



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월09일
(11) 등록번호 10-2701681
(24) 등록일자 2024년09월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/713 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/1131 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0065460
- (22) 출원일자 2021년05월21일
심사청구일자 2021년05월21일
- (65) 공개번호 10-2021-0144601
- (43) 공개일자 2021년11월30일
- (30) 우선권주장
1020200061828 2020년05월22일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020190134506 A
US07339051 A
US20090226885 A1
JP2006520760 A

- (73) 특허권자
(주)바이오니아
대전광역시 대덕구 문평서로 8-11 (문평동)
(주) 써나젠테라퓨틱스
대전광역시 대덕구 문평서로 8-11 (문평동)
- (72) 발명자
박한오
세종특별자치시 시청대로 210, 1003동 2502호 (보람동, 호려울마을10단지)
김장선
대전광역시 유성구 구즉로 25, 316동 408호 (송강동, 송강그린아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 29 항

심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 이중가닥 올리고뉴클레오타이드 및 이를 포함하는 코로나바이러스감염증-19 [COVID-19] 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 SARS-Cov-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)의 증식을 매우 특이적이고 높은 효율로 저해할 수 있는 이중가닥 올리고뉴클레오타이드, 바람직하게는 RNA/RNA, DNA/DNA, 또는 DNA/RNA hybrid 형태의 서열을 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오타이드, 상기 이중가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오타이드 구조체 및 나노입자, 및 이의 코로나바이러스감염증-19 치료 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2024.01)

A61K 9/14 (2013.01)

A61K 9/19 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

(72) 발명자

이미선

대전광역시 유성구 구즉로 25, 301동 810호 (송강동, 송강그린아파트)

최순자

대전광역시 유성구 엑스포로 501, 107동 502호 (진민동, 청구나래아파트)

이은광

대전광역시 대덕구 신탄진로804번길 87-8 (신탄진동)

변상진

대전광역시 서구 대덕대로 150, 109동 1008호 (갈마동, 큰마을아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 센스 가닥(sense strand)과 이에 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥(anti-sense strand)을 포함하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 19 내지 31개의 뉴클레오티드로 구성되는 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 siRNA, shRNA 또는 miRNA인 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 센스 또는 안티센스 가닥은 독립적으로 DNA 또는 RNA인 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 이중가닥 올리고뉴클레오티드의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥은 화학적 변형(chemical modification)을 포함하는 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 화학적 변형은,

뉴클레오티드 내 당(sugar) 구조의 2' 탄소 위치에서 수산화기(-OH)가 메틸기(-CH₃), 메톡시기(-OCH₃), 아민기(-NH₂), 불소(-F), 0-2-메톡시에틸기, 0-프로필기, 0-2-메틸티오에틸기, 0-3-아미노프로필기, 0-3-디메틸아미노프로필기, 0-N-메틸아세트아미도기 및 0-디메틸아미도옥시에틸로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나로 치환되는 변형;

뉴클레오티드 내 당 구조의 산소가 황으로 치환되는 변형;

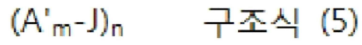
뉴클레오티드 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 결합, 보라노포스페이트(boranophosphate) 결합 및 메틸포스포네이트(methyl phosphonate) 결합으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 결합이 되는 변형; 및

PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid) 및 UNA(unlocked nucleic acid) 형태로의 변형;으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드.

청구항 12

제8항에 있어서,

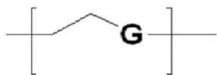
상기 친수성 물질은 하기 구조식 (5) 또는 구조식 (6)의 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오타이드 구조체:



상기 구조식 (5) 또는 구조식 (6)에서 A' 는 친수성 물질 단량체(monomer)를, J는 m개의 친수성 물질 단량체 간 또는 m개의 친수성 물질 단량체와 이중가닥 올리고뉴클레오타이드를 서로 연결하는 링커, m은 1 내지 15의 정수, n은 1 내지 10의 정수를 의미하며,

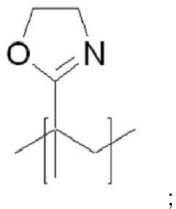
친수성 물질 단량체 A'는 하기 화합물 (1) 내지 화합물 (3)에서 선택된 어느 하나의 화합물이며, 링커(J)는 $-PO_3^-$, $-SO_3^-$ 및 $-CO_2^-$ 로 구성된 군에서 선택된다;

화합물 (1)

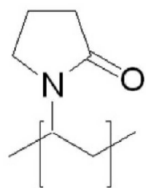


상기 화합물 (1)에서 G는 O, S 및 NH로 구성된 군에서 선택된다;

화합물 (2)

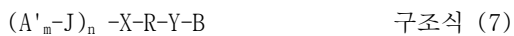


화합물 (3)



청구항 13

제12항에 있어서, 하기 구조식 (7) 또는 구조식 (8)의 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오타이드 구조체:



청구항 14

제8항에 있어서, 상기 친수성 물질의 분자량은 200 내지 10,000임을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체.

청구항 15

제8항에 있어서, 상기 소수성 물질의 분자량은 250 내지 1,000인 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 소수성 물질은 스테로이드 유도체, 글리세라이드 유도체, 글리세롤 에테르, 폴리프로필렌 글리콜, C₁₂ 내지 C₅₀의 불포화 또는 포화 탄화수소, 디아실포스파티딜콜린(diacylphosphatidylcholine), 지방산, 인지질, 리포폴리아민(lipopolyamine), 지질(lipid), 토코페롤(tocopherol) 및 토코트라이에놀(tocotrienol)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 스테로이드 유도체는 콜레스테롤, 콜리스탄올, 콜산, 콜리스테릴포르메이트, 코테스타닐 포르메이트 및 콜리스타닐아민으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 글리세라이드 유도체는 모노-글리세라이드, 디-글리세라이드 및 트리-글리세라이드로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체.

청구항 19

제8항에 있어서, 상기 X 및 Y로 표시되는 공유 결합은 비분해성 결합 또는 분해성 결합인 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 비분해성 결합은 아미드 결합 또는 인산화 결합인 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 분해성 결합은 이황화 결합, 산분해성 결합, 에스테르 결합, 안하이드라이드 결합, 생분해성 결합 및 효소 분해성 결합으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체.

청구항 22

제8항에 따른 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체를 포함하는 나노입자.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 나노입자는 상이한 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 2종 이상의 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체가 혼합되어 구성되는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 24

제1항에 따른 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 유효 성분으로 포함하는 코로나바이러스 증식 억제용 조성물.

청구항 25

제22항에 따른 나노입자를 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 증식 억제용 조성물.

청구항 26

제24항의 코로나바이러스 증식 억제용 조성물을 포함하는 동결건조된 형태의 제형.

청구항 27

제8항에 따른 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체를 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 증식 억제용 조성물.

청구항 28

제27항의 코로나바이러스 증식 억제용 조성물을 포함하는 동결건조된 형태의 제형.

청구항 29

제25항의 코로나바이러스 증식 억제용 조성물을 포함하는 동결건조된 형태의 제형.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 SARS-Cov-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)의 증식을 매우 특이적이고 높은 효율로 저해할 수 있는 이중가닥 올리고뉴클레오티드, 바람직하게는 RNA/RNA, DNA/DNA, 또는 DNA/RNA hybrid 형태의 서열을 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드, 상기 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체 및 나노입자, 및 이의 코로나바이러스감염증-19 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 1995년 Guo와 Kempnues는 *C. elegans*에서 안티센스(antisense)를 이용한 유전자 발현을 억제하는데 안티센스 RNA와 마찬가지로 센스 RNA도 유효하다는 것을 발견함으로써 그 원인을 규명하기 위한 연구가 진행되었으며, 1998년 Fire 등이 처음으로 double stranded RNA (dsRNA)를 주입하여 그에 대응하는 mRNA가 특이적으로 분해되어 유전자의 발현이 억제되는 현상을 확인하였고 이를 RNA interference (RNAi) 로 명명하였다. RNAi는 유전자

발현을 억제하기 위해 사용되는 방법으로 간편하면서 적은 비용으로 유전자 억제 효과를 뚜렷하게 볼 수 있기 때문에 그 기술의 응용 분야가 다양해지고 있다.

- [0004] 이러한 유전자의 발현을 억제하는 기술은 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있기 때문에 특정 유전자의 과잉 발현이 원인이 되는 암, 유전 질환 등의 표적 유전자를 mRNA 수준에서 제거할 수 있어, 질병치료를 위한 치료제 개발 및 표적 검증의 중요한 도구로 활용될 수 있다. 표적 유전자의 발현을 억제하는 종래의 기술로는 표적 유전자에 대한 전이 유전자를 도입하는 기술이 개시되어 있는데, 프로모터를 기준으로 역방향(antisense)으로 전이 유전자를 도입하는 방법과 프로모터 기준으로 정방향(sense)으로 이식 유전자를 도입하는 방법이 있다.
- [0005] 이러한 RNA를 표적으로 하는 RNA 치료법은 표적 RNA에 대한 올리고뉴클레오티드를 이용하여 해당 유전자의 기능을 제거하는 방법으로 기존의 항체와 화합물 (small molecule) 같은 종래의 치료제가 주로 단백질을 표적으로 하는 것과는 다르다고 할 수 있다. RNA를 표적으로 하는 접근법에는 크게 두 가지가 존재하는데, 하나는 이중나선-RNA가 매개된 RNAi이고 다른 하나는 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)이다. 현재 다양한 질병에서 RNA를 표적으로 하여 임상 시도가 시도되고 있다.
- [0006] 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO, 이하 'ASO'라고 한다)는 왓슨-크릭 염기 반응에 따라 목적 유전자에 결합하도록 디자인된 짧은 길이의 합성 DNA 로서, 유전자의 특정 염기 서열의 발현을 특이적으로 억제할 수 있어 유전자의 기능을 연구하고 암과 같은 질환을 분자 수준에서 치료할 수 있는 치료제를 개발하는데 이용되어 왔다. 이러한 ASO는 유전자 발현을 억제하는 목표를 다양하게 설정하여 용이하게 제작될 수 있는 장점이 있어, 발암 유전자의 발현과 암세포의 성장을 억제하는데 활용하고자 하는 연구가 있어 왔다. ASO가 특정 유전자의 발현을 억제하는 과정은 상보적인 mRNA 서열과 결합하여 RNase H 활성을 유도하여 mRNA를 제거하거나 단백질 번역을 위한 리보솜 복합체의 형성 및 진행을 방해함으로써 이루어진다. 또한 ASO는 게놈 DNA와 결합하여 트리플-헬릭스 (Triple helix) 구조를 형성함으로써 유전자의 전사를 억제한다고도 보고되었다. ASO는 위와 같은 잠재적 가능성이 있으나, 이를 임상에 활용되기 위해서는 뉴클레아제(nuclease)에 대한 안정성을 향상시키고, 목적 유전자의 염기 서열에 특이적으로 결합하도록 표적 조직이나 세포 내로 효율적으로 전달되어야 한다. 또한, 유전자 mRNA의 2차 및 3차 구조는 ASO의 특이적 결합에 중요한 요소로, mRNA 2차 구조가 적은 부분이 ASO가 접근하는데 매우 유리하므로, ASO를 합성하기 전에 mRNA 2차 구조가 적게 생성되는 영역을 체계적으로 분석하여 생체 외뿐 아니라 생체 내에서도 유전자-특이적 억제를 효과적으로 달성하기 위해 노력해왔다. 이러한 ASO는 RNA의 종류인 siRNA 보다 매우 안정적이고 물과 생리 식염수 등에 잘 용해되는 장점을 가지고 있으며, 현재 세 개의 ASO가 Federal Drug Administration (FDA)에 승인되었다(Jessica, C., J Postdoc Res, 4:35-50, 2016).
- [0007] 간섭 RNA(RNA interference, 이하 'RNAi'라고 한다)는 그 역할이 발견된 이후로, 다양한 종류의 포유동물 세포 (mammalian cell)에서 서열 특이적 mRNA에 작용한다는 사실이 밝혀졌다 (Barik, S., J Mol. Med. (2005) 83: 764-773). 긴 사슬의 RNA 이중가닥이 세포로 전달되면, 전달된 RNA 이중가닥은 Dicer라는 엔도뉴클라아제 (endonuclease)에 의하여 21 내지 23개의 이중가닥(base pair, bp)으로 프로세싱된 짧은 간섭 RNA (small interfering RNA, 이하 'siRNA'라고 한다)로 변환되며, siRNA는 RISC(RNA-induced silencing complex)에 결합하여 가이드(안티센스) 가닥이 타겟 mRNA를 인식하여 분해하는 과정을 통해 타겟 유전자의 발현을 서열 특이적으로 저해한다. siRNA를 이용한 유전자의 발현 억제 기술은 표적 세포에서 표적 유전자의 발현을 억제시키고 이로 인한 변화를 관찰하는 것으로 표적 세포에서의 표적 유전자의 기능을 규명하는 연구에 유용하게 사용된다. 특히, 감염성 바이러스 또는 암세포 등에서 표적 유전자의 기능을 억제하는 것은 해당 질병의 치료 방법을 개발하는데 유용하게 활용될 수 있을 것이며, 생체 외(*in vitro*)에서의 연구 및 실험동물을 이용한 생체 내 (*in vivo*) 연구를 수행한 결과, siRNA에 의한 표적 유전자의 발현 억제가 가능하다고 보고된 바 있다.
- [0008] 베르트랑(Bertrand) 연구진에 따르면 동일한 타겟 유전자에 대한 siRNA가 안티센스 올리고뉴클레오티드 (Antisense oligonucleotide, ASO)에 비하여 생체 내/외(*in vitro* 및 *in vivo*)에서 mRNA 발현의 저해효과가 뛰어나고, 해당 효과가 오랫동안 지속되는 효과를 가지는 것으로 밝혀졌다. 또한 siRNA의 작용 기작은 타겟 mRNA와 상보적으로 결합하여 서열 특이적으로 타겟 유전자의 발현을 조절하기 때문에, 기존의 항체 기반 의약품이나 화학물질 의약품(small molecule drug)에 비하여 적용할 수 있는 대상이 획기적으로 확대될 수 있다는 장점을 가진다(MA Behlke, MOLECULAR THERAPY. 2006 13(4):664-670).
- [0009] siRNA의 뛰어난 효과 및 다양한 사용범위에도 불구하고, siRNA가 치료제로 개발되기 위해서는 체내에서의 siRNA의 안정성(stability) 개선과 세포 전달 효율 개선을 통해 siRNA가 타겟 세포에 효과적으로 전달되어야 한다(FY Xie, Drug Discov. Today. 2006 Jan; 11(1-2):67-73). 체내 안정성 향상 및 siRNA의 비특이적인 세포 면역 반응(*innate immune stimulation*) 문제 해결을 위하여 siRNA의 일부 뉴클레오티드 또는 골격(backbone)을 핵산분

해효소 저항성을 가지도록 변형(modification)하거나 바이러스성 벡터(viral vector), 리포솜 또는 나노입자(nanoparticle) 등의 전달체를 이용하는 등, 이에 대한 연구가 활발하게 시도되고 있다.

[0010] 아데노바이러스나 레트로바이러스 등의 바이러스성 벡터를 이용한 전달 시스템은 형질주입 효율(transfection efficacy)이 높지만, 면역원성(immunogenicity) 및 발암성(oncogenicity)이 높다. 반면에 나노입자를 포함하는 비바이러스성(non-viral) 전달 시스템은 바이러스성 전달 시스템에 비하여 세포전달효율은 낮은 편이지만, 생체 내(*in vivo*)에서의 안정성(stability)이 높고, 타겟 특이적으로 전달이 가능하며, 내포되어 있는 RNAi 올리고뉴클레오타이드를 세포 또는 조직으로 흡수(uptake) 및 내재화(internalization)하고, 세포독성 및 면역 유발(immune stimulation)이 거의 없다는 장점을 가지고 있어, 현재는 바이러스성 전달 시스템에 비해 유력한 전달 방법으로 평가되고 있다(Akhtar S, J Clin Invest. 2007 December 3; 117(12): 3623-3632).

[0011] 비바이러스성 전달 시스템 중에서 나노전달체(nanocarrier)를 이용하는 방법은 리포솜, 양이온 고분자 복합체 등의 다양한 고분자를 사용함으로써 나노입자를 형성하고, siRNA를 이러한 나노입자(nanoparticle), 즉 나노전달체(nanocarrier)에 담지하여 세포에 전달하는 방법이다. 나노전달체를 이용하는 방법 중 주로 활용되는 방법은 고분자 나노입자(polymeric nanoparticle), 고분자 미셀(polymer micelle), 리포플렉스(lipoplex) 등이 있는데, 이 중에서 리포플렉스를 이용한 방법은 양이온성 지질로 구성되어 세포의 엔도솜(endosome)의 음이온성 지질과 상호작용하여 엔도솜의 탈 안정화 효과를 유발하여 세포 내로 전달하는 역할을 한다.

[0012] 또한, siRNA 패신저(passenger; 센스(sense)) 가닥의 말단 부위에 화학물질 등을 연결하여 증진된 약동력학(pharmacokinetics)적 특징을 갖도록하여 생체 내(*in vivo*)에서 높은 효율을 유도할 수 있다는 것이 알려져 있다(J Soutschek, Nature 11; 432(7014):173-8, 2004). 이 때 siRNA 센스(sense; 패신저(passenger)) 또는 안티센스(antisense; 가이드(guide)) 가닥의 말단에 결합된 화학 물질의 성질에 따라 siRNA의 안정성이 달라진다. 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)과 같은 고분자 화합물이 접합된 형태의 siRNA는 양이온성 물질이 존재하는 조건에서 siRNA의 음이온성 인산기와 상호작용하여 복합체를 형성함으로써, 개선된 siRNA 안정성을 가진 전달체가 된다(SH Kim, J Control Release 129(2):107-16, 2008). 특히 고분자 복합체로 구성된 미셀(micelle)들은 약물 전달 운반체로 쓰이는 다른 시스템인, 미소구체(microsphere) 또는 나노입자(nanoparticle) 등에 비해 그 크기가 극히 작으면서도 분포가 매우 일정하고, 자발적으로 형성되는 구조이므로 체제의 품질 관리 및 재현성 확보가 용이하다는 장점이 있다.

[0013] siRNA의 세포 내 전달 효율성을 향상시키기 위해, siRNA에 생체 적합성 고분자인 친수성 물질(예를 들면, 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG))을 단순 공유결합 또는 링커-매개(linker-mediated) 공유결합으로 접합시킨 siRNA 접합체를 통해, siRNA의 안정성 확보 및 효율적인 세포막 투과성을 위한 기술이 개발되었다(대한민국 등록특허 제883,471호). 하지만 siRNA의 화학적 변형 및 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)을 접합시키는 것(PEGylation) 만으로는 생체 내에서의 낮은 안정성과 표적 장기로의 전달이 원활하지 못하다는 단점은 여전히 가진다. 이러한 단점을 해결하기 위하여 올리고뉴클레오타이드, 특히 siRNA와 같은 이중가닥 올리고 RNA에 친수성 및 소수성 물질이 결합된 이중가닥 올리고 RNA 구조체가 개발되었는데, 상기 구조체는 소수성 물질의 소수성 상호작용에 의하여 SAMiRNA™ (self assembled micelle inhibitory RNA) 라고 명명된 자가조립 나노입자를 형성하게 되는데(대한민국 등록 특허 제1,224,828호), SAMiRNA™ 기술은 기존의 전달기술들에 비해 매우 사이즈가 작으면서도 균일한(homogenous) 나노입자를 수득할 수 있다는 장점을 가진다.

[0014] SAMiRNA™ 기술의 구체적인 예로서, 친수성 물질로서 PEG(polyethylene glycol) 또는 HEG(Hexaethylene glycol)가 사용되는데, PEG는 합성 폴리머(synthetic polymer)로 흔히 의약품 특히 단백질의 수용성(solubility) 증가 및 약물동태학(pharmacokinetics)의 조절을 위해 사용된다. PEG는 다분산계(polydisperse) 물질로, 한 배치(batch)의 폴리머는 다른 개수의 단량체(monomer)의 총 합으로 이루어져 분자량이 가우스 곡선 형태를 나타내며, 다분산지수(polydisperse value, Mw/Mn)로 물질의 동질성 정도를 표현한다. 즉, PEG가 낮은 분자량(3~5kDa)일 때 약 1.01의 다분산지수를 나타내며 높은 분자량(20 kDa)일 때 약 1.2라는 높은 다분산지수를 나타내어, 높은 분자량일수록 물질의 동질성이 상대적으로 낮은 특징을 보인다. 따라서, PEG를 의약품에 결합시킨 경우 접합체에 PEG의 다분산계 특징이 반영되어 단일물질의 검증이 쉽지 않다는 단점이 있어 PEG의 합성 및 정제과정의 개선을 통해 낮은 다분산지수를 가지는 물질을 생산하는 추세이지만, 특히 분자량이 작은 물질에 PEG를 결합시킨 경우 결합이 용이하게 이루어졌는지 확인이 용이하지 않은 불편한 점이 있는 등 물질의 다분산성 특징에 따른 문제점들이 존재한다. (Francesco M. VDRUG DISCOVERY TODAY(2005) 10(21):1451-1458).

[0015] 이에 따라 최근에는 기존 자가조립 나노입자인 SAMiRNA™ 기술의 개량된 형태로, SAMiRNA™를 구성하는 이중가닥

올리고뉴클레오티드 구조체의 친수성 물질을 일정한 분자량을 갖는 균일한 1~15개의 단량체(monomer)와 필요에 따라 링커(linker)를 포함하는 기본단위를 블록(block)화 하여, 이를 필요에 따라 적절한 개수를 사용함으로써, 기존의 SAMiRNA™에 비해 보다 작은 크기를 가지며 또한 다분산성이 획기적으로 개선된 새로운 형태의 전달체 기술이 개발되었다. 또한 체내로 siRNA를 주입하였을 경우, 혈액 내에 존재하는 여러 다양한 효소들에 의해 siRNA가 급속하게 분해되어 표적 세포 또는 조직 등으로 전달 효율이 좋지 않음이 이미 알려져 있듯이 개량된 SAMiRNA™에서도 표적 유전자에 따라 안정성 및 발현 저해율의 편차가 나타났다. 따라서, 본 발명자들은 개량된 자가조립 나노입자인 SAMiRNA™를 이용하여 표적 유전자를 보다 안정적이고 효과적으로 발현 저해하기 위해 가이드인 센스 가닥은 ASO인 DNA 서열을, 패신저인 안티센스 가닥은 RNA 서열을 이용하여 DNA-RNA hybrid 형태의 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 적용함으로써 표적 유전자에 대한 발현 저해 효과와 안정성이 현저하게 증가할 수 있음을 확인한 바 있다.

[0017] 한편, 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)는 SARS-Cov-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 감염에 의한 호흡기 중후군으로, 코로나바이러스감염증-19는 약 2~14일의 잠복기를 거친 뒤 발열 및 기침이나 호흡곤란 등 호흡기 증상, 폐렴이 주 증상으로 나타나며, 기침이나 재채기를 할 때 생긴 비말(침방울) 또는 SARS-Cov-2에 오염된 물건을 만진 뒤 눈, 코, 입을 만짐으로써 전파되는 것으로 알려져 있다.

[0018] 2019년 12월 중국 우한에서 처음 발생한 이후 중국 전역과 전 세계로 확산되었으며, 2020년 4월 현재 280만명의 환자가 확진되었고 20만명 이상의 사망자가 발생하였다. 세계보건기구(WHO)가 2020년 1월 30일 코로나바이러스감염증-19에 대해 국제적 공중보건 비상사태(PHEIC, Public health Emergency of International Concern)를 선포했으며, 이후 3월 11일 코로나바이러스감염증-19에 대해 세계적 대유행, 즉 팬데믹(pandemic)을 선언했다. 전염병 위험 최고단계인 팬데믹은 '대다수 사람들이 면역력을 갖고 있지 않은 바이러스의 전 세계 확산'을 의미하며, 확진자와 사망자, 피해국 수는 계속 증가하는 상황이다.

[0019] 코로나바이러스는 외피에 Spike(S) 단백질이 전자 현미경 상에서 왕관 모양을 띠는 것을 특징으로 하며, 양성 단일 가닥(+ssRNA) 바이러스로 원형 혹은 타원형 바이러스이다. 코로나바이러스는 alphaCoV, betaCoV, deltaCoV와 gammaCoV의 4가지 속으로 분류되며, 일반적인 호흡기 감염을 일으키는 alphaCoV는 HCoV-229E, HCoV-NL63, betaCoV는 HCoV-OC43과 HCoV-HKU1가 이에 속하며 감기와 같은 상부 호흡기 감염 및 소화기 질환을 유도하기도 한다. betaCoV에 속하는 SARS-CoV(B lineage)와 MERS-CoV(C lineage)는 급성 호흡기 증상을 특징으로 하는 심각한 호흡기 전염병을 유발한다. COVID-19 발생 초기 폐렴 환자로부터 분리된 유전체 서열은 bat SARS-like-CoVZXC21과 뉴클레오타이드 상동성이 89%, SARS-CoV와의 상동성은 82%인 것으로 분석되었으며, 같은 betaCoV에 속하는 것으로 밝혀져, SARS-CoV-2로 명명되었다.

[0020] 우리나라의 경우 코로나바이러스감염증-19 발생 초기에는 판 코로나바이러스 검사법(Conventional PCR)과 염기서열분석 일치 여부를 통한 확진 검사를 진행하였다. 그러나 현재는 실시간 RT-PCR(Real time reverse transcription polymerase chain reaction) 검사법을 통해 코로나바이러스감염증-19 진단 검사를 수행하고 있다. 현재 전세계 다수의 제약회사에서 백신 개발이 완료되어 접종이 진행 중이나, 코로나바이러스감염증-19에 대하여 아직까지 효과가 탁월한 치료제는 나오지 않은 상태이다.

[0021] 상기 살핀 바와 같이 아직까지 코로나바이러스감염증-19에 대한 RNAi 치료제 및 이의 전달기술에 대한 기술개발은 미미한 상황으로, 특이적이고 고효율로 SARS-Cov-2의 증식을 저해할 수 있는 이중가닥 올리고뉴클레오티드 치료제 및 이의 전달기술에 대한 시장의 수요는 매우 높은 상황이다.

[0022] 이에 본 발명자들은 SARS-Cov-2를 표적으로 하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 선별하고, 특히 SARS-Cov-2의 증식을 저해함으로써 코로나바이러스감염증-19를 효율적으로 치료할 수 있는 RNAi 치료제 및 그 전달체를 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0023] (특허문헌 0001) 미국특허 제5,034,323호;
- (특허문헌 0002) 미국특허 제5,231,020호;
- (특허문헌 0003) 미국특허 제5,283,184호

(특허문헌 0004) 대한민국 등록특허 제883471호

(특허문헌 0005) 대한민국 등록 특허 제1224828호

비특허문헌

- [0024] (비특허문헌 0001) Jessica, C., J Postdoc Res, 4:35-50, 2016
- (비특허문헌 0002) Barik, S. J Mol. Med. (2005) 83: 764-773
- (비특허문헌 0003) MA Behlke, MOLECULAR THERAPY. 2006 13(4):664-670)
- (비특허문헌 0004) FY Xie, Drug Discov. Today. 2006 Jan; 11(1-2):67-73
- (비특허문헌 0005) Akhtar S, J Clin Invest. 2007 December 3; 117(12): 3623-3632
- (비특허문헌 0006) J Soutschek, Nature 11; 432(7014):173-8, 2004
- (비특허문헌 0007) SH Kim, J Control Release 129(2):107-16, 2008
- (비특허문헌 0008) Francesco M. VDRUG DISCOVERY TODAY(2005) 10(21):1451-1458
- (비특허문헌 0009) 문성실, BRIC View 2020-TX2(2020)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0025] 본 발명의 목적은 SARS-Cov-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)의 증식을 매우 특이적이고 높은 효율로 저해할 수 있는 이중가닥 올리고뉴클레오티드, 바람직하게는 RNA/RNA, DNA/DNA, 또는 DNA/RNA hybrid 형태의 서열을 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드, 상기 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체 및 나노입자를 제공하는데 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 목적은 상기 이중가닥 올리고뉴클레오티드, 이를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체 및/또는 나노입자를 유효성분으로 함유하는 코로나바이러스감염증-19 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 코로나바이러스감염증-19 치료용 약학 조성물을 코로나바이러스감염증-19 치료를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 코로나바이러스감염증-19 치료방법을 제공하는데 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 목적은 코로나바이러스감염증-19 치료에 사용하기 위한 상기 이중가닥 올리고뉴클레오티드, 이를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체 및/또는 나노입자를 제공하는데 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 목적은 코로나바이러스감염증-19 치료에 사용하기 위한 상기 약학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 목적은 코로나바이러스감염증-19 치료를 위한 약물의 제조를 위한 상기 이중가닥 올리고뉴클레오티드, 이를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체 및 나노입자의 용도를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0032] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 서열을 포함하는 센스 가닥(sense strand)과 이에 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥(anti-sense strand)을 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 제공한다.
- [0033] 본 발명은 또한, 상기 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체 및/또는 나노입자를 제공한다.
- [0034] 본 발명은 또한, 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 서열을 포함하는 센스 가닥(sense strand)과 이에 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥(anti-sense strand)을 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드, 상기 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드

[0077] $(A'_m-J)_n-X-R-Y-B$ 구조식 (7)

[0078] $(J-A'_m)_n-X-R-Y-B$ 구조식 (8)

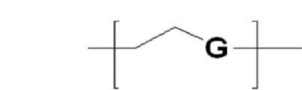
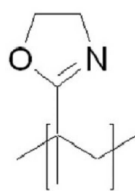
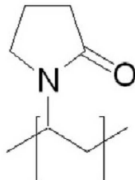
[0080] 상기 구조식 (7) 및 구조식 (8)에서, X, R, Y 및 B는 구조식 (1)에서의 정의와 동일하고, A', J, m 및 n은 구조식 (5) 및 구조식 (6)에서의 정의와 동일하다.

[0081] 상기 구조식 (5) 내지 구조식 (8)에서 친수성 물질 단량체(A')는 비이온성 친수성 고분자의 단량체 중에서 본 발명의 목적에 부합하는 것이라면 제한없이 사용이 가능하며, 바람직하게는 표 1에 기재된 화합물 (1) 내지 화합물 (3)에서 선택된 단량체, 더욱 바람직하게는 화합물 (1)의 단량체가 사용될 수 있으며, 화합물 (1)에서 G는 바람직하게는 O, S 및 NH에서 선택될 수 있다.

[0083] 특히, 친수성 물질 단량체 중에서도 특히 화합물 (1)로 표시되는 단량체는 다양한 기능을 도입할 수 있으며, 생체 내 친화성이 좋고 면역반응을 적게 유도하는 등 생체 적합성(bio-compatibility)이 우수할 뿐 아니라, 구조식 (7) 또는 구조식 (8)에 따른 구조체 내에 포함된 이중가닥 올리고뉴클레오티드의 생체 내 안정을 증가시키고, 전달 효율을 증가시킬 수 있다는 장점을 가지고 있어 본 발명에 따른 구조체의 제조에 매우 적합하다.

표 1

[0084] 본 발명에서의 친수성 물질 단량체 구조

화합물 (1)	화합물 (2)	화합물 (3)
 <p>G는 O, S 또는 NH</p>		

[0086] 상기 구조식 (5) 내지 구조식 (8)에서의 친수성 물질은 총 분자량이 1,000 내지 2,000에 범위 내인 것이 특히 바람직하다.

[0087] 예를 들어, 구조식 (5) 내지 구조식 (8)에서 화합물 (1)에 따른 헥사에틸렌 글리콜(Hexaethylene glycol), 즉 G가 O이고, m이 6인 물질이 사용되는 경우 헥사에틸렌글리콜 스페이스(spacer)의 분자량이 344이므로, 반복 횟수(n)는 3 내지 5인 것이 바람직하다. 특히, 본 발명은 필요에 따라 상기 구조식 (5) 내지 구조식 (8)에서 $(A'_m-J)_n$ 으로 또는 $(J-A'_m)_n$ 표시되는 친수성 그룹의 반복단위, 즉 친수성 물질 블록(block)이 n으로 표시되는 적절한 개수로 사용될 수 있음을 특징으로 한다. 상기 각 친수성 물질 블록 내에 포함되는 친수성 물질 단량체인 A와 링커인 J는 독립적으로 각 친수성 물질 블록간에 동일할 수도 있고, 상이할 수도 있다. 즉, 친수성 물질 블록이 3개 사용될 경우(n=3), 첫 번째 블록에는 화합물 (1)에 따른 친수성 물질 단량체가, 두 번째 블록에는 화합물 (2)에 따른 친수성 물질 단량체가, 세 번째 블록에는 화합물 (3)에 따른 친수성 물질 단량체가 사용되는 등, 모든 친수성 물질 블록별로 다른 친수성 물질 단량체가 사용될 수도 있고, 모든 친수성 물질 블록에 화합물 (1) 내지 화합물 (3)에 따른 친수성 물질 단량체에서 선택된 어느 하나의 친수성 물질 단량체가 동일하게 사용될 수도 있다. 마찬가지로, 친수성 물질 단량체의 결합을 매개하는 링커 역시 각 친수성 물질 블록별로 모두 동일한 링커가 사용될 수도 있고, 각 친수성 물질 블록 별로 상이한 링커가 사용될 수도 있다. 또한, 친수성 물질 단량체의 개수인 m 역시 각 친수성 물질 블록간에 동일할 수도 있고, 상이할 수도 있다. 즉, 첫 번째 친수성 물질 블록에서는 친수성 물질 단량체가 3개 연결(m=3)되고, 두 번째 친수성 물질 블록에서는 친수성 물질 단량체가 5개(m=5), 세 번째 친수성 물질 블록에서는 친수성 물질 단량체가 4개 연결(m=4)되는 등, 서로 다른 개수의 친수성 물질 단량체가 사용될 수도 있고, 모든 친수성 물질 블록에서 동일한 개수의 친수성 물질 단량체가 사용될 수도 있다.

[0088] 또한, 본 발명에서 상기 링커(J)는 $-PO_3^-$, $-SO_3^-$ 및 $-CO_2^-$ 로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 사용되는 친수성 물질의 단량체 등에 따라 본 발명의 목적에 부합하는 한 어떠한 링커라도 사용될 수 있음은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다.

- [0089]
- [0090] 상기 구조식 (1) 내지 구조식 (4), 구조식 (7) 및 구조식 (8) 에서의 소수성 물질(B)은 소수성 상호작용을 통해 구조식 (1) 내지 구조식 (4), 구조식 (7) 및 구조식 (8)에 따른 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체로 구성된 나노입자를 형성하는 역할을 수행한다. 상기 소수성 물질은 분자량이 250 내지 1,000인 것이 바람직하며, 스테로이드(steroid) 유도체, 글리세라이드(glyceride) 유도체, 글리세롤 에테르(glycerol ether), 폴리프로필렌 글리콜(polypropylene glycol), C₁₂ 내지 C₅₀ 의 불포화 또는 포화 탄화수소(hydrocarbon), 디아실포스파티딜콜린 (diacylphosphatidylcholine), 지방산(fatty acid), 인지질(phospholipid), 리포폴리아민(lipopolyamine) 등이 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 목적에 부합하는 것이라면 어떠한 소수성 물질도 사용 가능하다는 점은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명한 것이다.
- [0091] 상기 스테로이드(steroid) 유도체는 콜레스테롤, 콜레스탄올, 콜산, 콜리스테릴 포르메이트, 코테스타닐 포르메이트 및 콜리스타닐아민으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 상기 글리세라이드 유도체는 모노-, 디- 및 트리-글리세라이드 등에서 선택될 수 있는데 이때, 글리세라이드의 지방산은 C₁₂ 내지 C₅₀의 불포화 또는 포화 지방산이 바람직하다.
- [0092] 특히, 상기 소수성 물질 중에서도 포화 또는 불포화 탄화수소나 콜레스테롤이 본 발명에 따른 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체의 합성 단계에서 용이하게 결합 시킬 수 있는 장점을 가지고 있다는 점에서 바람직하며, C₂₄ 탄화수소, 특히 disulfide bond를 포함하는 형태가 가장 바람직하다.
- [0093] 상기 소수성 물질은 친수성 물질의 반대쪽 말단(distal end)에 결합되며, siRNA의 센스 가닥 또는 안티센스 가닥의 어느 위치에 결합되어도 무방하다.
- [0095] 본 발명에 따른 구조식 (1) 내지 구조식 (4), 구조식 (7) 및 구조식 (8)에서의 친수성 물질 또는 소수성 물질과 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드는 단순 공유 결합 또는 링커가 매개된 공유결합(X 또는 Y)에 의해 결합된다. 상기 공유결합을 매개하는 링커는 친수성 물질, 또는 소수성 물질과 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드의 말단에서 공유결합하며, 필요에 따라 특정 환경에서 분해가 가능한 결합을 제공하는 한 특별히 한정되는 것은 아니다. 따라서, 상기 링커는 본 발명에 따른 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체의 제조과정에서 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드 및/또는 친수성 물질(또는 소수성 물질)을 활성화하기 위해 결합시키는 어떠한 화합물도 사용될 수 있다. 상기 공유 결합은 비분해성 결합 또는 분해성 결합 중 어느 것이어도 무방하다. 이때, 비분해성 결합으로는 아마이드 결합 또는 인산화 결합이 있고, 분해성 결합으로는 이황화 결합, 산분해성 결합, 에스테르 결합, 안하이드라이드 결합, 생분해성 결합 또는 효소 분해성 결합 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0096] 또한 상기 구조식(1) 내지 구조식 (4), 구조식 (7) 및 구조식 (8)에서의 R(또는 S 및 AS)로 표시되는 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드는 SARS-Cov-2의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 특성을 지니는 이중가닥 올리고뉴클레오티드라면 모두 제한없이 사용 가능하며,
- [0098] 바람직하게는 본 발명에서는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10번으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 서열을 포함하는 센스 가닥과 그에 상보적 서열을 포함하는 안티센스 가닥으로 구성된다.
- [0099] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체에 있어서, 상기 구조체 내의 친수성 물질의 올리고뉴클레오티드와 결합된 반대편 말단 부위에 아민기 또는 폴리히스티딘(polyhistidine) 그룹이 추가적으로 도입될 수 있다.
- [0100] 이는 본 발명에 따른 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체의 전달체의 세포내 도입과 엔도솜 탈출을 용이하게 하기 위한 것으로, 이미 Quantum dot, Dendrimer, liposome 등의 전달체의 세포내 도입과 엔도솜 탈출을 용이하게 하기 위해서 아민 그룹의 도입과 폴리히스티딘 그룹이 이용할 수 있다는 점 및 그 효과가 보고된 바 있다.
- [0101] 구체적으로 전달체의 말단 혹은 바깥쪽에 수식된 일차 아민기는 생체 내 pH에서 양성자화되면서 음전하를 띠는 유전자와 정전기적 상호작용에 의해 결합체를 형성하며, 세포내 유입 후에 엔도솜의 낮은 pH에서 완충 효과를 갖는 내부 삼차 아민으로 인해 엔도솜의 탈출이 용이해짐에 따라 라이소솜의 분해로부터 전달체를 보호할 수 있다고 알려져 있고(고분자 기반 하이브리드 물질을 이용한 유전자 전달 및 발현 억제. *Polymer Sci. Technol.*, Vol. 23, No.3, pp254-259),

[0102] 비필수 아미노산의 하나인 히스티딘은 잔기(-R)에 이미다졸링(pKa3 6.04)을 가지므로 엔도솜과 라이소솜에서 완충능력(buffering capacity)을 증가시키는 효과가 있어, 리포솜을 비롯한 비바이러스성 유전자전달체(non-viral gene carrier)들에서 엔도솜 탈출효율을 높이기 위해서 히스티딘 수식이 이용될 수 있다는 점이 알려져 있다 (Novel histidine-conjugated galactosylated cationic liposomes for efficient hepatocyte selective gene transfer in human hepatoma HepG2 cells. J. Controlled Release 118, pp262-270).

[0104] 상기 아민기 또는 폴리히스티딘(polyhistidine) 그룹은 하나 이상의 링커를 통해 친수성 물질 또는 친수성 물질 블록과 연결될 수 있다.

[0106] 본 발명의 구조식 (1)에 따른 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체의 친수성 물질에 아민기 또는 폴리히스티딘 (polyhistidine) 그룹이 도입되는 경우에는 구조식 (9)와 같은 구조를 가질 수 있다.

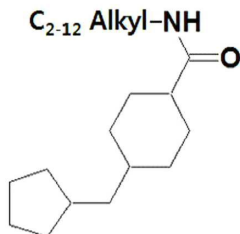
[0108] $P-J_1-J_2-A-X-R-Y-B$ 구조식 (9)

[0110] 상기 구조식 (9)에서 A, B, R, X 및 Y는 구조식 (1)에서의 정의와 동일하고,

[0111] P는 아민기 또는 폴리히스티딘 그룹을 의미하며, J_1 과 J_2 는 링커로서, J_1 은 및 J_2 는 독립적으로 단순 공유결합, PO_3^- , SO_3 , CO_2 , C_{2-12} 알킬, 알케닐, 알키닐에서 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 사용되는 친수성 물질에 따라 본 발명의 목적에 부합하는 J_1 과 J_2 는 어떠한 링커라도 사용될 수 있음은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다.

[0112] 바람직하게는 아민기가 도입된 경우에는, J_2 는 단순 공유결합 또는 PO_3^- , J_1 은 C_6 알킬인것이 바람직하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0113] 또한, 폴리히스티딘(polyhistidine) 그룹이 도입된 경우에는 구조식 (9)에서 J_2 는 단순 공유결합 또는 PO_3^- , J_1 은 화합물 (4)가 바람직하지만, 이에 한정되지는 않는다.



[0115]

[0116] 화합물 (4)

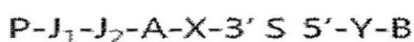
[0118] 또한, 구조식 (9)에 따른 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체의 친수성 물질이 구조식 (5) 또는 구조식 (6)에 따른 친수성 물질 블록이고, 이에 아민기 또는 폴리히스티딘(polyhistidine) 그룹이 도입되는 경우에는 구조식 (10) 또는 구조식 (11)과 같은 구조를 가질 수 있다.

[0120] $P-J_1-J_2-(A'_m-J)_n-X-R-Y-B$ 구조식 (10)

[0121] $P-J_1-J_2-(J-A'_m)_n-X-R-Y-B$ 구조식 (11)

[0123] 상기 구조식 (10) 및 구조식 (11)에서, X, R, Y, B, A', J, m 및 n은 구조식 (7) 또는 구조식 (8)에서의 정의와 동일하며, P, J_1 및 J_2 는 구조식 (9)에서의 정의와 동일하다.

[0125] 특히, 상기 구조식 (10) 및 구조식 (11)에 있어서, 친수성 물질은 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드 센스 가닥의 3' 말단에 결합된 형태인 것이 바람직하며, 이 경우 상기 구조식 (9) 내지 구조식 (11)은 다음 구조식 (12) 내지 구조식 (14)의 형태를 가질 수 있다.



[0127] **AS** 구조식 (12)

- [0150] (3) 상기 올리고뉴클레오타이드 단일가닥 5' 말단에 소수성 물질을 공유결합 시키는 단계;
- [0151] (4) 상기 올리고뉴클레오타이드 단일가닥의 서열과 상보적인 서열의 올리고뉴클레오타이드 단일가닥을 합성하는 단계;
- [0152] (5) 합성이 완료되면 고형지지체로부터 올리고뉴클레오타이드-고분자 구조체 및 올리고뉴클레오타이드 단일 가닥을 분리 정제하는 단계;
- [0153] (6) 제조된 올리고뉴클레오타이드-고분자 구조체와 상보적인 서열의 올리고뉴클레오타이드 단일가닥의 어닐링을 통해 이중가닥 올리고뉴클레오타이드 구조체를 제조하는 단계;
- [0154] 를 포함하여 이루어질 수 있다.
- [0155] 본 발명에서의 고형지지체(solid support)는 Controlled Pore Glass(CPG)가 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니며, 폴리스티렌(PS), 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA) 실리카겔, 셀룰로오스 페이퍼 등이 사용될 수 있다. CPG인 경우 직경은 40~180 μm 인 것이 바람직하며, 500~3000Å의 공극 크기를 가지는 것이 바람직하다. 상기 단계 (5) 이후, 제조가 완료되면 정제된 RNA-고분자 구조체 및 올리고뉴클레오타이드 단일가닥은 MALDI-TOF 질량분석기로 분자량을 측정하여 목적하는 올리고뉴클레오타이드-고분자 구조체 및 올리고뉴클레오타이드 단일가닥이 제조되었는지를 확인할 수 있다. 상기 제조방법에 있어서 (2) 단계에서 합성된 올리고뉴클레오타이드 단일가닥의 서열과 상보적인 서열의 올리고뉴클레오타이드 단일가닥을 합성하는 단계 (4)는 (1) 단계 이전 또는 (1) 단계 내지 (5) 단계 중 어느 한 과정 중에 수행되어도 무방하다.
- [0156] 또한, (2) 단계에서 합성된 올리고뉴클레오타이드 단일가닥과 상보적 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 단일가닥은 5' 말단에 인산기가 결합된 형태로 이용된 것을 특징으로 하는 제조방법도 사용될 수 있다.
- [0158] 한편, 본 발명의 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오타이드 구조체에 추가적으로 리간드가 결합된 이중가닥 올리고뉴클레오타이드 구조체의 제조방법을 제공한다.
- [0159] 리간드가 결합된 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오타이드 구조체를 제조하는 방법은 예를 들어,
- [0160] (1) 기능이 결합되어 있는 고형지지체에 친수성 물질을 결합시키는 단계;
- [0161] (2) 기능기-친수성 물질이 결합되어 있는 고형지지체를 기반으로 올리고뉴클레오타이드 단일가닥을 합성하는 단계;
- [0162] (3) 상기 올리고뉴클레오타이드 단일가닥의 5' 말단에 소수성 물질을 공유결합 시키는 과정으로 합성하는 단계;
- [0163] (4) 상기 올리고뉴클레오타이드 단일가닥의 서열과 상보적인 서열의 올리고뉴클레오타이드 단일 가닥을 합성하는 단계;
- [0164] (5) 합성이 완료되면 고형지지체로부터 기능기- 올리고뉴클레오타이드-고분자 구조체 및 상보적인 서열의 올리고뉴클레오타이드 단일가닥을 분리하는 단계;
- [0165] (6) 상기 기능기를 이용하여 친수성 물질 말단에 리간드를 결합하여 리간드-올리고뉴클레오타이드-고분자 구조체 단일가닥을 제조하는 단계;
- [0166] (7) 제조된 리간드- 올리고뉴클레오타이드-고분자 구조체와 상보적인 서열의 올리고뉴클레오타이드 단일가닥의 어닐링의 통해 리간드-이중가닥 올리고뉴클레오타이드 구조체를 제조하는 단계;
- [0167] 를 포함하여 이루어질 수 있다.
- [0168] 상기 (6) 단계 이후, 제조가 완료되면 리간드-올리고뉴클레오타이드-고분자 구조체 및 상보적인 서열의 올리고뉴클레오타이드 단일가닥을 분리 정제한 뒤 MALDI-TOF 질량 분석기로 분자량을 측정하여 목적하는 리간드-올리고뉴클레오타이드-고분자 구조체 및 상보적인 올리고뉴클레오타이드가 제조되었는지를 확인할 수 있다. 제조된 리간드-올리고뉴클레오타이드-고분자 구조체와 상보적인 서열의 올리고뉴클레오타이드 단일가닥의 어닐링을 통해 리간드-이중가닥 올리고뉴클레오타이드 구조체를 제조할 수 있다. 상기 제조방법에 있어서 (3) 단계에서 합성된 올리고뉴클레오타이드 단일가닥의 서열과 상보적인 서열의 올리고뉴클레오타이드 단일가닥을 합성하는 단계 (4)는 독립적인 합성과정으로서 (1) 단계 이전 또는 (1) 단계 내지 (6) 단계 중 어느 한 과정 중에 수행되어도 무방하다.
- [0169] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명에 따른 이중가닥 올리고뉴클레오타이드 구조체를 포함하는 나노입자에 관한

것이다. 본 발명에 따른 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체의 경우, 소수성 물질의 소수성 상호작용에 의하여 자기조립 나노입자를 형성하게 되는데 (대한민국 등록특허공보 제1224828호), 이러한 나노입자는 체내로의 전달 효율 및 체내에서의 안정성이 극히 우수할 뿐만 아니라, 입자 크기의 균일성이 우수하여 QC(Quality Control)가 용이하므로 약물로서의 제조 공정이 간단하다.

[0170] 본 발명에서, 상기 나노입자는 상이한 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 1종 이상, 바람직하게는 2종 이상의 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체가 혼합되어 구성되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 예를 들어, 상기 나노입자는 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 센스 가닥과 이에 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하는 한 종류의 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 포함할 수도 있고, 또 다른 양태로서, 서열번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 센스 가닥과 이에 상보적인 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함하는 서로 다른 종류의 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 함께 포함할 수 있으며, 본 발명에서 개시되지 않은 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오티드를 함께 포함할 수도 있을 것이다.

[0172] 본 발명은 다른 관점에서, 본 발명에 따른 이중가닥 올리고뉴클레오티드, 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체 또는 나노입자를 유효성분으로 함유하는 코로나바이러스감염증-19 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0173] 본 발명의 조성물에는 투여를 위하여 상기 기재된 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조될 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 본 발명의 유효성분과 양립 가능하여야 하며, 식염수, 멸균 수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 한 성분 또는 둘 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있고, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁 액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형으로 제제화 할 수 있다. 특히, 동결건조(lyophilized)된 형태의 제형으로 제제화하여 제공하는 것이 바람직하다. 동결건조 제형 제조를 위해서 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 알려져 있는 방법이 사용될 수 있으며, 동결건조를 위한 안정화제가 추가될 수도 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 레밍톤 약학 과학(Remington's pharmaceutical Science, Mack Publishing company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질병에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0174] 본 발명의 조성물은 통상의 환자의 증후와 질병의 심각도에 기초하여 본 기술분야의 통상의 전문가가 결정할 수 있다. 또한 산제, 정제, 캡슐제, 액제, 주사제, 연고제, 시럽제 등의 다양한 형태로 제제화할 수 있으며 단위-투여량 또는 다-투여량 용기, 예를 들면 밀봉된 앰플 및 병 등으로 제공될 수도 있다.

[0175] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비 경구 투여가 가능하다. 본 발명에 따른 조성물의 투여경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 구강, 흡입용, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 장관, 설하 또는 국소 투여가 가능하다.

[0176] 특히 코로나바이러스감염증-19이 호흡기 질환이라는 점에서, 비내 투여, 바람직하게는 스프레이 방식을 이용한 비내 투여, 기관지내 점적주입을 통한 폐로의 투여가 가능하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0177] 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 방법, 배설율 또는 질병의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 본 기술분야의 통상의 전문가가 용이하게 결정할 수 있다. 또한, 임상 투여를 위해 공지된 기술을 이용하여 본 발명의 조성물을 적합한 제형으로 제제화할 수 있다.

[0178] 본 발명의 일 양태에서는 페럿을 이용하여, 본 발명에 따른 SARS-CoV-2 서열을 타겟으로 SAMiRNA™를 SARS-CoV-2 바이러스를 감염시킨 페럿에 투여하고, 페럿의 비강 세척액 (Nasal wash)에서 qRT-PCR로 SARS-CoV-2 copy number 측정결과 피하주사 및 기관지 투여군에서 SARS-CoV-2 바이러스 수가 감염대조군 대비 유의적으로 감소되는 것을 확인하였으며, TCID50을 이용한 바이러스 역가 측정 결과 피하주사 투여군과 피하주사 및 기관지 투여군 모두 감염대조군 대비 통계적 유의하게 바이러스 역가가 감소한 것을 확인하였다 (도 5).

[0180] 본 발명은 다른 관점에서, 본 발명에 따른 약학조성물을 포함하는 동결건조 된 형태의 제형에 관한 것이다.

[0181] 본 발명은 다른 관점에서, 본 발명에 따른 코로나바이러스감염증-19 치료용 약학 조성물을 코로나바이러스감염증-19 치료를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 코로나바이러스감염증-19 치료방법에 관한 것이다.

[0182] 본 발명은 또 다른 관점에서 코로나바이러스감염증-19 치료에 사용하기 위한 상기 이중가닥 올리고뉴클레오티드, 이를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오티드 구조체 및 나노입자에 관한 것이다.

[0183] 본 발명의 또 다른 관점에서 코로나바이러스감염증-19 치료에 사용하기 위한 상기 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0184] 본 발명은 또 다른 관점에서 코로나바이러스감염증-19 치료를 위한 약물의 제조를 위한 상기 이중가닥 올리고뉴클레오타이드, 이를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오타이드 구조체 및 나노입자의 용도에 관한 것이다.

발명의 효과

[0186] 본 발명에 따른 SARS-Cov-2 특이적 이중가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 이중가닥 올리고뉴클레오타이드 구조체 및 이를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 부작용 없이 높은 효율로 SARS-Cov-2의 발현을 억제할 수 있어, 코로나바이러스감염증-19 치료에 탁월한 효과를 거둘 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0188] 도 1은 SARS-CoV-2 특이적 올리고뉴클레오타이드 후보 서열 디자인을 위하여 genome에서 1-염기 슬라이딩 윈도우 알고리즘(1-base sliding window algorithm)을 적용하여 19개의 염기로 구성된 후보 서열을 선별하는 과정을 나타낸다.

도 2A 및 도 2B는 SAMiRNA 처리 Huh7 세포주에 COVID-19 감염 후 E와 Rdrp 유전자 Ct값 측정 결과를 나타낸다.

도 3은 SAMiRNA-COVID19의 in-vivo 항 바이러스 효능 평가를 위한 과정을 나타낸다.

도 4는 SAMiRNA-COVID19의 in-vivo 항 바이러스 효능 평가에서, 족제비의 체중 및 체온 변화를 나타낸다.

도 5는 SAMiRNA-COVID19의 in-vivo 항 바이러스 효능 평가에서, 족제비의 비강 세척액 샘플 내 SARS-CoV-2 바이러스 RNA copy 수 및 바이러스 역가 특정 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0189] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0191] 실시예 1. SARS-CoV-2 타겟으로 하는 올리고뉴클레오타이드 스크리닝을 위한 알고리즘과 후보 서열 선정

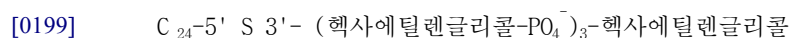
[0192] siRNA 기초 치료제 고속대량 스크리닝(siRNA based drug high-throughput screening)은 RNA virus genome 서열 전체에 대해 슬라이딩 윈도우 알고리즘(sliding window algorithm)을 적용하여 가능한 모든 후보 서열을 생성하고 상동성 필터링(homology filtering)을 진행하여 불필요한 후보 서열을 제거하고 최종적으로 선별된 모든 올리고뉴클레오타이드에 대해 해당 virus의 복제의 저해 정도를 확인하는 방법이다.

[0193] SARS-CoV-2 대한 올리고뉴클레오타이드 후보 서열에 대한 디자인 과정은 SARS-CoV-2 reference genome (NC_045512.2, 29,903 bp)에 대해 1-염기 슬라이딩 윈도우 알고리즘(1-base sliding window algorithm)을 적용하여 19개의 염기로 구성된 29,885개의 후보 서열을 생성하였다(도 1).

[0194] 생성된 올리고뉴클레오타이드 후보서열 리스트를 인간 총 참고 서열 RNA(human total reference seq RNA)에 대한 BLAST e-value 100 이하로 수행하여 인간 유전자와 RNA 서열에 대해 동일성(identity)이 15 염기 이하인 6,885개의 후보 서열을 선별하였다. 이를 SARS-CoV (NC_004718.3, 29,751 bp)에 대해 19 염기가 모두 일치하는 후보 서열 560개를 선별하였고 siRNA 효율을 고려하여 GC content 30~60 구간으로 480개를 최종 선별하였다.

[0196] 실시예 2. 이중가닥 올리고 RNA 구조체의 합성

[0197] 본 발명에서 제조된 이중가닥 올리고 RNA 구조체(SAMiRNA)는 하기 구조식과 같은 구조를 갖는다.



[0202] monoSAMiRNA(n=4) 이중가닥 올리고 구조체의 센스 가닥은 3,4,6-트리아세틸-1-헥사(에틸렌글리콜)-N-아세틸 갈락토사민-썬피지 (1-Hexa(Ethylene Glycol)- N-Acetyl Galactosamine-CPG를 지지체로 하여, 친수성 물질 단량

체인 DMT핵사에틸렌글리콜 포스포아미다이트(Demethoxytrityl hexaethylene glycol p hosphoramidate) 3개를 상기 반응을 통해 연속하여 결합한 후, RNA 또는 DNA 합성을 진행한 다음, 추가적으로 5' 말단 부위에 소수성 물질인 이황화 결합이 포함되어있는 C₂₄ (C₆-S-S-C₁₈) 을 결합시켜, 3' 말단에 NAG-핵사에틸렌글리콜-($-PO_3^-$ 핵사에틸렌글리콜)₃이 결합되어 있고, 5' 말단에 C₂₄ (C₆-S-S-C₁₈) 이 결합되어 있는 monoSAMiRNA(n=4)의 센스 가닥을 만들었다.

[0203] 합성이 완료되면 60℃의 온탕기(water bath)에서 28 %(v/v) 암모니아(ammonia)를 처리하여 합성된 RNA 단일가닥 및 올리고(DNA 또는 RNA) -고분자 구조체를 CPG로부터 떼어낸 뒤, 탈보호(deprotection) 반응을 통해 보호 잔기를 제거하였다. 보호 잔기가 제거된 RNA 단일가닥 및 올리고(DNA 또는 RNA)- 고분자 구조체는 70℃의 오븐에서 엔-메틸피롤리돈(N-methylpyrrolid on), 트리에틸아민(triethylamine) 및 트리에틸아민트리하이드로플로라이드(triethylaminetrihydrofluoride)를 부피비 10:3:4의 비율로 처리하여 2' TBDMS(tert-butyldimethylsilyl)를 제거하였다. 상기 반응물들로부터 고속 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)로 RNA 단일 가닥, 올리고(DNA 또는 RNA)-고분자 구조체 및 리간드가 결합된 올리고(DNA 또는 RNA)-고분자 구조체를 분리하고, 이를 MALDI-TOF 질량 분석기(MALDI TOF-MS, SHIMADZU, 일본)로 분자량을 측정하여, 합성하고자 하는 염기서열 및 올리고-고분자 구조체와 부합하는지 확인하였다. 그 후, 각 각의 이중가닥 올리고 구조체를 제조하기 위하여 센스 가닥과 안티센스 가닥을 동량 혼합하여 1X 어닐링 버퍼(30 mM HEPES, 100 mM 칼륨 아세테이트(Potassium acetate), 2 mM 마그네슘 아세테이트(Magnesium acetate), pH 7.0~7.5)에 넣고, 90℃ 항온수조에서 3분 반응시킨 후 다시 37 °C에서 반응시켜, 목적하는 SAMiRNA를 제조하였다. 제조된 이중가닥 올리고 RNA 구조체들은 전기영동을 통해 어닐링을 확인하였다.

[0205] **실시예 3. SARS-CoV-2를 타겟으로 하여 RNAi를 유도하는 SAMiRNA 나노입자의 고속대량스크리닝**

[0206] **3.1 SAMiRNA 나노입자의 제조**

[0207] 실시예 2에서 합성된 SARS-CoV-2 서열을 타겟으로 하는 960종의 SAMiRNA를 1X Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS) (WELGENE, KR)에 녹인 다음 96-well Filtration Plate MultiScreen_{HTS} GV Filter Plate, 0.22 μm, clear, sterile (MERCK, DE)로 필터한 다음 본 발명을 위한 실험에 사용하였다.

[0208] **3.2 SAMiRNA 나노입자의 세포 내 처리 방법**

[0209] SARS-CoV-2의 발현을 억제하는 SAMiRNA 발굴을 위하여 인간 유래 간암 세포주인 Huh7를 이용하였으며, SAMiRNA 처리 (treatment) 24시간 전 96-웰 플레이트(Well plate)에 Huh-7 cell(JCRB, JP)을 접종(seeding)하였다. RPMI 1640 (sh30027.01) (Hyclone, US) 배지를 세포 배양액으로 사용하여 1 well 당 100ul씩 넣어 37℃5% CO₂의 조건으로 세포를 배양하였다. 배지의 조성은 RPMI 1640에 2.05mM의 L-Glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin (Hyclone, US), 그리고 10% Fetal Bovine Serum (Hyclone, US)이 추가되었다. SAMiRNA 후보물질은 두 반복으로 배지 교체와 함께 10uM 농도 1회 처리 후 24시간 동안 37℃5% CO₂의 조건으로 세포를 배양하였다.

[0210] **3.3 세포 내 SARS-CoV-2 감염 방법**

[0211] 실시예 3.2에서 배양된 96-well cell culture plate의 배지를 제거한 다음 준비된 0.01 MOI의 virus를 각 웰에 처리하여 1시간 30분 동안 감염시켰다. 이후 2% Fetal Bovine Serum이 포함된 RPMI 1640 배지(virus growth media)로 교환하여 2일간 37℃5% CO₂의 조건으로 세포를 배양하였다. 마지막으로 세포 배양 플레이트에서 세포 배양액을 수득 후 ExiprepTM96 Viral DNA/RNA Kit (BIONEER, KR)의 카트리지 1번(Lysis buffer), Proteinase K와 혼합한 다음 65℃, 2시간 배양하였다.

[0212] **3.4 SARS-CoV-2 gRNA 발현 억제효능 분석을 통한 SAMiRNA 스크리닝**

[0213] 실시예 3.4에서 수득한 세포 배양액에서 gRNA 추출하기 위하여 핵산 추출 자동화 장비인 ExiPrepTM96 lite (BIONEER, KR)와 ExiprepTM96 Viral DNA/RNA Kit (BIONEER, KR)를 이용하였다. 추출된 핵산은 AccuPower[®] SARS-CoV-2 Real-Time RT-PCR Kit (BIONEER, KR)의 제조사 매뉴얼에 따라 E와 Rdrp 유전자를 ExicyclerTM96 Real-Time Quantitative Thermal Block (BIONEER, KR)로 50℃30분, 94℃10분, 그리고 95℃15초와 60℃1분을 45 반복하여 RT-qPCR로 분석 하였다.

[0214] SAMiRNA가 처리된 바이러스 감염 세포 배양 샘플에서 얻어지는 E 및 Rdrp 유전자의 생물학적/기술적 반복으로

도출되는 모든 Ct 값을 정렬하였다. 상기 결과물에서 SARS-CoV-2의 유전자 영역별 최적의 SAMiRNA 후보군을 선별하였다. 선별된 SAMiRNA 후보군은 COVID19 데이터베이스에 등록된 7259종의 서열과 비교하여 유전자 서열 변이를 검정 하였다.

[0215] 그 결과 표 2에 도시된 바와 같이 SARS-CoV-2 저해능을 보유하는 10종의 SAMiRNA를 최종 선별하였다. 선별된 SAMiRNA 후보군은 기재된 순서대로 각각 서열 번호 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10의 서열을 가지는 SAMiRNA이다. 선별된 서열번호 1 내지 10은 각각 도 2의 #161, #214, #233, #246, #249, #544, #625, #707, #715, #758과 일치한다.

표 2

[0216] 1-염기 슬라이딩 윈도우 스크리닝(1-base sliding window screening)으로 선별된 SARS-CoV-2 특이적 올리고뉴클레오티드 후보

서열 번호	Accession No.	위치	센스가닥 서열	서열 번호	안티센스가닥 서열	Identity
1	NC_045512.2	15094~15112	AATAGAGCTCGCACCGTAG	11	CUACGGUGCGAGCUCUAUU	99.99%
2	NC_045512.2	17088~17106	TGGTACTGGTAAGAGTCAT	12	AUGACUCUUACCAGUACCA	99.83%
3	NC_045512.2	18255~18273	GTTTATCACCCGCGAAGAA	13	UUCUUCGCGGGUGAUAAAC	99.92%
4	NC_045512.2	20457~20475	CATAACAGATGCGCAAACA	14	UGUUUGCGCAUCUGUUAUG	99.89%
5	NC_045512.2	20776~20794	ATAATGATGAATGTCGCAA	15	UUGCGACAUUCAUUAUU	99.96%
6	NC_045512.2	10488~10506	TTAAAACCAACTACCAC	16	GUGGUAGUGUUGUUUUAA	100.00%
7	NC_045512.2	15038~15056	ATAGTAGGGATGACATTAC	17	GUAAUGUCAUCCUACUAU	100.00%
8	NC_045512.2	17957~17975	TCTCTATCAGACATTATGC	18	GCAUAAUGUCUGAUAGAGA	100.00%
9	NC_045512.2	18257~18275	GCTTCTTCGCGGGTGATAA	19	UUAUCACCCGCGAAGAAGC	99.94%
10	NC_045512.2	25509~25527	CCATCCGAAAGGGAGTGAG	20	CUCACUCCCUUCGGAUGG	99.71%

[0218] 실시예 4. SARS-CoV-2 감염 페럿(Ferret) 모델에서 SAMiRNA™의 증상 완화 효능 평가

[0219] 4.1 SAMiRNA™ 나노입자의 제조

[0220] 표 2에서 확보된 SARS-CoV-2 서열을 타겟으로 하는 10종의 SAMiRNA™ 혼합물을 1X Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS) (WELGENE, KR)에 녹인 다음 96-well Filtration Plate MultiScreen_{HTS} GV Filter Plate, 0.22 μm, clear, sterile (MERCK, DE)로 필터한 다음 본 발명을 위한 실험에 사용하였다.

[0221] 4.2 SARS-CoV-2 감염 페럿 동물 시험 방법

[0222] 평균 15월령 암컷 페럿(아이디바이오, 한국) 총 11 마리를 감염후 무처리 대조군 3 마리, 피하투여(sc)군 4 마리 및 피하 및 기관지(sc +intratracheal) 투여군 4 마리로 나누어 실험을 진행하였다.

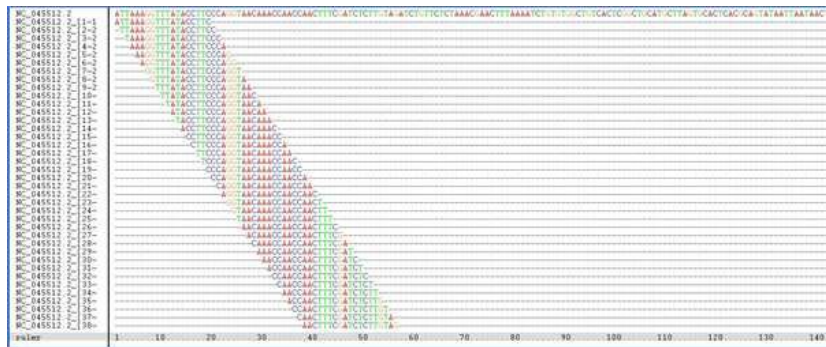
[0223] 페럿의 비강과 기관지에 SARS-CoV-2 (CBNU-nCoV-01)를 $1 \times 10^{5.5}$ TCID₅₀/mL로 각 0.5 mL씩 총 1.0 mL을 접종하였다. 바이러스 감염 24시간 후, 각 실험동물에 피하주사(50mpk), 피하주사(50mpk) 및 기관지(500u1) 경로로 SAMiRNA™ 나노입자를 단 회 투여되었다.

[0224] 바이러스 감염 전 0일째, 감염 후 2, 4, 6, 8, 10일째에 대조군 및 시험군의 개별 개체의 체중 및 체온 변화를 측정하고 비강 세척액 샘플을 채취하였다(도 3). 채취한 샘플은 TCID50방법을 이용하여 바이러스 역가를 측정하거나, RNA를 추출한 다음 AccuPower[®] SARS-CoV-2 Real-Time RT-PCR Kit (BIONEER, KR)의 제조사 매뉴얼에 따라 qRT-PCR로 viral RNA copy number를 절대 정량 분석 하였다.

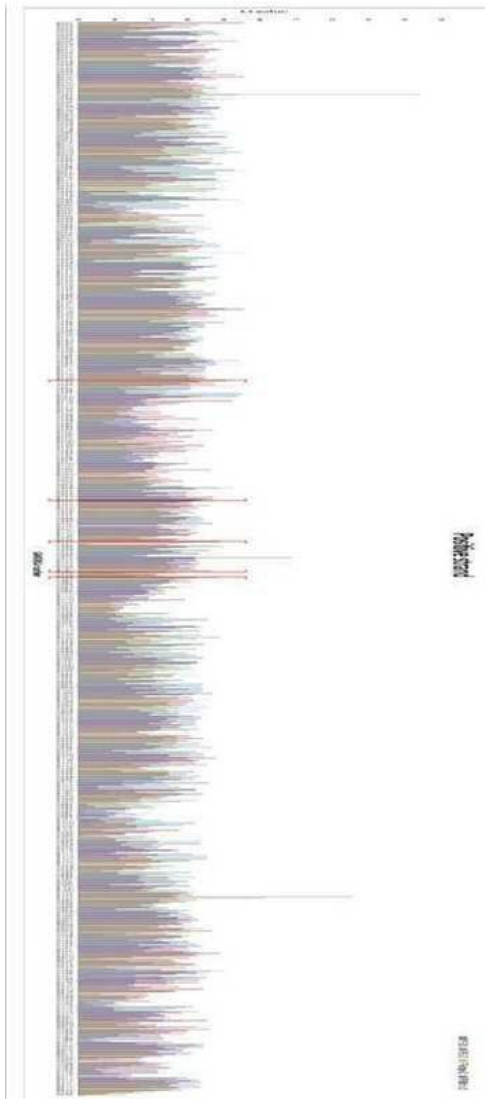
- [0225] 그 결과, 바이러스 감염 후 폐렴의 체중은 감염 전 대비 7-8% 줄어들었으며, 체온은 4dpi 일 때 평균 0.5°C 이상 상승 후 회복되었으며, SAMiRNA 처리에 의한 유의적 차이는 없었다(도 4).
- [0226] 폐렴의 비강 세척액(Nasal wash)에서 qRT-PCR로 SARS-CoV-2 copy number 측정결과 8dpi의 피하주사 및 기관지 투여군에서 SARS-CoV-2 바이러스 수가 감염대조군 대비 유의적으로 감소되었다 (도 5A).
- [0227] TCID50을 이용한 바이러스 역가 측정 결과 4dpi의 피하주사 투여군과 피하주사 및 기관지 투여군 모두 감염대조군 대비 통계적 유의하게 바이러스 역가가 감소하였다. 피하주사 및 기관지 투여군은 6dpi에서도 감염대조군 대비 통계적 유의성을 확인하였다 (도 5B).
- [0229] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 이용될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면

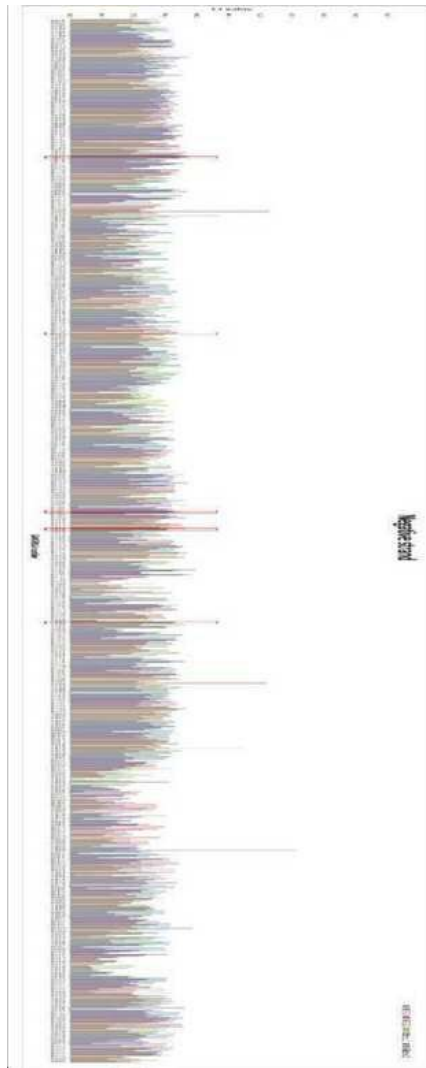
도면1



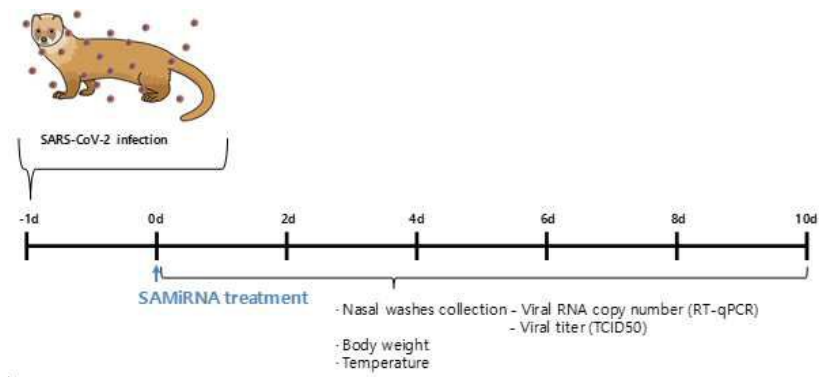
도면2a



도면2b

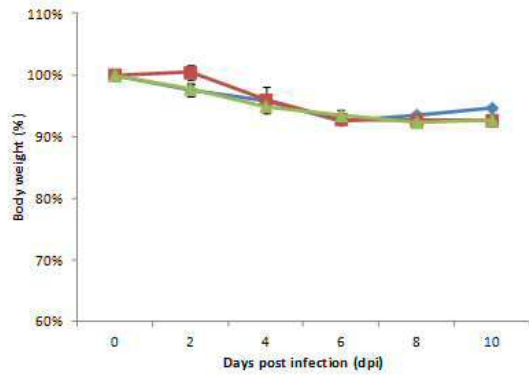


도면3

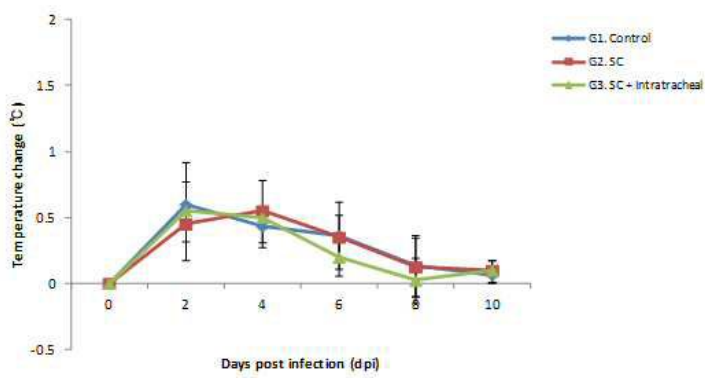


도면4

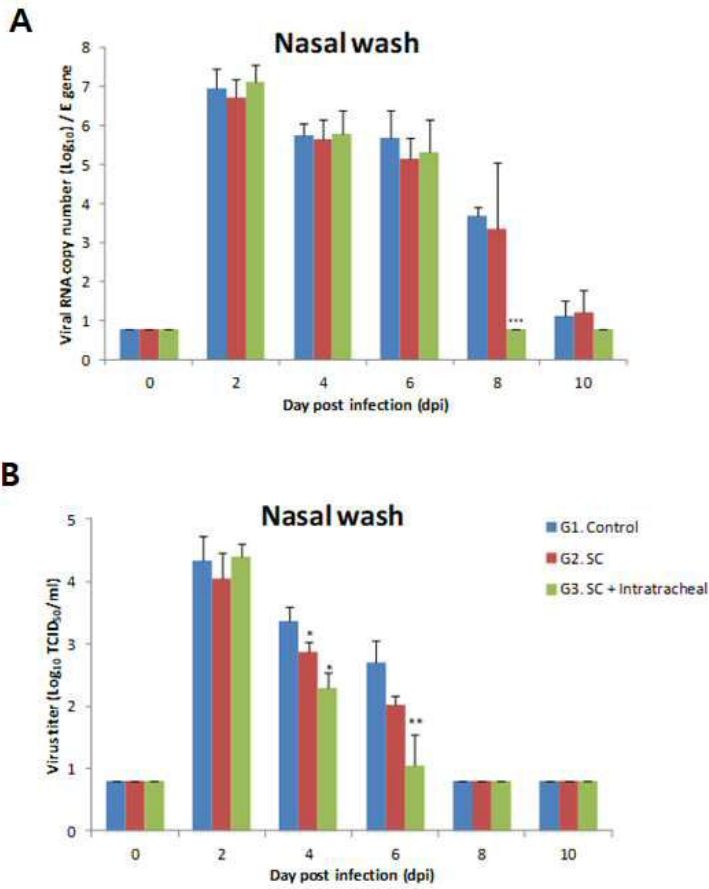
A



B



도면5



서열목록

- <110> Bioneer Cooperation
- <120> Double Strand Oligonucleotide and Composition for Treating COVID-19 Infection Containing Thereof
- <130> P21-B104
- <150> KR 2020-0061828
- <151> 2020-05-22
- <160> 20
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
- <400> 1

aatagagctc gcaccgtag

<210> 2
 <211> 19
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 2
 tggtagctggg aagagtcac 19
 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 3
 gttatcacc cgcgaagaa 19
 <210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide

 <400> 4
 cataacagat gcgcaaaca 19
 <210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 5
 ataatgatga atgtcgcaa 19
 <210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide

<400> 6
 ttaaaaccaa cactaccac 19

<210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 7
 atagtaggga tgacattac 19

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 8
 tctctatcag acattatgc 19

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 9
 gcttcttcgc gggtgataa 19

<210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 10
 ccatccgaaa gggagtgag 19

<210> 11
 <211> 19
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 11
 cuacggugcg agcucuauu 19

<210> 12
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 12
 augacucuua ccaguacca 19

<210> 13
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 13
 uucuucgagg gugauaac 19

<210> 14
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <

220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 14
 uguuugcgca ucuguuauug 19

<210> 15
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 15
 uugcgacauu caucauuau 19

<210> 16

<211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 16
 gugguagugu ugguuuuaa 19

<210> 17
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 17
 guaaugucuu ccuacuau 19

<210> 18
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 18
 gcuaaaguc ugauagaga 19

<210> 19
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 19
 uuaucacccg cgaagaagc 19

<210> 20
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SARS-CoV-2 specific oligonucleotide
 <400> 20

cucacuccu uucggaugg

19