



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월07일

(11) 등록번호 10-1944909

(24) 등록일자 2019년01월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/336 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)

A61K 31/343 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01) A61Q 19/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/336 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0095963

(22) 출원일자 2017년07월28일

심사청구일자 2017년07월28일

(56) 선행기술조사문헌

US20070203073 A1

KR1020130071032 A

Biochemistry. 2016 May 31; 55(21): 3007-3019

(73) 특허권자

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

김성한

서울특별시 강남구 압구정로29길 57, 204동 903호(압구정동, 현대아파트)

김지연

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, 울산대학교 의과대학(풍납동)

김인기

서울특별시 강동구 고덕로 131, 126동 2201호(암사동, 강동 롯데캐슬퍼스트아파트)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 10 항

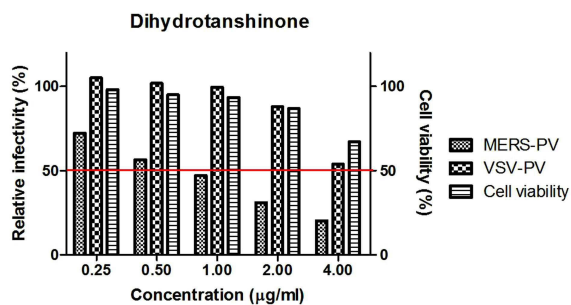
심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 중등호흡기 증후군의 예방 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 중등호흡기 증후군(MERS)의 예방 또는 치료용 약학조성물 및 중등호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 흡착방지제에 관한 것으로, 이는 중등호흡기 증후군 코로나바이러스의 세포 내 흡착 기전에 의한 감염을 억제함으로써, 중등호흡기 증후군을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도3a



(52) CPC특허분류

A61K 31/343 (2013.01)
A61K 8/4973 (2013.01)
A61K 9/006 (2013.01)
A61K 9/0073 (2013.01)
A61Q 19/10 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015-1651
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 질환극복기술개발
 연구과제명 신변종 감염병 진단을 위한 새로운 고속, 정밀, 고감도 진단기술의 임상적 유용성
 기 여 율 50/100
 주관기관 서울아산병원
 연구기간 2015.12.03 ~ 2016.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345266098
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공학학술연구기반구축
 연구과제명 안전하고 효율적인 슈도바이러스 시스템을 이용하여 신변종 바이러스를 억제하는 천연물
 스크리닝
 기 여 율 50/100
 주관기관 울산대학교(의대)
 연구기간 2017.06.01 ~ 2018.02.28

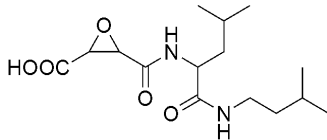
명세서

청구범위

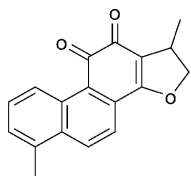
청구항 1

하기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물 중 어느 하나, 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 중동호흡기 증후군(MERS)의 예방 또는 치료용 약학조성물.

[화학식 1]



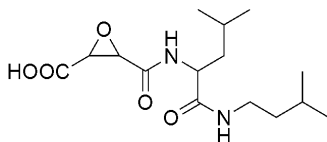
[화학식 2]



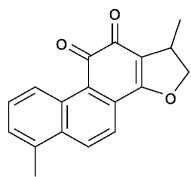
청구항 2

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 중동호흡기 증후군(MERS)의 예방 또는 개선용 기능성 식품.

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 3

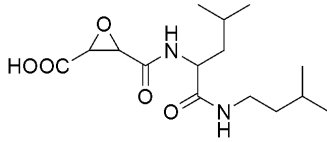
제2항에 있어서,

상기 건강기능 식품 총 중량에 대하여 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 0.001 내지 15 중량%로 포함됨을 특징으로 하는 중동호흡기 증후군(MERS)의 예방 또는 개선용 기능성 식품.

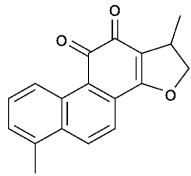
청구항 4

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)에 대한 항바이러스용 조성물.

[화학식 1]



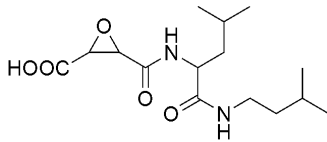
[화학식 2]



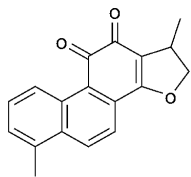
청구항 5

하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 포함하는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 흡착방지제.

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 6

제5항의 흡착방지제를 포함하는 코팅제.

청구항 7

제5항의 흡착방지제를 포함하는 세정제.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 세정제는 자동차 세정제, 구강 세정제 또는 손 세정제인 것을 특징으로 하는 세정제.

청구항 9

제5항의 흡착방지제를 포함하는 스프레이.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 스프레이는 눈 스프레이, 코 스프레이 또는 구강 스프레이인 것을 특징으로 하는 스프레이.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 중동호흡기 증후군(MERS)의 예방 또는 치료용 약학조성물 및 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 흡착방지제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 바이러스(virus)란 라틴어로 독성물질을 의미하며, 세균여과지(0.22 μm)를 통과하는 일군의 감염형 병원성 입자를 의미한다. 바이러스는 숙주세포의 종류에 따라 박테리오파지, 식물 바이러스, 동물 바이러스로 분류하기도 하며, 핵산의 종류에 따라 DNA 바이러스, RNA 바이러스로 분류할 수 있다. 최근 신종플루, AI 및 구제역 등 다양한 바이러스 질병이 사회적으로 큰 문제를 일으켰으며, 이에 따라 바이러스 질병의 효과적인 대책에 대한 고민이 사회적으로 큰 관심을 불러일으키고 있다.

[0003] 코로나바이러스(coronavirus)는 알파, 베타, 감마, 델타의 4가지 속(屬, genus)으로 나뉘는데, 메르스 코로나바이러스는 베타코로나바이러스에 속한다. 정체가 알려지기 전인 발견 초창기에는 같은 베타코로나바이러스 속에 속한 사스 코로나바이러스의 유사 바이러스, 혹은 그냥 신종 코로나바이러스로 취급 받았으나 2013년 5월 23일에 바이러스 분류학 국제 위원회에서 메르스 코로나바이러스라는 공식 명칭을 채택하면서 상기 사스 코로나바이러스와는 다른 독자적인 정식 명칭을 갖게 되었다.

[0004] 메르스 코로나바이러스는 중동호흡기 증후군(Middle East Respiratory Syndrome, MERS)이라는 질병을 유발하며, 사스 코로나바이러스에 의한 질병과는 질병의 원인, 전파양상, 증상, 유행기간, 치료법, 치사율 등이 본질적으로 다르다.

[0005] 중동호흡기 증후군(Middle East Respiratory Syndrome, MERS)은 MERS-CoV는 사람과 동물 모두에 감염되며 발열, 기침, 호흡 곤란 2) 동아시아(중국, 한국 등), 아프리카(알제리, 튀니지), 미국(미국), 유럽(미국, 유럽)에서 2012년 이후로 총 1843 개의 실험실 확진 사례와 705명의 사망자가 보고되었다. 영국, 프랑스 및 중동 지역에서는 사망률이 38%이었다. 2015년 한국에서 MERS-CoV가 발병한 사례는 186 건, 사망자는 38 (20%)건이었다. 이러한 막대한 피해에도 불구하고, 현재까지 중동호흡기 증후군에 대한 바이러스 질병을 효과적으로 예방하거나 치료할 수 있는 방법은 없고, 비특이적인 보존적 치료에 의존하고 있는 상태이다.

[0006] 또한 기존의 항바이러스 제제는 독성 및 다양한 부작용을 야기함에 따라, 이러한 단점을 극복하여 독성 및 부작용이 거의 없는, 우수한 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 억제활성을 갖는 조성물의 개발이 절실히 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허공보 제10-2004-0091722호

발명의 내용

해결하려는 과제

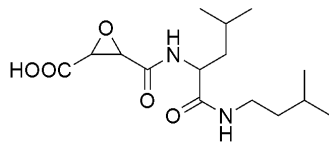
[0008] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 감안하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 중동호흡기 증후군(MERS)의 예방 또는 치료를 위한 새로운 약학조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 흡착방지제를 제공하는 것이다.

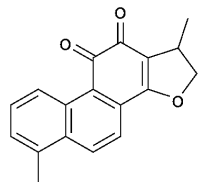
과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, 하기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물 중 어느 하나, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 프로드러그(prodrug)를 유효성분으로 포함하는 중동호흡기 증후군(MERS)의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

화학식 1

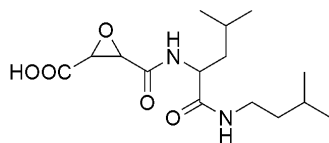


화학식 2

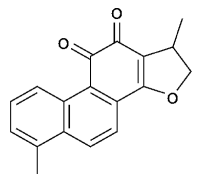


또한 본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 중동호흡기 증후군(MERS)의 예방 또는 개선용 기능성 식품을 제공한다.

[화학식 1]



[화학식 2]



상기 건강기능 식품 총 중량에 대하여 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 0.001 내지 15 중량%로 포함됨을 특징으로 한다.

또한 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)에 대한 항바이러스용 조성물을 제공한다.

또한 본 발명은 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 포함하는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 흡착방지제를 제공한다.

또한 본 발명은 상기 흡착방지제를 포함하는 코팅제, 세정제(자동차 세정제, 구강 세정제 또는 손 세정제), 스프레이(눈 스프레이, 코 스프레이 또는 구강 스프레이)를 제공한다.

발명의 효과

본 발명에 따른 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물 중 어느 하나, 이의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드러그(prodrug)는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스의 Spike 단백질에 결합하여, 활성화를 억제시켜 세포 표면에 흡착되지 못하게 함으로써, 중동호흡기 증후군을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

따라서 본 발명의 화학식 1 또는 2의 화합물을 유효성분으로 함유한 조성물을 중동호흡기 증후군을 치료하거나 예방할 수 있는 의약품 또는 건강식품 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

본 발명은 중동호흡기 증후군 코로나바이러스의 S 단백질을 발현할 수 있도록 제조된 MERS-PV 슈도바이러스

(MERS-pseudovirus)를 통해, 중동호흡기 증후군 코로나바이러스에 대한 흡착 억제 활성을 분석하고, 세포생존율을 측정하여, 독성이 낮으면서 예방 효과는 현저함을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 스크리닝 공정을 단계별로 도시한 공정도이다.

도 2는 MERS-CoV 환자의 혈장(plasma)에 의한 MERS-PV의 중화항체분석(Neutralization) 결과로, 혈장 희석비율이 1:1280일 때, 50%로 중화되었으므로, 적정량(titer)은 혈장 희석비율이 1:1280 이상임을 확인하였다. 상기 데이터는 평균 및 표준 편차로 표시한다.

도 3은 최종 선별된 화학식 1(b;E-64-C), 화학식 2(a;dihydrotanshinone)로 표시되는 화합물의 농도(0.25 내지 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 따른 상대감염율(%) 및 세포생존율(%)을 측정하여 나타낸 그래프이다. 이때, MERS-PV에 대한 상대감염율(%)은 원으로 채워진 막대그래프로 표기하고, VSV-PV에 대한 상대감염율(%)은 사각형으로 채워진 막대그래프로 표기하며, 세포생존율(%)은 세로줄로 채워진 막대그래프로 표시한다. 상기 실험은 총 세 번의 반복실험을 수행한 것이고, 데이터는 평균 및 표준 편차로 표시하였다.

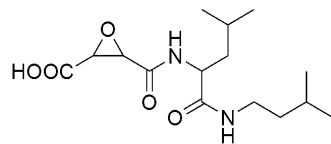
도 4는 최종 선별된 화학식 1(b;E-64-C), 화학식 2(a;dihydrotanshinone)로 표시되는 화합물의 MERS-PV 흡착 차단 효과를 측정하여 나타낸 그래프이다. 최종 선별된 각각의 화합물에 따른 차단 효과를 명확히 분석하기 위하여, 시간별 분석법(time-point-assay)으로 수행한다. 구체적으로 상기 최종 선별된 각 화합물을 MERS-PV 부착한 숙주세포에 처리하거나(사전 세포부착능 분석;post-attachment, circle dots), MERS-PV와 동시에 숙주세포에 처리한 다음 세포부착능을 분석한다. 또한, 상기 화합물을 MERS-PV와 혼합하고 2 시간동안 배양한 다음 숙주세포에 처리한다(사후 세포부착능 분석;pre-attachment, horizontal stripes). 사후 세포부착능 분석에서, 상기 상대감염율(%)은 부착되기 전이나 부착되는 동안보다 현저히 높았다. 상기 실험은 총 세 번의 반복실험을 수행한 것이고, 데이터는 평균 및 표준 편차로 표시하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

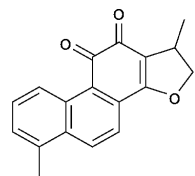
이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현예에 대해 더욱 구체적으로 살펴보도록 한다.

본 발명의 일 측면은 하기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)로 인한 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[화학식 1]



[화학식 2]



중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)는 spike 단백질(이하, S 단백질이라고 한다)이라고 하는, S 단백질을 사용하여 숙주세포에서 dipeptidyl peptidase 4(DPP4)에 결합하는 것이라 여겼고, 실험에 적용하기 위하여 MERS-CoV의 표면에 존재하는 S 단백질을 발현하는 슈도바이러스(MERS-PV)를 설계 및 제조하여, 이를 DPP4 수용체가 많은 Huh7.5에 첨가하여 감염성을 평가하였다. 그 결과 MERS-PV로 Huh7.5 세포가 효과적으로 감염되는 것과, MERS-CoV로 진단된 인간 혈장에 의해 중화되는 것을 확인하였다.

따라서 Env-결핍 HIV-1을 코딩하고, 루시페라아제를 발현하는 제1 플라스미드 벡터(pVRC5601 12-09 luciferase), MERS-CoV S 단백질을 갖는 제2 플라스미드 벡터(pVRC4766 MERS S TM Korea 002) 및 envelope packaging 제3 플라스미드 벡터(pVRC5602 polymerase)를 공동 형질감염 시킨 슈도바이러스(MERS-PV)를 제조하고, 상기 MERS-PV에 후보 화합물을 처리하여, 루시페라아제 활성을 측정하는, MERS-CoV 감염 억제 활성 평가

방법을 통해, 유효 화합물을 효과적으로 스크리닝할 수 있었다.

[0034] 일반적으로 화합물은 치환기에 따라 반응속도(활성화와 관련)와 반응의 지향성이 현저히 달라지게 되고, 치환기에 따라 유발효과 차이가 발생하기 때문에, 본 발명에 따른 화학식 1 또는 2의 화합물 역시 치환기가 변경될 경우, 중동호흡기 증후군 코로나바이러스 S 단백질의 활성 억제 효과가 감소하여 중동호흡기 증후군에 대한 예방 또는 치료 효과가 저하될 수 있다.

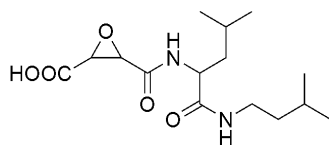
[0035] 상술한 방법으로 선별된 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물은, 다양한 실험을 통해 MERS-PV 감염을 50% 이상 억제하고, VSV-PV (vesicular stomatitis virus-pseudovirus) 감염은 20% 미만 억제하며, 세포에 대한 독성(세포생존율 90 % 이상)도 거의 관찰되지 않는 것을 확인하였다.

[0036] 게다가 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물은 사전 세포부착능, 사후 세포흡착후 분석을 통해, MERS-CoV가 세포 표면에 흡착되어 세포 내로 진입하는 과정을 차단하여 MERS-CoV 감염을 억제한다는 것을 확인하였다.

[0037] 따라서 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 포함하는 본 발명에 따른 약학조성물은 숙주 세포내에서 MERS-CoV의 RNA 복제 과정을 억제하는 것이 아닌, MERS-CoV의 세포 흡착을 사전에 차단하는 효과를 가지고 있음을 의미하는 것으로, 본 발명의 화합물은 상기 언급된 MERS-CoV에 의해 유발된 질환에 대한 예방 및 치료 약제로서 사용될 수 있음을 알 수 있다.

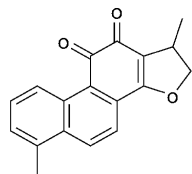
[0038] 본 발명에서 루시퍼라아제 리포터 백본에서 유사(pseudovirus) 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)의 스파이크 단백질(spike protein)을 사용하여 고효율 저해효과를 측정할 수 있는 분석법을 통해, 502 종의 화합물을 스크리닝 하였고, 이중에서도 하기 본 발명의 화학식 1, 2로 표시되는 화합물은 저농도($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)에서도 우수한 예방 또는 치료효과를 가지면서, 세포 독성이 없는 비독성 화합물로 최종 선별되었다.

[0039] [화학식 1]



[0040]

[0041] [화학식 2]



[0042]

[0043] 상기 중동호흡기 증후군(MERS; 메르스)은 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)로 인한 질병일 수 있다.

[0044] 본 명세서를 통해 사용된 용어 "약학적으로 허용되는 염"이란 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는, 화합물의 제형을 의미한다. 상기 약학적 염은, 약학적으로 허용되는 음이온을 함유하는 무독성 산부가염을 형성하는 산, 예를 들어, 염산, 황산, 질산, 인산, 브롬화수소산, 요드화수소산 등과 같은 무기산, 타타르산, 포름산, 시트르산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산, 글루콘산, 벤조산, 락트산, 푸마르산, 말레인산, 살리신산 등과 같은 유기 카본산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산 등과 같은 설폰산 등에 의해 형성된 산부가염이 포함된다. 예를 들어, 약학적으로 허용되는 카르복실산 염에는, 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등에 의해 형성된 금속염 또는 알칼리 토금속 염, 라이신, 아르기닌, 구아니딘 등의 아미노산 염, 디시클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민, 트리스(히드록시메틸)메틸아민, 디에탄올아민, 콜린 및 트리에틸아민 등과 같은 유기염 등이 포함된다. 본 발명에 따른 화학식 1 또는 2의 화합물은 통상적인 방법에 의해 그것의 염으로 전환시킬 수도 있다.

[0045] 본 명세서를 통해 사용된 용어 "프로드러그(prodrug)"는 약물학적으로 허용 가능한 유도체, 예컨대, 에스테르, 아마이드 및 포스페이트 유도체를 의미하고, 상기 유도체의 생체내 생물학적 변환 생성물이 화학식 1 또는 2의 화합물인 것을 의미한다. 프로드러그는 모 약제보다 투여하기 쉽기 때문에 종종 사용된다. 예컨대, 이들은 구강투여에 의해 생활성을 얻을 수 있음에 반하여 모 약제는 그렇지 못할 수 있다. Goodman 및 Gilman(The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed, McGraw-Hill, Int. Ed. 1992, "Biotransformation of

Drugs", p 13-15)에서는 통상의 프로드러그를 기술하며, 본 명세서에 이를 인용한다. 프로드러그는 또한 모 약제보다 제약 조성물에서 향상된 용해도를 가질 수도 있다. 예를 들어, 프로드러그는 수용해도가 이동성에 해가 되지만, 일단 수용해도가 이로운 세포에서는, 물질대사에 의해 활성체인 카르복실산으로 가수분해되는, 세포막의 통과를 용이하게 하는 에스테르("프로드러그")로서 투여되는 화합물일 것이다. 프로드러그의 또 다른 예는 펩티드가 활성 부위를 드러내도록 물질대사에 의해 변환되는 산기에 결합되어 있는 짧은 펩티드(폴리아미노산)일 수 있다.

- [0046] 본 발명의 약학조성물에서, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물 중 어느 하나, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 프로드러그(prodrug)를 0.0001 내지 50 중량%로 포함할 수 있다. 상기 조성물은 상기 증동호흡기 증후군(MERS)에 대해, 예방 또는 치료효과를 갖는 약제와 함께 제제화하거나 병용하여 사용될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0048] "담체(carrier)"는 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물로 정의된다. 예를 들어, 디메틸설폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기 화합물들의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.
- [0049] "희석제(diluent)"는 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다.
- [0050] 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다.
- [0051] "대상" 또는 "환자"는 인간, 소, 개, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.
- [0052] 본 발명에 따른 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 함유하는 조성물에 함유될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스(lactose), 텍스트로즈, 수크로스(sucrose), 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0054] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0055] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0056] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0057] 본 명세서에서 사용되는 "유효량"은, 이롭거나 바람직한 임상적 또는 생화학적 결과에 영향을 주는 적절한 양이다. 유효량은 한번 또는 그 이상 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위하여, 유효량은 질병 상태의 진행을 일시적으로 완화, 개선, 안정화, 되돌림, 속도를 늦춤 또는 지연시키는데 적절한 양이다. 만약, 수혜동물이 조성물의 투여에 견딜 수 있거나, 조성물의 그 동물에의 투여가 적합한 경우라면, 조성물은 "약학적으로 또는 생리학

적으로 허용가능함"을 나타낸다. 투여된 양이 생리학적으로 중요한 경우에는 상기 제제는 "치료학적으로 유효량"으로 투여되었다고 말할 수 있다. 상기 제제의 존재가 수혜 환자의 생리학적으로 검출가능한 변화를 초래한 경우라면 상기 제제는 생리학적으로 의미가 있다.

[0058] '치료하는'이란 용어는, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, '치료'란 용어는 '치료하는'이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다.

[0059] 본 발명의 약학조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한 그 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

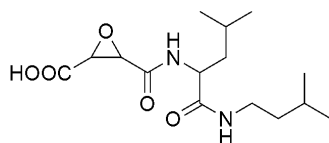
[0060] 상기 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0061] 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 다른 측면은 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)로 인한 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품에 관한 것이다.

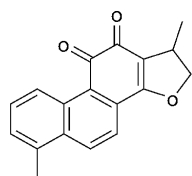
[0063] "기능성 식품"이란, 일반 식품에 본 발명의 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 첨가함으로써 일반 식품의 기능성을 향상시킨 식품을 의미한다. 기능성은 물성 및 생리기능성으로 대별될 수 있는데, 본 발명의 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 일반식품에 첨가할 경우, 일반 식품의 물성 및 생리기능성이 향상될 것이고, 본 발명은 이러한 향상된 기능의 식품을 포괄적으로 '기능성 식품'이라 정의한다.

[0064] [화학식 1]



[0065]

[0066] [화학식 2]



[0067]

[0068] 예를 들어, 본 발명의 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 중동호흡기 증후군(MERS)의 예방 및 개선용 기능성 식품을 제조할 수 있다. 또한, 이를 이용한 기능성 강화식품 등을 제조할 수 있을 것이다. 본 발명의 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 약학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 프로드러그는 다양한 기능성 식품 및 건강기능성식품의 제조시 식품의 주성분 또는 첨가제 및 보조제로 사용될 수 있다.

[0069] 이를 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민복합제, 건강기능성 식품류 등이 있다.

[0070] 일 구체예로서, 본 발명의 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 중동호흡기 증후군(MERS)의 예방을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 화합물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.001 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 30 g, 바람직하게는 0.3 내지 10 g의 비율로 가할 수 있다.

[0071] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물(화학식 1 또는 2)을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가

성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0072] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0073] 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0074] 또한, 본 발명의 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 천연 화합물이기 때문에, 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0075] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)에 대한 항바이러스제에 관한 것이다.

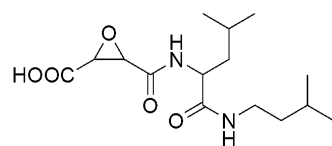
[0076] 상기 항바이러스제는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스의 S 단백질과 세포막의 DPP4와의 상호작용을 억제하여, 세포와의 흡착 및 부착을 방해하여, 바이러스가 세포 내로 진입 혹은 유입되지 못하도록 하는 것을 의미한다.

[0077] 상기 항바이러스제는 목적 세포로의 흡착을 위해 중동호흡기 증후군 코로나바이러스의 S 단백질을 활성화시키는 주요인자인 시스테인 프로테아제 카텝신을 억제하여, 중동호흡기 증후군 코로나바이러스의 S 단백질 활성을 억제시켜 목적 세포와의 흡착 및 부착을 차단한다.

[0078] 즉, 본 발명의 흡착방지제는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)와 목적세포 사이의 결합 및 융합의 단계를 억제하여 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)가 목적세포와 흡착되는 것을 차단하고, 나아가 세포 내로 진입(entry)하는 것을 차단하므로, 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)에 노출되기 전에 주입되어 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)의 감염을 방지하는 효과와 더불어, 감염된 세포에 의한 정상 세포의 이차 감염도 억제하므로, 증상의 진행을 억제하는 효과를 갖는다.

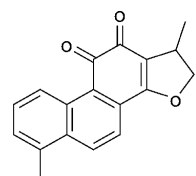
[0079] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 포함하는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 흡착방지제에 관한 것이다.

[0080] [화학식 1]



[0081]

[0082] [화학식 2]



[0083]

[0084] "흡착방지제"는 목적 세포로 바이러스성 감염 전에 일어나는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스의 S 단백질과 목적 세포의 DPP4 간의 상호작용 단계를 목표로 하는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스의 항바이러스성 조성물이다. 구체적으로 중동호흡기 증후군 코로나바이러스의 세포 흡착 또는 부착을 방지하여, 세포내 진입을 저해하도록 계획된 화합물로, 이를 유효성분으로 하는 흡착방지제는 부착방지제, 진입방지제, 유입억제제, 결합억제제의 용어를 포함하며, 모든 흡착방지제는 목적 세포에 연속적으로 유입되어 목적 세포를 감염시키는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스의 능력을 차단함으로써 작동한다. 반드시 이에 한정될 필요는 없으나, 본 흡착방지제는

통상적으로 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물일 수 있고, 상기 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물은 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물 중 어느 하나, 이의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 이의 프로드러그(prodrug)를 포함한다.

- [0085] 본 발명에 따른 흡착방지제는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스의 S 단백질과 세포막의 DPP4와의 상호작용을 억제하여, 세포와의 흡착을 방해한다. 구체적으로 상기 화합물은, 목적 세포로의 흡착을 위해 중동호흡기 증후군 코로나바이러스의 S 단백질을 활성화시키는 주요인자인 시스테인 프로테아제 카텡신의 억제제로, 중동호흡기 증후군 코로나바이러스의 S 단백질 활성을 억제시켜 목적 세포와의 흡착을 차단한다.
- [0086] 즉, 본 발명의 흡착방지제는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)와 목적세포 사이의 결합 및 융합의 단계를 억제하여 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)가 목적세포와 흡착되는 것을 차단하고, 나아가 세포 내로 진입(entry)하는 것을 차단하는 효과를 갖는다.
- [0087] 상기 흡착방지제는 코팅제로 사용될 수 있고, 상기 코팅제는 10 내지 120℃의 환경하에서 경화가능한 바인더 성분을 더 포함할 수 있다. 상기 바인더 성분으로는 무기계 바인더 또는 유기계 바인더 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있는데, 특별히 이에 한정되지 않는다. 상기 바인더는 구체적으로 실리카 바인더, 지르코니아 바인더, 알루미늄 바인더, 티타니아 바인더 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 일 수 있다.
- [0088] 상기 바인더의 함량은 상기 흡착방지제 중에 0.1 내지 10 중량%인 것이 바람직하고, 상기 함량으로 바인더를 포함하여야 코팅제가 안정하게 분산되며, 코팅체에 상기 코팅제를 도포되고 상기 코팅제를 경화하여 형성된 코팅막을 쉽고 균일하게 할 수 있으며, 우수한 코팅 밀착성을 갖게 된다.
- [0089] 본 발명의 코팅제를 코팅체에 도포하여, 중동호흡기 증후군 코로나바이러스에 대한 항바이러스성을 갖는 물품을 제조할 수 있고, 상기 물품은 최외측면의 적어도 일부(예를 들면, 사람이 접촉하는 부분)에 본 발명의 코팅제로 형성된 막을 가지는 것으로, 건축 건재, 위생용품 및 방오용품 등의 물품을 포함한다.
- [0090] 또한 상기 흡착방지제는 중동호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)에 대해 항바이러스 효과를 갖는 각종 방향제나 세정제 조성물로 사용될 수 있는데, 예를 들면 액상, 크림상, 페이스트상, 고체상 등 어떠한 제형으로도 응용될 수 있다. 또한 그 용도도 다양한 분야에 적용될 수 있다.
- [0091] 예를 들면 자동차 세정제, 손 세정제, 구강 세정제, 전신 세정제, 주방식기 세정제, 주거환경 세정제 등과 같은 세정제 조성물, 휘발식이나 분무식 등의 방향제 조성물 등에 적용될 수 있다.
- [0092] 본 발명의 상기 각종 방향제나 세정제 등의 조성물은 각종의 방향제나 세정제의 통상적인 베이스 조성에 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 흡착방지제를 통상적인 방법으로 혼합기에서 균일하게 혼합, 교반시켜 액상, 크림상, 페이스트상의 제형으로 제조할 수 있고, 다른 제형의 조성물도 일반적인 공지의 방법에 따라 고체상이나 분무형의 제품도 제조할 수 있다.
- [0093] 이외에도 상기 흡착방지제는, 사람 및 동물용 식품, 제약학적 제품, 수의학용 제품, 화장품, 마스크 또는 필터 제품, 개인 위생 제품 및 가정 용품을 포함하는 다양한 제품에 사용될 수 있다.
- [0094] 구체적으로, 본 발명의 상기 조성물은 피부 외용제로 사용할 수 있으며, 바람직하게는 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 젼제 또는 젼의 형태의 피부 외용제로 사용할 수 있다.
- [0095] 또한, 본 발명의 상기 흡착방지제는 식료품으로 사용할 수 있으며, 바람직하게는 마아가린, 지방 지속성(fat continuous) 또는 물 지속성(water continuous) 또는 양쪽 지속성(bicontinuous) 스프레드, 지방 감소된 스프레드, 초콜렛, 빵, 과자, 껌, 아이스크림, 아이스크림 코팅, 아이스크림 함유물, 드레싱, 마요네즈, 치즈, 크림 대체물, 건조 스프, 드링크, 시리얼 바, 소스, 스낵바, 유제품, 임상 영양식품 또는 소아 제제로 사용할 수 있다.
- [0096] 또한, 본 발명의 상기 흡착방지제는 개인위생용품으로 사용할 수 있으며, 바람직하게는 비누, 화장품, 물티슈, 휴지, 샴푸, 피부 크림, 얼굴 크림, 치약, 구강청정제, 립스틱, 향수, 메이크-업, 파운데이션, 볼터치, 마스크라, 아이섀도우, 선크림 로션, 모발 손질 제품, 에어프레쉬너 젼 또는 세정 젼로 사용할 수 있다.
- [0097] 본 발명의 화학식 1 또는 2의 화합물은 천연 화합물이므로 독성 및 부작용 등의 문제가 없다.
- [0098] 본 발명의 흡착방지제는 의약품으로 사용될 수 있고, 비제한적인 예로서, 액상치약, 구강청정제, 구강용 스프레이, 눈 스프레이, 코 스프레이, 구강용 연고제, 구강용 바니쉬 등의 형태로 사용될 수 있다.

- [0099] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.
- [0100] 또한 이하에서 제시되는 실험 결과는 상기 실시예 및 비교예의 대표적인 실험 결과만을 기재한 것이며, 아래에서 명시적으로 제시하지 않은 본 발명의 여러 구현예의 각각의 효과는 해당 부분에서 구체적으로 기재하도록 한다.
- [0101] **실험방법.**
- [0102] **1) 세포배양**
- [0103] 293TN 및 Huh7.5 세포는 한국과학기술원(KAIST) 의대의과 대학원 신의철 교수님 연구실로부터 제공받아 사용하였다. 세포는 10% 소태아 혈청(Gibco)과 1% 스트렙토마이신(streptomycin)/페니실린(penicillin)(Gibco)(DMEM10)을 함유한 DMEM 배지(Gibco, Grand Island, NY, USA)에서, 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.
- [0104] **2) 통계 분석**
- [0105] 본 발명의 실험 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차(SD)로 표시하고, Graphpad Prism 5로 데이터 분석 및 그래프 플롯팅을 수행한다. 사전 세포부착능(pre-attachment data)과 사후 세포부착능 데이터(post-attachment data)는 한 쌍의 student's t-테스트를 사용하여 비교한다. $p < 0.05$ 인 유의한 수치는 *로 표시하고, $p < 0.01$ 인 매우 유의한 수치는 **로 표시한다.
- [0106] **실험예 1. MERS-CoV로 진단받고 회복한 환자의 혈장을 이용한 MERS-CoV S 단백질의 발현 측정법**
- [0107] 감염성을 확인하기 위하여, 단계별로 희석된 MERS-PV, BALD-PV, VSV-PV 각 100 μ l를 Huh7.5 세포에 첨가하여 2 시간 동안 배양하였다. 이때, Huh7.5 세포는 polybrene(8 μ g/ml)(Sigma-Aldrich co. LLC., St. Louis, MS, USA)와 함께 96-well 플레이트(2X10⁴/well)에서, 실험 하루전에 미리 준비해둔 것을 사용하였다.
- [0108] 2 시간의 배양이 끝난 후, 신선한 DMEM10을 첨가하고, 70 시간 더 배양하였다. 이후 제조자의 지시에 따라 Bright-Glo luciferase assay system(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 루미노미터(luminometer)(PerkinElmer VICTORX3, Waltham, MA, USA)로 상대적인 발광 수치(relative luminescence unit(RLU))를 측정하였다. 여기서 TCID₅₀은 Reed-Muench 식을 사용하여 계산하였다(Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. The Am J Hyg 1938; 27: 493-7).
- [0109] MERS-PV에 의해 발현된 MERS-CoV S 단백질의 발현은 MERS-CoV로 진단받고 회복한 환자의 혈장을 이용한, 중화항체 분석(neutralizing assay)으로 측정하였다. 환자 혈장은 연속 희석액(1:10 내지 1:5120)을 제조한 후, MERS-PV와 혼합하고, 이를 2 시간동안 배양한 다음, polybrene(8 μ g/ml)과 함께 Huh7.5 세포에 첨가하고, 2 시간 동안 배양하였다. 2 시간이 지난 후, 신선한 배지를 상기 세포에 첨가하고, 70 시간 더 배양한 후, 상술한 방법을 통해 RLU 를 측정하였다. 이는 MERS-CoV의 대체제로써, MERS-PV를 사용할 수 있는지를 확인하고자 하는 것으로, MERS-PV로부터 S 단백질(spike protein) 발현 여부를 MERS-CoV 감염으로 진단받은 환자의 혈장을 이용한다.
- [0110] 도 2는 MERS-CoV 환자의 혈장(plasma)에 의한 MERS-PV의 중화항체분석(Neutralization) 결과를 나타낸 그래프이고, 상기 데이터는 평균 및 표준 편차로 표시한다.
- [0111] 도 2에 나타난 바와 같이, 혈장을 희석비율 1:1280일 때, MERS-PV에 대하여 50% 미만의 중화 활성을 나타내었으므로, 혈장 희석비율이 1:1280 이상인 것이 적정량임을 확인할 수 있다. 구체적으로 혈장의 희석비율은 1:1000 내지 1:5500인 것이 바람직하다. 이에 반해 혈장을 포함하지 않은 분석배지만으로는(control) 중화활성이 전혀 검출되지 않았다. 이를 통해 MERS-PV로, MERS-CoV을 대체할 수 있음을 확인하였다.
- [0112] **실험예 2. MERS-PV, BALD-PV, VSV-PV 제조**
- [0113] 메르스에 대한 유효성분을 검출할 수 있는 대량의 스크리닝 공정을 위해, MERS-CoV의 S 단백질(spike protein)과 반딧불의 루시페라아제 리포터 유전자를 발현하는 슈도바이러스(pseudovirus)(이하, MERS-PV라고도 한다)를 제조하였다.

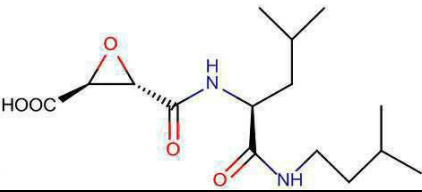
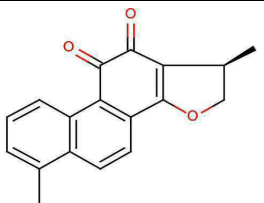
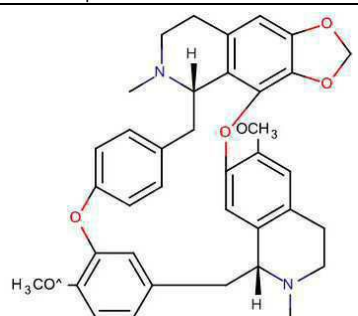
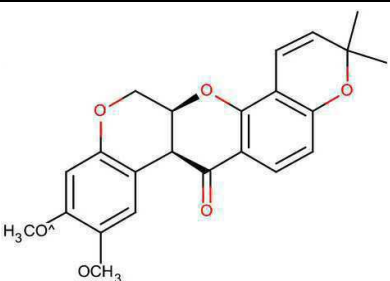
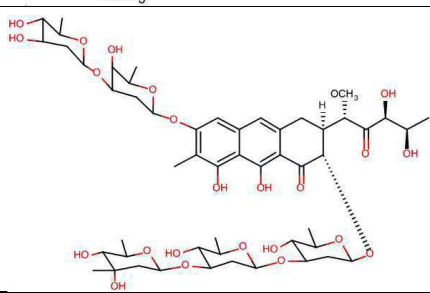
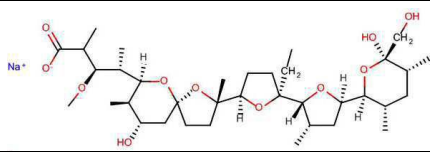
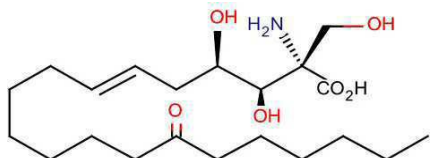
- [0114] 이때 벡터 생산에 필요한 3 개의 제조합 플라스미드는 미국 메릴랜드 주 베데스다(National Institutes of Health in Bethesda)에 있는 국립 보건원(the National Institutes of Health)의 Barney S. Graham 박사로부터 제공받아 사용하였다. 이는 Env-결핍 HIV-1을 코딩하고, 루시페라아제를 발현하는 제1 플라스미드 벡터(pVRC5601 12-09 luciferase), MERS-CoV S 단백질질을 갖는 제2 플라스미드 벡터(pVRC4766 MERS S TM Korea 002) 그리고 envelope packaging 제3 플라스미드 벡터(pVRC5602 polymerase)였다.
- [0115] 우선, 293TN 세포를 T175 조직 배양 플라스크에 접종하고 밤새 배양하여, 단층의 293 TN 세포를 얻었다. 이후, jetprime transfection 용액(Polyplus transfection, Illkirch, France)을 사용하여 제1 플라스미드(pVRC5601) 17.5 μ g, 제2 플라스미드(pVRC5602) 17.5 μ g 및 제3 플라스미드(pVRC4766) 1 μ g를 동시에 형질주입한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 48 시간 동안 배양하였다. 배양액을 원심분리하여, 상청액(supernatant)을 회수한 후 0.45 μ m 필터(Millipore, Darmstadt, Germany)를 사용하여 필터링 한 다음 Wellprot virus 농축 시약(Welgene, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea)을 사용하여 10 배 농축시켰다.
- [0116] 이때, 음성 대조군은 제1 플라스미드(pVRC5601)와 제2 플라스미드(pVRC5602)로만 형질주입하여 제조된 MERS-CoV의 S 단백질이 결핍된 BALD-슈도바이러스(이하, BLD-PV라고도 한다)를 사용하였다.
- [0117] 또한, 양성 대조군은 수포구내염 바이러스 G 단백질을 코딩하는 플라스미드(pCMV VSV-G), 제1 플라스미드(pVRC5601) 및 제2 플라스미드(pVRC5602)로 공동 형질주입하여 제조된, 수포구내염 바이러스의 G 단백질을 발현하는 슈도바이러스(이하, VSV-PV라고도 한다)를 사용하였다.
- [0118] 상술한 과정을 통해 제조된 S 단백질을 발현하는 슈도바이러스(pseudovirus)인 MERS-PV의 감염율(infectivity)을 실험에 1의 루시페라제 분석(luciferase assay)으로 분석한 결과, 숙주세포를 2×10^4 /well로 접종한 경우, 상기 MERS-PV(50 μ l)의 감염율은 1209 ± 35 RLU이고, VSV-PV(양성 대조군)의 감염율은 12884 ± 442 RLU이며, BALD-PV(음성 대조군)의 감염율은 23 ± 2 RLU였다.
- [0119] **실험예 3. MERS-CoV 감염성을 저해 및 억제하는 화합물 스크리닝**
- [0120] **1) 1차 스크리닝**
- [0121] Huh7.5 세포를 96-well 플레이트(1×10^4 /well)에 접종하고, 37 $^{\circ}$ C에서 18 시간동안 배양하여 Huh7.5 세포를 준비한다. 502개의 테스트용 화합물 용액 각각 60 μ l(1 μ g/ml 농도)와 2000 TCID₅₀/ml를 갖는 MERS-PV 60 μ l를 별도의 96-well 플레이트에 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C에서 2 시간동안 배양하여 혼합액을 제조한다. 상기 각각의 혼합액 100 μ l과 polybrene(8 μ g/ml) 100 μ l를 상기 미리 준비된 Huh7.5 세포에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 2 시간동안 배양한다. 신선한 DMEM10(100 μ l) 첨가하고, 감염된 세포를 70 시간 동안 배양하였다.
- [0122] 본 실험에서 양성 대조군은 동일량의 분석배지와 MERS-PV와 혼합한 것이고, 음성 대조군은 동일량의 분석 배지를 BALD-PV와 혼합한 것이다.
- [0123] 상술한 과정을 통해 배양한 배양액의 MERS-PV에 대한 상대감염율(%)을 측정하여, 이들 결과 중에서 적정 수준을 만족하는 화합물만을 1차적으로 선별한다. 이때 상대감염율(Relative infectivity)(%)은 하기 식 1을 통해 계산한다.
- [0124] [식 1]
- [0125] 상대감염율(Relative infectivity)(%) = (테스트용 화합물의 RLU - 음성 대조군의 RLU)/(양성 대조군의 RLU) $\times$ 100
- [0126] 502개의 테스트용 화합물들 중에서 MERS-PV 상대감염율(%)이 50%이거나 300 RLU인 것은 67개였고, 이 중에서 현미경 검사시, 세포가 완전히 파괴된 화합물들은 제외한 결과 총 9 개의 화합물을 1차적으로 선정하였다.
- [0127] **2) 2 차 스크리닝**
- [0128] 앞선 실험예 1(1차 스크리닝)을 통해 선별된 10 개의 화합물을, 동일한 과정으로 반복수행하여, 9개 화합물의 MERS-PV에 대한 상대감염율(%)과 루시페라아제 분석, VSV-PV 상대감염율(%) 및 세포생존율(%)을 측정하여, 이들 결과 중에서 적정 수준을 만족하는 화합물을 2차적으로 선별한다. 이때 상대감염율(Relative infectivity)(%)은 상기 식 1을 통해 계산한다. 세포 생존율(Cell viability)은 제조자의 지시에 따라 CellTiterGlo 키트(Promega)로 분석하고 루미노미터로 측정한다.

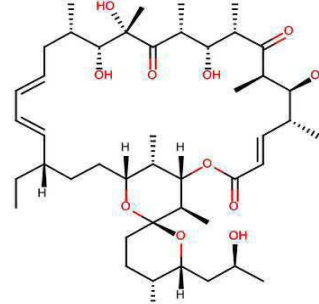
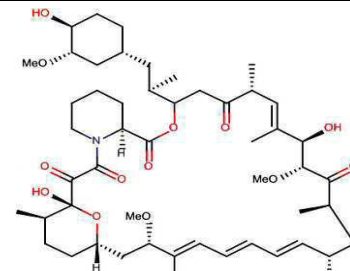
[0129]

그 결과, MERS-PV의 50% 이상 억제하고, VSV-PV는 20% 미만으로 억제하는 효과를 나타냄과 동시에 세포생존율(%)은 90% 이상으로 매우 안정한 2개의 화합물(화학식 1, 2)를 최종 선별하였다. 본 발명에서는 이러한 추가 스크리닝 과정을 2차 스크리닝 과정이라 칭한다.

표 1

[0130]

구분	화합물의 구조	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 상대감염률(%)		세포생존율(%)
		MERS-PV	VSV-PV	
E-64-C [화학식 1]		43.1	91.9	> 90
Dihydrotanshinone [화학식 2]		47.6	99.5	> 90
Cepharanthine		49.0	78.7	> 90
Degeulin		10.3	7.5	< 50
Mithramycin A		15.4	17.6	< 50
Monensin		33.0	38.7	< 90
Myriocin		46.0	56.9	< 90

Oligomycin A		29.0	8.5	< 50
Rapamycin		37.1	50.7	< 90

[0132] **실험예 4. 스크리닝 과정을 통해 최종 선정된 화합물의 상대감염율(%) 및 세포생존율(%) 분석**

[0133] 상술한 스크리닝 과정을 통해 선정된 2 개의 화합물(화학식 1, 2)의 농도에 따른 MERS-PV의 상대감염율(%)과 VSV-PV의 상대감염율(%) 및 세포생존율(%)을 재확인하였다.

[0134] **1) MERS-PV, VSV-PV에 대한 상대감염율(%) 분석**

[0135] 1차 스크리닝과 동일한 감염 시스템을 이용하여, 최종 선별된 화학식 1, 2의 화합물이 MERS-PV 및 VSV-PV 감염에 대해 효과를 갖는지 여부를 분석하였다.

[0136] 상기 화학식 1, 2의 화합물은 다양한 농도(0.25, 0.5, 1, 2, 4 $\mu\text{g/ml}$)로 투여되며, 이와 병행하여, 슈도바이러스(pseudovirus)를 첨가하지 않고 상기 화학식 1, 2, 3의 화합물에 대한 세포 생존율(%)을 평가한다. 상기 실험은 3 번 반복수행한다.

[0137] **2) 세포생존율(%) 분석**

[0138] Huh7.5 세포를 96-well 플레이트(2×10^4 /well)에 접종하고 37°C에서 18 시간 동안 배양한다. 여기에 선별된 화합물 용액(1 $\mu\text{g/ml}$) 50 μl 와 2000 TCID₅₀/ml를 갖는 MERS-PV 50 μl 를 첨가하고 37°C에서 2 시간 동안 계속 배양한다. 이후 신선한 DMEM10 배지(100 μl)를 첨가하고, 37°C에서 70 시간 동안 배양한다. 본 실험에서 양성 대조군은 동일량의 분석배지와 VSV-PV와 혼합한 것이고, 음성 대조군은 동일량의 분석 배지를 BALD-PV와 혼합한 것이다. 세포 생존율(Cell viability)은 제조사의 지시에 따라 CellTiterGlo 키트(Promega)로 분석하고 루미노미터로 측정한다.

[0139] **3) 결과**

[0140] 도 3은 최종 선별된 화학식 1(b;E-64-C), 화학식 2(a;dihydrotanshinone)로 표시되는 화합물의 농도(0.25 내지 4 $\mu\text{g/ml}$)에 따른 상대감염율(%) 및 세포생존율(%)을 측정하여 나타낸 그래프이다. 이때, MERS-PV에 대한 상대감염율(%)은 원으로 채워진 막대그래프로 표기하고, VSV-PV에 대한 상대감염율(%)은 사각형으로 채워진 막대그래프로 표기하며, 세포생존율(%)은 세로줄로 채워진 막대그래프로 표시한다. 상기 실험은 총 세 번의 반복실험을 수행한 것이고, 데이터는 평균 및 표준 편차로 표시하였다.

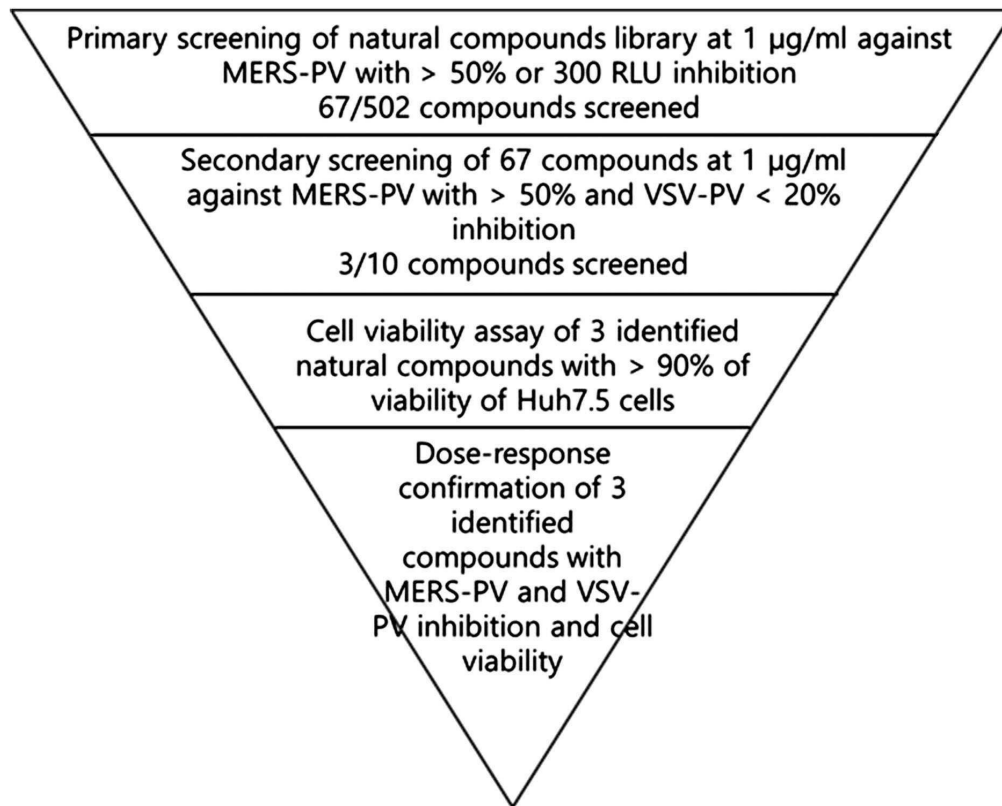
[0141] 도 3에 나타난 바와 같이, 화학식 2로 표시되는 화합물은 1 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도일 때, MERS-PV의 감염성을 50% 이상 억제하고, VSV-PV 감염성은 20% 미만 억제하였으며, 2 $\mu\text{g/ml}$ 미만의 농도에서 90% 이상의 세포생존율(%)을 나타냈다(도3a).

[0142] 화학식 1로 표시되는 화합물은 1 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서, MERS-PV의 감염성을 50% 이상 억제하고, 4 $\mu\text{g/ml}$ 미만의 농도에서 VSV-PV 감염성을 10% 미만 억제하였으며, 4 $\mu\text{g/ml}$ 미만의 농도에서 90% 이상의 세포생존율(%)을 나타냈다(도3b).

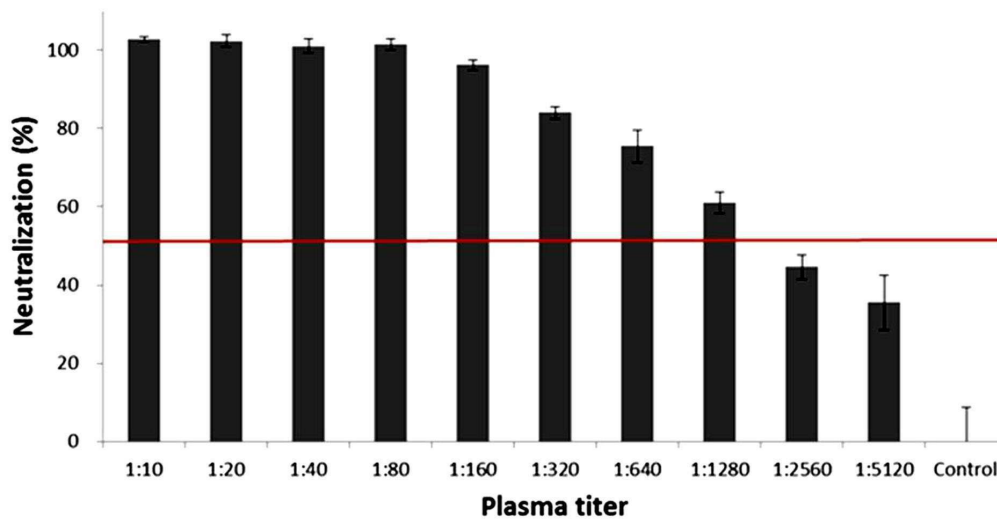
- [0144] **실험예 5. 화학식 1, 2 화합물의 세포내 MERS-PV 흡착에 대한 억제 효과 분석**
- [0145] 세포 내에서, 최종 선별된 화학식 1, 2로 표시되는 화합물이 MERS-CoV 바이러스 감염 경로에 미치는 영향을 확인하고자, 사전(pre-), 사후(post-) 세포부착능을 분석(attachment assay)을 실시하였다.
- [0146] 세포부착능을 분석하기 위하여, 우선 최종 선별된 화학식 1, 2로 표시되는 화합물($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)을 MERS-PV와 2 시간 동안 배양하고, 이를 미리 배양한 Huh7.5 세포(96-well 플레이트($1 \times 10^4/\text{well}$))에 접종하고, 37°C 에서 18 시간 동안 배양)에 첨가한다.
- [0147] 사후 세포부착능 분석은 MERS-PV를 미리 배양한 Huh7.5 세포에 첨가하고, 2 시간이 지난 후, 최종 선별된 화학식 1, 2로 표시되는 화합물($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)을 첨가한다.
- [0148] 앞서 설명한 바와 같이 두가지 경우로, 최종 선별된 화학식 1, 2로 표시되는 화합물($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)을 및 MERS-PV를 동시에 숙주세포(Huh7.5)에 첨가하고, 이를 배양하여, MERS-CoV의 세포 내 흡착 경로에 대한 화학식 1, 2로 표시되는 화합물의 효과를 확인한다.
- [0149] 도 4는 최종 선별된 화학식 1(b;E-64-C), 화학식 2(a; dihydrotanshinone)로 표시되는 화합물의 MERS-PV 흡착 차단 효과를 측정하여 나타낸 그래프이다. 최종 선별된 각각의 화합물에 따른 차단 효과를 명확히 분석하기 위하여, 시간별 분석법(time-point-assay)으로 수행한다. 구체적으로 상기 최종 선별된 각 화합물을 MERS-PV 부착한 숙주세포에 처리하거나(사전 세포부착능 분석; post-attachment, circle dots), MERS-PV와 동시에 숙주세포에 처리한 다음 세포부착능을 분석(동시 세포부착능 분석; during-attachment)한다. 또한, 상기 화합물을 MERS-PV와 혼합하고 2 시간 동안 배양한 다음 숙주세포에 처리한다(사후 세포부착능 분석; pre-attachment, horizontal stripes). 사후 세포부착능 분석에서, 상기 상대감염율(%)은 부착되기 전(사전 세포부착능 분석)이나 부착되는 동안(동시 세포부착능)보다 현저히 높았다. 상기 실험은 총 세 번의 반복실험을 수행한 것이고, 데이터는 평균 및 표준 편차로 표시하였다.
- [0150] 도 4에 나타난 바와 같이, 각 화합물이 처리된 MERS-PV의 상대감염율(%)은 부착 전, 후에 따라 상이하였다. 구체적으로 사후 세포부착능 분석에서 상대감염율(%)은 80% 였고, 사전 세포부착능 분석에서 상대감염율(%)은 50% 였으며, 동시 세포부착능 분석에서는 상대감염율(%)이 50% 미만이었다.
- [0151] 이러한 결론을 통해, 최종 선별된 화학식 1(b;E-64-C), 화학식 2(a; dihydrotanshinone)로 표시되는 화합물은 MERS-PV가 숙주세포 내에 흡착하거나, 흡착한 후에는 그 효과가 다소 낮으나, MERS-PV가 숙주세포 내로 흡착하기 전에는 MERS-PV의 감염을 억제하는 효과가 매우 우수한 것을 확인할 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 약학조성물은 치료 효과보다 예방 효과가 더 우수하다는 것을 확인하였다.

도면

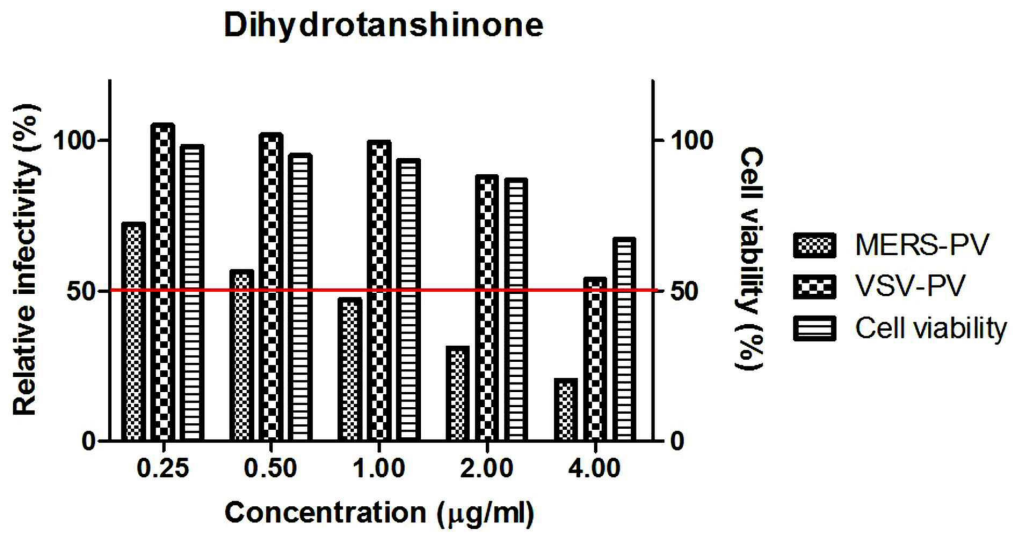
도면1



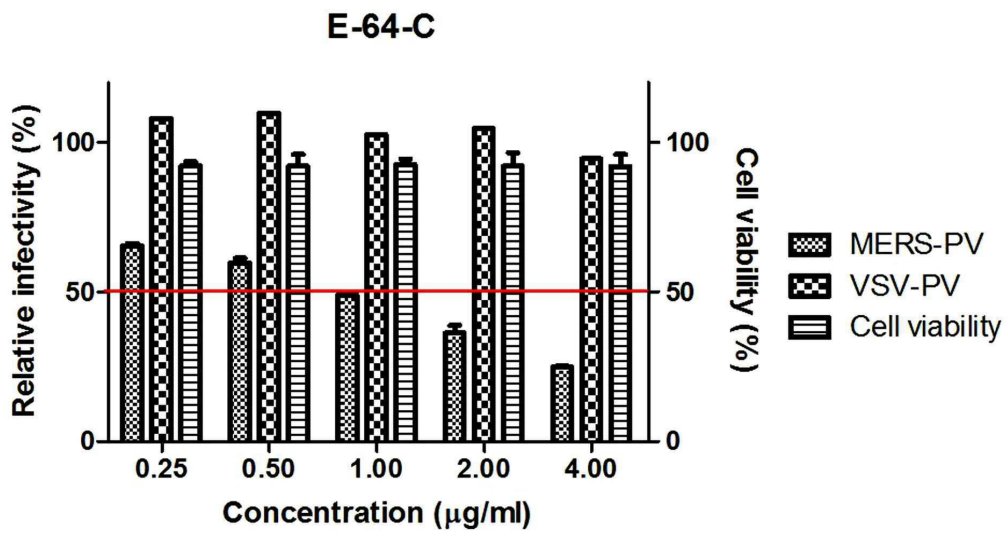
도면2



도면3a



도면3b



도면4

