



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0139056
(43) 공개일자 2024년09월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/57 (2006.01) A61K 38/05 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/57 (2013.01)
A61K 38/05 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7024942
- (22) 출원일자(국제) 2023년01월19일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년07월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2023/051296
- (87) 국제공개번호 WO 2023/139182
국제공개일자 2023년07월27일
- (30) 우선권주장
22305072.5 2022년01월24일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
인세름 (앵스띠뛰 나찌오날 드 라 쌍떼 예 드 라
흐쉴르슈 메디칼)
프랑스공화국, 에프-75013 빠리, 뤼 드 툴비악
101
유니베르시떼 파리 시떼
프랑스 75006 파리 생 제르맹 블러바드 85
- (72) 발명자
라포르쥬, 미레이유
프랑스, 75019 빠리, 볼르바르 쉐뤼리에 48, 인세
름-위니베르시떼 드 빠리 / 뇌로킨 / 인세름 위엠
에르1141
그레셴, 뻬에르
프랑스, 75019 빠리, 볼르바르 쉐뤼리에 48, 인세
름-위니베르시떼 드 빠리 / 뇌로킨 / 인세름 위엠
에르1141
- (74) 대리인
특허법인오리진

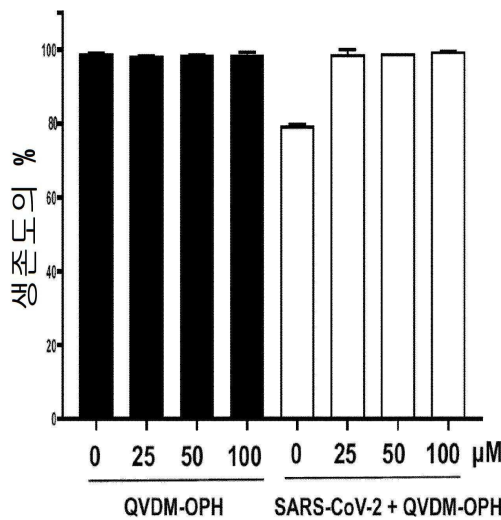
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 SARS-COV-2에 의해 야기되는 감염을 예방 및/또는 치료하는 데 사용하기 위한 화합물

(57) 요약

본 발명은 SARS-CoV-2에 의해 유발되는 바이러스 감염의 치료 및/또는 예방의 분야와 관련된다. 본 발명자들은 N-(2(퀴놀릴)-발틸-O-메틸아스파르틸-(2,6-디플루오로페녹시)메틸 케톤이 SARS-Cov-2 복제를 시험관 내 및 생체 내 모두에서 억제할 수 있음을 발견하였고, 이러한 억제는 상기 화합물(N-(2(퀴놀릴)-발틸-O-메틸아스파르틸-(2,6-디플루오로페녹시)메틸 케톤)의 비-O-메틸화된 형태에서 획득되는 것과 비교할 때 더욱 중요한 것임을 발견하였다. 따라서, 본 발명은 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 감염을 치료 및/또는 예방하는 데 사용하기 위한 N-(2(퀴놀릴)-발틸-O-메틸아스파르틸-(2,6-디플루오로페녹시)메틸 케톤 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물과 관련된다. 본 발명은 또한 동일한 용도를 위한 이러한 화합물을 포함하는 약제학적 조성물 및 부품 키트(kit of parts)에 관한 것입니다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

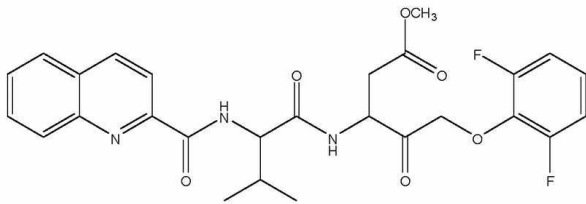
명세서

청구범위

청구항 1

화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을, 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 방법:

[화학식 (I)]



청구항 2

유효 성분으로서, 제1항에서 정의되는 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 포함하는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 비히클을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 적어도 하나의 추가 치료제를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 5

하기를 포함하거나 이로 이루어지는 부품들의 키트를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 방법:

- 제1항에서 정의되는 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, 또는 제2항 내지 제4항들 중의 어느 한 항에서 정의되는 바와 같은 약제학적 조성물; 및
- 적어도 하나의 추가 치료제, 또는 적어도 하나의 추가 치료제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가 치료제가 항-바이러스제, 항-염증제, 진통제, 근이완제, 마취제, 이뇨제 및 항생제로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가 치료제가 N-(2(퀴놀릴)-발릴-글루타미드)-(2,6-디플루오로페녹시)메틸 케톤 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물인, 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 항-바이러스제가 바이러스 RNA-의존성 RNA 중합효소 조절자 또는 융합 억제제인, 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 항-염증제가 모노클로날 항체인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 SARS-CoV-2로 감염된 대상체에서 바이러스 복제 및/또는 바이러스 단백질 합성을 방지, 억제 및/또는 감소시키도록 구현되는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 COVID-19 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 급성 호흡 부전 및 간 또는 심장 손상과 같은 COVID-19의 합병증을 예방하도록 구현되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 바이러스 감염 특히 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염의 치료 및/또는 예방의 분야에 속한다.
- [0002] 실제로 본 발명은 N-(2(퀴놀릴)-발릴-O-메틸아스파르틸-(2,6-디플루오로페녹시)메틸 케톤(N-(2(quinolyl)-valyl-O-methylaspartyl-(2,6-difluorophenoxy)methyl ketone) 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물인 특정 화합물 및 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 감염을 치료 및/또는 예방하는 데 사용하기 위한 이러한 화합물을 포함하는 약제학적 조성물 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 코로나바이러스는 코로나바이러스 과(*Coronaviridae* family)에 속하는 단일-가닥의, 외피 보유 RNA 바이러스이다.
- [0004] 2000년대 초반부터, 코로나바이러스에 의해 야기되고 인간에게 영향을 주는 여러 중증(severe) 감염이 나타났다. 실제로, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV: severe acute respiratory syndrome coronavirus)가 2002년 11월 중국에서 처음 확인된 한편으로 인간에게 중중이고 때로는 치명적인 기도 감염을 야기하는 다른 코로나바이러스가 2012년 6월 사우디아라비아에서 검출되었으며 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV: Middle East Respiratory Syndrome coronavirus)로 명명되었다.
- [0005] 2019년 12월에는 신종 코로나바이러스에 의해 야기된 폐렴 사례들의 발발이 중국 우한에서 발생하여 전 세계적으로 신속하게 확산되었다. 세계보건기구(WHO: World Health Organization)는 해당 코로나바이러스를 먼저 2019-nCoV로 명명 한 다음에 SARS-CoV-2로 그리고 관련 질환을 코로나바이러스 질환 2019(COVID-19)로 명명하였다. 질환이 신속하게 전 세계적으로 확산되었기 때문에, WHO는 2020년 3월 11일에 이 질환을 팬데믹(pandemic)으로 선언하였다.
- [0006] 게놈 시퀀스(genome sequence)의 수준에서, 처음으로 확인된 SARS-CoV-2는 SARS-CoV와는 대략 80% 그리고 MERS-CoV와는 대략 50% 뉴클레오티드 동일성을 나타낸다. 게다가, SARS-CoV-2는 빠르게 SARS-CoV 및 MERS-CoV보다 덜 심각하기는 하나 보다 더 전염성이 강한 것으로 간주되었다.
- [0007] SARS-CoV-2로 감염된 대부분의 사람들은 하기 징후들: 열(fever), 두통(headache), 근육통(muscle pain), 피로감(fatigue), 마른 기침(dry cough), 호흡곤란(dyspnea), 미각 상실(loss of taste) 및 후각 상실(loss of smell) 중의 적어도 하나의 증상을 가지고 경미(mild) 내지 중등도(moderate)의 호흡기 질환을 나타내지만 특별한 치료를 필요로 함이 없이 회복된다. 그럼에도 불구하고, 고령자와 COVID-19가 예를 들어 비만(obesity), 심혈관 질환(cardiovascular disease), 당뇨병(diabetes), 만성 호흡기 질환(chronic respiratory disease) 및 암(cancer)과 같은 다른 의학적 질환 또는 문제와 연관되어 있는 사람은 심각한 질병으로 발달할 수 있다. 이러한 경우, 질병은 COVID-19 연관 폐렴(COVID-19 associated pneumonia) 또는 COVID-19 폐렴(COVID-19 pneumonia)으로도 공지된 폐렴 및/또는 다-기관 부전(multi-organ failure)으로 진행될 수 있다. COVID-19의 합병증에는 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS: acute respiratory distress syndrome), 급성 호흡 부전(acute

respiratory failure) 및 간 또는 심장 손상이 포함될 수 있다.

[0008] 위의 관점에서, 수많은 기업 및 공공 연구 기관에서는 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 감염을 예방 및/또는 치료할 수 있는 항-바이러스 화합물을 확인하는 것을 추구하였다.

[0009] 국제출원 WO 2021/228846에서, 본 발명자는 이미, 잠재적인 항-SARS-CoV-2 화합물로서, N-(2(퀴놀릴)-발릴-글루타미드(2,6-디플루오로페녹시)메틸 케톤(N-(2(quinolyl)-valyl-glutamyl(2,6-difluorophenoxy)methyl ketone)을 제안하였다. 이는 "QVE-Oph", "퀴놀릴-Val-Glu-Oph(Quinolyl-Val-Glu-Oph)" 또는 "QVD-Oph 음성 대조"로도 공지되어 있다. 실제로, 두 화합물이 QVD-Oph의 경우 아스파르트산(Asp 또는 D) 그리고 QVE-Oph의 경우 글루탐산(Glu 또는 E)인 하나의 아미노산의 측쇄에 의해 서로 상이하기 때문에 QVD-Oph, 즉 N-(2(퀴놀릴)-발릴-아스파르트(2,6-디플루오로페녹시)메틸 케톤(N-(2(quinolyl)-valyl-aspartyl-(2,6-difluorophenoxy)methyl ketone)은 화학적으로 QVE-Oph에 매우 가깝다. 활성의 면에서, QVD-Oph는 광범위한 카스파제 억제제(caspase inhibitor)인 한편으로 QVE-Oph는 카스파제 억제 활성을 나타내지 않으며 따라서 음성 대조로 사용된다.

[0010] QVD-Oph는 또한 메틸화 형태, 특히 O-메틸화 형태(O-methylated form)로 구현될 수 있다. 본 개시에서 QVDM-Oph로 지명된 이러한 형태에서, 아스파르트산의 측쇄의 카복실기(carboxyl group)의 수소 원자가 에스테르화 반응을 통해 메틸기로 치환된다. QVD-Oph는 이미 국제 출원 WO 2009/092897에서 항-바이러스 화합물로서 제안되었다. 특히, 이 출원에서 제공된 실험 데이터는 카스파제 억제 활성의 덕분으로 QVD-Oph가 HIV-감염 세포의 세포자멸 표현형을 억제하고 바이러스 복제 또한 억제한다는 것을 나타내었다. QVD-Oph의 잠재적인 항-HIV 활성은 문헌[Laforge et al, 2018 (J. Clin. Invest., vol. 128, pages 1627-1640)]에 의해 확인되었으며, 여기에서 바이러스 복제의 장기적인 제어를 가능하게 하는 QVD-Oph 치료의 덕분으로 SIV-감염 레서스 마카크(SIV-infected rhesus macaques)에서의 AIDS 질환 진행이 방지된다. 그럼에도 불구하고, 국제 출원 WO 2009/092897 또는 문헌[Laforge et al, 2018]에서는 다른 유형의 바이러스에 대한 데이터는 제공되지 않았다.

[0011] QVE-Oph가 어떠한 카스파제 억제 활성을 나타내지 않더라도, 본 발명자는 국제 출원 WO 2021/228846에서 이러한 화합물이 바이러스 복제 특히 HIV 바이러스 복제 및 SARS-CoV-2 바이러스 복제를 억제할 수 있다는 것을 입증하였다. 실제로 이러한 화합물은 세포 내 복제를 억제함으로써 그리고 어떠한 독성도 수반함이 없이 바이러스 생성 및 새로운 감염을 억제함으로써 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 시험관 내 감염을 제어하는 데 매우 효과적이다. QVE-Oph의 항-SRAS-CoV-2 활성에 대한 실험 데이터는 단지 시험관 내 데이터이다. 게다가, 본원은 HIV에 관한 실험에 대해서만 QVE-Oph와 QVD-Oph 및 QVDM-Oph를 비교하고 있다는 것에 유의해야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자는 개선된 특성을 수반하는 추가적인 항-SARS-CoV-2 화합물(들)을 확인하는 것을 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 발명자에 의해 설정된 목적에 도달할 수 있도록 한다.

[0014] 실제로, 본 발명자는 시험관 내 및 생체 내 둘 모두에서 QVDM-Oph가 SARS-CoV-2에 대한 억제 활성을 나타낸다는 것을 나타내었다. 보다 구체적으로, 이 화합물은 세포 내부에서의 바이러스 복제를 억제함으로써 그리고 어떠한 독성도 수반함이 없이 시험관 내 바이러스 생성 및 새로운 감염을 예방함으로써 시험관 내 SARS-CoV-2 감염의 조절에 효과적이다. 게다가, QVDM-Oph의 항-SRAS-CoV-2 활성은 COVID-19로 고통받는 햄스터(hamsters)에서 생체 내에서 입증되었으며, 그로 인해 햄스터의 폐에서의 바이러스 복제가 QVDM-Oph 치료에 의해 현저하게 감소된다. 본원의 출원 당시, QVDM-Oph가 그러한 활성을 가질 것이라는 것은 전혀 명백하지 않았다. 비록 QVE-Oph가 국제 출원 WO 2021/228846에서 항-HIV 및 항-SARS-CoV-2 화합물로서 기술되어 있기는 하나, 이는 항-HIV 활성에 대해 공지된 QVDM-Oph가 의심할 여지 없이 항-SARS-CoV-2 활성을 갖는다는 것을 의미하지는 않았다. 실제로, 한편으로는, HIV 와 SARS-CoV-2는 2가지의 전혀 상이한 형태의 바이러스, 즉 레트로바이러스(retroviruses)와 코로나바이러스(coronaviruses)에 속하며, 다른 한편으로는, QVD-Oph와 QVDM-Oph는 제한된 스펙트럼(spectrum)을 갖는 항바이러스제로 정의된다(국제 출원 WO 2021/228846의 6페이지, 8 내지 10행).

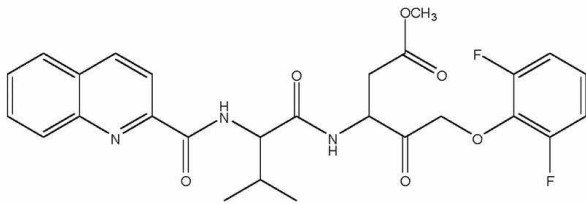
[0015] 심지어 보다 놀랍게도, 아래의 실시예 1에서의 바이러스 생산 및 새로운 감염의 예방에 대해 설명된 바와 같이, QVDM-Oph가 QVD-Oph 보다 더 강한 항-SARS-CoV-2 활성을 나타낼 것이라는 언급은 없었다(도 5 및 도 9). QVD-Oph와 QVDM-Oph의 차이와 관련하여, O-메틸화를 수반하지 않는 화합물이 보다 소수성이 될 하여 수성 매질에서

의 사용을 용이하게 한다는 것(문단 [057]) 그리고 QVD-OPh가 QVDM-OPh 보다 덜 안정적이라는 것(문단 [0068]) 이 언급되어 있다. 그러나, 이들의 항-바이러스 활성의 차이는 종래 기술에서 언급되거나 제안되지 않았다. 특히, 국제 출원 WO 2021/228846(30페이지, 24 내지 32행)에서 HIV의 바이러스 복제에 대한 QVE-OPh, QVD-OPh 및 QVDM-OPh에 대해 동일한 항-바이러스 효과가 관찰되었다.

[0016] 게다가, 본 발명자는 햄스터의 폐 내에서의 바이러스 부하(viral load) 및 바이러스 복제의 비교된 수준에 의해 확인된 바와 같이 COVID-19으로 고통받는 햄스터에서 생체 내에서 QVE-OPh 보다 더 강한 항-SRAS-Cov-2 활성을 나타낸다는 것을 나타내었다(도 10).

[0017] 결과적으로, 본 발명은 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하는 데 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물:

[0018] [화학식 (I)]



[0019] 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물에 관한 것이다.

[0021] 화학식 (I)의 화합물의 화학명은 N-(2-(퀴놀린)-발릴-0-메틸아스파르틸-(2,6-디플루오로페녹시)메틸 케톤, 즉 QVDM-OPh, 이는 QVD-OPh의 0-메틸화 형태이다. 화학식 (I)의 화합물은 참조번호 BIOV2787-1 및 BIOV2787-5 하에 VWR™으로 인계되는 Avantor™로부터 상용적으로 획득가능한 범-카스파제 억제제(pan-caspase inhibitor)이다.

[0022] 화학식 (I)의 화합물의 "약제학적으로 허용가능한 염(pharmaceutically acceptable salt)"이라는 표현은 약제학적으로 허용가능하고 화학식 (I)의 화합물의 생물학적 활성과 비교하여, 즉 화학식 (I)의 화합물의 항-SARS-CoV-2 활성과 비교하여 본질적으로 유사한 생물학적 활성을 갖는 염을 의미한다. 화학식 (I)의 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염이 무독성인 것은 명백하다. 전형적으로, 본 발명에서 구현되는 약제학적으로 허용가능한 염은 화학식 (I)의 화합물로부터 수득되는 임의의 산 부가 염(acid addition salt)이다. 이러한 산 부가 염은 무기 산 부가 염 또는 유기 산 부가 염일 수 있다. 이러한 산 부가 염의 예시적이고 비-제한적인 예로서, 염산염(hydrochloride), 염화물(chloride), 브롬산염(hydrobromide), 브롬화물(bromide), 인산염(phosphate), 인산 수소염(hydrogen phosphate), 인산이수소염(dihydrogen phosphate), 황산염(sulphate), 중황산염(bisulphate), 붕산염(borate), 아세트산염(acetate), 중주석산염(bitartrate), 탄산염(carbonate), 시트르산염(citrate), 포름산염(formate), 유산염(lactate), 질산염(nitrate), 옥살산염(oxalate), 스테아르산염(stearate) 및 숙신산염(succinate)이 언급될 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명에서 구현되는 화학식 (I)의 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염은 염산염이다. 이러한 염은 염산을 사용함으로써 수득될 수 있으며, 염산은 화학식 (I)의 화합물의 적어도 하나의 질소 원자와 복합체(complex)를 형성할 수 있다.

[0023] 화학식 (I)의 화합물의 "약제학적으로 허용가능한 용매화물(pharmaceutically acceptable solvate)"이라는 표현은 화학식 (I)의 화합물 및, 예를 들어, 에탄올(ethanol) 또는 물과 같은 화학양론적 또는 화학양론적 이하의 양의 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 용매 분자를 포함하는 분자 복합체를 의미한다. 용어 "수화물(hydrate)"은 상기 용매가 물인 경우를 의미한다.

[0024] 화학식 (I)의 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물은, 예를 들어, 침전 단계(precipitation step), 여과 단계(filtration step), 결정화 단계(crystallization step), 증발 단계(evaporation step), 동결 건조 단계(lyophilisation step) 및/또는 이온 교환 수지(ion exchange resins)를 포함하는 기술과 같이 당해 기술분야에서 충분히 공지된 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0025] 본 발명에서 구현되는 화합물 또는 그의 임의의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물은 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염의 예방 및/또는 치료를 위해 사용된다.

[0026] 용어 "치료하다(treat)", "치료하는(treating)" 및 "치료(treatment)"는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 상태 또는 질환, 특히 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염 및/또는 그와 연관되는 징후, 증상 및/또는

합병증을 완화(alleviating), 약화(attenuating) 또는 폐지(abrogating)하는 것을 포함하는 것을 의미한다. 상태 또는 질환과 연관되는 징후 또는 증상은 생화학적, 세포적, 조직학적, 기능적 또는 신체적, 주관적 또는 객관적인 것일 수 있다. 상태 또는 질환, 특히 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염과 연관되는 합병증은 COVID-19 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 급성 호흡 부전 및 간 또는 심장 손상일 수 있다.

[0027] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "예방(prevent)", "예방하는(preventing)" 및 "예방(prevention)"은 상태 또는 질환, 특히 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염 및/또는 그와 연관되는 징후, 증상 및/또는 합병증의 발병을 지연(delaying)시키거나 배제(precluding)하는 것 뿐만 아니라 상태 또는 질환, 특히 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염을 환자가 획득하는 것을 예방하거나 상태 또는 질환, 특히 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염을 획득하는 환자의 위험을 감소시키는 것을 포함하는 것을 의미한다.

[0028] 용어 "SARS-CoV-2"는, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 최초로 확인된 SARS-CoV-2 뿐만 아니라 그의 변종 또는 돌연변이로 이해된다. 최초로 확인된 SARS-CoV-2는 초기에 발견된 바이러스의 균주이며 바이러스의 균주는 또한 2019-nCoV, HCoV-19, SARS2, COVID-19 바이러스(COVID-19 virus), 우한 코로나바이러스(Wuhan coronavirus), 우한 수산물 시장 폐렴 바이러스(Wuhan seafood market pneumonia virus) 및 인간 코로나바이러스 2019(Human coronavirus 2019)로도 알려져 있다. 이 코로나바이러스(29903 bp ss-RNA)의 완전한 게놈은 NCBI("National Center for Biotechnology Information") 사이트 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>에서 참조 시퀀스 NC_045512.2로 접근가능하다.

[0029] 최초로 확인된 SARS-CoV-2의 "돌연변이 또는 변종"은 변종 알파(또한 변종 B.1.1.7로도 알려짐), 변종 베타(또한 변종 B.1.351로도 알려짐), 변종 감마(또한 변종 P.1로도 알려짐), 변종 델타(또한 변종 B.1.617.2로도 알려짐) 및 변종 오미크론(또한 변종 B.1.1.529로도 알려짐) 및 그의 하위-계층(또한 변종 BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 및 BA.5로도 알려짐)과 같이 적어도 일부 국가들에서 이미 확인된 임의의 돌연변이 또는 변종일 수 있다. 최초로 확인된 SARS-CoV-2의 "돌연변이 또는 변종"에는 또한 그의 완전한 게놈이 참조 시퀀스 NC_045512.2와 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 심지어 적어도 99% 동일성을 나타내는 임의의 돌연변이 또는 변종이 포함된다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 표현 "2개의 뉴클레오티드 시퀀스들 간의 동일성 백분율"은 비교되는 2개의 시퀀스들 간의 동일한 뉴클레오티드 잔기의 백분율을 의미하며, 이 백분율은 2개의 시퀀스들 간의 최상의 정렬(최적의 정렬)을 구현한 후에 취득된다. 당해 기술분야에서 통상의 기술자에게는 그러한 동일성 백분율을 취득할 수 있도록 하고 프로그램 BLAST와 같은 상동성 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램을 포함하는 다양한 기술들이 공지되어 있다.

[0031] 동일성 백분율은 통계이고 2개의 시퀀스들 간의 차이는 이들 시퀀스들을 따라 무작위로 분포된다. 2개의 시퀀스들 간의 차이는 하기와 같은 시퀀스들의 상이한 변형 유형으로 이루어질 수 있다: 뉴클레오티드 잔기의 결실(deletions), 치환(substitutions) 또는 부가(additions).

[0032] 본 발명에서 구현되는 화합물 또는 본 발명에서 구현되는 이들의 임의의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매 화합물은 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한, 유효 성분으로서, SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염을 예방하고/하거나 치료하는 용도를 위해 앞서 정의되는 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것입니다.

[0033] 전형적으로, 본 발명에서 구현되는 약제학적 조성물은 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 비히클을 추가로 포함한다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 표현 "약제학적으로 허용가능한 비히클"은 본 발명에서 구현되는 유효 성분에 첨가되어 유효 성분의 이동을 촉진하고/하거나 상기 조성물 중에서의 유효 성분의 실질적인 분해를 회피토록 하고/하거나 유효 성분의 반감기를 증가시키는 임의의 물질을 의미한다. 유리하게도, 이러한 약제학적으로 허용가능한 비히클은 멸균이고 비-발열성이며 동물, 특히, 포유동물, 구체적으로, 인간에 적절히 투여되는 경우 부정적인 반응, 알러지 반응 또는 다른 예기치 못한 반응을 생성하지 않는 분자 실체(molecular entities) 및 조성물을 의미한다. 비히클은 본 발명의 약제학적 조성물의 유형에 따라 그리고 특히 약제학적 조성물의 투여 방식에 따라 선택된다. 유리하게도, 약제학적으로 허용가능한 비히클은 무-독성의, 고체, 반-고체 또는 액체 담체(carrier), 충전제(filler), 희석제(diluent), 첨가제(additive), 부형제(excipient), 완충제(buffer), 캡슐화 물질(encapsulating material) 또는 임의의 유형의 제형 보조제(formulation auxiliary)를 의미한다.

[0035] 본 발명에서 구현되는 약제학적 조성물은 전신적 경로(systemic route)로; 비경구적 경로(parenteral route),

예를 들어 정맥내(intravenous), 동맥내(intra-arterial), 복강내(intraperitoneal), 척수강내(intrathecal), 뇌실내(intraventricular), 흉골내(intrasternal), 두개내(intracranial), 근육내(intramuscular) 또는 피하 경로(sub-cutaneous route)로; 국소 경로(topical route)로; 안구 경로(ocular route)로; 경구 경로(oral route)로; 그리고 혀측(buccal), 비강(nasal), 비강내(intranasal), 직장(rectal) 및 질(vaginal) 경로와 같은 점막 경로(mucosal route)로 투여될 수 있다.

[0036] 본 발명에서 구현되는 경구 투여를 위한 고상의 약제학적 조성물로서, 유효 성분이, 예를 들어, 전분(starch), 탄산칼슘(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴(gelatin)과 같은 하나 이상의 관습적으로 사용되는 비활성 희석제 및, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트(magnesium stearate) 또는 활석(talc)일 수 있는 윤활제(lubricant), 착색제(colorant) 또는 코팅제(coating)와 같은 가능한 다른 물질과 혼합되는 경우 정제(tablets), 알약(pills), 분말(powders), 과립(granules) 또는 캡슐(capsules)이 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명에서 구현되는 경구 또는 안구 투여를 위한 액상의 약제학적 조성물로서, 관습적으로 사용되는 비활성 희석제 및 가능하게는, 예를 들어, 적심제(wetting products), 보습제(humectants), 감미제(sweetening agents), 향미제(flavoring agents), 보존제(preservatives) 또는 농후화제(thickeners)와 같은 다른 물질을 포함하는 약제학적으로 허용가능한 현탁액(suspensions), 용액(solutions), 에멀전(emulsions), 시럽(syrups)이 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명에서 구현되는 비경구 투여를 위한 멸균 약제학적 조성물은 멸균된, 수성 또는 비-수성 용액, 현탁액 또는 에멀전일 수 있다. 용매 또는 비히클로서, 물, 프로필렌 글리콜(propylene-glycol), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 식물유(plant oils), 에틸 올레이트(ethyl oleate) 같은 주입가능한 에스테르(injectable ester) 또는 다른 적합한 유기 용매가 사용될 수 있다. 이 조성물은 또한 적심제(wetting agents), 등장화제(isotonising agents) 또는 에멀전화제(emulsifiers)와 같은 보조제(adjuvants)를 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명에서 구현되는 국소 투여를 위한 약제학적 조성물은, 예를 들어, 크림(creams), 로션(lotions), 구강 스프레이(oral sprays), 점비액(nose drops) 또는 점안액(eye drops) 또는 에어로졸(aerosol)일 수 있다.

[0040] 특정한 구현예에서, 본 발명에서 구현되는 약제학적 조성물은 적어도 하나의 추가 치료제(therapeutic agent)를 추가로 포함한다.

[0041] 따라서, 본 발명에서 구현되는 약제학적 조성물은 (i) 앞서 정의되는 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, (ii) 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 비히클 및 임의선택적으로 (iii) 적어도 하나의 추가 치료제를 포함하거나 또는 이들로 이루어진다. 특히, 본 발명에서 구현되는 약제학적 조성물은 (i) 앞서 정의되는 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, (ii) 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 비히클 및 (iii) 적어도 하나의 추가 치료제를 포함하거나 또는 이들로 이루어진다.

[0042] 전형적으로, 본 발명에서 구현되는 약제학적 조성물 중에 존재하는 추가 치료제(들)는 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염의 예방 및/또는 치료에 이미 사용되는 치료제(들) 및 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염에서 마주하게 되는 징후 또는 합병증의 예방 및/또는 치료에 이미 사용되는 치료제(들)일 수 있다. 유리하게도, 본 발명에서 구현되는 약제학적 조성물 중에 존재하는 추가 치료제(들)는 항바이러스제(antiviral agents), 항-염증제(anti-inflammatory agents), 진통제(analgesic agents), 근이완제(muscle-relaxant agents), 마취제(anaesthetic agents), 이뇨제(diuretic agents) 및 항생제(antibiotic agents)로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0043] 본 발명에서 구현되는 약제학적 조성물이 적어도 하나의 항-바이러스제인 적어도 하나의 추가 치료제를 포함하는 경우, 이러한 적어도 하나의 추가 항-바이러스제는 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물과 상이한 것임은 자명하다.

[0044] 본 발명에서 사용가능한 항-바이러스제의 제1 예는 특히 국제 출원 WO 2021/228846에 개시된 것과 같은 QVE-Oph 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물이다. QVDM-Oph의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매 화물에 대해 이미 개시된 것은 QVE-Oph의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물에 대해 필요한 부분만 약간 수정하여 적용된다. 달리 말하면, 본 발명에서 구현되는 약제학적 조성물의 적어도 하나의 추가 치료제는 N-(2(퀴놀릴)-발릴-글루타미드-(2,6-디플루오로페녹시)메틸 케톤 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매

화물일 수 있다.

- [0045] 본 발명에서 사용가능한 다른 항-바이러스제로서, 뉴클레오티드 유사체(nucleotide analogues)와 같은 바이러스 RNA-의존성 RNA 중합효소 조절자(viral RNA-dependent RNA polymerase modulators) 및 융합 억제제(fusion inhibitors)가 언급될 수 있다. 융합 억제제는 SARS-CoV-2 외피와 세포 막 사이의 융합 및 계속해서 SARS-CoV-2의 세포 내로의 진입을 방지한다. 유리하게도, 융합 억제제는 세린/단백질분해효소 억제제(serine/protease inhibitors), 안지오텐신-전환 효소 2(ACE2: angiotensin-converting enzyme 2)의 억제제 또는 항말라리아/기생충 약물(antimalarial/parasiticide drugs)이다. 결과적으로, 본 발명에서 사용가능한 융합 억제제는 렘데시비르(remdesivir), 카모스타트 메실레이트(camostat mesilate), 나파모스타트 메실레이트(nafamostat mesilate), 클로로퀸 포스페이트(chloroquine phosphate), 하이드록시클로로퀸(hydroxychloroquine), 세파란틴(cepharanthine), 셀라멕틴(selamectin) 및 메플로퀸(mefloquine) 및 메플로퀸 염산염(mefloquine hydrochloride)과 같은 메플로퀸의 염으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0046] 본 발명에서 사용가능한 항-염증제로서, 모노클로날 항체(monoclonal antibodies)가 언급될 수 있다. 모노클로날 항체는 바람직하게는 IL-6 및 그의 수용체와 같은 염증성 인터류킨(inflammatory interleukins) 및 그의 수용체에 대한 것이다. 결과적으로, 본 발명에서 사용가능한 모노클로날 항체는 토실리주마브(tocilizumab), 사릴루마브(sarilumab) 및 실투시마브(siltuximab)로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0047] 대안으로 또는 추가로, 본 발명에서 구현되는 약제학적 조성물 중에 존재하는 추가 치료제(들)는 시스아트라쿠리움 베실레이트(cisatracurium besylate), 덱사메타손 소듐 포스페이트(dexamethasone sodium phosphate), 덱스메토토키딘 염산염(dexmedetomidine hydrochloride), 펜타닐 시트레이트(fentanyl citrate), 푸로세미드(furosemide), 하이드로모르폰 염산염(hydromorphone hydrochloride), 케타민 염산염(ketamine hydrochloride), 로라제팜(lorazepam), 미다졸람 염산염(midazolam hydrochloride), 모르핀 술페이트(morphine sulfate), 노르에피네프린 바이타르테이트(norepinephrine bitartrate), 로쿠로늄 브로마이드(rocuronium bromide), 반코마이신 염산염(vancomycin hydrochloride) 및 베쿠로늄 브로마이드(vecuronium bromide)로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0048] 특정한 구현예에서, 본 발명에서 구현되는 약제학적 조성물은 앞서 정의된 목록들 중 동일한 목록 또는 상이한 목록에서 선택되는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 추가 치료제들을 포함한다.
- [0049] 보다 특정한 구현예에서, 본 발명에서 구현되는 약제학적 조성물은 (i) 앞서 정의되는 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, (ii) 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 비히클, (iii) 앞서 정의되는 바와 같은 적어도 하나의 추가 항-바이러스제 및 (iii)₂ 앞서 정의되는 바와 같은 적어도 하나의 항-염증제를 포함하거나 이들로 이루어진다.
- [0050] 본 발명에서 구현되는 약제학적 조성물의 투여량(dosage)은 약제학적 유효량이어야 할 필요가 있다. "약제학적 유효량(pharmaceutically effective amount)"은 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 유익성/위험성 비로 질환을 예방하거나 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량의 수준은, 예를 들어, 제형화 방법, 체중, 성별 및 연령을 포함하여 환자의 상태, 질환의 정도, 약물 형태, 투여 경로, 이러한 투여가 단일 또는 분획 투여를 구현하는 경우의 투여 기간, 배설 속도 및 반응 민감도와 같은 인자들에 따라 당해 기술분야에서 통상의 기술자에 의해 다양하게 선택될 수 있다. 유효량은 당해 기술분야에서 통상의 기술자에 의해 인식되는 바와 같이 폐기의 경로, 부형제의 사용 및 다른 치료제(들)와 함께 사용될 가능성에 따라 달라질 수 있다.
- [0051] 본 발명은 또한 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하는 데 사용하기 위한, 하기들을 포함하거나 이들로 이루어지는 키트(kit)에 관한 것이다:
- [0052] a) 앞서 정의되는 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 또는 앞서 정의되는 바와 같은 화합물 또는 염 또는 용매화물을 포함하는 약제학적 조성물, 및
- [0053] b) 특히 앞서 정의되는 바와 같은 적어도 하나의 추가 치료제 또는 적어도 하나의 추가 치료제를 포함하는 약제학적 조성물.
- [0054] 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 포함하는 약제학적 조성물에 대해 이미 개시된 것이 적어도 하나의 추가 치료제를 포함하는 약제학적 조성물에 대해 필요한 부분만 약간 수정하여 적용된다.
- [0055] 부품들의 키트는 또한 위에서 정의되는 바와 같은 요소 a) 및 b)들의 조합으로 정의될 수도 있다.

- [0056] 이러한 부품들의 키트는 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 및 적어도 하나의 추가 치료제가 동일한 약제학적 조성물에 제형화될 수 없는 경우 및/또는 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 또는 이를 포함하는 약제학적 조성물 및 적어도 하나의 추가 치료제 또는 이를 포함하는 약제학적 조성물이 별개로 또는 순차적으로 투여되는 경우에 본 발명에서 특히 흥미롭다.
- [0057] 따라서, 본 발명에서 구현되는 부품들의 키트는 동시적으로, 개별적으로 또는 순차적으로 그리고 특히 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하기 위하여 사용될 수 있다.
- [0058] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 동시적 사용은 환자에게 위에서 정의되는 바와 같은 요소 a)가 위에서 정의되는 바와 같은 요소 b)와 동일한 시간에 투여되는 것을 의미한다. 환자 수준의 투여의 영역과 그에 따른 투여 경로는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0059] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 개별적 또는 순차적 사용은 요소 a)가 그의 약리학적 효과가 환자에게 발휘되는 기간과 요소 b)가 그의 약리학적 효과가 환자에게 발휘되는 기간이 적어도 부분적으로 교차한다면 위에서 정의되는 바와 같은 요소 a) 및 b)가 환자에게 개별적으로 또는 순차적으로 투여되는 것을 의미한다.
- [0060] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "환자(patient)", "이를 필요로 하는 환자(patient in need)", "대상체(subject)" 및 "이를 필요로 하는 대상체(subject in need)"는 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염으로 발달할 위험에 있는 대상체 또는 SARS-CoV-2에 이미 오염된 대상체를 의미한다. 대상체는 비인간의 동물 또는 인간일 수 있다. 오염은 타액, 혈액 또는 비인두 샘플과 같이 대상체로부터 파생되는 샘플 중의 SARS-CoV-2의 단백질 또는 SARS-CoV-2에 특이적인 항체의 검출에 의해 확증될 수 있다. SARS-CoV-2에 의해 오염된 대상체는 유증상(symptomatic), 비전형적증상(paucisymptomatic) 또는 무증상(asymptomatic)일 수 있다. 치료를 필요로 하는 대상체는 또한 초기 질병에서 회복한 후 중장기적 영향으로 고통받는 대상체일 수도 있다. 이러한 중장기적 영향은 "COVID-19 이후 병태(post COVID-19 condition)" 또는 "코로나 장기 후유증(long COVID)"로 그리고 특히 "코로나 신경 장기 후유증(Neuro-Long COVID)"로 지정된다.
- [0061] 게다가, 앞서 정의되는 바와 같은 용도를 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, 앞서 정의되는 바와 같은 용도를 위한 약제학적 조성물 및/또는 앞서 정의되는 바와 같은 용도를 위한 부품들의 키트가 SARS-CoV-2에 의해 감염된 대상체에서의 바이러스 복제 및/또는 바이러스 단백질 합성을 방지, 억제 및/또는 감소시키는 용도를 위해 구현된다. 이러한 구현예에서, 대상체는 또한 비-인간 동물 또는 인간일 수 있다. 바이러스 복제 및/또는 바이러스 단백질 합성의 방지 또는 억제는 부분적이거나 전체적일 수 있다.
- [0062] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 표현 "바이러스 복제(viral replication)"에는 바이러스의 복제 주기(replication cycle)의 단계들의 총합을 포함한다. 특히 이러한 발현에는 세포 내로의 바이러스의 진입, 바이러스 복제 및 전사 복합체의 형성, 바이러스 게놈 RNA 복제, 음성 템플릿(negative template)의 전사 및 번역에 의한 구조 단백질의 형성 및 바이러스 입자의 조립을 포함하여 SARS-CoV-2의 복제의 주요 단계들이 포함된다.
- [0063] 바이러스 복제 및/또는 바이러스 단백질 합성을 방지, 억제 및/또는 감소시키는 앞서 정의되는 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, 약제학적 조성물 또는 부품들의 키트의 능력은, 예를 들어, 시험관 내에서 평가될 수 있다. 이하의 실시예 1은 웨스턴 블롯 분석(western blot analysis) 및 정량적 실시간-중합효소연쇄반응 분석(qRT-PCR analysis)을 포함하여 이러한 평가를 위한 기법을 제안한다.
- [0064] 더욱이, 앞서 정의되는 바와 같은 용도를 위한 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, 앞서 정의되는 바와 같은 용도를 위한 약제학적 조성물 및/또는 앞서 정의되는 바와 같은 용도를 위한 부품들의 키트는 COVID-19 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 급성 호흡 부전 및 간 또는 심장 손상과 같은 COVID-19의 합병증을 예방하는 데 사용하기 위해 구현된다.
- [0065] 본 발명은 치료를 필요로 하는 환자에서 SARS-CoV-2에 의해 야기되는 바이러스 감염을 예방 및/또는 치료하기 위한 방법에 관한 것이며, 여기에서 상기 방법은, 치료를 필요로 하는 환자에게, 앞서 정의되는 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, 앞서 정의되는 바와 같은 약제학적 조성물 또는 앞서 정의되는 바와 같은 부품들의 키트를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0066] 약제학적 조성물에 대해 이미 개시된 바와 같이, 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염

또는 용매화물 및 부품들의 키트의 요소 a) 및 b)들은 전신적 경로로; 비경구적 경로, 예를 들어 정맥내, 동맥내, 복강내, 척수강내, 뇌실내, 흉골내, 두개내, 근육내 또는 피하 경로로; 국소 경로로; 안구 경로로; 경구 경로로; 그리고 협측, 비강, 비강내, 직장 및 질 경로와 같은 점막 경로로 투여될 수 있다.

[0067] 게다가, 약제학적 조성물에 대해 이미 개시된 바와 같이, 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 및 부품들의 키트의 요소 a) 및 b)들은 약제학적 유효량으로 투여된다. 약제학적 조성물에 대해 앞서 주어진 정의가 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 및 부품들의 키트의 요소 a) 및 b)들에 대해 필요한 부분만 약간 수정하여 적용된다.

[0068] 특정한 구현예에서, 이러한 예방 및/또는 치료 방법은 SARS-CoV-2에 의해 감염된 대상체에서 바이러스 복제 및/또는 바이러스 단백질 합성을 방지, 억제 및/또는 감소시키기 위해 구현될 수 있다.

[0069] 다른 특정한 구현예에서, 이러한 예방 및/또는 치료 방법은 특히 치료를 필요로 하는 환자에서 그리고, 보다 구체적으로는, SARS-CoV-2에 의해 감염된 대상체에서 COVID-19 폐렴, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 급성 호흡 부전 및 간 또는 심장 손상과 같은 COVID-19의 합병증을 예방하기 위해 구현될 수 있다.

[0070] 본 발명의 다른 특징 및 장점이 첨부된 도면들을 참조하여 제한이 아닌 예시로서 주어지는 아래의 실시예들을 관독함으로써 당해 기술분야에서 통상의 기술자에게 추가로 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0071] 도 1: Vero E6/TMPRSS2 세포에 대한 QVDM-OPh 펩티드에 대한 독성 시험

감염되지 않거나 SARS-CoV-2로 감염다중도(MOI: multiplicity of infection) 0.05로 감염된 Vero-E6/TMPRSS2 세포를 매일 25, 50, 100 μ M의 농도의 상이한 농도의 QVDM-OPh와 함께 배양하고 72시간 후 수집하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 다음 4°C에서 30분 동안 생존도 고정가능 염료(viability fixable dye) 염색을 하고, 계속해서 세척하고 2% 파라포름알데히드(PFA: paraformaldehyde)로 고정하고 Fortessa Flux Cytometer에서 분석하였다. 각 조건에 대해 3중으로 30000개의 이벤트가 기록되었다. FlowJo Software를 사용하여 분석을 수행하고 생존도의 백분율을 분석 보고서에 따라 계산하였다. 결과는 각 조건에 대해 개별적으로 3개의 독립적인 지점들을 갖는 4개의 독립적인 실험의 평균 \pm 표준편차(SD)를 나타낸다.

도 2: 전체 치료 조건(full treatment condition)에 대한 SARS-CoV-2에 의해 유도한 감염 및 사망에 대한 영향. 치료하지 않거나 다른 화합물로 처리한 감염된 세포에서의 Sars-CoV-2 Spike(S)의 세포 내 검출을 위한 유세포 분석.

a) 감염되지 않거나 SARS-CoV-2로 MOI 0.05로 감염된 Vero E6/TMPRSS2 세포를 상이한 농도의 QVDM-OPh(10, 25, 50, 100 μ M), Vx765(25 μ M) 또는 램테시비르(10 μ M)와 함께 감염 전에 1시간 동안 배양하였다. 그 후, 실험이 종료될 때까지 배양물로부터 바이러스를 제거하지 않고 세포를 약물-함유 배지로 배양하였다(전체 치료). 감염-후 72시간에서, 세포를 수집하고 사망을 및 감염을 분석을 위해 염색하였다. 감염의 백분율은 각 분석의 도표에 표시된다.

b) 결과는 감염된, 치료되지 않은 군과 비교하여 상이한 감염되고 치료된 세포에서의 스파이크 단백질 염색(Spike protein staining)에 의해 검출된 감염의 백분율을 나타내고 있다. 결과는 각 조건에 대해 개별적으로 3개의 독립적인 지점들을 갖는 4개의 독립적인 실험의 평균 \pm 표준편차를 나타낸다. 통계학적 유의성은 GraphPad Prism 소프트웨어(GraphPad Software Inc., USA)를 사용하여 Oneway ANOVA 검정(Oneway ANOVA test) 후 Dunnett의 사후 검정(Dunnett's post-hoc test)을 적용하여 평가되었다. (****p<0.0001).

도 3: 전체 치료 조건에 대한 시험관 내 바이러스 복제 및 바이러스 단백질 발현에 대한 QVDM-OPh 펩티드의 영향. 치료하지 않거나 상이한 화합물로 치료된 감염된 세포에서의 Sars-CoV-2 스파이크(S) 및 뉴클레오캡시드(N) 단백질들의 세포 내 검출을 위한 웨스턴 블롯 분석.

a-b) Vero E6/TMPRSS2 세포를 QVDM-OPh 펩티드 또는 램테시비르로 표시된 농도로 1시간 동안 전-처리한 후 바이러스로 MOI = 0.05로 감염시켰다. 그 후, 실험이 종료될 때까지 세포를 약물-함유 배지로 배양하였다(전체 치료). 감염되지 않은 세포를 수반하는 웰을 감염의 음성 대조로서 수행하였다. 감염-후 72시간에서, 세포를 RIPA 완충제로 용해시키고 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 스파이크 단백질(Spike protein)(S), 전장 및 SI 도메인(full length and SI domain) 및 뉴클레오캡시드 단백질(Nucleocapsid protein)(N)의 발현을 검출하였다. GAPDH가 적재 대조(loading control)로서 사용되었다. 결과는 각 조건 마다 개별적으로 3개의 독립적인 지점들

을 갖는 4개의 독립적인 실험의 평균 ± 표준편차를 나타낸다.

도 4: 전체 치료 조건에 대한 시험관 내 바이러스 복제에 대한 QVDM-OPh 펩티드의 영향. 치료되지 않거나 QVDM-OPH로 치료된 감염된 세포에서의 Sars-CoV-2 스파이크(S), 뉴클레오캡시드(N) 및 NSP6 유전자에 대한 세포 내 qRT-PCR 분석.

a - b - c) Vero E6/TMRPSS2 세포를 QVDM-OPH 펩티드로 표시된 농도로 1시간 동안 전-처리한 후, 바이러스로 MOI = 0.05로 감염시켰다. 그 후, 실험이 종료될 때까지 세포를 약물-함유 배지로 배양하였다(전체 치료). 감염되지 않은 세포를 수반하는 웰을 감염의 음성 대조로서 수행하였다. 감염-후 72시간에서, 세포를 RNA 정제를 위한 LBP 완충제로 용해시키고 RT-qPCR 분석을 수행하여 스파이크 단백질(S), 뉴클레오캡시드 단백질(N) 및 NSP6의 유전자 발현을 검출하였다. 각 유전자에 대한 상대적인 mRNA 양을 GAPDH mRNA 발현에 대해 정규화하였다. $\Delta \Delta Ct$ 방법을 사용하여 배양 변화(fold change)를 계산하였다. 결과는 조건 당 3개의 독립적인 지점들을 갖는 4개의 독립적인 실험의 평균 ± 표준편차를 나타낸다.

도 5: 전체 치료 조건에 대한 시험관 내 SARS-CoV-2에 대한 QVDM-OPh 펩티드의 항바이러스 활성. 감염된 세포 상층액의 바이러스 수율이 qRT-PCR로 정량되었다.

a - b) Vero E6/TMRPSS2 세포를 QVD-OPh(QVD), QVDM-OPh(QVDM) 또는 램테시비르로 표시된 농도로 1시간 동안 전-처리한 후, 바이러스로 MOI = 0.05로 감염시켰다. 감염되지 않은 세포를 수반하는 웰을 감염의 음성 대조로서 수행하였다. 그 후, 실험이 종료될 때까지 세포를 약물-함유 배지로 배양하였다(전체 치료). 감염-후 72시간에서, 상층액을 수집하고, 바이러스 RNA를 추출하였다. SARS-CoV-2 N 유전자 또는 NSP6 유전자에 대한 탐침을 사용하여 상층액에 대해 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR) 분석을 수행하였다. 결과는 평균 ± 표준오차(SEM)를 나타낸다(n=3). 평균들 간의 차이 비교는 *One-way ANOVA* 검정 후 *Dunnnett*의 사후 검정을 사용하여 조사되었다. *치료되지 않은 군과 비교하여 ***p<0.001.*

도 6: 진입-후 치료 조건에 대한 SARS-CoV-2에 의해 유도되는 감염 및 사망에 대한 QVDM-OPh 펩티드의 영향. 치료되지 않았거나 상이한 화합물들로 치료된 감염된 세포에서의 Sars-CoV-2 스파이크(S) 단백질의 발현의 검출을 위한 유세포 분석.

a) Vero E6/TMRPSS2를 바이러스로 MOI 0.05로 2시간 동안 감염시키고 계속해서 바이러스를 배지로부터 제거하였다. 계속해서, 세포를 상이한 농도의 QVDM-OPh(10, 25, 50 및 100 μ M), Vx765(25 μ M) 또는 램테시비르(10 μ M)와 함께 72시간 동안 배양하였다(진입-후). 실험이 종료될 때까지 매일 상이한 농도의 배지에 약물을 첨가하였다. 감염-후 72시간에서, 세포를 수집하고 사망을 및 감염을 분석을 위해 염색하였다. 감염의 백분율은 각 분석의 도표에 표시된다.

b) 결과는 치료되지 않은 대조군과 비교하여 스파이크 단백질 염색의 발현의 억제 백분율의 평균 ± 표준오차를 나타낸다(n=3).

도 7: 진입-후 치료 조건에 대한 시험관 내 바이러스 복제 및 바이러스 단백질 발현에 대한 QVDM-OPh 펩티드의 영향. 치료되지 않았거나 상이한 화합물들로 치료된 감염된 세포에서의 Sars-CoV-2 스파이크(S) 단백질 및 뉴클레오캡시드(N) 단백질의 세포 내 검출을 위한 웨스턴 블롯 분석.

a - b) Vero E6/TMRPSS2 세포를 감염시키고 계속해서 도 6에서 기술된 바와 같이 QVDM-OPh로 표시된 농도로 또는 램테시비르로 치료하였다. 감염되지 않은 세포를 수반하는 웰을 감염의 음성 대조로서 수행하였다. 감염-후 72시간에서, 세포를 RIPA 완충제로 용해시키고 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 스파이크 단백질(S), 전장 및 SI 도메인 및 뉴클레오캡시드 단백질(N)의 발현을 검출하였다. GAPDH를 적재 기준으로 사용하였다. 결과는 조건 당 3개의 독립적인 지점들을 갖는 4개의 독립적인 실험의 평균 ± 표준편차를 나타낸다.

도 8: 진입-후 치료 조건에 대한 시험관 내 바이러스 복제에 대한 QVDM-OPh 펩티드의 영향. 치료되지 않았거나 QVDM-OPh로 치료된 감염된 세포에서의 Sars-CoV-2 스파이크(S), 뉴클레오캡시드(N) 및 NSP6 유전자에 대한 세포 내 qRT-PCR 분석.

a - b - c) Vero E6/TMRPSS2 세포를 바이러스로 MOI 0.05로 2시간 동안 감염시키고 계속해서 바이러스를 배지로부터 제거하였다. 계속해서, 세포를 상이한 농도의 QVDM-OPh와 함께 72시간 동안 배양하였다(진입-후). 실험이 종료될 때까지 매일 상이한 농도의 배지에 약물을 첨가하였다. 감염되지 않은 세포를 수반하는 웰을 감염의 음성 대조로서 수행하였다. 감염-후 72시간에서, 세포를 RNA 정제를 위한 LBP 완충제로 용해시키고 RT-qPCR 분석을 수행하여 스파이크 단백질(S), 뉴클레오캡시드 단백질(N) 및 NSP6의 유전자 발현을 검출하였다. 각 유전자에

대한 상대적인 mRNA 양을 GAPDH mRNA 발현에 대해 정규화하였다. $\Delta\Delta Ct$ 방법을 사용하여 배양 변화를 계산하였다. 결과는 조건 당 3개의 독립적인 지점들을 갖는 4개의 독립적인 실험의 평균 \pm 표준편차를 나타낸다.

도 9: 진입-후 치료 조건에 대한 시험관 내 SARS-CoV-2에 대한 QVDM-OPh 펩티드의 항바이러스 활성. 감염된 세포 상청액의 바이러스 수율이 qRT-PCR로 정량되었다.

a - b) Vero E6/TMPRSS2 세포를 바이러스로 MOI 0.05로 2시간 동안 감염시키고 계속해서 바이러스를 배지로부터 제거하였다. 계속해서, 세포를 표시된 농도의 상이한 농도의 QVD-OPh(QVD), QVDM-OPh(QVDM) 또는 램테시비르와 함께 배양하였다(진입-후). 실험이 종료될 때까지 매일 상이한 농도의 배지에 약물을 첨가하였다. 감염되지 않은 세포를 수반하는 웰을 감염의 음성 대조로서 수행하였다. 감염-후 72시간에서, 상청액을 수집하고, 바이러스 RNA를 추출하였다. SARS-CoV-2 N 유전자 또는 NSP6 유전자에 대한 탐침을 사용하여 상청액에 대해 실시간 중합 효소연쇄반응 분석을 수행하였다. 결과는 평균 \pm 표준오차를 나타낸다(n=3). 평균들 간의 차이 비교는 *One-way ANOVA* 검정 후 *Dunnett's 사후 검정*을 사용하여 조사되었다. *치료되지 않은 군과 비교하여 ***p<0.001.*

도 10: COVID-19 골든 시리안 햄스터 모델에서의 SARS-CoV-2에 대한 QVDM-OPh 및 QVE-OPh의 영향

골든 시리안 햄스터(Golden Syrian hamsters)를 D-3에 무작위로 그룹들로 구분하고, 동물 당 10^5 pfu TCID50으로 SARS-CoV-2로 접종하였다. 모든 군들은 0일차(D0)에서 비강내(IN) 경로로 SARS-CoV-2를 수령하였다. QVDM-OPh 펩티드 및 QVE-OPh 펩티드 또는 비히클을 D0에서 접종 시점 당 총 용적 10 ml/kg 이하로 복강내(IP) 경로로 투여하였다. 시험 물품들을 D0(t+1h) 및 1일차(D1)에서 접종하였다. 2일차(D2)가 연구의 최종일이었다.

a) D0, 감염-후 D1 및 D2에서의 비히클, QVE-OPH 및 QVDM-OPH 치료 동물의 군들 간의 평균 체중 변화 곡선(대 D0).

b) 접종 후 2일차(2 dpi), 시점 당 n=5에서 SARS-CoV-2로 접종된 골든 시리안 햄스터로부터의 폐에서의 바이러스 RNA 발현 수준(평균 + 표준편차). 결과는 $2^{-\Delta Ct}$ 로 표현되었다. Mann-Whitney 검정(Mann-Whitney test) 비교 감염 동물 대 모의 동물(mock)(A). *P<0.05; **P<0.01.

c) 접종 후 2일차에서 SARS-CoV-2로 접종되고 비히클에 비해 QVE-OPH 또는 QVDM-OPH로 치료된 골든 시리안 햄스터로부터 수득된 폐에서의 바이러스 복제 감소의 백분율.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 실시예 1

[0073] 재료 및 방법

[0074] 세포, 바이러스 및 약물

[0075] 아프리카 그린 몽키(African green monkey) 신장 Vero E6/TMPRSS2 세포주는 친절하게도 Dr. Andreola Marie-Aline, University of Bordeaux로부터 수득되었으며, 이글 배지(Eagle's medium ; 10% 열-비활성화 FBS, 1% PS(페니실린(Penicillin) 10,000 U/ml; 스트렙토마이신(Streptomycin) 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 보충된 돌베코 변성 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium); Gibco Invitrogen)(Gibco Invitrogen) 중에 37°C에서 5% CO₂의 가습 분위기(humidified atmosphere)에서 유지시켰다. 균주 BetaCoV/France/IDF0372/2020은 Institut Pasteur(Paris, France)가 주최하고 Pr. Sylvie van der Werf가 이끄는 National Reference Centre for Respiratory Viruses에서 공급하였다. 균주 BetaCoV/France/IDF0372/2020이 단리되는 인간 샘플은 Bichat Hospital, Paris, France의 Dr. X. Lescure 및 Pr. Y. Yazdanpanah가 제공하였다. 더욱이, 균주 BetaCoV/France/IDF0372/2020은 European Union's Horizon 2020 research and innovation program으로부터 보조금 협정 653316호(grant agreement No. 653316)에 따라 자금을 지원받은 프로젝트인 Evag(European Virus Archive goes Global) 플랫폼을 통해 공급받았다. 바이러스 스톡(viral stocks)은 1×10^4 PFU의 감염다중도로 감염된 Vero-E6 세포에서 생산되었다. 바이러스는 감염 3일 후에 수확하였으며, 청정화되고, 계속해서 분획된 후 -80°C에서 저장하였다. 바이러스 스톡은 반고체 오버레이(semisolid overlays ; Avicel, RC581-NFDR080I, DuPont)를 사용하는 고전적인 용균반 검사(classical plaque assay)에 의해 Vero-E6 세포에서 적정하였다. 모든 감염 실험은 CRC(Cordelier Research Center)의 생물안전등급-3(BLS-3: biosafety level-3) 실험실에서 수행되었다. QVDM-OPH(Cat no. BIOV2787-5)로 알려진 범-카스파제 억제제인 Q-VD(OME)-OPH 및 QVE-OPH를 Avantor-VWR 및 Hello Bio로부터 구입하였다. 램테시비르는 COGER(Cat no. AG--CR1-3713-M005)로부터 그리고

카스파제-1 억제제(caspase-1 inhibitor)(Cat no. BIOV2781-5)인 Vx765는 Avantor-VWR로부터 구입하였다.

[0076] 항바이러스 활성, 독성 및 감염 억제의 평가

[0077] Vero E6 세포에 대한 QVDM-Oph의 독성과 항바이러스 효능을 평가하기 위해, 사망의 백분율 및 감염된 세포의 백분율을 유세포 분석법으로 측정하였다. 세포를 밤새도록 24-웰 세포-배양 페트리-접시에서 75×10^4 세포/웰의 밀도로 배양하였다. 다음날, 세포를 전처리하지 않거나 상이한 투여량의 표시된 QVDM-Oph, Vx765 또는 램테시비르로 상이한 농도로 1시간 동안 전처리하였다. 계속해서, 바이러스를 MOI 0.05로 후속하여 첨가하여 250 μl /웰에서 2시간 동안 감염되도록 하였다. 그 후, 완전 배지를 세포 배양물에 첨가하여 500 μl /웰의 최종 용적이 되도록 하였다. 약물을 매일 동일한 농도로 세포 배양물에 첨가하였다. 감염-후 72시간에서, 세포 상청액을 수집하고 바이러스 추출 및 qRT-PCR 증폭을 위해 즉각적으로 -80°C 에서 동결시켰다. 세포를 수집하고 그의 일부를 유세포 분석에 사용하여 제조업자의 지침에 따라 스파이크 단백질(SARS-CoV-2 Spike Protein-Alexa 647, Cat no. 51-6490-82, eBioscience) 및 Cytotfix/cytoperm 고정 투과화 키트(Cat no. 554714, BD)에 대한 세포 내 염색을 사용하여 감염율을 측정하였다. 독성은 제조업자의 지침에 따라 Viability 405/452 Fixable Dye(Miltenyi Biotec의 Cat no. 130-109-814)를 사용하여 분석하였다. 요약하면, 세포를 PBS로 2회 세척한 후 4°C 에서 30분 동안 생존도 고정가능 염료 염색을 하였다. 계속해서, 세포를 Cytotfix/cytoperm 완충제로 20분 동안 투과화시키고, permawash 완충제로 2회 세척한 다음, 항-스파이크-알렉사 647(anti-spike-Alexa 647)을 4°C 에서 30분 동안 세포에 첨가하였다. 염색 후, 세포를 2% 파라포름알데히드(FPA)로 고정한 다음 Fortessa Flow Cytometer로 분석하였다. 각 조건에 대해 3중으로 30000개의 이벤트가 기록되었다. FlowJo Software를 사용하여 분석을 수행하였다. 세포의 다른 부분은 추가적인 정량 및 면역블롯팅 분석(immunoblotting analysis)을 위한 단백질분해효소(Roche) 및 포스파타제 억제제(Invitrogen)를 포함하는 RIPA 용해 완충제(RIPA lysis buffer)(Invitrogen, Cat no. 10230544) 또는 RNA 정제 및 RT-qPCR 분석을 위한 LBP 완충제에 용해시켰다. 각 조건은 동일한 실험에서 3중으로(n=3) 수행되었으며 4개의 독립적인 실험들에 대해 반복되었다.

[0078] 첨가의 시간 실험

[0079] QVDM-Oph(10, 25, 50 및 100 μM), Vx765 (25 μM) 및 램테시비르(5 및 10 μM)를 첨가의 시간 실험(time-of-addition experiment)을 위해 사용하였다. 바이러스 감염의 여러 단계들에서 Vero E6 세포(75×10^3 세포/웰)를 QVDM-Oph, Vx765 및 램테시비르로 치료하였다. "전체-시간(full-time)" 치료의 경우, Vero E6 세포는 바이러스 감염 전 1시간 동안 약물로 전-처리한 다음 실험이 종료될 때까지 약물의 존재 중에서 2시간 동안 바이러스와 함께 배양하였다. "진입-후(Post-Entry)" 실험의 경우, 바이러스를 세포에 첨가하여 2시간 동안 감염되도록 하고, 계속해서 실험이 종료될 때까지 바이러스-함유 상청액을 약물-함유 배지로 교체하였다.

[0080] Vero E6/TMPRSS2 세포에서의 RNA 추출 및 정량적 실시간 RT-PCR(qRT-PCR)

[0081] 상청액으로부터의 바이러스 RNA 추출

[0082] 제조업자의 지침에 따라 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit(Takara, Cat no. 9766)를 사용하는 바이러스 RNA 추출을 위해 200 μl 의 세포 배양 상청액을 사용하였다. RNA는 무-RNA분해효소 물(RNase-free water) 30 μl 에서 용리시켰다.

[0083] 세포 내 RNA 정제

[0084] PBS로 세척한 후, 세포를 LBP로 용해시키고 -80°C 에서 보관하였다. 제조업자의 추천 절차(Machery Nagel ref #740984.250)에 따라 "Nucleospin RNA PLUS" 키트를 사용하여 RNA 정제를 수행하였다. RNA는 RNA분해효소가 없는 물 30 μl 에서 용리시켰다.

[0085] 정량적 실시간 RT-PCR(zRT-PCR)

[0086] 전체 RNA는, 제조업자의 추천 절차에 따라, gDNA Eraser(Takara, Cat no. RR047A)를 수반하는 PrimeScript RT Reagent Kit를 사용하여 cDNA로 전환하였다. TB Green Premix Ex Taq II(Takara Cat no. RR820A)를 사용하여 정량적 PCR을 수행하였다. 요약하면, 각 반응은 1 μl 의 각 프라이머[0.4 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$], 2 μl 의 cDNA(5 ng/ μl), 12.5 μl 의 TB Green Premix Ex Taq II 및 8.5 μl 의 무-RNase 물을 포함하는 25 μl 의 총 용적으로 이루어졌다.

[0087] Bio Rad CFX384 Real-Time system PCR Machine을 사용하여 실시간 PCR을 수행하였다. 사용된 열 사이클링 조건(thermal cycling conditions)은 하기와 같다: 초기 변성(initial denaturation): 95°C 에서 30초, 후속하여 96°C 에서 5초 동안 40사이클의 증폭(amplification) 및 60°C 에서 30초. Abdel-Sater et al, 2021("A Rapid and

Low-Cost protocol for the detection of B.1.1.7 lineage of SARS-CoV-2 by using SYBR Green-Based RT-qPCR", medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.27.21250048>)이 설계하고 기술한 SARS-CoV-2 뉴클레오캡시드(N), 비-구조 단백질 6(NSP6: Non-Structural Protein 6) 및 스파이크(S) 유전자들에 대해 사용된 프라이머들은 Eurofins으로부터 구매하였다. 세포외 바이러스 mRNA 상대적 정량의 경우, SARS-CoV-2 cDNA(N 및 NSP6 유전자들의 경우 Ct 약 20)를 양성 대조로 사용하였다. ΔCt 방법을 사용하여 계산된 Ct 값을 양성 대조와 비교하여 치료된 샘플의 배양-감소(fold-reduction)로 변환시켰다(바이러스 RNA에서의 변화된 배양= $2^{\Delta Ct}$).

[0088] 세포 내 mRNA의 경우, 기기 소프트웨어(instrument software) 및 오토-Ct 함수(auto-Ct function)를 사용하여 각 유전자에 대한 문턱값 사이클(Ct: threshold cycle) 값을 획득하였다. 각 유전자에 대한 상대적 mRNA 양을 GAPDH mRNA 발현에 대해 정규화하였다. $\Delta \Delta Ct$ 방법을 사용하여 배양 변화를 계산하였다. 본 실험에서 사용된 특정 SARS-CoV-2(N, NSP6 및 S) 및 인간(GAPDH) 프라이머 시퀀스들은 하기와 같다:

[0089] N-qF: CGTTTGGTGGACCTCAGAT (서열 목록 중의 시퀀스 동정 번호: 1) ;

[0090] N-qR: CCCACTGCGTTCTCCATT (서열 목록 중의 시퀀스 동정 번호: 2) ;

[0091] NSP6-qF: GGTGATACTAGTTTGTCTGGTTTT (서열 목록 중의 시퀀스 동정 번호: 3) ;

[0092] NSP6-qR: AACGAGTGCAAGACATTCATAAG (서열 목록 중의 시퀀스 동정 번호: 4) ;

[0093] S-qF: GGTCCATGCTATACATGTCTC (서열 목록 중의 시퀀스 동정 번호: 5) ;

[0094] S-qR: GGTCTCGAATCTAAAGTAGTACCA (서열 목록 중의 시퀀스 동정 번호: 6) ;

[0095] GAPDH-qF: AAGGTCGGAGTCAACGGATTT (서열 목록 중의 시퀀스 동정 번호: 7) ;

[0096] GAPDH-qR: TGAAGGGTCATTGATGGCA (서열 목록 중의 시퀀스 동정 번호: 8).

[0097] 웨스턴 블롯 분석

[0098] 웨스턴 블롯 분석의 경우, 각 지점으로부터 40 μ g의 단백질을 4 내지 12% Bis-Tris-SDS-NUPAGE 겔(Invitrogen)에서 분해하고 계속해서 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membranes)(Amersham Bioscience)으로 옮겼다. 0.05% Tween 20을 포함하는 TBS 완충제 중에서 5% 소혈청알부민(BSA)으로 블로킹한 후, 계속해서 막을 마우스 항-스파이크(mouse anti-Spike)(S1-NTD)(E7M5X)(Ozyme, Cat. No. 42172S), 래빗 항-뉴클레오캡시드(rabbit anti-Nucleocapsid)(Fisher Scientific, Cat. No. MA536086)로 탐색하였다. 막을 래빗 항-GAPDH(Protein Tech, Cat. No. 60004-1-AP)로 탐색함으로써 증가의 단백질 적체를 평가하였다. 막을 서양고추냉이 과산화효소-연결 고트 항-마우스 2차 항체(horseradish peroxidase-linked goat anti-mouse secondary antibodies) 또는 서양고추냉이 과산화효소-연결 고트 항-래빗 2차 항체(horseradish peroxidase-linked goat anti-rabbit secondary antibodies)(Amersham Biosciences)로 처리하였다. 면역반응성 단백질(immunoreactive proteins)을 CCD 카메라(GBOX, SYNGENE Pxi-4, Ozyme)를 사용하여 향상된 화학발광(Pierces, USA)에 의해 검출하고 정량하였다.

[0099] **결과**

[0100] 상이한 농도의 QVDM-Oph 펩티드로의 치료는 감염되지 않았는지 감염-후 72시간 동안 MOI 0.05로 바이러스로 감염되었는지에 관계없이 Vero E6/TMPRSS2 세포에 독성 효과를 나타내지 않았다(도 1).

[0101] 상이한 농도의 QVDM-Oph의 항바이러스 및 사망도 영향은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 세포 내 염색과 사망도를 측정하기 위한 생존도 염료를 사용하는 유세포 분석에 의해 평가하였다. 렘데시비르를 연구 동안 양성 대조로 그리고 Vx765를 음성 대조로 사용하였다. SARS-CoV-2 복제에 대한 QVDM-Oph의 영향은 스파이크 단백질 및 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 바이러스 단백질 발현의 웨스턴 블롯 분석으로도 평가되었다. 유세포 분석 및 웨스턴 블롯에 의해 획득된 결과들은 10 μ M(억제는 대략 50%임) 및 25 μ M(억제는 대략 70%임)의 투여량에서 QVDM-Oph에 의한 바이러스 복제의 유의미한 억제를 나타내고 있다. 억제는 50 μ M(억제는 대략 99%임)의 농도에서 완료된다. 이러한 영향은 감염-후 72시간 동안 매일 투여에 대해 배양물 중의 바이러스의 지속적 존재와 함께 나타났다(전체 치료 조건). 이러한 감소는 렘데시비르에 대해 획득되는 것에 필적한다(도 2 및 도 3).

[0102] 계속해서, 본 발명자는 SARS-CoV-2 바이러스 유전자의 mRNA 발현, 그리고, 보다 구체적으로는, 치료되지 않았거나 QVDM-Oph로 치료된 감염된 세포 내에서의 스파이크(S), 뉴클레오캡시드(N) 및 비-구조적 단백질 6 또는 부속 단백질(accessory protein) ORF6(NSP6)의 유전자 발현을 알아보았다. 실제로, QVDM-Oph 치료는 세포 내에서의

구조 단백질 유전자, 스파이크 유전자, 뉴클레오펙시드 유전자 및 NSP6 유전자의 상대적 발현을 유의미하게 감소시킬 수 있다(도 4).

[0103] 마지막으로, 본 발명자는 QVDM-Oph가 세포로부터 배지에서의 바이러스의 분비/생산을 억제하였는 지의 여부를 확인하였다. 이를 위해, 본 발명자는 바이러스 추출 후 전체 치료 조건을 위해 치료되지 않았거나 상이한 억제제로 치료된 감염된 세포의 상청액을 분석하고 뉴클레오펙시드(N) 및 NSP6 유전자 발현에 대해 qRT-PCR을 수행하였다. Vero E6/TMPRSS2 감염되고 램테시비르와 마찬가지로 QVDM-Oph 치료된 세포의 상청액에서 SARS-CoV-2는 유의미하게 감소된다(도 5).

[0104] 이 모든 결과들은 세포가 2시간 동안 감염되고 계속해서 신선한 배지로 교체된 배지에서 바이러스가 완전히 제거되는 진입-후 치료 조건에서 재수행되었다. 모든 약물들이 상이한 농도로 감염 2시간 후에 첨가되었으며 72시간 동안 매일 첨가되었다. 진입-후 조건에서 수행된 실험들은 전체 치료 조건에서의 모든 실험들에서 기술된 것과 동일한 효과를 나타내고 있다(도 6, 도 7, 도 8 및 도 9).

[0105] 본 발명자의 조사결과는 QVDM-Oph 펩티드가 25 μ M 및 50 μ M의 농도에서조차도 독성을 수반함이 없이 세포 내에서의 바이러스 복제를 억제하고 바이러스 생산 및 새로운 감염을 예방함으로써 시험관 내 SARS-CoV-2 감염 제어에 매우 효과적임을 입증하고 있다.

[0106] 게다가, 동일한 농도에서 사용된 QVDM-Oph와 QVD-Oph를 비교하였을 때(도 5 및 도 9), QVDM-Oph가 동일한 농도에서 구현된 QVD-Oph 보다 더 효율적으로 세포로부터 배지에서의 바이러스의 분비/생산을 억제할 수 있다.

[0107] **실시예 2**

[0108] **재료 및 방법**

[0109] COVID-19 골든 시리안 햄스터 모델

[0110] **1. 윤리 선언**

[0111] 동물 수용 및 실험 절차는 French and European Regulations 및 National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals에 따라 수행되었다. 동물 시설은 프랑스 당국의 승인을 받았다(Agreement N° B 91 962 106). 본 연구에서 사용된 모든 동물 절차(해당하는 경우 수술, 마취 및 안락사를 포함)는 프랑스 당국이 승인한 Institutional Animal Care and Use Committee of Oncodesign(Oncomet)에 제출되었다(CNREEA agreement N° 91).

[0112] 동물 BSL3 시설은 프랑스 당국의 승인을 받았다(Agreement N° D92-032-02). 본 연구에서 사용된 모든 동물 절차(해당하는 경우 수술, 마취 및 안락사를 포함)는 프랑스 당국이 승인한 CEA의 Institutional Animal Care and Use Committee에 제출되었다(CETEA DSV - n° 44).

[0113] **2. 수용 조건**

[0114] 동물은 FELASA 지침에 따라 특정 병원체가 없는 건강한 상태로 유지되었다. 동물은 개별적으로 확인되었다. 동물은 조절된 환경 조건, 즉 온도: 21°C \pm 2°C, 습도: 55 \pm 10%, 광주기(photoperiod)(12시간 명(light)/12시간 암(dark)), H14 여과 공기 및 재순환 없이 시간 당 최소 12회 공기 교환 하의 수용 공간에서 유지될 것이다.

[0115] 각 우리(cage)는 특정 코드로 표지되었다. 동물 울타리(animal enclosures)는 아래에 기술되는 바와 같은 잠자리 재료(bedding material), 먹이와 물, 환경 및 사회적 풍부화(environmental and social enrichment)(그룹 수용(group housing))를 수반하는 무균이고 적절한 공간을 제공하였다: A3 시설(A3 facility): IsoRat900N 생물봉쇄 시스템(IsoRat900N biocontainment system)(Techniplast, France), 포플러 잠자리(Poplar bedding)(Select fine, Safe, France), A04 SP-10 급이시설(A04 SP-10 diet)(Safe, France), 수돗물(Tap water) 및 터널과 나무 막대를 수반하는 환경적 풍부화.

[0116] **3. SARS-CoV-2**

[0117] - 원래 European Virus Archive global(EVAg)(GISAID EPI_ISL_417879, <https://www.european-virus-archive.com/virus/sars-cov-2-strains/slovakia-sk-bmc52020>)에 의해 제공되고, Oncodesign에 의해 Vero E6/TMPRSS2 세포에서 제조되고 적정된 SARS-CoV-2 균주 "Slovakia/SK-BMC5/2020"이 햄스터 감염을 위해 사용되었다. 균주는 GH 그룹(GH clade)에 속한다.

[0118] - 40 mL의 최종 용적으로 50x10⁶ Vero E6/TMPRSS2 세포로 접종된 T175 플라스크에서 바이러스 생산이 수행되었

다. 세포 수와 생존도는 ViCell 장치에 의한 0.25% 트리판 블루(trypan blue) 배제 분석에 의해 평가되었다. 감염 기간 48시간 후(0.001 내지 0.005 MOI의 SARS-CoV-2 바이러스 수반), 현미경 관찰 하에 세포병원성 효과를 확인하였다. 배양 상청액을 수확하고, 원심분리(5000 g에서 5분)하고 분획(1 ml 분획)하였다.

[0119] - 바이러스 스톡 TCID50 역가가 Vero E6/TMPRSS2 세포에서 결정되었다. 시험 약 2시간 전에, 세포를 200 μ l의 완전 성장 배지(complete growth medium)(DMEM 10% FCS(fetal calf serum: 우태혈청))의 용적에서 웰 당 2×10^4 세포의 밀도로 96-웰 플레이트에 평판배양하였다. 세포는 바이러스 스톡의 연속 희석물(8-배; 1차 희석 1:100; 5-배 연속 희석물)로 1시간 동안 37°C에서 감염되었다. 공급자 프로토콜(Promega, reference #G5430)에 따라, 72시간 동안 신선한 배지를 첨가하고 계속해서 MTS/PMS 분석을 수행하였다. ELISA Plate 판독기를 사용하여 플레이트를 판독하고 데이터를 기록하였다. 감염도는 Spearman-Kärber 공식을 기반으로 하여 TCID50/ml/72h로 표현되었다.

[0120] 실험 설계 및 치료

[0121] **1. 동물**

[0122] 수령할 때 6 내지 8주령인, 12개체의 건강한 골든 시리안 햄스터(암컷)를 Janvier Labs로부터 획득하였다.

[0123] **2. 무작위 그룹화**

[0124] 동물을 칭량한 후 5개체의 동물들로 이루어지는 2개의 동질적인 군으로 할당하였다. 동물들은 꼬리에 표지를 하였다.

[0125] **3. 치료**

[0126] 치료제는 10 ml/kg의 총 용적 이하 그리고 접종 시점 마다 복강내(IP) 경로로 투여되었다. 시험 물품은 0일차(t+1h) 및 1일차에 접종되었다. 시험 물질로의 치료는 아래에 표시된 스케줄에 따라 수행되었다:

[0127] - A군 동물들(비히클) 복강내(IP) 경로를 사용하여 2.5% DMSO로 보충된 염화 나트륨 0.9%를 사용하여 접종이 수행되었다;

[0128] - B군 동물들(Q-VDM-OPH)은 시험 화합물(10 ml/kg 용적, 10 mg/kg 투여량)을 0일차(t+1h) 및 1일차에 2회 복강내 경로로 수령하였다;

[0129] - C군 동물들(Q-VE-OPH)은 시험 화합물(ml/kg 용적, 10 mg/kg 투여량)을 0일차(t+1h) 및 1일차에 2회 복강내 경로로 수령하였다.

[0130] **4. SARS-CoV-2 시험**

[0131] SARS-CoV-2의 투여 경로는 Oncodesign에 의해 선택되었다. 바이러스는 이소플루란-마취(Isoflurane-anesthetized) 동물에서 70 μ l(비공(nostril) 당 35 μ l)의 총 용적으로 비강내(IN) 경로로 투여되었다. 동물 당 10^5 pfu TCID50의 비강내 투여량이 투여되었다. 모든 그룹은 0 일차에 비강내 경로로 SARS-CoV-2를 수령하였다.

[0132] **5. 감염-후 2일차(2dpi)에서 동물의 살처분**

[0133] 동물(n=12)은 감염-후 2일차(2dpi)에 살처분하였다. 복강내 경로로 주입된 Zoletil(30 mg/kg - 0.6 ml/kg)과 Xylazine(10 mg/kg - 0.5 ml/kg)의 콕테일을 사용하여 동물을 깊이 마취시켰다. 완전한 경추 탈구 후 개흉술(thoracotomy)을 한 후 폐를 수집하였다.

[0134] 상우엽(superior right lobe)을 RNAlater에 밤새도록 4°C에서 투입하고, 계속해서 qRT-PCR에 의해 바이러스 부하를 정량하기 위해 RNA를 추출할 때까지 -80°C에서 저장하였다. 중대정맥(middle caval), 후대정맥(post caval) 및 하우엽(inferior right lobes)은 액체 질소 중에서 급속 동결시킨 다음 추후 사용할 때까지 -80°C에서 저장하였다.

[0135] 생체 외 분석

[0136] **1- 계층 RT-베CR에 의한 폐 중의 바이러스 부하 결정**

[0137] 바이러스 ORF1ab 유전자를 사용하여 폐로부터 RT-qPCR에 의한 바이러스 부하의 정량이 수행되었다. 바이러스 RNA의 추출은 Macherey Nagel Viral RNA 키트(ref. 740452.4)를 사용하여 수행되었다. RNA는 qRT-PCR을 수행할 때까지 -80°C에서 동결시켰다. 완전 qRT-PCR은 Superscript™ III One-Step qRT-PCR System 키트(상용 키트

#1732-020, Life Technologies)를 사용하여 ORFlab 유전자를 표적으로 하는 프라이머 및 qRT-PCR 조건으로 실행되었다. Bio-Rad CFX384™과 그에 결합된 소프트웨어를 사용하여 증폭을 수행하였다. 이러한 정량을 위해 구현된 프라이머와 탐침은 다음과 같다:

[0138] ORFlab_Fw: CCGCAAGTTCTTCTCTCGTAAAG (서열 목록 중의 시퀀스 동정 번호: 9);

[0139] ORFlab_Rv: TGCTATGTTTAGTGTCCAGTTTTTC (서열 목록 중의 시퀀스 동정 번호: 10);

[0140] ORFlab_probe: Hex-AAGGATCAGTGCCAAGCTCGTCGCC-BHQ-1 (서열 목록 중의 시퀀스 동정 번호: 11) 여기에서 5'-말단 위치의 Hex가 헥사클로로플루오레세인(Hexachlorofluorescein)을 나타내고 3'-말단 위치의 BHQ-1이 Black Hole Quencher-1을 나타냄.

[0141] **2- 동물 모니터링**

[0142] **임상 모니터링**

[0143] SARS-CoV-2 감염 후 동물 생존도, 거동 및 체중을 매일 모니터링하였다. 하기 나열된 매개변수를 사용하여, SARS-CoV-2 감염 후 매일 모델별 임상 추적을 기록하였다:

[0144] - 체중 손실

[0145] - 입모(piloerection) (없음 - 약간 - 뚜렷함)

[0146] - 거동(정상 - 이동성이 저하됨 - 무정형 또는 고립됨)

[0147] - 자세(정상 - 비정상 - 구부정함)

[0148] - 기침(존재 또는 부존재)

[0149] - 재채기(존재 또는 부존재)

[0150] **인도적 종료점(Humane endpoints)**

[0151] 인도적 종료점은 다음과 같이 설정되었다:

[0152] - 최대 2 연속일 동안 지속되는 20%의 체중 손실(치료 첫날 또는 최대 체중에 비해),

[0153] - 통증, 고통 또는 괴로움의 징후: 통증 자세(pain posture), 통증 안면 마스크(pain face mask), 이상 행동 또는 발성,

[0154] - 몸 상태가 안 좋아지고, 수척해지고, 악액질하고, 탈수됨,

[0155] - 방광 내의 피개물(bladder outflow obstruction) 또는 48시간에 걸친 설사,

[0156] - 외부 자극에 대한 자발적 반응 부재의 장기화,

[0157] - 빠르고 가쁜 호흡,

[0158] - 빈혈, 상당한 출혈,

[0159] - 요관구(orifice)의 출혈성 또는 점액농즙성 분비물,

[0160] - 신경학적 징후: 회선병(circling), 경련, 후지 마비(hind limb paralysis),

[0161] - 지속적인 체온 저하,

[0162] - 복부 팽만.

[0163] **마취 및 통각 상실**

[0164] 시험 제품 접촉 및 경정맥(jugular vein)에서의 혈액 채취(해당되는 경우)를 위해 이소플루란 가스 마취가 사용되었다. 모든 고통스러운 시술에 대해 비-약물적인 관리가 제공되었다. 추가로, 연구에 간섭하지 않는 약물적 관리(국소 치료)가 담당 수의사의 권유에 따라 제공될 수 있다.

[0165] **안락사**

[0166] 복강내 경로로 주입된 Zoletil(30 mg/kg - 0.6 ml/kg)과 Xylazine(10 mg/kg - 0.5 ml/kg)의 각테일을 사용하는 깊은 마취 하에 동물의 안락사를 수행하였다. 완만한 경추 탈구 후 개흉술 및 최대 말기 혈액 채취를 수행한 후

조직을 수집하였다. 안락사(경추 탈구)를 위한 물리적 방법이 필요한 경우, 고도로 숙련되고 훈련된 기술자에 의해 수행되었다.

[0167] 통계학적 분석

[0168] Prism 소프트웨어(GraphPad, version 8, San Diego, USA)를 사용하여 통계학적 분석이 수행되었다. 시험관 내 실험의 경우, Oneway ANOVA 검정 후 Dunnett의 사후 검정이 사용되었다. 생체 내 실험의 경우, Mann-Whitney 검정을 사용하여 동물 군들 간의 정량적 데이터를 비교하였다. 데이터는 평균 ± 표준오차를 나타낸다. One-way ANOVA 검정에 기반하여 통계들이 계산되었다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

[0169] 결과

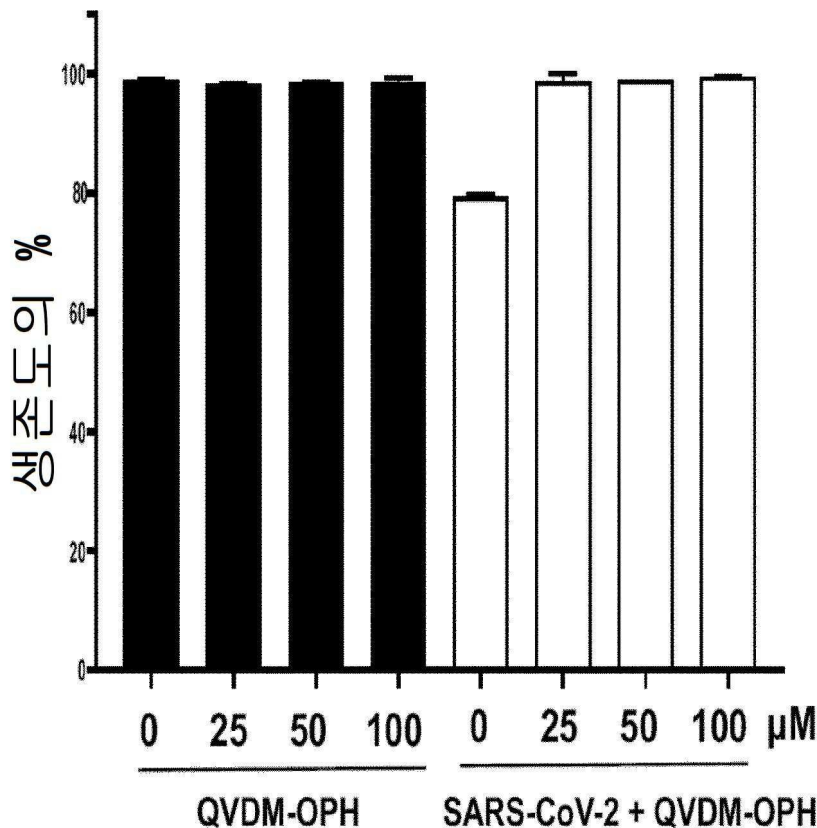
[0170] SARS-CoV-2에 대한 QVDM-OPh의 항바이러스 효과에 대해 시험관 내에서 수행된 연구를 완료하기 위해, 본 발명자는 COVID19 글든 시리안 햄스터 모델에서의 생체 내 분석을 실현하여 폐에서의 바이러스 복제를 억제하는 QVDM-OPh 펩티드의 효능을 입증하고 이를 QVE-OPh와 비교하였다.

[0171] 임상 점수 및 체중 변화 대 0 일차(body weight change vs Day 0)는 감염되고 치료되지 않은 군에 비해 감염되고 QVDM-OPh-치료된 군 및 감염되고 QVE-OPh-치료된 군에서 고무적인 결과를 나타내고 있다(도 10a). 분석이 접종-후 2일차(dpi2)에서 중단되고, 이 시점에서 동물이 안락사되었음에도 불구하고, 결과는 매우 고무적이며 치료되지 않은 군에 비해 감염되고 치료된 동물의 폐에서의 바이러스 부하 및 바이러스 복제의 유의미한 감소를 나타낸다(각각 도 10b 및 도 10c). 게다가, 바이러스 부하 및 바이러스 복제의 감소는 QVE-QVE-OPh로 치료된 동물(52%의 바이러스 감소)에 비해 QVDM-OPh로 치료된 동물(70%의 바이러스 복제 감소)에서 보다 더 영향력이 크다.

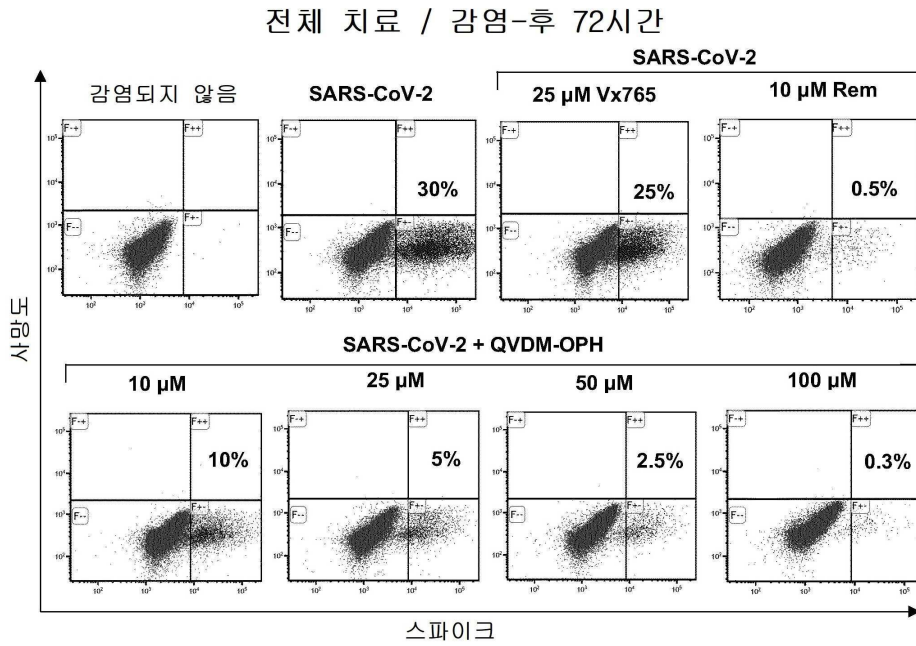
[0172] 이러한 시험관 내 및 생체 내 결과들은 모두 SARS-CoV-2 복제에 대한 QVDM-OPh의 항-바이러스 효과를 확증하고 있다.

도면

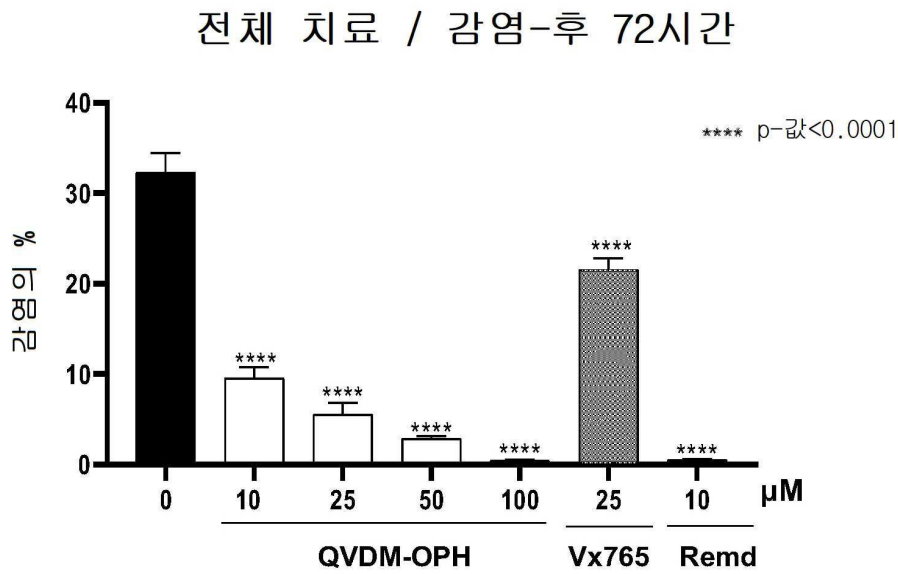
도면1



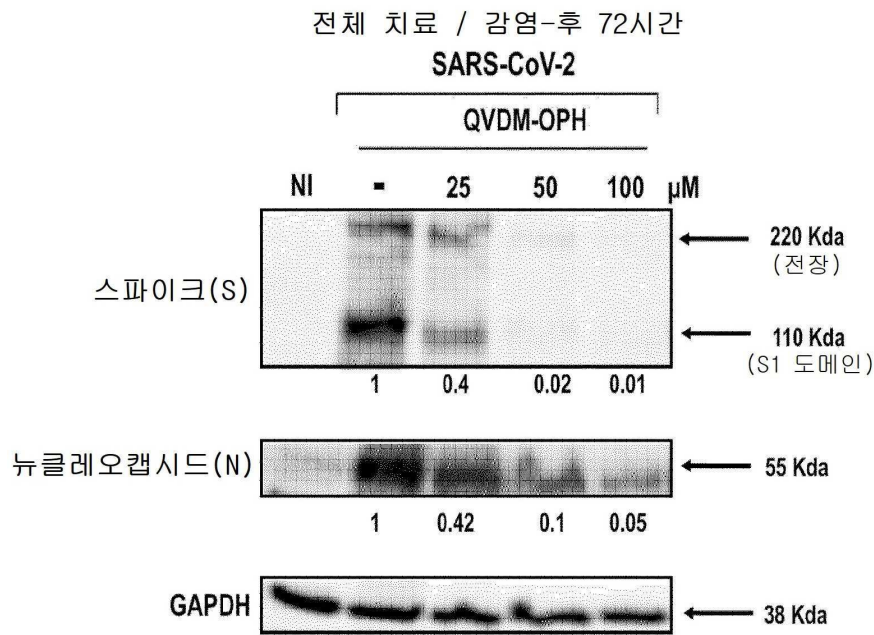
도면2a



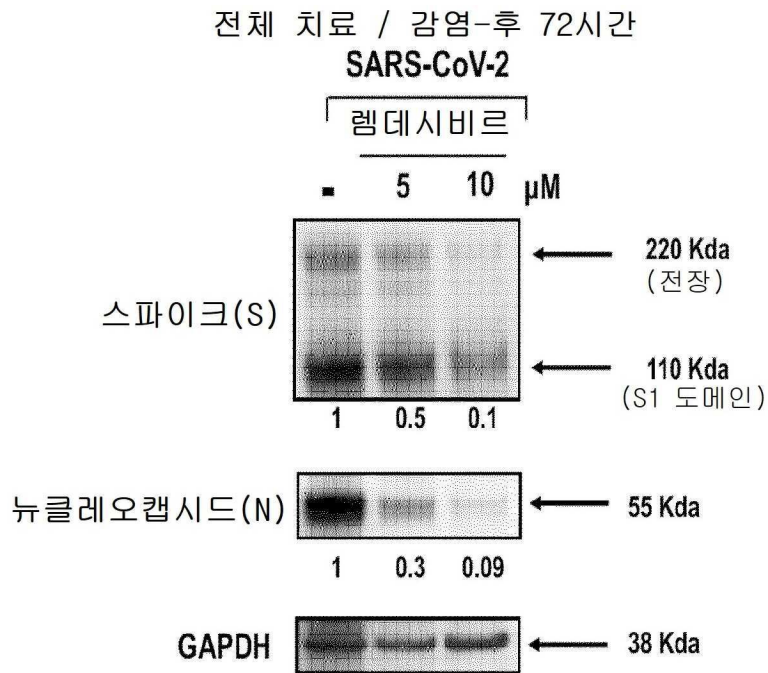
도면2b



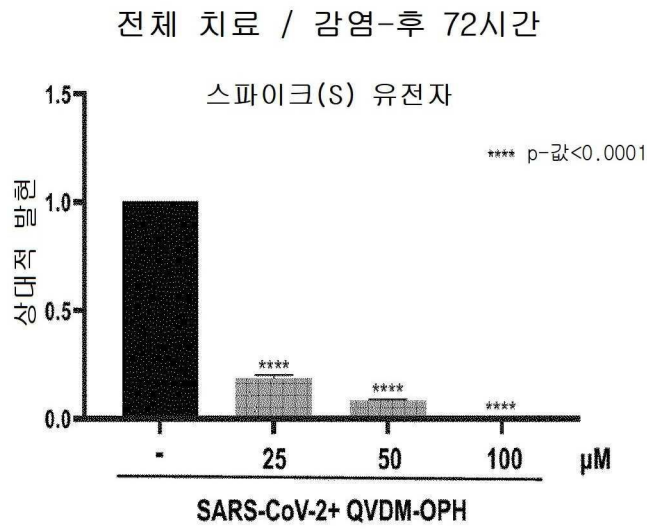
도면3a



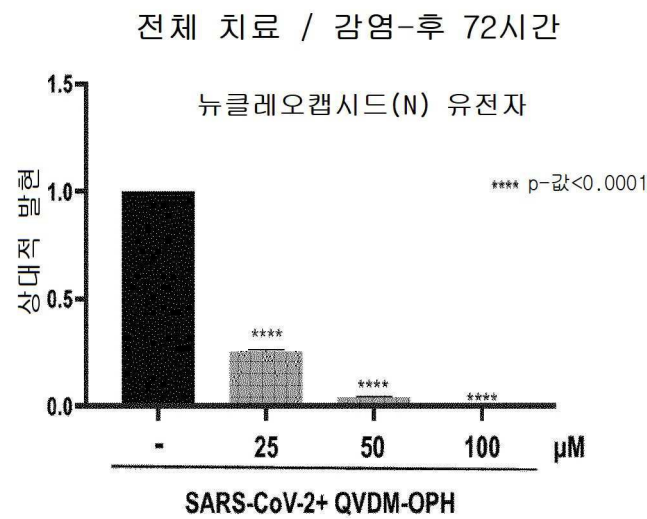
도면3b



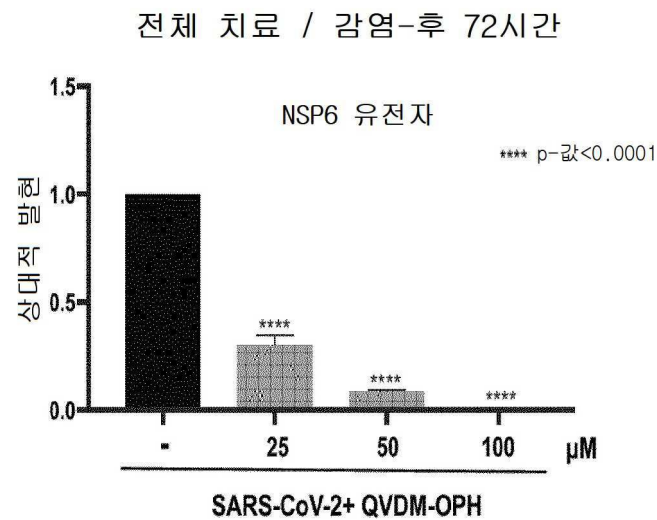
도면4a



도면4b

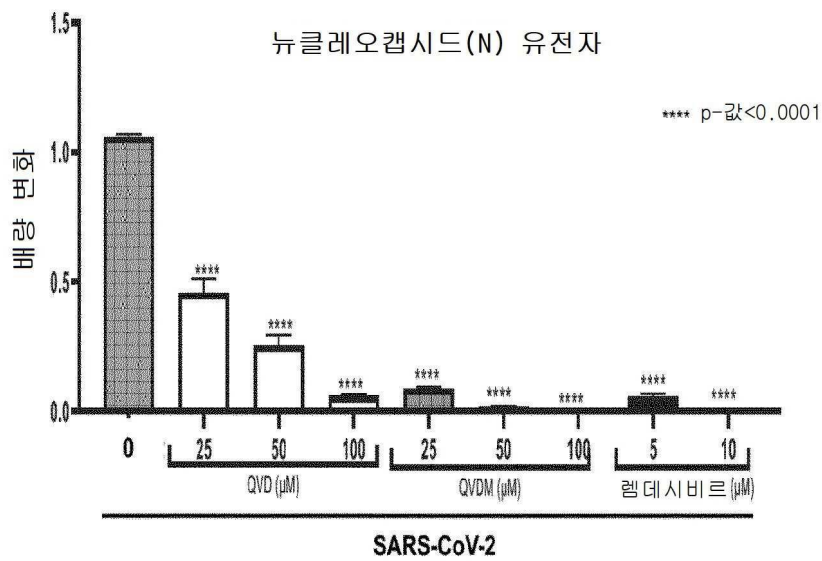


도면4c



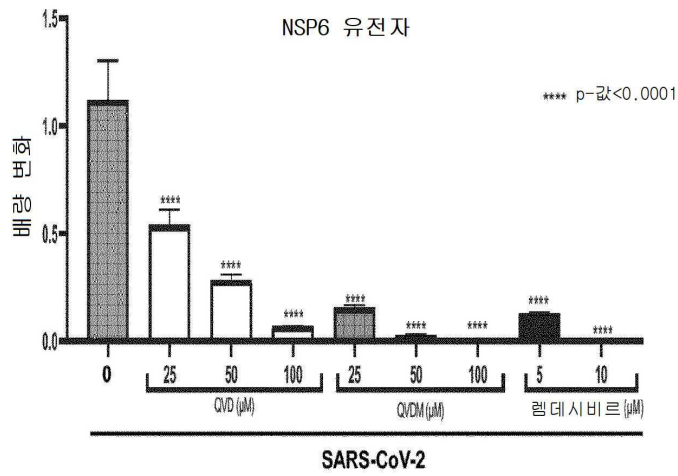
도면5a

전체 치료 / 감염-후 72시간

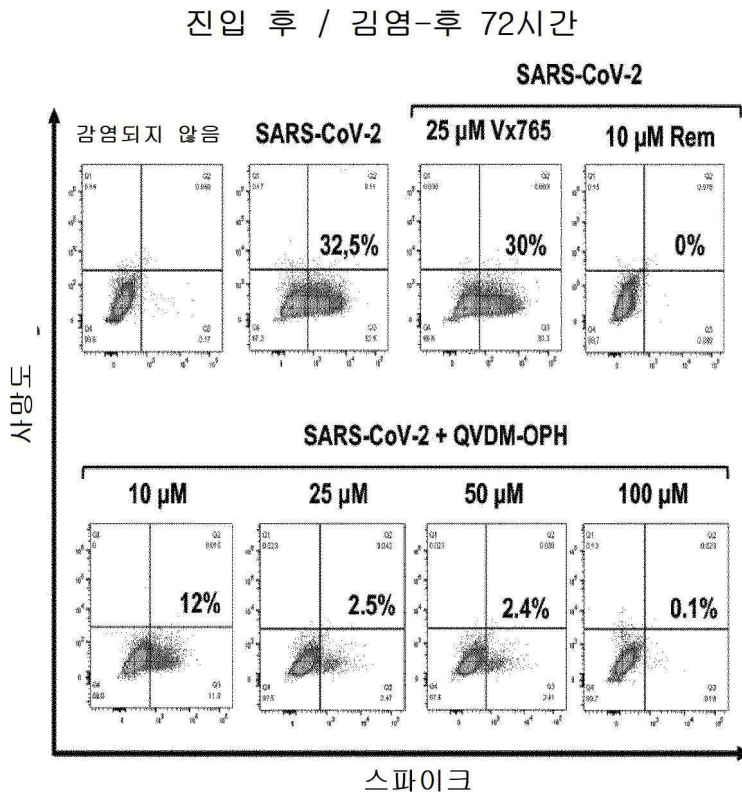


도면5b

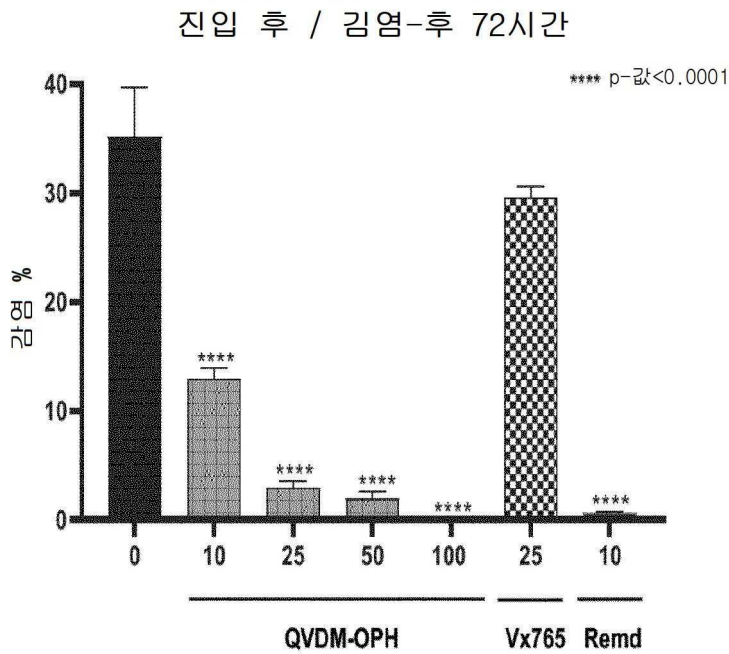
전체 치료 / 감염-후 72시간



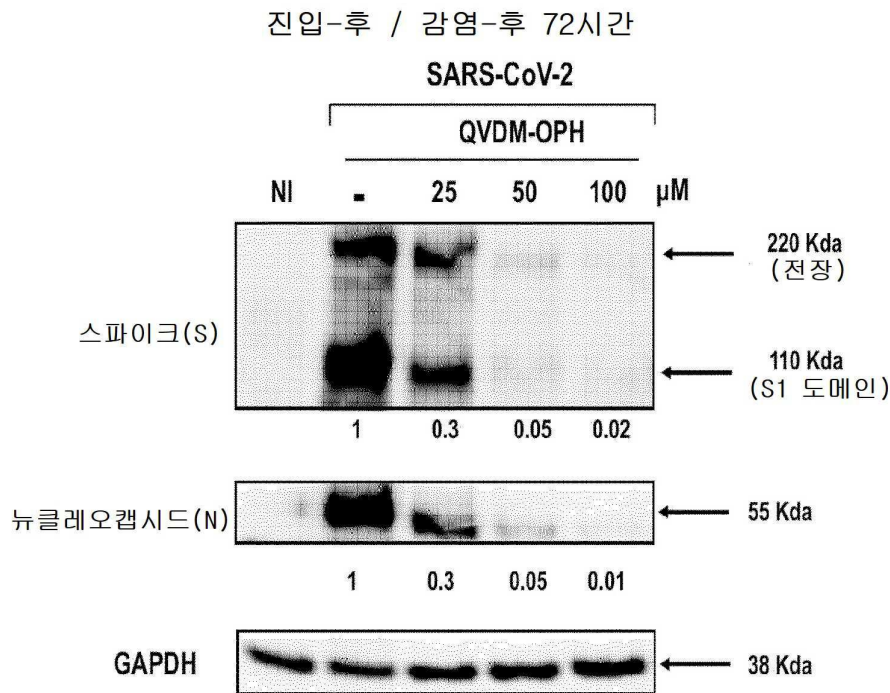
도면6a



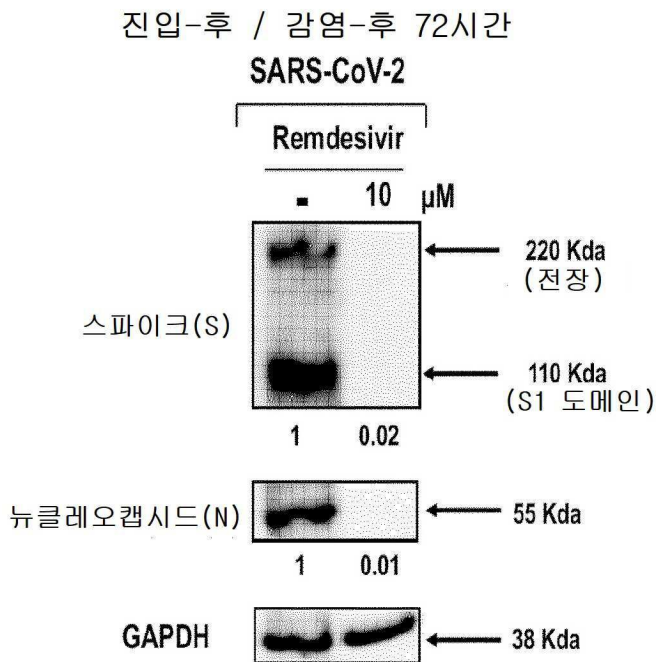
도면6b



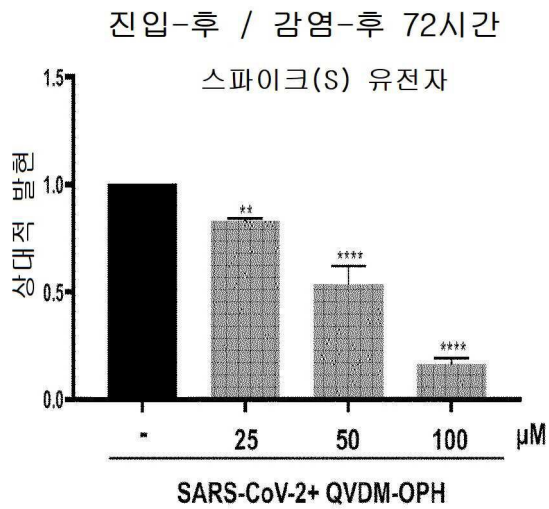
도면7a



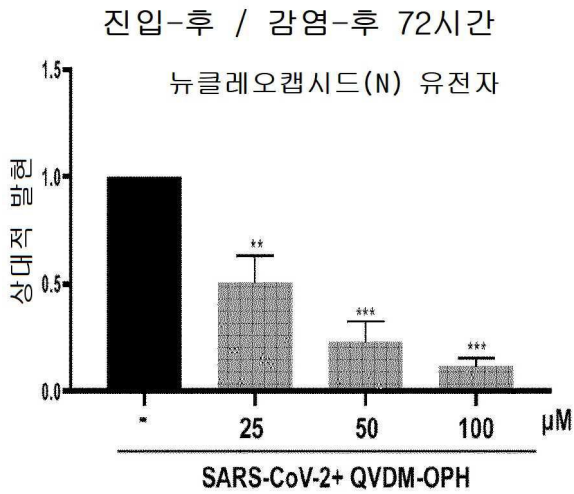
도면7b



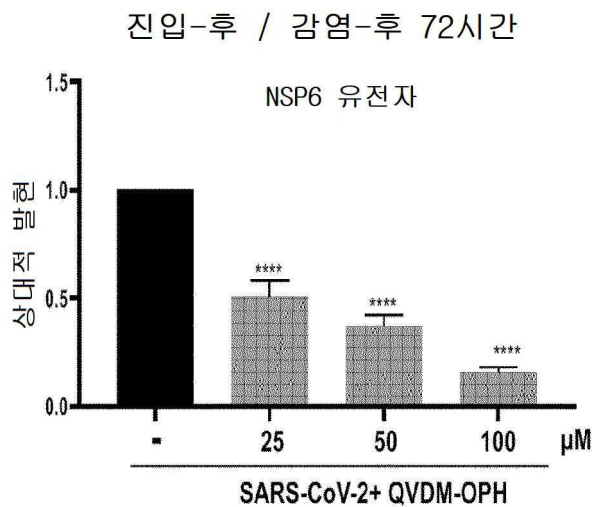
도면8a



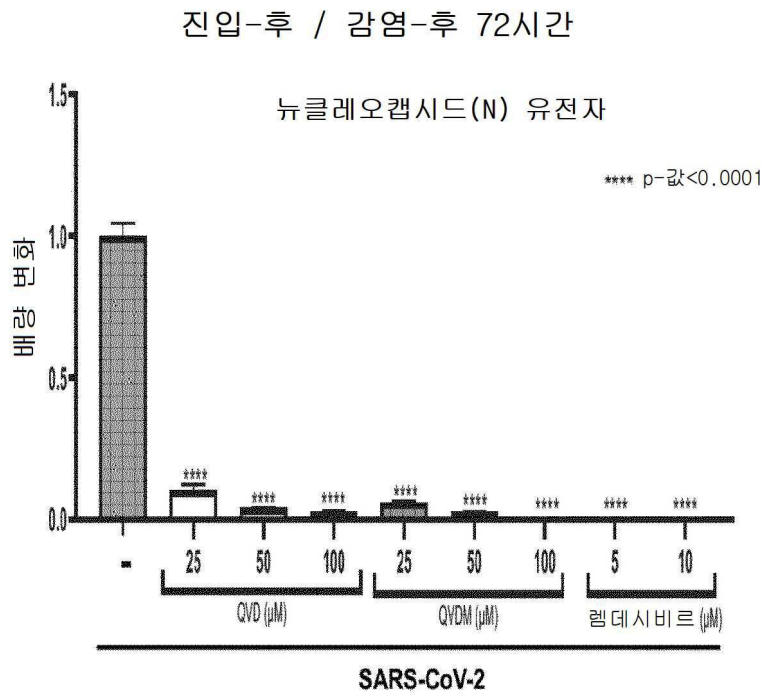
도면8b



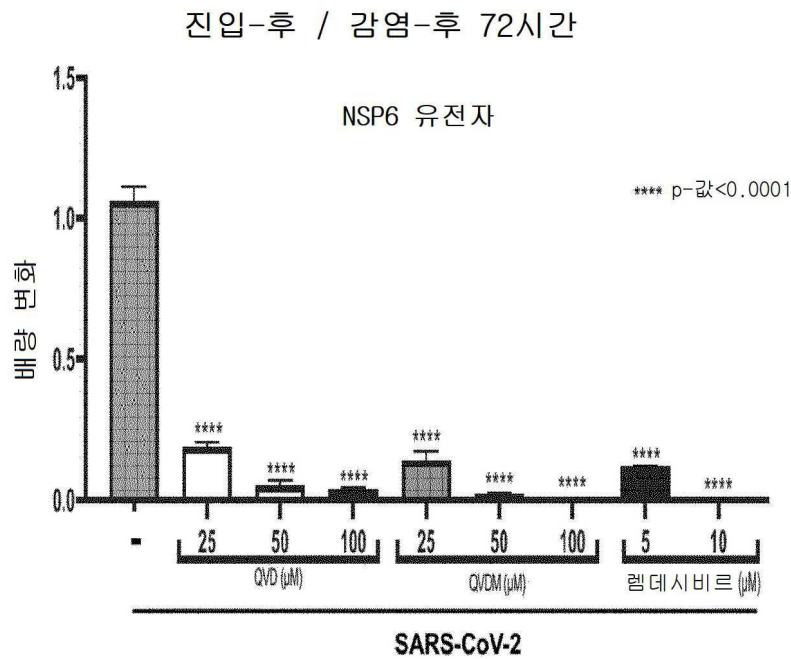
도면8c



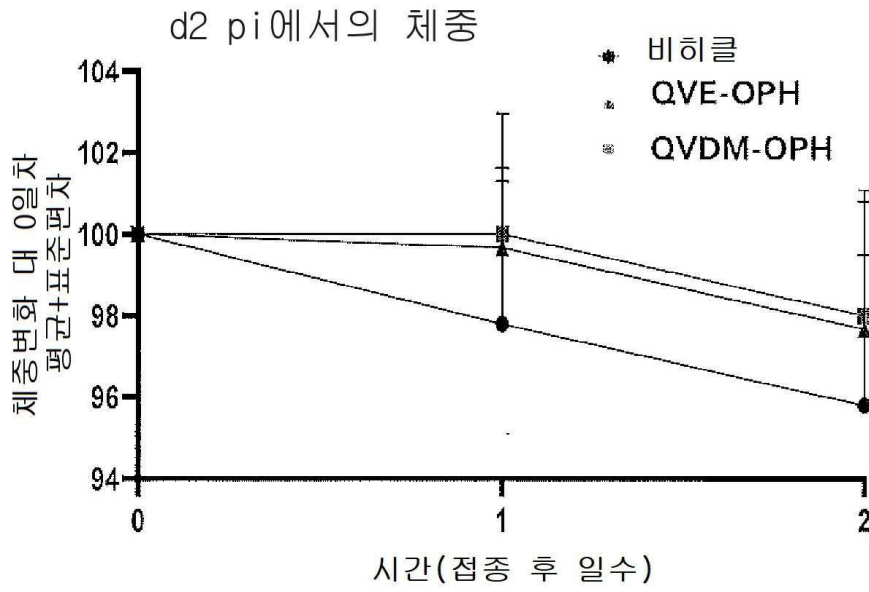
도면9a



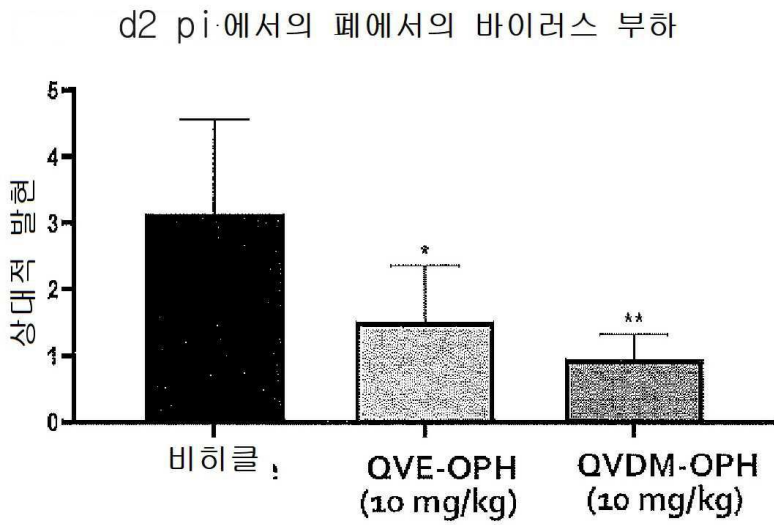
도면9b



도면10a

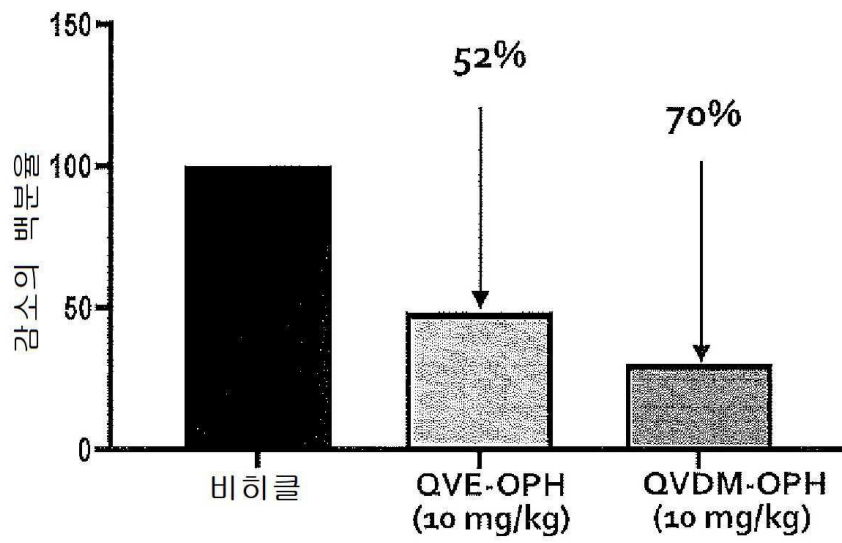


도면10b



도면10c

d2 pi 에서의 폐에서의 바이러스 복제 감소의 %



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.