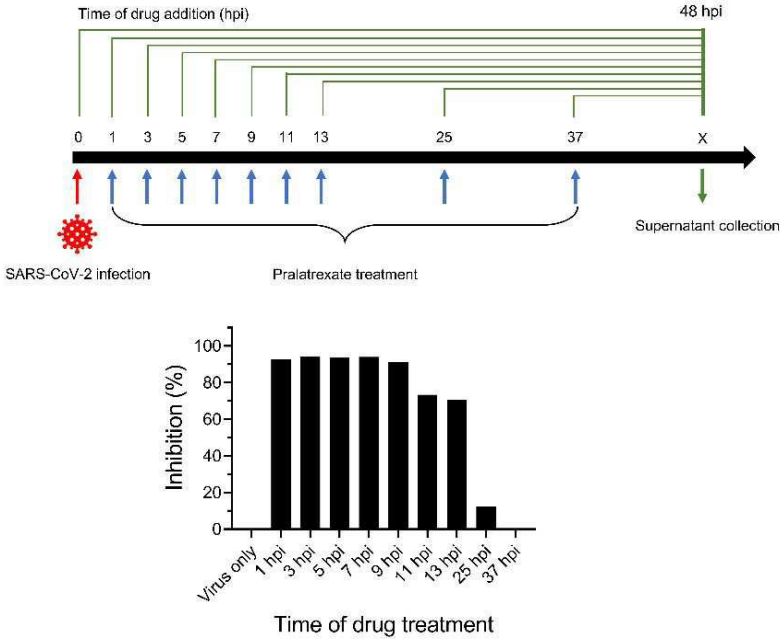
도면8c


C
Pralatrexate in Calu-3 cells, MOI = 0.1
Virus titer [(Log10 (PFU/ml)]
Hours post-infection (hpi)
24
48
72
***
***
Virus only
50 μM
25 μM
12.5 μM
6.25 μM
3.13 μM
1.56 μM

도면8d


D
Hydroxychloroquine in Calu-3 cells, MOI = 0.1
Virus titer [(Log10 (PFU/ml)]
Hours post-infection (hpi)
24
48
72
Virus only
50 μM
25 μM
12.5 μM
6.25 μM
3.13 μM
1.56 μM

도면9


Time of drug addition (hpi)
48 hpi
0
1
3
5
7
9
11
13
25
37
X
SARS-CoV-2 infection
Pralatrexate treatment
Supernatant collection
Inhibition (%)
100
80
60
40
20
0
Virus only
1 hpi
3 hpi
5 hpi
7 hpi
9 hpi
11 hpi
13 hpi
25 hpi
37 hpi
Time of drug treatment