



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0166337
(43) 공개일자 2022년12월16일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7039288</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년04월09일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년11월09일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/059328</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/205012
국제공개일자 2021년10월14일</p> <p>(30) 우선권주장
20168929.6 2020년04월09일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
베를린 큐어스 게엠베하
독일 베를린 10719 크니제백슈트라세 59-61</p> <p>(72) 발명자
하베를란트 아네카트린
독일 13086 베를린 스트로이슈트라세 43
필러 요하네스
독일 10717 베를린 킨켈슈트라세 63
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
유미특허법인</p> |
|--|--|

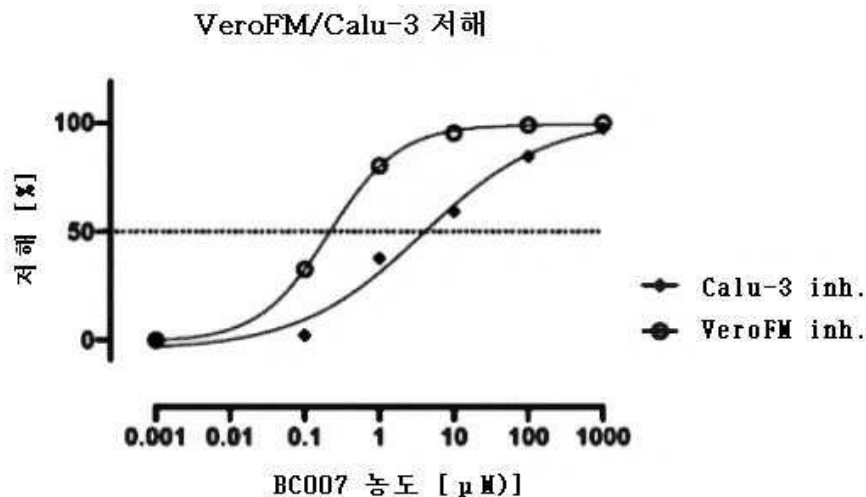
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 코로나비리대 감염을 치료하는데 사용하기 위한 앵타머

(57) 요약

본 발명은 코로나비리대 과 바이러스에 의해 유발된 감염에 대한 요법에 사용하기 위한 새로운 앵타머 분자, 코로나비리대 과 바이러스에 의해 유발된 감염의 시험관내/생체의 예방 방법, 이러한 앵타머 분자를 포함하는 약학적 조성물 및 키트, 및 체세포의 코로나비리대 과 바이러스 감염을 예방하기 위한 앵타머 분자의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 코로나비리대 바이러스의 핵심 효소에서 특이적이고 신규로 동정된 에피토프에 대해 결합하는 친화성 분자에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)

C12N 2310/16 (2013.01)

C12N 2320/30 (2013.01)

(72) 발명자

발루카트 게르트

독일 13129 베를린 볼젠슈타인슈트라세 4

괴텔 페터

독일 14612 팔켄제 슈바르츠빌트베크 6

(30) 우선권주장

20176023.8 2020년05월22일

유럽특허청(EPO)(EP)

20180781.5 2020년06월18일

유럽특허청(EPO)(EP)

20204036.6 2020년10월27일

유럽특허청(EPO)(EP)

명세서

청구범위

청구항 1

코로나비리대 (*Coronaviridae*) 과 바이러스 감염을 치료하거나, 치유하거나 또는 추가적인 진행을 방지함으로써 개체의 요법에 사용하기 위한 앵타머로서, 상기 앵타머는 서열번호 1의 핵산 서열 (GGT TGG TGT GGT TGG) 및/또는 서열번호 1과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 앵타머.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 감염이 베타코로나바이러스 (*Betacoronavirus*) 속 바이러스, 바람직하게는 사르베코바이러스 (*Sarbecovirus*) 또는 메르베코바이러스 (*Merbecovirus*) 아속 바이러스, 더 바람직하게는 MERS-CoV, SARS-CoV 및 SARS-CoV-2를 포함하는 군으로부터 선택되는 바이러스에 의해 유발되고, 특히 바람직하게는 감염이 SARS-CoV-2에 의해 유발된, 앵타머.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 앵타머가 항-응고 활성을 가지며, 바람직하게는 앵타머 농도 0.03 mg/ml에서 인간 보정 혈장의 부분 트롬보플라스틴 시간 (PTT)으로서 측정된 응고 시간을 60초 이상으로 연장할 수 있거나, 및/또는 앵타머 농도 0.03 mg/ml에서 인간 보정 혈장의 프로트롬빈 시간 (Quick 값)을 40% 이하로 단축할 수 있는, 앵타머.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 앵타머가 선택적으로 바이러스의 스파이크 (S) 당단백질과 상호작용함으로써, 바람직하게는 바이러스의 스파이크 당단백질과 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2) 또는 다이펩티딜 펩티다제 4 (DPP4) 간의 상호작용을, 더 바람직하게는 바이러스의 스파이크 당단백질과 대상 숙주 세포 ACE2 간의 상호작용을 방지하거나 또는 간섭함으로써, 체세포의 감염을 방해하는, 앵타머.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 스파이크 당단백질의 수용체-결합 도메인이 서열번호 2 (SARS-CoV-2 스파이크 RBD) 또는 서열번호 3 (SARS-CoV 스파이크 RBD) 또는 서열번호 4 (MERS-CoV 스파이크 RBD)의 서열을 가지며, 바람직하게는 스파이크 당단백질의 수용체-결합 도메인이 서열번호 2 또는 서열번호 3의 서열을 가지며, 바람직하게는 스파이크 당단백질이 서열번호 2의 서열을 가진, 앵타머.

청구항 6

코로나비리대 과 바이러스의 감염으로부터 회복한 환자에서 롱 코비드 (long COVID)와 관련한 질환 증상을 치료, 치유 또는 방지함으로써 요법에 이용하기 위한 앵타머로서, 상기 앵타머가 서열번호 1의 핵산 서열 (GGT TGG TGT GGT TGG) 및/또는 서열번호 1과 80% 이상 동일한 핵산 서열을 포함하는, 앵타머.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 질환 증상이 만성 피로 증후군, 체위 기립성 빈맥 증후군 (PoTS), 자율신경실조증, 진전증, 주의력 결핍, 명칭 실어증, 신경병증, 횡단성 척수염, 급성 괴사성 척수염 및 궤양 배례 증후군과 같은 신경학적 증상, 심근 염증, 부정맥, 빈맥, 서맥, 고혈압 및 방실 (AV) 차단과 같은 심혈관 증상, 탈모 및 습진과 같은 피부 증상, 또는 위장 질환을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는, 앵타머.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 앵타머가 G-단백질 커플링된 수용체에 특이적인 자가항체와 이의 표적 단백질 간의 상호작용을 저해하기 위해 사용되는, 앵타머.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 앵타머는 G-단백질 커플링된 수용체에 대한 자가항체를 검출할 수 있는 환자를 치료하는데 사용하기 위한 것인, 앵타머.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 G-단백질 커플링된 수용체에 대한 기능성 자가항체, 바람직하게는 인간 G-단백질 커플링된 수용체 아드레날린성 α -1 수용체, 아드레날린성 β -2 수용체, 엔도텔린 1 ETA 수용체, 무스카린성 M_2 수용체, 안지오텐신 II AT1 수용체, MAS-수용체 및/또는 통각 수용체 중 어느 하나에 대해, 더 바람직하게는 아드레날린성 β -2 수용체, 무스카린성 M_2 수용체, 안지오텐신 II AT1 수용체, MAS-수용체 중 어느 하나에 대해 특이적인 기능성 자가항체를 나타내며, 특히 바람직하게는 상기 환자는 아드레날린성 β -2 수용체, 무스카린성 M_2 수용체, 안지오텐신 II AT1 수용체 및 MAS-수용체 각각에 대해 특이적인 기능성 자가항체를 포함하는 항체 패튼을 가진, 앵타머.

청구항 11

앵타머를 이용하여 코로나바이러스 과 바이러스에 의한 체세포 감염을 방지하는 방법으로서, 상기 방법이 시험관 내/생체의 수행되고; 앵타머가 서열번호 1의 핵산 서열 (GGT TGG TGT GGT TGG) 및/또는 서열번호 1과 80% 이상 동일한 핵산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 앵타머 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 앵타머 및 용기를 포함하는, 키트.

청구항 14

코로나바이러스 과 바이러스에 의한 체세포 감염을 방지하기 위한 제1항에 따라 정의되는 앵타머의 용도로서, 상기 앵타머가 시험관내/생체외에서 사용되는, 용도.

청구항 15

중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2의 RNA-의존적인 RNA 중합효소 내 아미노산 서열 Leu-Tyr-Arg-Asn-Arg-Asp-Val (LYRNRDV; 서열번호 9) 및/또는 His-Arg-Phe-Tyr-Arg-Leu-Ala-Asn (HRFYRLAN; 서열번호 10)의 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 친화성 분자.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 친화성 분자가 분자량 최대 900 달톤의 소분자이며, 바람직하게는 친화성 분자는 신시내티 대학 화합물 컬렉션, ApexBio Technology LLC 사의 DiscoveryProbe™ Bioactive Compound Library Plus 및 Cayman Chemical 사의 SARS-CoV-2 Screening Library를 포함하는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 소분자 컬렉션으로부터 유래한 소분자인, 친화성 분자.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 친화성 분자가 펩타이드-계 화합물, 바람직하게는 항체 또는 이의 결합 단편인, 친화성 분자.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 친화성 분자가 앵타머 또는 올리고뉴클레오타이드인, 친화성 분자.

청구항 19

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 의약제로서 사용하기 위한 것인, 친화성 분자.

청구항 20

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 코로나비리대 과 바이러스 감염을 치료, 치유 또는 추가적인 진행을 방지함으로써, 개체의 요법에 사용하기 위한 것인, 친화성 분자.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 코로나비리대 과 바이러스에 의해 유발된 감염에 대한 요법에 사용하기 위한 새로운 앵타머 분자, 코로나비리대 과 바이러스에 의해 유발되는 감염의 시험관내/생체외 예방 방법, 이러한 앵타머 분자를 포함하는 약학적 조성물 및 키트, 및 체세포의 코로나비리대 과 바이러스로 인한 감염을 예방하기 위한 앵타머 분자의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 코로나비리대 바이러스의 핵심 효소에서 특이적인 신규 동정된 에피토프에 결합하는 친화성 분자에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 신종 고 병원성 코로나바이러스 (SARS-CoV-2)의 출현과 국제적인 빠른 확산은 심각한 세계적 공중 보건 비상 사태를 야기하였다. 2003년 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 (SARS-CoV)와 2012년 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스 (MERS-CoV)와 같은 다른 병원성 코로나바이러스 균주에 의해 감염된 환자와 마찬가지로, SARS-CoV-2로 감염된 환자는 마른 기침, 열, 두통, 호흡곤란 및 폐렴 등의 다양한 증상들을 보이며, 추정 사망률은 3-5%이다.
- [0003] SARS-CoV-2는 2019년 12월에 처음으로 발병한 이래로, 212개국, 지역 및 영토로 전 세계적으로 확산되었다. 2020년 4월 8일 현재, 세계적으로 1,317,130건의 바이러스 감염이 확인되었으며, 감염 환자에서 확인된 사망 건수는 74,304명이다 (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>)
- [0004] 현재, 전세계 다양한 도시와 국가들에서 계속적인 확산을 최소화하기 위해 다양한 수준의 폐쇄 조치를 취하고 있으며, WHO는 SARS-CoV-2의 급속한 세계적인 확산으로 인해 국제적 공중 보건 비상 사태 (PHEIC)를 공표하였다.
- [0005] 코로나바이러스 계통에 대한 계통 발생 분석을 통해, SARS-CoV-2는 SARS-CoV, MERS-CoV, bat SARS-관련 코로나바이러스 (SARSr-CoV)뿐 아니라 인간 및 다양한 동물 중에서 동정된 기타 종을 포함하는 베타코로나바이러스 속에 속하는 새로운 종인 것으로 밝혀졌다.
- [0006] 각 코로나바이러스는 스파이크 (S), 외피 (E), 막 (M) 및 뉴클레오텍시드 (N) 단백질을 비롯한 구조 단백질 4종을 가지고 있다. 그 중, 스파이크 당단백질 또는 S 단백질은 바이러스 부착, 융합 및 유입에 가장 중요한 역할을 담당하며, 항체, 유입 저해제 및 백신 개발에 가장 유망한 표적으로 이용되고 있다. S 단백질은 먼저 S1 서브유닛의 수용체-결합 도메인 (RBD)을 통해 숙주 수용체에 결합한 다음 S2 서브유닛을 통한 바이러스와 숙주 막의 융합에 의해 바이러스의 숙주 세포내 유입을 매개한다 (Lu, G. et al. *Nature* **500**, 227-231 (2013)). 즉, 바이러스 외피 상의 동형삼량체 스파이크 당단백질 (각 스파이크 모노머에서 S1 서브유닛 및 S2 서브유닛)을 이용해 세포 수용체에 결합한다. 이러한 결합은 세포 유입을 위한 세포와 바이러스 막 간의 융합으로 이어지는 캐스케이드 현상들을 촉발한다.
- [0007] SARS-CoV 및 MERS-CoV RBD는 서로 다른 수용체를 인지한다. SARS-CoV는 수용체로서 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2)를 인지하는 반면, MERS-CoV는 수용체로서 다이펩티딜 펩티다제 4 (DPP4)를 인지한다. SARS-CoV와 마찬가지로, SARS-CoV-2 역시 바이러스 S 단백질에 결합하는 숙주 수용체로서 ACE2를 인지한다 (Zhou, P., et al. *Nature* **579**, 270-273 (2020)).
- [0008] 종래의 SARS-CoV 스파이크와 이의 세포 수용체 ACE2 간의 상호작용에 대한 cryo-EM 연구에서, 표적 체세포 상의 ACE2 수용체에 결합하는 것이 SARS-CoV가 표적 세포에 진입하는데 중요한 초기 단계인 것으로 밝혀졌다. 최근 연구는 또한 SARS-CoV-2의 유입을 매개하는데 있어 ACE2의 중요한 역할도 지적하였다 (Walls, A. C. et al. *Cell* S0092-8674(20)30262-2 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>. 및 Hoffmann, M. et al. *Cell* S0092-8674 (20)30229-4 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>).

- [0009] ACE2를 발현하는 HeLa 세포는 SARS-CoV-2 감염에 취약하지만, 수용체가 결핍된 세포는 그렇지 않다. 시험관내 결합 측정으로 또한 SARS-CoV-2 수용체-결합 도메인 (RBD)이 ACE2에 낮은 nM 범위의 친화성으로 결합하는 것으로 밝혀졌는데, 이는 RBD가 ACE2 매개 SARS-CoV-2의 결합을 담당하는 스파이크 당단백질의 S1 서브유닛내 핵심적인 기능성 요소임을 의미한다.
- [0010] 최근 들어, SARS-CoV2 역시 이후 성공적인 ACE2 매개 세포 유입을 달성할 수 있는 보조인자 또는 세포-부착 인자로서 헤파란 설페이트를 이용하는 것으로 입증될 수 있었다. RBD와 헤파란 설페이트의 사전 접촉이, 후속적인 세포-흡수에 필수적인 "바이러스-콜렉터"로서 기능할 수 있다. 여기서, SARS-CoV-2의 RBD의 양으로 하전된 아미노산이 헤파란 설페이트 및 헤파린에 대한 잠재적인 결합 파트너인 것으로 논의되고 있다 (Clausen et al., 2020, *Cell* 183, 1043-1057.e15.).
- [0011] 요컨대, 각각의 코로나바이러스의 스파이크 단백질은 바이러스의 전염성과 병원성에 중요하며 관련있다. 이 시점에, 코로나바이러스 스파이크 단백질을 겨냥하여 감염 과정을 방해할 수 있는 새로운 부가적인 물질을 동정하기 위한 연구 및 개발 활동이 상당히 이루어지고 있다. 이러한 모이어티를 선택적으로 표적화하는 항체를 개발할 수도 있지만, I상 임상 시험을 통과한, 즉 환자에게 안전하게 투여할 수 있는, (소)분자를 동정하는 것이 더 유익할 수 있다.
- [0012] 아울러, 바이러스 및 바이러스 감염 주기에는 이론상 물질에 의해 공격받을 수 있는 취약한 부분들이 더 많다. 앵타머로도 알려진 올리고뉴클레오타이드-기반의 약물의 경우, 이러한 분자에 의한 간섭에 대해 취약한 여러 중요한 부분들이 이전에 동정 및 언급된 바 있다. 소분자, 항체-유래 생물제제뿐 아니라 앵타머를 비롯한 약물에 대해 추가적으로 잠재적인 표적 부분은 RNA 바이러스의 복제 공정에 참여하는 효소이다. 이러한 새로운 표적 부분과 이러한 새로운 표적 부분을 겨냥하는 친화성 분자에 대한 특정화는 코로나비리대 감염을 퇴치하기 위한 도구 키트를 보완할 것이다.
- [0013] Gonzalez et al. and Zou et al. (Gonzalez, V.M. et al., 2016. Use of Aptamers as Diagnostics Tools and Antiviral Agents for Human Viruses. *Pharmaceuticals* (Basel) 9. <https://doi.org/10.3390/ph9040078> 및 Zou et al., 2019. Application of Aptamers in Virus Detection and Antiviral Therapy. *Front Microbiol* 10, 1462. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01462>)에서 항-바이러스 활성의 앵타머에 대한 개발이 제공된 바 있다.
- [0014] 실제, 중증 급성 호흡기 증후군 (SARS) 코로나바이러스 NTPase/Helicase에 대한 각각의 저해성 RNA 및 DNA 앵타머의 단리를 기반한, 항-코로나바이러스 요법이 추가로 보고되었다. 이러한 항-바이러스 활성의 앵타머들 중에서도, 헤마글루티닌의 수용체 결합 영역을 차단하는 항-인플루엔자 앵타머 A22 (-AATTAACCTCACTAAAGGGCTGAGTCTCAAACCGCAATACACTGGTTGTATGGTCGAATAAGTTAA; 서열번호 6)가 언급되었다. 본 발명에 따른 표적으로서 바이러스의 세포 유입 매개인자 외에도, 인플루엔자 바이러스의 핵단백질과 같은 다른 바이러스-표적 결합 부위들 역시 이미 동정되어 있다 (Negri et al., 2012. Direct Optical Detection of Viral Nucleoprotein Binding to an Anti-Influenza Aptamer. *Anal Chem.* 2012 Jul 3; 84(13): 5501-5508).
- [0015] COVID-19 환자에서 새롭게 제기된 데이터에 기반한 최근 발표들은, SARS-CoV-2가 신체 다양한 부위에 도달하여, 혈류 및 미세혈전증을 유발하는 것으로 보이는 결과들을 제시하거나 또는 심지어 입증하고 있다. 이러한 미세혈전증은 현재 COVID-19 환자의 주요 사망 요인 중 하나인 것으로 보인다 (Ackermann M. et al., *N Engl J Med.* 2020 doi: 10.1056/NEJMoa2015432; Varga Z et al., *The Lancet* 2020 doi: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5; Wichmann D et al. *Annals of Internal Medicine* 2020 doi: 10.7326/M20-2003).
- [0016] 대유행이 진행됨에 따라, 예를 들어 이탈리아 연구에서, 85% 이상의 높은 비율로 환자들이 COVID-19 회복 이후에도 지속적인 증상을 나타낸다는 것이 명확해 졌다 (Carfi A, Bernabei R, Landi F, Gemelli Against COVID-19 Post-Acute Care Study Group (2020) Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *JAMA* 324:603-605. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12603>). post-COVID-19 증상 정도에 대한 유사한 결과가 독일 연구에서 검증되어, 조사한 COVID-19 환자들 중 75% 이상에서 post-질환 증상이 나타나는 것으로 확인되었다 (Puntmann VO, Carerj ML, Wieters I, et al (2020) Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered From Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.* <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.3557>).
- [0017] 활성 SARS-CoV-2 감염 및 질환 COVID-19가 잠잠해진 후 관찰된 지속적인 복합적인 증상들을 일반적으로 코로나 감염 후 후유증 (Post-COVID syndrome), 롱 코비드 (Long COVID), PASC (SARS-CoV-2 감염 후 급성 후유증),

CCS (만성적인 COVID 증후군) 또는 장기-지속 코비드 (long-haul COVID)라 칭한다.

- [0018] 이들 증상은 만성 피로 증후군, 체위 기립성 빈맥 증후군 (PoTS), 자율신경실조증, 횡단성 측수염, 급성 괴사성 측수염, 궤양 바레 증후군 등과 같은 한가지 이상의 신경 교란뿐 아니라 심근 염증, 부정맥, 빈맥, 서맥 및 심지어 심정지로 악화될 수 있는 방실 (AV) 차단과 같은 심혈관 장애를 포함할 수 있다.
- [0019] 이에, 활성 SARS-CoV-2 감염에 대한 예방 및 치료뿐 아니라 롱 코비드 상태에서 이러한 감염 이후의 증상을 예방 및 치료하기 위한 새로운 치료학적 물질이 요구되고 있다. 흥미롭게도, 최근 롱 코비드와 자가면역 간의 연관성이 드러났다. 이와 관련하여, SARS-CoV-2 촉발된 자가면역 반응이 질환의 중증도 및 지속성에 잠재적인 핵심 인자인 것으로 제안되었다 (Khamsi R 2021, Nature 590(7844):29-31.).
- [0020] 임의의 새로운 화합물과 조성물은 이론적으로는 단시간내에 환자에서 코로나비리드에 의해 유발된 증상을 완화 및 치유하는 등의 임상적으로 적절한 다수의 활용 분야들에서 용도를 찾을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0021] 이에, 본 발명의 과제는 코로나비리대 과 바이러스 감염을 앓고 있는 개체에 대한 요법에 사용하기 위한 새로운 분자를 제공하는 것이다.
- [0022] 아울러, 본 발명의 다른 과제는 코로나비리대 과 바이러스에 의한 체세포 감염을 방지하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0023] 또한, 본 발명의 과제는 이러한 바이러스 감염에 대항하여 이용할 수 있는 약학적 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.
- [0024] 본 발명의 다른 과제는 코로나비리대 과 바이러스에 의한 체세포 감염을 방지하기 위한 새로운 분자의 용도를 제공하는 것이다.
- [0025] 과제는, COVID-19 질환의 진행 중에 최근 인지된 미세혈전증 연관성에 비추어, 코로나비리대 과 바이러스 감염에 대해 효과적이며 동시에 항-응고 효과를 나타내는 새로운 분자를 제공하는 것이다.
- [0026] 본 발명의 추가적인 과제는 코로나비리대 복제 기구의 새로운 표적 부위를 겨냥하는 친화성 분자를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0027] 전술한 과제들은 아래에 명시된 본 발명의 측면들에 의해 해소된다.
- [0028] 본 발명의 제1 측면에서, 앵타머가 코로나비리대 과 바이러스의 감염을 치료, 치유 또는 추가적인 진행을 방지함으로써 개체에 대한 요법 (therapy)에 사용하기 위해 제공되며, 앵타머는 서열번호 1의 핵산 서열 (GGT TGG TGT GGT TGG) 및/또는 서열번호 1과 80% 이상 동일한 핵산 서열을 포함한다.
- [0029] 본 발명의 제1 측면에 대한 바람직한 구현예에서, 개체는 포유류이며, 바람직하게는 개체는 인간이다.
- [0030] 본 발명의 제1 측면에 대한 바람직한 일 구현예에서, 감염은 베타코로나바이러스 (Betacoronavirus) 속 바이러스, 바람직하게는 사르베코바이러스 (Sarbecovirus) 또는 메르베코바이러스 (Merbecovirus) 아속 바이러스, 더 바람직하게는 MERS-CoV, SARS-CoV 및 SARS-CoV-2를 포함하는 군으로부터 선택되는 바이러스에 의해 유발된다.
- [0031] 본 발명의 제1 측면에 대한 다른 바람직한 구현예에서, 감염은 사르베코바이러스 아속 바이러스, 바람직하게는 중증 급성 호흡기 증후군-관련 코로나바이러스 중, 보다 더 바람직하게는 SARS-CoV 및 SARS-CoV-2 중 하나에 의해 유발된다.
- [0032] 본 발명의 제1 측면에 대한 특히 바람직한 구현예에서, 감염은 SARS-CoV-2에 의해 유발된다.
- [0033] 본 발명의 제1 측면에 대한 바람직한 일 구현예에서, 앵타머는 항-응고 활성을 가지며, 바람직하게는 앵타머는 앵타머 농도 0.03 mg/ml에서 인간 보정 혈장 (calibration plasma)의 부분 트롬보플라스틴 시간 (PTT 또는 대안적으로 aPTT)으로서 측정된 응고 시간을 60초 이상으로 연장할 수 있거나, 및/또는 앵타머는 앵타머 농도 0.03 mg/ml에서 인간 보정 혈장의 프로트롬빈 시간 (Quick 값)을 40% 이하로 단축할 수 있다.

- [0034] 본 발명의 제1 측면에 대한 다른 바람직한 구현예에서, 앵타머는 선택적으로 인간 트롬빈과 상호작용하거나 또는 인간 트롬빈에 결합하고, 바람직하게는 앵타머가 인간 트롬빈에 결합하는 K_D 값은 $1 \mu M$ 또는 그 미만이다.
- [0035] 본 발명의 제1 측면에 대한 바람직한 구현예에서, 앵타머는 선택적으로 바이러스의 스파이크 (S) 당단백질과, 바람직하게는 스파이크 (S) 당단백질의 수용체-결합 도메인 (RBD)과 상호작용함으로써, 더 바람직하게는 바이러스의 스파이크 당단백질과 안지오텐신-전환 효소 2 (ACE2) 또는 다이펩티딜 펩티다제 4 (DPP4) 간의 상호작용, 보다 더 바람직하게는 대상 숙주 세포의 ACE2와의 상호작용을 방지하거나 또는 간섭함으로써, 체세포의 감염을 방해한다.
- [0036] 본 발명의 제1 측면에 대한 전술한 구현예들 중 더 바람직한 구현예에서, 스파이크 당단백질의 수용체-결합 도메인은 서열번호 2 (SARS-CoV-2 스파이크 RBD) 또는 서열번호 3 (SARS-CoV 스파이크 RBD) 또는 서열번호 4 (MERS-CoV 스파이크 RBD)의 서열을 가지며, 바람직하게는 스파이크 당단백질의 수용체-결합 도메인은 서열번호 2 또는 서열번호 3의 서열을 가지며, 바람직하게는 스파이크 당단백질은 서열번호 2의 서열을 가진다.
- [0037] 본 발명에 대한 바람직한 일 구현예에서, 앵타머는 전신성 전달 또는 폐 전달에 의해, 바람직하게는 폐 전달에 의해, 더 바람직하게는 흡입에 의해 개체에 투여된다.
- [0038] 본 발명의 제2 측면에 따라, 앵타머는 코로나비리대 과 바이러스의 감염으로부터 회복한 환자에서 롱 코비드와 관련한 질환 증상을 치료, 치유 또는 방지함으로써 개체의 요법에 이용하기 위해 제공되며, 앵타머는 서열번호 1의 핵산 서열 (GGT TGG TGT GGT TGG) 및/또는 서열번호 1과 80% 이상 동일한 핵산 서열을 포함한다.
- [0039] 제2 측면에 대한 바람직한 구현예에서, 질환 증상은 만성 피로 증후군, 체위 기립성 빈맥 증후군 (PoTS), 자율 신경실조증, 진전증, 주의력 결핍, 명칭 실어증, 신경병증, 횡단성 척수염, 급성 괴사성 척수염 및 궤양 배례 증후군과 같은 신경학적 증상, 심근 염증, 부정맥, 빈맥, 서맥, 고혈압 및 방실 (AV) 차단과 같은 심혈관 증상, 탈모 및 습진과 같은 피부 증상, 또는 위장 질환을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함한다.
- [0040] 본 발명의 제2 측면에 대한 다른 바람직한 구현예에서, 앵타머를 이용해, G-단백질 커플링된 수용체에 특이적인 자가항체와 이의 표적 단백질 간의 상호작용을 저해한다.
- [0041] 본 발명의 제2 측면에 대한 또 다른 바람직한 구현예에서, 앵타머는 G-단백질 커플링된 수용체에 대한 자가항체가 검출될 수 있는 환자를 치료하는데 이용하기 위한 것이다.
- [0042] 본 발명의 제2 측면에 대한 바람직한 일 구현예에서, 환자는 G-단백질 커플링된 수용체에 대한 기능성 자가항체, 바람직하게는 인간 G-단백질 커플링된 수용체 아드레날린성 α -1 수용체, 아드레날린성 β -2 수용체, 엔도텔린 1 ETA 수용체, 무스카린성 M_2 수용체, 안지오텐신 II AT1 수용체, MAS-수용체 및/또는 통각 수용체 중 어느 하나에 대해 특이적인 기능성 자가항체, 더 바람직하게는 아드레날린성 β -2 수용체, 무스카린성 M_2 수용체, 안지오텐신 II AT1 수용체, MAS-수용체 중 어느 하나에 대해 특이적인 기능성 자가항체를 생성하며, 특히 바람직하게는, 환자는 아드레날린성 β -2 수용체, 무스카린성 M_2 수용체, 안지오텐신 II AT1 수용체 및 MAS-수용체 각각에 대해 특이적인 자가항체를 포함하는 항체 패턴을 나타낸다.
- [0043] 본 발명의 제3 측면에 따라, 시험관내/생체의 수행되며; 앵타머가 서열번호 1의 핵산 서열 (GGT TGG TGT GGT TGG) 및/또는 서열번호 1과 80% 이상 동일한 핵산 서열을 포함하는, 앵타머를 이용함으로써 코로나비리대 과 바이러스에 의한 체세포 감염을 방지하는 방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 제3 측면에 대한 바람직한 구현예에서, 세포는 포유류 세포이며, 바람직하게는 세포는 인간 세포이다.
- [0045] 본 발명의 제4 측면에 따라, 본 발명의 제1 측면에 따라 이용하기 위한 앵타머 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0046] 본 발명의 제4 측면에 대한 바람직한 구현예에서, 제1 측면에 따라 이용하기 위한 약학적 조성물은 개체에 전신성 전달 또는 폐 전달에 의해, 바람직하게는 폐 전달에 의해, 더 바람직하게는 흡입에 의해 사용하기 위한 것이다.
- [0047] 본 발명의 제5 측면에 따라, 본 발명의 제1 측면에 따라 이용하기 위한 하나 이상의 앵타머 및 용기를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0048] 본 발명의 제6 측면에 따라, 코로나비리대 과 바이러스에 의한 체세포 감염을 방지하기 위한 본 발명의 제1 측

면에서 정의되는 앵타머의 용도를 제공하며, 앵타머는 시험관내/생체외에서 사용된다.

- [0049] 본 발명의 제7 측면에 따라, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2의 RNA-의존적인 RNA 중합효소의 아미노산 서열 Leu-Tyr-Arg-Asn-Arg-Asp-Val (LYRNRDV; 서열번호 9) 및/또는 His-Arg-Phe-Tyr-Arg-Leu-Ala-Asn (HRFYRLAN; 서열번호 10)의 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 친화성 분자를 제공한다.
- [0050] 본 발명의 제7 측면에 대한 바람직한 구현예에서, 친화성 분자는 분자량 최대 900 달톤의 소분자이며, 더 바람직하게는 친화성 분자는 신시내티 대학 화합물 컬렉션, ApexBio Technology LLC 사의 DiscoveryProbe™ Bioactive Compound Library Plus 및 Cayman Chemical 사의 SARS-CoV-2 Screening Library를 포함하는 군으로부터 선택되는 임의의 한가지 소분자 컬렉션으로부터 유래한 소분자이다.
- [0051] 본 발명의 제7 측면에 대한 다른 바람직한 구현예에서, 친화성 분자는 펩타이드-계 화합물, 더 바람직하게는 항체 또는 이의 결합 단편이다.
- [0052] 본 발명의 제7 측면에 대한 바람직한 일 구현예에서, 친화성 분자는 앵타머 또는 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0053] 본 발명의 제8 측면에서, 의약제로서 사용하기 위한 제7 측면의 친화성 분자를 제공한다.
- [0054] 본 발명의 제9 측면에서, 코로나비리과 과 바이러스로 인한 감염을 치료, 치유 또는 추가적인 진행을 방지함으로써, 개체의 요법에 사용하기 위한 제7 측면의 친화성 분자를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0055] 도 1은 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질로부터 유래한 4번 펩타이드 (서열번호 5의 아미노산 6개로 이루어진 펩타이드 서열; **YRLFRK**)의 존재 하에 BC 007의 사중선 (quadruplex) 생성에 대한 NMR-분석 결과를 도시한다; 상단 스펙트럼: BC 007과 서열 YRLFRK의 4번 펩타이드의 1:1 혼합물의 ¹H-NMR 스펙트럼; 중간 스펙트럼: 서열번호 5의 4번 펩타이드의 순수한 수 중 스펙트럼; 하단 스펙트럼: KC1 존재 하의 BC 007의 사중선 구조에 대한 스펙트럼.
- 도 2는 도 1과 동일한 스펙트럼을, 8.5-6.0 ppm 범위에 대해 확대한 도이다; 중간 및 하단: 순수한 물질은 오히려 날카로운 신호를 나타내고, 2종의 물질이 서로 상호작용하는 경우 상단 스펙트럼에서 넓어지고 위치가 쉬프트된다.
- 도 3은 VeroFM 및 Calu-3 세포에서 BC 007의 항-바이러스 용량-반응 효과에 기반한, 세포 배양물에서 BC 007에 의한 SARS-CoV-2 복제 저해를 도시한다.
- 도 4는 본 발명의 앵타머 BC 007 (서열번호 1)의 고정된 인간 트롬빈 결합에 대한 ELISA 검사 결과를 도시한다.
- 도 5는 (A) 부분 트롬보플라스틴 시간 (PTT) 및 (B) 프로트롬빈 시간 (Quick) 값으로서 측정된 앵타머 BC 007 (서열번호 1) 및 AS1411 (서열번호 7) 각각에 의해 유도되는 응고 저해 측정 결과를 도시한다.
- 도 6은 SARS-CoV-2의 RNA-의존적인 RNA 중합효소 (서열번호 8의 전장 서열)의 펩타이드 LYRNRDV (상단; 서열번호 9) 및 펩타이드 HRFYRLAN (하단; 서열번호 10)의 존재 하에 BC 007의 사중선 생성에 대한 NMR 분석 결과를 도시한 것으로, 이들 펩타이드 2종은 성공적인 특이 결합을 의미하는 사중선 폴드 (quadruplex fold)를 유도할 수 있다.
- 도 7은 SARS-CoV-2의 RNA-의존적인 RNA 중합효소의 펩타이드 HRFYRLAN (서열번호 10)으로 적정한 BC 007에 대한 ITC (등온 적정 열량 측정법) 분석 결과를 도시한다; 상단 - 온도기록도; 하단 - 결합 등온도 (binding isotherm).
- 도 8은 SARS-CoV-2의 스파이크 RBD에 또한 존재하는, 고도로 하전된 비교 펩타이드 대조군 서열, NRKRISN (서열번호 11)로 적정한 BC 007에 대한 ITC 분석 결과를 도시한다; 상단 - 온도기록도; 하단 - 결합 등온도.
- 도 9는 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질로부터 유래한 4번 펩타이드 (서열번호 5; **YRLFRK**) 및 대조군 펩타이드 NRKRISN (서열번호 11)의 존재 하에 BC 007의 NMR 분석 결과를 비교하여 도시한다.
- 도 10은 롱 코비드 증상에 대한 개괄 및 환자 혈청내 GPCR 자가항체를 함께 나타낸 것이다.
- 도 11은 생물분석에서 Post-COVID-증상을 앓고 있는 환자의 혈청으로부터 G-단백질 커플링된 수용체를 표적화하는 기능적으로 활성인 자가항체를 측정된 결과를 도시한다. **A:** β2-아드레노셉터 (β2-R), 노시셉틴 수용체 (노

시애틀-R), 안지오텐신 II AT1 수용체 (AT1) 및 $\alpha 1$ -아드레노셉터 ($\alpha 1$ -R)에 대한 양성 크로노트로픽 (chronotropic) 자가항체; 이들 측정은 길항제 아트로핀, A779 및 음성 크로노트로픽 효과를 발휘하는 항체를 차단하는 BQ123의 존재 하에 수행하였으며; 앵타머 BC 007과 예비-인큐베이션할 경우, 기능적인 활성이 소실되었다. 대조군은 건강한 공여자의 샘플이다. **B:** MAS-수용체 (MAS-R), 무스카린성 M_2 -수용체 (M_2 -R), 엔도텔린 수용체 (ETA-R)에 대한 음성 크로노트로픽 자가항체; 여기서, 양성 크로노트로픽 작용성 자가항체의 활성은 ICI118.551, J113397, 로사르탄 및 우라피딜에 의해 차단되었으며; 앵타머 BC 007과 예비-인큐베이션한 경우, 기능성 활성이 소실되었다. 대조군은 건강한 공여자의 샘플이다; Neuro* = 신경학적 증상; Cardiovasc** = 심혈관 증상, n.a. = 적용 불가, PoTS = 체위 기립성 빈맥 증후군; $NOC-fAAB^{\S}$ = 노시셉틴 수용체에 대한 기능적으로 활성인 자가항체, $\beta 2-fAAB^{\S}$ = $\beta 1$ -아드레노셉터를 표적으로 하는 자가항체, $\alpha 1-fAAB^{\S}$ = $\alpha 1$ -아드레노셉터를 표적으로 하는 자가항체, $ETA-fAAB^{+}$ = 엔도텔린 수용체를 표적으로 하는 자가항체, $M2-fAAB^{\S}$ = 무스카린성 수용체를 표적으로 하는 자가항체, $AT1-fAAB^{\S}$ = 안지오텐신 II AT1 수용체를 표적으로 하는 자가항체, $MAS-fAAB^{\#}$ = MAS 수용체를 표적으로 하는 자가항체.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0056] 본 발명은 코로나비리대 바이러스의 스파이크 단백질과 선택적으로 상호작용할 수 있으며, 따라서 이러한 바이러스에 의한 체세포 감염을 방해할 것으로 예상되는, 새로운 화합물의 동정을 기반으로 한다. 아울러, 본 발명자들은, 특이적인 앵타머 분자가 인간 세포에서 이러한 바이러스의 감염성 활성 및 복제를 저해할 수 있다는 것을, 성공적으로 인지하였다.
- [0057] 본 발명자들은 트롬빈-결합성 앵타머 또는 BC 007로서 통상적으로 언급되는 서열번호 1의 앵타머와 트롬빈과 같은 수종의 결합 파트너 간의 상호작용에 대해 집중적으로 연구하였다. NMR 기법으로 BC 007과 트롬빈 간의 상호작용의 특이성을 조사하던 중에, BC 007에 의한 NMR-검출가능한 사중선 구조의 획득에 의해 입증된 바와 같이, BC 007에 강하게 결합하는데 완전한, 전장 트롬빈-분자가 필요한 것은 아니라 사실을 확인할 수 있었다.
- [0058] 실제, 결합 모이어티로부터 취한 훨씬 짧은 펩타이드가 동일한 결과를 달성하는 것으로 확인되었다 (데이터 도시하지 않음). 실제, BC 007의 사중선 폴드를 유발하는 전장 트롬빈으로부터 유래한 펩타이드는 양 전하를 띠는 측쇄를 가진 수종의 아미노산, 바람직하게는 아르기닌을 포함하는 서열 모티프로 구성되거나 이를 포함한다는 점이 명확하게 드러났다. 이들 펩타이드는 이의 양 전하로 인해 용매-계면에 존재할 수 있으며, 그래서 이는 트롬빈뿐 아니라 코로나비리대 과 바이러스의 스파이크 단백질과 같은 기타 단백질내 본 발명에서 청구되는 앵타머에 의해 선택적으로 결합될 수 있다.
- [0059] 본 발명자들은, 현재 SARS-CoV-2 및 기타 코로나바이러스-관련 감염 발생으로 유발된 문제들에 직면하여, 본 발명의 앵타머 분자가 코로나바이러스 감염에 대항하는 물질로서 잠재적으로 기능성을 가질 수 있는지를 고려하였다.
- [0060] 놀랍게도, 본 발명자들은, 여러가지 코로나바이러스 균주의 스파이크 단백질, 특히 이의 수용체-결합 도메인에 속하는 서열들이 아르기닌-풍부 클러스터와 같이 양으로 하전된 측쇄를 가진 아미노산 수개를 함유한 서열 모티프를 가진다는 것을, 알게 되었다 (상기 Hoffmann et al., 2020 참조).
- [0061] 이러한 정보와 특이적인 앵타머와 트롬빈 간의 상호작용 연구에 대한 상당한 경험에 기반하여, 본 발명자들은 SARS-CoV-2의 바이러스 스파이크 단백질의 수용체-결합 도메인 내 양으로 하전된 아미노산 및 아르기닌-풍부 서열 단편 (예, 클러스터)뿐 아니라 코로나비리대 바이러스의 RNA-의존적인 RNA 중합효소 내 기존에 공지되지 않은 표적 펩타이드인 대표적인 클러스터를 성공적으로 동정하게 되었다.
- [0062] SARS-CoV-2의 스파이크 단백질의 S1 서브유닛의 수용체-결합 도메인의 일부로서 4번 펩타이드 (아미노산 서열 YRLFRK; 서열번호 5)는 BC 007을 이용한 결합 연구에서 대표적인 펩타이드로서 선택하였다. 놀랍게도, 실제 BC 007이 사중선 폴드를 취하게 하는 강력한 상호작용이 4번 펩타이드와 BC 007 간에 존재하는 것으로 관찰되었다 (도 1 및 2, 아래 실시예에서 실시예 1 참조).
- [0063] 이러한 강력한 상호작용은 매우 타당한 것으로 보이며, 전장 분자, 전체 스파이크 단백질뿐 아니라 전체 바이러스 입자에서 마찬가지로 가능성에 있는데, 스파이크 단백질은 코로나비리대 과 바이러스의 감염성 및 병원성을 담당한다. 또한, 코로나비리대 과의 기타 바이러스 균주의 스파이크 단백질 내 양으로 하전된 아미노산 클러스터

터가 존재한다는 점에 비추어, 본 발명은 이러한 기타 바이러스에 대해서도 물론 유용한 것으로 보인다.

- [0064] 본 발명의 앵타머와 SARS-CoV-2의 스파이크 서열 모티프 간의 강력한 상호작용에 대한 이러한 증거에 기반하여, 본 발명자들은 SARS-CoV-2 감염된 인간 세포에서 본 발명의 앵타머의 저해 활성 분석을 진행하였다.
- [0065] 놀랍게도, 본 발명의 앵타머는 SARS-CoV-2의 바이러스 활성을 매우 효과적으로 저해할 뿐 아니라 실제 COVID-19에 대한 잠재적인 치료학적 옵션으로서 현재 논의된 기타 항-바이러스제를 능가하는 것으로 보인다 (실시예 2 참조).
- [0066] 이러한 결과는 본 발명의 앵타머를 코로나비리대 과 바이러스의 감염을 치료, 치유 또는 방지하는데 이용하는 치료학적 용도에 기반이 되는, 치료학적 효과를 명확하게 나타낸다.
- [0067] 관찰된 효과와 더불어, G-사중체 올리고뉴클레오타이드-구조가 예를 들어 HIV 감염에서, HIV의 숙주 세포로의 도입을 저해할 (ISIS5320) 뿐 아니라 HIV 인테그라제 자체 (T30177 또는 AR177, 임상 실험에서의 최초 인테그라제 저해제)를 저해함으로써, 항-바이러스 효과 발생을 유발하는 것으로, 기존에 보고되어 있다 (리뷰로서 Roxo, C., et al., 2019. G-Quadruplex-Forming Aptamers-Characteristics, Applications, and Perspectives. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24203781> 참조).
- [0068] HIV는 SARS-CoV-2 및 기타 코로나비리대 바이러스와 마찬가지로 ssRNA 바이러스이며, 이는 바이러스 복제 단계가 비슷하다는 것을 의미한다. 따라서, 결합 파트너와의 상호작용시 G-사중선-유사 폴드 (G-quadruplex-like fold)를 취할 수 있는 본 발명의 앵타머가 또한 스파이크 단백질과의 직접 상호작용뿐 아니라 SARS-CoV-2 인테그라제 또는 기타 취약한 부위를 저해할 가능성이 매우 높다.
- [0069] 아울러, COVID-19를 앓고 있는 환자들의 사망에서 미세혈전증의 유의한 연관성을 시사하는 최근 데이터들로 인해, 항-혈전성 및 항-응고성 효과를 가진 분자가 코로나비리대 감염 상황에서 연구되고 있다. 코로나비리대 과 바이러스 감염을 퇴치하고 동시에 항-응고 효과를 나타내는 본 발명의 앵타머 분자의 능력은, 본 발명을 COVID-19 및 기타 코로나비리대-관련 질환에 이용하게 더 적합하게 한다.
- [0070] 이는 본 발명의 앵타머가 앵타머 AS1411 (서열번호 7)과 같이 COVID-19에 대항하는 치료학적 물질로서 최근 제안된 다른 앵타머를 능가하는 특별한 이점이다. 비교 앵타머는 임의의 항-혈전성 또는 항-응고성 효과가 결여되어 있어 본 발명의 이중적인 공격 방식을 취하지 못한다. AS1411은 본래 세포 표면에서 발견되는 뉴클레오타이드로 지칭되는 단백질에 결합하는 합성 DNA 분자로서 개발되었다. 이의 활성에 기반하여, 이는 이전에 암 치료용 실험 약물로서 조사된 바 있다.
- [0071] 본 발명의 일 측면에서, 앵타머는 코로나비리대 과 바이러스에 의한 감염을 치료하거나, 치유하거나 또는 추가적인 진행을 방지함으로써 개체의 요법에 이용하기 위해 제공되며, 앵타머는 서열번호 1의 핵산 서열 (GGT TGG TGT GGT TGG) 및/또는 서열번호 1과 80% 이상 동일한 핵산 서열을 포함한다.
- [0072] 본 발명에서, 바이러스 감염의 치료 용도는 또한 개체의 최초 감염을 본 발명에 따라 사용하기 위한 앵타머에 의해 예방할 수 있다는 것을 의미할 것이다. 아울러, 보다 중요하게는, 본 발명에 따른 용도의 앵타머는 코로나비리대 과 바이러스로 감염된 것으로 동정된 개체에서 감염을 치료하거나, 치유하거나 또는 추가적인 진행을 방지하는데 사용될 것이다.
- [0073] 상기에서 언급된 바와 같이 Clausen et al., 2020의 새로운 발견 사실과 관련하여, 서열번호 1의 앵타머는 RBD의 헤파린 결합 모티프와 또한 경쟁할 가능성이 또한 높으며, 타당해 보인다. 이 앵타머는 트롬빈의 피브리노겐 결합부인 엑소사이트 1에 대해 잘 알려져 있으며 조사된 결합성 외에도, 트롬빈의 헤파린 결합 모티프 (엑소사이트 2; Padmanabhan and Tulinsky, 1996 *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52:272-282 참조)와 선택적으로 상호작용하는 것으로 이미 발표된 바 있다. 이러한 헤파린 결합부에서 음으로 하전된 아미노산의 함량 증가로 인해, 트롬빈의 헤파린 결합 모티프에 대한 공지된 결합성과 유사하게 SARS-CoV-2의 RBD의 헤파린 결합부에서 서열번호 1의 결합은 타당한 것으로 보인다.
- [0074] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 앵타머는 개체 숙주 세포의 세포성 헤파린 설페이트와 선택적으로 상호작용함으로써 체세포의 감염을 추가로 간섭한다.
- [0075] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 바이러스 감염을 치료, 치유 또는 추가적인 진행을 방지하여야 하는 개체는 척추동물이며, 더 바람직하게는 개체는 포유류이다. 본 발명의 의미에서, 포유류 군으로는 랫, 마우스, 흰당비, 토끼, 고양이, 개, 말, 소, 젖소, 돼지, 양, 인간을 제외한 영장류 및 인간을 포함하지만, 이들로 한정되는

것은 아니다. 가장 바람직하게는, 개체는 인간이다.

- [0076] 본 발명에 대한 바람직한 구현예에서, 본원에 개시 및 기술된 본 발명의 앵타머는 서열번호 1의 핵산 서열 (GGT TGG TGT GGT TGG) 및/또는 서열번호 1과 80% 이상 동일한 핵산 서열을 포함한다. 다른 더 바람직한 구현예에서, 앵타머는 서열번호 1의 핵산 서열 (GGT TGG TGT GGT TGG)을 포함하며, 특히 앵타머는 서열번호 1의 핵산 서열 (GGT TGG TGT GGT TGG)로 구성된다.
- [0077] 서열 2종 간의 동일성 % 결정은 Karlin 및 Altschul의 수학적 알고리즘을 이용해 본 발명에 따라 이루어진다 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 5873-5877). 이러한 알고리즘은 Altschul et al. (J. Mol. Biol. (1990) 215: 403-410)의 BLASTN 및 BLASTP 프로그램의 토대이다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은 BLASTN 프로그램으로 수행한다. 비교 목적으로 갭 정렬을 수행하기 위해, Gapped BLAST를 Altschul et al. (Nucleic Acids Res. (1997) 25: 3389-3402)에 기술된 바와 같이 이용한다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용할 경우, 각 프로그램의 디폴트 파라미터를 적용한다.
- [0078] 본 발명의 더 바람직한 구현예에 있어서, 본원에 기술된 각각의 앵타머 서열에 대해 적어도 85% 동일한, 보다 더 바람직하게는 적어도 90% 동일한, 특히 바람직하게는 적어도 95% 동일한 핵산 서열로 구성되거나 또는 이를 포함하는 앵타머 서열은 본 발명의 일부를 구성한다.
- [0079] 본 발명의 목적에서, 용어 "앵타머"는 표적 분자에 고 친화성으로 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 앵타머는 지정된 조건 하에 특이적인 3차원 구조로 접힐 수 있다. 본 발명에 대한 바람직한 일 구현예에서, 본 발명의 앵타머는 표적 서열과 고 친화성으로 특이적으로 상호작용한다.
- [0080] 바람직한 구현예에서, 앵타머는 코로나비리드 과 바이러스의 스파이크 당단백질 내 서열과, 바람직하게는 S1 서브유닛 내 서열과, 더 바람직하게는 이의 수용체 결합 도메인 내 서열과 상호작용한다. 본 발명의 일 구현예에서, 앵타머는 아미노산 7개로 된 가닥 내 양으로 하전된 아미노산, 더 바람직하게는 아르기닌을 2개 이상 가진 바이러스 서열 내 영역에 결합한다.
- [0081] 본 발명의 앵타머는 핵산 분자, 즉 뉴클레오타이드의 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 앵타머는 본원에 정의된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열로 구성된다.
- [0082] 본 발명의 앵타머는 바람직하게는 비-변형된 및/또는 변형된 D-뉴클레오타이드 및/또는 L-뉴클레오타이드를 포함한다. 핵산 염기에 대한 통상적인 단문자 코드에 따라, 뉴클레오타이드 서열이 DNA 서열일 경우 "C"는 시토신, "A"는 아데닌, "G"는 구아닌, "T"는 티민을 지칭하고, 뉴클레오타이드 서열이 RNA 서열일 경우에 "T"는 우라실 뉴클레오타이드이다. 만일 아래에서 상충되게 언급되지 않은 한, 용어 "뉴클레오타이드"는 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드를 지칭할 것이다.
- [0083] 본 발명의 앵타머는 DNA-뉴클레오타이드 서열 또는 RNA-뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되므로, 각각 DNA-앵타머 또는 RNA-앵타머를 지칭할 수 있다. 만일 본 발명의 앵타머가 RNA-뉴클레오타이드 서열을 포함한다면, 본 발명 전체에서 명시된 서열 모티프에서 "T"는 우라실을 의미한다.
- [0084] 본 발명 전체에서 간결하게 기술하기 위해, 명확한 DNA-뉴클레오타이드 서열만 참조한다. 그러나, 대응되는 RNA-뉴클레오타이드 서열 역시 본 발명에 포함된다.
- [0085] 일 구현예에서, DNA-앵타머를 사용하는 것이 바람직하다. DNA-앵타머는 통상적으로 RNA-앵타머에 비해 열장에서 더 안정적이다. 다른 구현예에서, 단일 가닥 뉴클레오타이드 서열이 바람직하다. 다른 대안적인 구현예에서, 이중 가닥 뉴클레오타이드 서열이 바람직하다.
- [0086] 본 발명의 앵타머는 2'-변형된 뉴클레오타이드, 예를 들어 2'-플루오로-변형된 뉴클레오타이드, 2'-메톡시-변형된 뉴클레오타이드, 2'-메톡시에틸-변형된 뉴클레오타이드 및/또는 2'-아미노-변형된 뉴클레오타이드를 함유한 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 앵타머는 또한 데옥시리보뉴클레오타이드, 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 및/또는 변형된 리보뉴클레오타이드의 혼합을 포함할 수 있다. 각각 용어 "2'-플루오로-변형된 뉴클레오타이드", "2'-메톡시-변형된 뉴클레오타이드", "2'-메톡시에틸-변형된 뉴클레오타이드" 및/또는 "2'-아미노-변형된 뉴클레오타이드"는 변형된 리보뉴클레오타이드 및 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0087] 본 발명의 앵타머는 변형을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 거울상 이성질체 및/또는 앵타머와 하나 이상의 다른 뉴클레오타이드 또는 핵산 서열의 융합을 포함한, 예를 들어 하나 이상의 뉴클레오타이드의 알킬화, 즉 메틸화, 아릴화 또는 아세틸화를 망라한다. 이러한 변형은 예를 들어 5'- 및/또는 3'-PEG-변형 또는 5'- 및/또는 3'-CAP-변형을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 아울러, 본 발명의 앵타머는 바람직하게는 잠금-핵산 (locked-

nucleic acid), 2'-플루오로-변형된 뉴클레오타이드, 2'-메톡시-변형된 뉴클레오타이드 및/또는 2'-아미노-변형된 뉴클레오타이드로부터 선택되는, 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

- [0088] 잠금 핵산 (LNA)은 입체구조가 고정된 각 RNA 뉴클레오타이드 유사체를 나타낸다. 잠금 핵산으로 된 올리고뉴클레오타이드는, 2'-OH 기가 메틸렌 기를 통해 C₄-탄소 원자와 브릿지된, 하나 이상의 이환식 리보뉴클레오타이드를 포함한다. 잠금 핵산은 대응되는 비-변형된 RNA-애포머 카운터파트와 비교해 뉴클레아제에 대해 개선된 안정성을 나타낸다. 또한, 혼성화 특성이 개선되어, 애포머의 친화성 및 특이성의 강화가 허용된다.
- [0089] 다른 바람직한 변형은 애포머의 3'-말단 및/또는 5'-말단에 소위 3'-CAP-구조, 5'-CAP-구조 및/또는 변형된 구아노신-뉴클레오타이드 (예, 7-메틸-구아노신)의 부가이다. 이러한 3'-말단 및/또는 5'-말단의 변형은 애포머를 뉴클레아제에 의한 빠른 분해로부터 보호하는 효과를 가진다.
- [0090] 대안적으로 또는 아울러, 본 발명의 애포머는 폐쇄화된 3'-말단 또는 5'-말단을 나타낼 수 있다. 3'-PEG 또는 5'-PEG 변형은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 단위 하나 이상의 부가를 포함하며, 바람직하게는 PEG 기는 에틸렌 기 1-900개, 더 바람직하게는 에틸렌 기 1-450개를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 애포머는 HO-(CH₂CH₂O)_n-H의 선형 PEG 단위를 포함하며, 여기서 n은 1-900의 정수이고, 바람직하게는 n은 1-450의 정수이다.
- [0091] 본 발명의 애포머는 전체가 또는 일부가 펩타이드 핵산 (PNA)로서 구성될 수 있다. 본 발명에 따른 애포머는 Keefe AD et al., Nat Rev Drug Discov. 2010 Jul;9(7):537-50 또는 Mayer G, Angew Chem Int Ed Engl. 2009;48(15):2672-89 또는 Mayer, G. and Famulok M., Pharmazie in unserer Zeit 2007; 36: 432-436에 기술된 바와 같이 추가로 변형될 수 있다.
- [0092] 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 일반적으로 연결된 뉴클레오타이드 단위를 복수개 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 올리고뉴클레오타이드는 게놈 또는 cDNA 등의 기존 핵산 기원으로부터 수득할 수 있지만, 바람직하게는 합성 방법에 의해 제조한다. 바람직한 구현예에서, 각 뉴클레오타이드 단위는 비-제한적으로 변형된 뉴클레오타이드 염기 및/또는 변형된 당 단위를 비롯해, 야생형 올리고뉴클레오타이드와 비교해 다양한 화학적 변형 및 치환을 포함할 수 있다.
- [0093] 화학적 변형에 대한 예들은 당해 기술 분야의 당업자에게 공지되어 있으며, Uhlmann, E. et al. (1990) Chem. Rev. 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Hunziker, J. et al. (1995) Mod. Syn. Methods 7:331-417; 및 Crooke, S. et al. (1996) Ann. Rev. Pharm. Tox. 36:107-129에 기술되어 있다.
- [0094] 뉴클레오타이드 잔기는, 특히 올리고뉴클레오타이드의 효소 분해, 예를 들어 뉴클레아제에 의한 효소 분해로부터 안정성을 개선하기 위해, 다수의 공지된 임의의 뉴클레오타이드간 연결 (internucleoside linkage)에 의해 서로 커플링될 수 있다. 이러한 뉴클레오타이드간 연결로는 포스포다이에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로다티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포르아미데이트, 실록산, 카보네이트, 카르보알콕시, 아세트아미데이트, 카바메이트, 모르폴리노, 보라노, 티오에테르, 브릿지된 포스포르아미데이트, 브릿지된 메틸렌 포스포네이트, 브릿지된 포스포로티오에이트 및 설폰 뉴클레오타이드간 연결 등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0095] 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 또한 입체특이적인 뉴클레오타이드간 연결 (예를 들어, (Rr)- 또는 (Sr)-포스포로티오에이트, 알킬포스포네이트, 또는 포스포트리에스테르 연결)을 하나 이상 가진 폴리뉴클레오타이드를 망라한다. 본원에서, 용어 "올리고뉴클레오타이드" 및 "다뉴클레오타이드"는 연결이 포스페이트 기를 포함하든 또는 포함하지 않든, 임의의 이러한 뉴클레오타이드간 연결을 가진 폴리뉴클레오타이드 및 다뉴클레오타이드를 망라하는 것으로 명확하게 의도된다. 바람직한 특정 구현예에서, 이들 뉴클레오타이드간 연결은 포스포다이에스테르, 포스포로티오에이트 또는 포스포로다티오에이트 연결 또는 이들의 조합일 수 있으며, 더 바람직하게는 뉴클레오타이드간 연결은 포스포로티오에이트이다.
- [0096] 나아가, 애포머는 구조 온전성을 보호하고 아울러 세포 내에서 이의 전달을 촉진하기 위해 적절한 비히클 안에 캡슐화될 수 있다. 바람직한 비히클로는 리포솜, 지질 소낭, 미세입자 등을 포함한다.
- [0097] 전술한 어느 한가지 방식으로 본 발명의 애포머를 변형하는 경우 한가지 이점은 애포머가 예를 들어 애포머가 이용되는 환경에 존재하는 뉴클레아제와 같은 유해한 영향으로부터 안정화할 수 있다는 것이다. 이러한 변형은 또한 애포머의 약리학적 특성을 조정하는데 적합하다. 변형은 바람직하게는 애포머의 친화성 또는 특이성을 바꾸진 않는다.

- [0098] 본 발명의 앵타머는 또한 담체 분자 및/또는 리포터 분자에 접합될 수 있다. 담체 분자는, 앵타머에 접합시, 예를 들어 안정성을 강화하거나 및/또는 배출 속도에 영향을 미침으로써 인간 혈장에서 접합된 앵타머의 혈장 반감기를 연장하는 상기한 분자를 포함한다.
- [0099] 리포터 분자는 접합된 앵타머의 검출을 가능하게 하는 분자를 포함한다. 이러한 리포터 분자에 대한 예는 GFP, 바이오틴, 콜레스테롤, 형광 염료와 같은 염료, 전기화학적 활성 리포터 분자 및/또는 방사성 잔기를 함유한 화합물, 구체적으로 PET (양전자 방출 단층촬영술) 검출에 적합한 방사핵종, 예를 들어 ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{82}Rb 또는 ^{68}Ga 이다. 당업자는 적절한 담체와 리포터 분자, 그리고 이를 본 발명의 앵타머에 접합하는 방법을 잘 알고 있을 것이다.
- [0100] 본 발명의 제1 측면에 대한 바람직한 일 구현예에서, 본 발명의 앵타머는 항-응고 활성을 가진다. 항-응고 활성은 바람직하게는 항-혈전 활성을 의미하며, 바람직하게는 미세혈전증의 방지 또는 감소로서 이해된다.
- [0101] 더 바람직하게는, 본 발명의 앵타머는 인간 보정 혈장의 부분 트롬보플라스틴 시간 (PTT 또는 대안적으로 aPTT)로서 측정된 응고 시간을 앵타머 농도 0.03 mg/ml에서 60초 이상으로 연장할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 앵타머는 인간 보정 혈장의 부분 트롬보플라스틴 시간으로서 측정된 응고 시간을 앵타머 농도 0.03 mg/ml에서 40초 이상, 더 바람직하게는 50초 이상으로 연장할 수 있다. 바람직한 일 구현예에서, 본 발명의 앵타머는 인간 보정 혈장의 부분 트롬보플라스틴 시간을 앵타머 AS1411 (서열번호 7)에 비해 연장한다.
- [0102] 또한, 더 바람직하게는, 앵타머는 인간 보정 혈장의 프로트롬빈 시간 (Quick 값)을 앵타머 농도 0.03 mg/ml에서 40% 이하로 낮출 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 앵타머는 인간 보정 혈장의 프로트롬빈 시간 (Quick 값)을 앵타머 농도 0.03 mg/ml에서 80% 이하, 더 바람직하게는 70% 이하, 보다 더 바람직하게는 60% 이하, 특히 바람직하게는 50% 이하로 낮출 수 있다. 바람직한 일 구현예에서, 본 발명의 앵타머는 인간 보정 혈장의 프로트롬빈 시간 (Quick 값)을 앵타머 AS1411 (서열번호 7)에 비해 단축한다.
- [0103] 바람직한 일 구현예에서, PTT 시간은 후술한 실시예 부분에 기술된 검사를 이용해 평가한다. 대안적으로, 바람직하게는, PTT 시간 및/또는 Quick 값은 당해 기술 분야에서 통상적으로 공지된 바와 같이 평가한다. 보정 혈장으로서, 건강한 개체의 임의의 인간 참조 혈장을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 HemosIL 인간 보정 혈장 (Instrumentation Laboratory, Werfen)을 이용한다.
- [0104] 본 발명의 제1 측면에 대한 다른 바람직한 구현예에서, 앵타머는 선택적으로 인간 트롬빈과 상호작용하거나 또는 인간 트롬빈에 결합하며, 바람직하게는 앵타머가 인간 트롬빈에 결합하는 K_D 값은 1 μM 또는 그 미만이고, 더 바람직하게는 K_D 값은 100nM 또는 그 미만, 보다 더 바람직하게는 K_D 값은 10nM 또는 그 미만이다. K_D 값은 도트 블롯 결합 분석에서 바람직하게는 인간 트롬빈의 연속 희석물 (1 pM 내지 1000 nM 범위)을 이용하고, 1:1 NA:단백질 복합체를 나타내는 등식에 피팅하여 결정함으로써, 데이터를 취득할 수 있다 (결합된 앵타머 분율 = 진폭 (amplitude) $\times$ ($[\text{트롬빈}] / (K_D + [\text{트롬빈}])$))(KaleidaGraph v. 3.51, Synergy Software, Reading, Pa.).
- [0105] 본 발명에서, 분자 2종 간의 선택적인 결합 또는 상호작용 또는 특이적인 결합 또는 상호작용은 바람직하게는 언급된 분자 2종이 결합 파트너로서 비-관련, 비-상호작용성 또는 비-결합성 분자와 비교해, 적어도 10배, 더 바람직하게는 적어도 50배, 특히 바람직하게는 적어도 100배 높은 수준으로 결합 또는 상호작용하는 것을 의미할 수 있다.
- [0106] 본 발명의 앵타머는 코로나비리대 과 바이러스 감염을 치료하는데 이용가능하다. 본 발명의 맥락에서, 앵타머는 인간 개체뿐 아니라 동물 개체에 이용가능한 것으로 간주된다. 일 구현예에서, 앵타머는 인간 개체에 사용하기 위한 것이다. 다른 구현예에서, 앵타머는 동물 개체에 사용하기 위한 것이다.
- [0107] 코로나바이러스의 감염을 저해함으로써, 코로나바이러스 감염의 잠재적으로 부정적인 효과가 중화 및 제거되며, 임의의 질환 증상이 없어지거나 또는 정상 수준으로 경감될 수 있다. 그 결과, 코로나바이러스 감염으로 유발되거나 또는 관련된 질환의 정도 및 심각성이 유의하게 감소될 수 있다. 이에, 본 발명은 코로나바이러스 감염과 관련된 질환 또는 증상을 치료하는데 이용하기 적합한 앵타머를 제공한다.
- [0108] 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 앵타머를 이용함으로써 코로나비리대 과 바이러스에 의한 체세포 감염을 방지하는 방법을 제공한다. 바람직한 일 구현예에서, 감염을 방지하는 방법은 개체에서 코로나비리대 과 바이러스에 의한 감염의 치료, 치유 또는 진행의 방지를 포괄한다.

- [0109] 본 발명에 대한 바람직한 구현예에서, 방법은 시험관내/생체외에서 수행된다. 더 바람직하게는, 본 발명의 방법에 따라 앵타머와 접촉하게 될 세포는 살아있는 유기체 전체의 일부를 구성하지 않는다. 일 구현예에서, 접촉하게 될 세포는 세포 배양물로 배양할 수 있다. 개별 세포 또는 세포 군에 대한 이러한 배양은 당해 기술 분야에서 통상적으로 이루어지는 바와 같이 수행할 수 있다.
- [0110] 본 발명의 방법에 대한 다른 바람직한 구현예에서, 방법은 살아있는 전체 유기체의 일부를 구성하는 세포에 대해 및/또는 생체내에서 수행될 수 있다. 이러한 구현예에서, 접촉시킬 세포, 조직 또는 장기는 코로나비리드 과 바이러스로 감염된 것으로 이미 진단된 것이다. 바람직하게는, 본 발명에 따라 처리할 세포는 위장 또는 호흡기, 더 바람직하게는 호흡기에 속하며, 더 바람직하게는 폐 세포에 처리된다.
- [0111] 또한, 본 발명은 코로나비리드 과 바이러스의 감염으로부터 회복한 환자에서 롱 코비드와 관련한 질환 증상을 치료, 치유 또는 방지함으로써 개체의 요법에 사용하기 위한 앵타머에 관한 것으로, 앵타머는 서열번호 1의 핵산 서열 (GGT TGG TGT GGT TGG) 및/또는 서열번호 1과 80% 이상 동일한 핵산 서열을 포함한다.
- [0112] 롱 코비드는 코로나비리드 과 바이러스에 의한 감염으로부터 회복한 환자에서 관찰되는 병태 또는 복합 증상이다. 이와 관련한 복합 증상은 여전히 조사 중이지만, 활성 감염의 증상이 소실된 이후에도 증상이 만연한 것으로 점점 명백해지고 있다.
- [0113] 본원에 포함된 또한 실험 데이터를 토대로, 활성 SARS-CoV-2 감염으로 회복된 환자에서 관찰된 다수의 증상들이 기능성 자가항체의 존재와 관련 있다는 것이 명확해졌다 (도 10). 본 발명의 앵타머가 이러한 기능성 자가항체에 대항하는 저해 활성을 가지고 있는 것으로 이미 입증되었으므로 (또한, 본 발명의 도 11에서도 입증됨), 본 발명의 앵타머는 롱 코비드로 총칭되는 그러한 증상에 대해 활성을 가진 것으로 추정할 수 있다.
- [0114] 임의 사례에서, 롱 코비드로서 총칭되는 증상은 SARS-CoV-2와 같은 코로나비리드 감염의 후기 효과 또는 지연성 효과인 것으로 간주된다. 이와 관련하여, 본 발명의 앵타머가 롱 코비드에 미치는 특이적인 효과는 본 발명에서 기술되고 청구항에 청구된 바와 같이 SARS-CoV-2 등의 코로나비리드 과 바이러스에 의한 감염의 치료의 일부로 볼 수 있다.
- [0115] 일 구현예에서, 질환 증상은 만성 피로 증후군, 체위 기립성 빈맥 증후군 (PoTS), 자율신경실조증, 진전증, 주의력 결핍, 명칭 실어증, 신경병증, 횡단성 척수염, 급성 괴사성 척수염 및 궤양 바레 증후군과 같은 신경학적 증상, 심근 염증, 부정맥, 빈맥, 서맥, 고혈압 및 방실 (AV) 차단과 같은 심혈관 증상, 탈모 및 습진과 같은 피부 증상, 또는 위장 질환을 포함하는 군으로부터 유래한 하나 이상을 포함한다.
- [0116] 바람직하게는, 앵타머를 이용해, G-단백질 커플링된 수용체에 특이적인 자가항체와 이의 표적 단백질 간의 상호작용을 저해한다. 또한, 바람직하게는, 앵타머는 G-단백질 커플링된 수용체에 대한 자가항체가 검출될 수 있는 환자를 치료하는데 이용하기 위한 것이다.
- [0117] 본 발명의 일 구현예에서, 치료할 환자는 G-단백질 커플링된 수용체에 대한 기능성 자가항체, 바람직하게는 인간 G-단백질 커플링된 수용체 아드레날린성 α -1 수용체, 아드레날린성 β -2 수용체, 엔도텔린 1 ETA 수용체, 무스카린성 M₂ 수용체, 안지오텐신 II AT1 수용체, MAS-수용체 및/또는 통각 수용체 중 어느 하나에, 더 바람직하게는 아드레날린성 β -2 수용체, 무스카린성 M₂ 수용체, 안지오텐신 II AT1 수용체, MAS-수용체 중 어느 하나에 대해 특이적인 기능성 자가항체를 나타내며, 특히 바람직하게는 환자는 아드레날린성 β -2 수용체, 무스카린성 M₂ 수용체, 안지오텐신 II AT1 수용체 및 MAS-수용체 각각에 대해 특이적인 기능성 자가항체들을 포함하는 항체 패터를 나타낸다.
- [0118] 또한, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 앵타머, 및 선택적으로, 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본 발명의 앵타머 또는 본 발명의 여러가지 앵타머들의 혼합물, 및 예를 들어 적절한 담체 또는 희석제와 같은 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0119] 바람직하게는, 본 발명의 앵타머는 약학적 조성물의 활성 성분을 구성하거나, 및/또는 유효량으로 제공된다. 용어 "유효량"은 질환 또는 병리학적인 병태에 대해 예방학적으로, 진단학적으로 또는 치료학적으로 적절한 효과를 가진 본 발명의 앵타머의 양을 지칭한다. 예방학적 효과는 질환의 발병을 방지한다. 치료학적으로 적절한 효과는 질환의 하나 이상의 증상을 어느 정도 완화하거나 또는 질환 또는 병리학적인 병태와 관련있거나 또는 요인과 관련있는 하나 이상의 생리학적 또는 생화학적 매개변수를 일부 또는 완전히 정상으로 회복시킨다.

- [0120] 본 발명의 앵타머를 투여하는 각각의 양은 예방학적, 진단학적 또는 치료학적 효과를 달성할 정도로 충분히 높다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 임의의 특정 포유류에 대한 구체적인 용량 수준, 빈도 및 투여 기간이 이용되는 구체적인 성분, 나이, 체중, 전반적인 건강 상태, 성별, 식이, 투여 시간, 투여 경로, 약물 조합 및 구체적인 요법의 심각성 등의 다양한 인자들에 따라 결정될 것임을 알 것이다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 잘 알려진 수단 및 방법을 이용해 정확한 양을 일상적인 실험의 과제로서 결정할 수 있다.
- [0121] 본 발명의 약학적 조성물에 대한 일 구현예에서, 앵타머 총 양의 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 50%, 더 바람직하게는 적어도 75%, 가장 바람직한 적어도 95%는 본 발명의 앵타머로 구성된다.
- [0122] 약학적 조성물은 요법에 사용할 경우, 일반적으로 선택적으로 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 부형제와 함께 제형으로서 투여될 것이다. 용어 "부형제"는 본원에서 본 발명의 앵타머 이외의 임의의 다른 성분을 지칭하기 위해 사용된다. 부형제의 선택은 구체적인 투여 방식에 크게 좌우될 것이다. 부형제는 적절한 담체 및/또는 희석제일 수 있다.
- [0123] 본 발명의 약학적 조성물은 바람직하게는 경구 또는 정맥내로 투여할 수 있다. 바람직한 일 구현예에서, 약학적 조성물은 흡입에 의해 투여된다. 대안적인 구현예에서, 약학적 조성물은 정맥내 투여된다.
- [0124] 바람직한 구현예에서, 약학적 조성물은 전신 전달 또는 폐 전달에 의해, 바람직하게는 폐 전달에 의해, 더 바람직하게는 흡입에 의해 환자에게 투여된다. 흡입에 의해 투여될 약학적 조성물은 바람직하게는 분말 또는 스프레이 형태일 수 있다.
- [0125] 인간 환자에게 투여하기 위해, 본 발명의 앵타머 및/또는 본 발명의 약학적 조성물의 총 일일 용량은 전형적으로 물론 투여 방식에 따라 0.001 mg 내지 8000 mg 범위이다. 예를 들어, 정맥내 일일 용량은 단순히 0.001 mg 내지 40 mg을 요구할 수 있다. 총 일일 용량은 단일 용량 또는 분할된 용량들로 투여할 수 있으며, 의사의 소견에 따라 본원에 주어진 전형적인 범위를 벗어날 수도 있다.
- [0126] 이들 투여량은 평균 체중이 약 75 kg 내지 80 kg인 인간 개체를 기준으로 한다. 의사는 유아 및 노인 등의 체중이 이 범위를 벗어난 개체에 대한 용량을 쉽게 결정할 수 있을 것이다.
- [0127] 본 발명의 맥락에서, 앵타머는 바람직하게는 백신, 항원, 항체, 세포독성제, 알레르겐제, 항생제, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, TLR 길항제, 펩타이드, 단백질, 유전자 요법 벡터, DNA 백신, 보강제, 키나제 저해제, T-세포 치료제 또는 황산화 폴리글리세롤 또는 유사한 황산화 폴리머 중 하나 이상과 조합하여 투여될 수 있다.
- [0128] 또한, 본 발명은 본 발명의 앵타머, 용기 및 선택적으로 서면 작성된 사용 설명서 및/또는 투여 수단을 포함하는 키트를 포함한다.
- [0129] 투여 경로와 무관하게, 코로나바이러스 감염과 관련있거나 또는 유발되는 질환을 치료하기 위해, 본 발명의 앵타머는 150 mg/체중 kg 이상, 바람직하게는 20 mg/체중 kg 이상, 더 바람직하게는 10 mg/체중 kg 이상, 보다 더 바람직하게는 1 μ g/kg 내지 20 mg/체중 kg 범위에서 선택되는 용량, 가장 바람직하게는 0.01 내지 10 mg/체중 kg 범위로부터 선택되는 용량의, 치료 사이클 당 전체 일일 용량으로 투여된다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 앵타머는 하루 동안 수회 분할한 투약 단계 동안에, 바람직하게는 1일 당 2-6회, 예를 들어 1일 당 4회로 투여한다. 앵타머는 하루에 각각 1900 mg씩 4회 투여할 수 있다.
- [0130] 본 발명의 일 측면에서, 코로나비리드 과 바이러스에 의한 체세포 감염을 방지하기 위해 본원에 정의된 바와 같은 앵타머의 용도를 제공한다. 본 발명에 대한 바람직한 구현예에서, 앵타머는 시험관내/생체외에서 이용할 수 있다. 대안적인 바람직한 구현예에서, 앵타머는 생체내에서 이용할 수 있다.
- [0131] 본 발명의 앵타머의 제조 또는 대량 생산은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 주로 일상적인 행위에 해당한다.
- [0132] 본 발명의 일 측면에서, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2 (서열번호 8)의 RNA-의존적인 RNA 중합효소의 아미노산 서열 Leu-Tyr-Arg-Asn-Arg-Asp-Val (LYRNRDV; 서열번호 9) 및/또는 His-Arg-Phe-Tyr-Arg-Leu-Ala-Asn (HRFYRLAN; 서열번호 10)의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 친화성 분자를 제공한다.
- [0133] 본 발명에서, 친화성 분자는 주어진 표적, 예를 들어, 서열번호 9 또는 10의 펩타이드에 대해 고 친화성을 가진 임의의 분자일 수 있다. 고 친화성 결합은 바람직하게는 비-관련 에피토프, 단백질 또는 단백질 영역과 비교해 적어도 10배, 바람직하게는 적어도 50배, 더 바람직하게는 적어도 100배 증가된 친화성으로 표적 에피토프에 결합하는 것을 의미한다.

- [0134] 본 발명자들이 수행한 추가적인 연구에서, 놀랍게도, 본 발명의 앵타머가 SARS-CoV-2 (서열번호 8; NCBI 참조 서열 등재 번호: YP_009725307.1)의 효소 RNA-의존적인 RNA 중합효소에서 기존에 미공지된 개별 에피토프 2종과 특이적으로 상호작용하여 결합하는 것으로, 발견되었다. NMR 실험뿐 아니라 등은 적정 열량 측정법을 통해, 본 발명의 앵타머와 RNA-의존적인 RNA 중합효소의 상기한 에피토프 간의 선택적인 상호작용이 결정적으로 확인되었다 (도 6 및 7 참조). 특이적인 결합이 관찰된 이 효소의 정의된 펩타이드 가닥은 아미노산 731-737 (LYRNRDV; 서열번호 9) 및 아미노산 650-657 (HRFYRLAN; 서열번호 10)이다.
- [0135] 코로나비리대 과의 다른 구성원, SARS-CoV로부터 유래된 RNA-의존적인 RNA 중합효소의 서열에서 동등한 표적 서열 역시 동정되었다 (데이터 도시 안함). 종래 기술 분야에서, RNA-의존적인 RNA 중합효소의 서열이 코로나비리대 과에서 매우 높은 아미노산 서열 동일성을 공유하지만, 다른 바이러스 RNA-의존적인 RNA 중합효소 및 역전사 효소에 대해서는 매우 낮은 서열 유사성을 가진 것으로 공지되어 있다 (예를 들어, Xu X et al. (2003) Molecular model of SARS coronavirus polymerase: implications for biochemical functions and drug design. *Nucleic Acids Res* **31**:7117-7130, page 7118, right-hand column, 1st full paragraph, 2nd sentence). 따라서, 동등한 표적 서열이 코로나비리대 과의 다른 바이러스의 RNA-의존적인 RNA 중합효소에도 존재하는 것으로 타당하게 추정할 수 있다.
- [0136] NMR 연구에서 관찰된 바와 같은 이러한 강력한 상호작용은, 이 경우에, 또한 전장 분자뿐 아니라 코로나비리대 과의 활성 바이러스에서 지속될 가능성이 있으며 매우 타당하다. 실제, 스파이크 단백질뿐 아니라 바이러스 RNA-의존적인 RNA 중합효소에 대항하는 본 발명의 앵타머의 부가적인 활성이 공지된 약물과 비교해 세포 배양 분석에서 관찰된 우수한 결과를 설명해 줄 수 있다.
- [0137] 종래에 보고된 바에 따르면, 렘데시비르 (Remdesivir) 및 갈리테시비르 (Galidesivir)와 같은 코로나비리대에 대해 활성을 가진 항-바이러스제는 RNA-의존적인 RNA 중합효소 내 서열과 상호작용할 수 있다 (갈리테시비르를 이용한 연구 및 표적 아미노산으로서 아미노산 Thr455, Arg553, Lys621, Arg624, Asp452, Ala554, Asp623, Asn691, Ser759, Asp760의 동정에 대해, Wang Y, Anirudhan V, Du R, Cui Q, and Rong L (2020) RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2 as a therapeutic target. *J Med Virol*, doi: 10.1002/jmv.26264, 그리고 렘데시비르를 이용한 연구 및 표적 아미노산으로서 아미노산 Asn 497, Arg 569, Asp 684, Leu 576, Ala 685, Tyr 687의 동정에 대해 Wu C, Liu Y, Yang Y, Zhang P, Zhong W, Wang Y, Wang Q, Xu Y, Li M, Li X, Zheng M, Chen L, and Li H (2020) Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B*, doi: 10.1016/j.apsb.2020.02.008. 참조). 보고된 서열들은 본 발명에서 동정된 펩타이드 가닥과 별개의 것이며 관련성이 없다.
- [0138] 표적 효소, 즉 RNA-의존적인 RNA 중합효소는 코로나비리대 바이러스의 바이러스 복제 기구의 핵심 요소이다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 이러한 효소에 대한 특이적인 결합이 적어도 코로나비리대 과 RNA 바이러스의 바이러스 RNA의 정확하고 효율적인 복제를 적어도 간섭하거나, 손상시키거나 또는 심지어 저해할 것임은 명백할 것이다. 이런 방식으로, 바이러스의 감염성은 숙주에서 바이러스 생활 주기에 대한 영향으로 인해 감소될 것이다.
- [0139] 이러한 핵심 효소에 대한 새로운 에피토프 동정은, 바이러스 복제를 간섭하거나 또는 저해하게 되는 부가적인 결합 파트너를 생성 및 동정할 수 있을 것이므로, 당해 기술 분야에 상당히 기여한다. 또한, 신규 동정된 에피토프는 친화성 분자에 적합한 결합부로서 이전에 공지된 핵심 효소의 임의 에피토프와는 별개이므로, 이에 결합하는 임의의 친화성 분자는 RNA-의존적인 RNA 중합효소에 특이적으로 결합하는 임의의 다른 분자에 의해 제공된 저해 작용을 보완하도록 적어도 작용할 것이다.
- [0140] 부가적으로, 신규 동정된 에피토프가 효소의 외측에 위치하므로, 용매에 접촉해 특이적인 상호작용 또는 결합에 쉽게 접근할 수 있는 것으로 인지 및 입증되었다 (데이터 도시 안함). 또한, 앵타머 결합 물질은 대부분의 경우 이의 표적 단백질의 기능성을 간섭하고, 심지어 생체내에서 이러한 목적으로 의도적으로 발현되는 것으로 언급되어야 한다 (Ulrich H (2005) DNA and RNA aptamers as modulators of protein function. *Medicinal Chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))* **1**:199-208).
- [0141] 놀랍게도, 본 발명의 앵타머는 SARS-CoV-2의 바이러스 활성을 매우 효과적으로 저해하는 것으로 입증되었을 뿐 아니라 실제 COVID-19에 대한 잠재적인 치료 옵션으로서 현재 논의 중인 다른 항바이러스제를 능가하는 것으로 확인되었다 (실시예 2 참조). 이는 바이러스 감염 과정뿐 아니라 숙주에서의 복제에 대한 이중 작용이 그 원인 일 수 있다.
- [0142] 당업자라면, 바이러스의 복제 사이클에 결정적인 핵심 효소의 새로운 에피토프를 제공함으로써, 부가적인 소분

자, 항체 또는 항체-유래 생물제제, 또는 당해 기술 분야에서 일반적으로 공지된 표준 절차를 이용함으로써 신규 동정된 에피토프에 대해 친화성을 가진 올리고뉴클레오타이드/펩타이드를 동정, 생성 또는 구축할 수 있을 것이다.

- [0143] 본 발명의 제6 측면에 대한 바람직한 구현예에서, 친화성 분자는 분자량이 최대 900 달톤인 소분자이다. 바람직하게는, 친화성 분자는 신시내티 대학 화합물 컬렉션, ApexBio Technology LLC 사의 DiscoveryProbe™ Bioactive Compound Library Plus 및 Cayman Chemical 사의 SARS-CoV-2 Screening Library를 포함하는 군으로부터 유래한 임의의 하나의 소분자 컬렉션의 소분자이다.
- [0144] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 있어서, 친화성 분자는 ZINC 15 데이터베이스에 존재하는 소분자이다 (Sterling T and Irwin JJ, *Journal of Chemical Information and Modeling* **2015** 55 (11), 2324-2337; DOI: 10.1021/acs.jcim.5b00559).
- [0145] 대안적으로, 바람직하게는, 친화성 분자는 Kowalewski J and Ray A (2020), *Heliyon*. 6. e04639. 10.1016/j.heliyon.2020.e04639의 내용에 따른 하나 이상의 바이러스 표적, 더 바람직하게는 2 이상의 바이러스 표적에 대항하는 잠재적인 활성을 가지는 것으로 확인된다.
- [0146] COVID-19 저해와 관련하여, 종래의 간행물들에서 기존 약물 또는 소분자 라이브러리들이 이미 스크리닝되었으며, SARS-CoV-2의 감염 또는 복제에 중요한 단백질과 가능한 상호작용/결합이 검토되어, 특히 이러한 상호작용을 동정할 수 있는 적절한 인 실리코 방법 (컴퓨터 프로그램)이 개발되어 있다.
- [0147] 이러한 스크리닝으로, 기존 약물을 SARS-CoV-2의 공지된 단백질 구조에 대한 잠재적인 결합성에 대해 스크리닝 하여, 공지된 바이러스 증식 저해제 (virustatic agent) 이외의 항-궤양제, 파모티딘이 SARS-CoV-2에 대한 가능성 있는 3CLpro-프로테아제 차단제로서 (Wu C, Liu Y, Yang Y, Zhang P, Zhong W, Wang Y, Wang Q, Xu Y, Li M, Li X, Zheng M, Chen L, and Li H (2020) Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B*, doi: 10.1016/j.apsb.2020.02.008), 그리고 수종의 항생제들이 RNA-의존적인 RNA 중합효소에 대한 가능성 있는 차단제로서 (Pokhrel R, Chapagain P, and Siltberg-Liberles J (2020) Potential RNA-dependent RNA polymerase inhibitors as prospective therapeutics against SARS-CoV-2. *J Med Microbiol*, doi: 10.1099/jmm.0.001203), 또한 기타 소분자들이 RNA-의존적인 RNA 중합효소로서 (Aftab SO, Ghouri MZ, Masood MU, Haider Z, Khan Z, Ahmad A, and Munawar N (2020) Analysis of SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase as a potential therapeutic drug target using a computational approach. *Journal of Translational Medicine* **18**:275) 동정되었다.
- [0148] 같은 맥락으로, 당해 기술 분야의 당업자는 임의의 이용가능한 컬렉션 또는 소분자 라이브러리를 벌크 라이브러리로서 또는 특이적인 친화성, 특징 또는 요건에 따른 하위 군으로서 취하여, 표적으로서 서열번호 9 또는 10의 신규 동정된 임의의 펩타이드 에피토프에 대해, 예를 들어 표면 플라즈몬 공명에 기반하여, 고-처리 분석을 수행할 수 있을 것이다. 이로써, 신규 에피토프에 특이적으로 결합하는 신종 소분자를 과도한 부담 없이 당해 기술 분야에서 일반적으로 공지된 표준 절차를 이용해 동정할 수 있다.
- [0149] 바람직하게 이용할 수 있는 예시적인 소분자 컬렉션은 미국 캘리포니아주 샌디에고에 위치한 ChemBridge Corporation 사의 ChemBridge DIVERSet-CL 및 ChemBridge DIVERSet-EXP 컬렉션, 벨기에 길에 위치한 Thermo Fisher Scientific 사의 Maybridge 스크리닝 컬렉션 (Maybridge HitDiscover, Maybridge HitFinder 또는 Maybridge HitCreator의 형태), 미국 미시건주 앤아버에 위치한 Cayman Chemical 사의 항-바이러스 스크리닝 라이브러리 (Supplier/Item Nr. 30390-50) 또는 SARS-CoV-2 스크리닝 라이브러리 (Supplier/Item Nr. 9003509), 또는 신시내티 대학 화합물 컬렉션의 임의의 Diversity Set 또는 당업자가 유용한 것으로 간주하는 임의의 기타 이용가능한 적절한 소분자 컬렉션 또는 라이브러리이다.
- [0150] 본 발명의 제6 측면에 대한 다른 바람직한 구현예에서, 친화성 분자는 펩타이드-계 화합물, 더 바람직하게는 항체 또는 이의 결합 단편이다.
- [0151] 신규 항체 또는 이러한 항체의 결합 단편을 생성하기 위해, 예를 들어, 대응되는 펩타이드 서열로 동물을 면역화하면서, 확립된 신뢰할 수 있는 하이브리도마 기법을 이용함으로써 신규 동정된 펩타이드 에피토프에 대해 유효한 단일클론 항체를 구축하는 것은 쉽고, 간단한, 일반적인 관행이다. 바이러스 질환을 치료하기 위해 전장 항체 (약 150 kDa)를 투여하지 않을 수 있으며, 예를 들어 FAB-단편과 같은 단편 또는 심지어 항체로부터 유래한 더 작은 영역을 생체내에서 표적에 도달할 수 있기 위해 요법에 이용할 수 있다.

- [0152] 이러한 결합 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab)₂, Fv, 다이아바디, 단쇄 항체 단편 또는 에피토프에 대해 특이적인 친화성을 가진 기타 단편들로 구성되거나 또는 이를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명에서, 서열번호 9 또는 10의 신규 동정된 에피토프에 특이적으로 결합하거나 또는 이를 겨냥하는 친화성 분자는, 비관련 에피토프, 단백질 또는 단백질 영역과 비교해, 적어도 10배, 바람직하게는 적어도 50배, 더 바람직하게는 적어도 100배 높은 친화성으로 표적 에피토프에 결합하는 친화성 분자를 의미한다.
- [0153] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 단리된 표적 에피토프에 대한 친화성 분자의 특이적인 결합성은 추가로 후술한 바와 같이 등은 적정 열량 측정법으로 측정시, K_d 500 μM 미만, 바람직하게는 200 μM 미만, 더 바람직하게는 100 μM 미만으로 제시되는 것으로 간주된다. 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 친화성 분자가 전장 RNA-의존적인 RNA 중합효소에 결합하는 특이적인 결합성은 추가로 후술한 바와 같이 등은 적정 열량 측정법으로 측정시, K_d 1 mM 미만, 바람직하게는 100 μM 미만, 더 바람직하게는 10 μM 미만으로 제시되는 것으로 간주된다. 대안적으로, 바람직하게는, K_d 값을 결정하기 위한 친화성 측정은 GE Healthcare Life Sciences 사의 Biacore™ 분석을 Biacore Assay Handbook 29-0194-00 Edition AA에 따라 이용하거나 또는 당해 기술 분야에 공지된 임의의 기타 친화성 측정법을 이용해 수행할 수 있다.
- [0154] 본 발명의 제6 측면에 대한 다른 바람직한 일 구현예에서, 친화성 분자는 앵타머 또는 올리고뉴클레오티드이다. 항체의 경우와 마찬가지로, 이러한 분석에서 쉽게 이용할 수 있고 접근가능한 표적에 대해 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드 분자를 구축하기 위한 공정들이 존재한다.
- [0155] 1990년대 초반에 공지된 에피토프에 대해 새로운 올리고뉴클레오티드 결합 물질을 발굴하기 위한 기법들 중 하나로서 SELEX가 이용 및 언급되었다. 오늘날, 다수의 여러가지 SELEX-기반의 앵타머 선별 공정들이 개발 및 이용되고 있으며 (Ali MH, Elsherbiny ME, and Emara M (2019) Updates on Aptamer Research. *International Journal of Molecular Sciences* **20**), 총체적으로 거의 모든 생각가능한 표적들에 대해 앵타머를 선별할 수 있다 (Stoltenburg R, Nikolaus N, and Strehlitz B (2012) Capture-SELEX: Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2012**:415697).
- [0156] 1990년에 앵타머가 최초로 발표된 이래로, 뉴클레오티드, 보조인자 또는 아미노산과 같은 소분자에서부터 펩타이드, 다당류 및 단백질을 넘어 전체 세포, 바이러스 및 단일 세포 유기체와 같이 복잡한 구조에 이르기까지 매우 다양한 계열의 표적들에 대해 언급되고 있다 (예, Zhang Y, Lai BS, and Juhas M (2019) Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules* **24** 참조).
- [0157] 이와 관련하여, 코로나비리드 바이러스의 핵심 효소 내 신규 에피토프의 제공시, 당해 기술 분야의 당업자는 소분자, 항체-유래 화합물뿐 아니라 앵타머와 같은 부가적인 친화성 분자를 당해 기술 분야에서 통상적으로 공지된 표준 공정을 이용함으로써 구축할 수 있다. 이러한 부가적인 친화성 분자는 바이러스의 핵심 효소 내 아직 미공지된 부위에 대한 특이적인 결합으로 인해 SARS-CoV-2의 감염을 퇴치하기 위한 타당한 활성 물질인 것으로 보인다.
- [0158] 본원에 기술된 본 발명에 대한 모든 구현예들은 당업자가 이들의 임의 조합이 어떠한 기술적인 의미가 없는 것으로 간주하지 않은 한, 임의의 조합으로 조합가능한 것으로 간주된다.

[0159] 실시예

[0160] 1.SARS-CoV-2의 수용체-결합 도메인 (RBD)의 서열 모티프와 BC 007 간의 상호작용에 대한 NMR 분석

- [0161] 모든 NMR 스펙트럼은 Bruker AV600 분광기 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany)에서 90/10 H₂O/D₂O 중에 298K 하에 600 MHz에서 획득하였다. 용매 신호는 Bruker 펄스 프로그램 zgpgw5에 포함된 Watergate w5 펄스 서열을 이용해 억제하였다. 획득 매개변수는 다음을 포함한다: 시간 도메인 = 65K, 스캔 횟수 = 512, 스위프 폭 (sweep width) = 24 ppm, 및 90° 고 파워 펄스 = 13.8 μs.
- [0162] Bc 007과 서열번호 5의 펩타이드의 농도는 1 mM이다. 물질은 어떠한 첨가제 없이 순수한 H₂O/D₂O 혼합물 0.5 ml에 용해하였다.
- [0163] 도 1에서, BC 007과 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질의 수용체-결합 도메인으로부터 유래한 서열번호 5의 펩타이드와 조합한 경우 (상단 스펙트럼)인 상단 NMR 스펙트럼은, 펩타이드와의 상호작용에 의해 유발되며 12.5 ppm에서 8개의 이미노 신호에 의해 명확하게 인지되는, BC 007의 사중선 (quadruplex) 구조의 생성을 보여주며; 스펙

트럼에서 펩타이드 신호는 분자 2종 (펩타이드와 BC 007)의 상호작용에 의해 유발되는 효과인 칼륨-유도 폴드와 비교해 강하게 쉬프트되고 넓어진다.

- [0164] 도 1의 하단 NMR 스펙트럼에서, 12 ppm 범위에서의 이미노 신호는 칼륨 이온의 존재에 의해 유도된 구조 생성에 대한 명확한 표시이지만, 이미노 프로톤의 화학적 쉬프트는 상단 스펙트럼과 명확한 차이를 보인다. 펩타이드 단독 (중간 스펙트럼)의 경우, 12 ppm 범위에서 이미노 신호는 관찰되지 않는다.
- [0165] 서열번호 1의 앵타머는 칼륨 이온의 존재시 이의 특징적인 접힌 상태로 안정화되고 (Schultze, P. et al., 1994. Three-dimensional solution structure of the thrombin-binding DNA aptamer d(GGTGGGTGGTTGG). J. Mol. Biol. 235, 1532-1547. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1105>), 수중 우세적인 랜덤 코일 구조로 존재하는 (Weisshoff, H. et al., 2018. Characterization of Aptamer BC 007 Substance and Product Using Circular Dichroism and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. J Pharm Sci. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.04.003>) 것으로 보고된 바 있다.
- [0166] 도 2의 확대도에서, 각 분자 단독에서 나타난 피크들이 매우 날카로운 신호에 근거하는지를 볼 수 있다. 이들 신호는 코로나바이러스에 대해 활성인 것으로 간주되는 물질로서 서열번호 1의 앵타머와 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질의 수용체-결합 도메인으로부터 유래한 대표적인 서열로서 서열번호 5 사이의 강력한 상호작용으로 인해, 상단 스펙트럼에서 넓어지고, 위치가 쉬프트된다.
- [0167] 이러한 결과를 토대로, 이러한 상호작용은 또한 생체내 조건에서 세포 도입 및 감염에 스파이크 단백질과 이의 수용체-결합 도메인을 또한 이용하는 동일한 코로나비리대 과의 다른 균주 및 완전한 바이러스 물질을 이용해 발생할 것으로 예측된다.
- [0168] 2. 인간 및 영장류 세포주에서 BC 007에 의한 SARS-CoV-2의 복제 저해
- [0169] BC 007의 항바이러스 용량-반응 효과를 VeroFM 및 Calu-3 세포에서 조사하였다. 서열번호 1의 앵타머 BC 007을 여러가지 농도로 바이러스에 첨가하여 15분간 4℃에 둔 후, 혼합물을 세포에 (MOI 0.0005) 첨가하고, 바이러스 부착 및 도입을 개시하기 위해 30분간 최대 37℃로 승온시킨다.
- [0170] 30분간 인큐베이션한 다음, 상층물은 제거하고, 세포를 PBS로 한번 세척한 다음 세척 후 BC 007을 동일한 최종 농도로 함유한 배지를 첨가하였다. 24시간 동안 37℃에서 인큐베이션한 다음 (복제), 각 농도에서 샘플 분획을 취하여, 종래에 공지된 바와 같이 플라크 분석을 수행하였다 (Herzog et al., *Virology Journal* 2008, **5**:138).
- [0171] BC 007은 Vero 및 Calu-3 세포주에서 낮은 농도에서 바이러스의 복제를 매우 효과적으로 저해하는 것으로 입증되었다 (도 3 참조). 바이러스 감염 저해에 대해 결정된 1/2-최대 유효 농도 (EC₅₀, 대안적으로 1/2-최대 저해 농도 IC₅₀으로도 지칭됨)는 Calu-3 세포의 경우 3.74 μM, Vero 세포의 경우 0.21 μM이었다.
- [0172] SARS-CoV-2의 잠재적인 치료와 관련한 기타 항-바이러스제와의 비교에 대해서는 Wang et al., *Cell Research* 2020, **30**:269-271의 간행물을 참조한다. 이 문헌에서, 리바비린 (ribavirin), 펜시클로비르 (penciclovir), 파비피라비르 (favipiravir), 니타록사나이드 (nitazoxanide), 클로로퀸 (chloroquine) 및 렘데시비르 (remdesivir)가 Vero E6 세포와 시작 MOI 0.05를 이용하여 비슷한 실험 설정에서 조사되었다.
- [0173] Wang 등의 보고서에서, EC₅₀ 농도는 리바비린이 109.50 μM, 펜시클로비르가 95.96 μM, 파비피라비르가 61.88 μM, 니타록사나이드가 2.12 μM, 클로로퀸이 1.13 μM, 그리고 렘데시비르가 0.77 μM인 것으로 결정되었다 (Wang et al., 2020의 270쪽 도 1a 및 269쪽의 좌우 칸에 걸친 전체 단락 참조).
- [0174] 렘데시비르에 대해 수득한 결과에 기초하여, 렘데시비르가 낮은-마이크로몰 농도에서 바이러스 감염을 강하게 차단하는 것으로 결정되었다. 아울러, 렘데시비르는 SARS-CoV-2 저해 효과를 검사하는데 사용된 농도에서 실질적인 세포 독성은 부족하였다.
- [0175] Wang et al., 2020에서 발표된 결과에 비추어, Vero 세포에서 본 발명의 앵타머를 이용해 수득한 결과는 또한 코로나비리대 감염에 대한 잠재적인 치료 옵션으로서 현재 논의된 다른 항-바이러스제에서 관찰된 효능까지 또는 심지어 그 이상으로까지 바이러스 감염을 강하게 차단하는 것으로 명확해졌다.
- [0176] 중요하게도, Wang et al., 2020에서 성능이 매우 우수한 것으로 동정된 분자와 마찬가지로, 본 발명의 앵타머는 Vero 세포, 또한 심지어 인간 세포 (Calu-3)에 대해 SARS-CoV-2 감염 활성을 효과적으로 저해하였을 뿐 아니라, 인간 세포에서 SARS-CoV-2 저해 관찰을 위해 의도한 필요한 용량에서 성공적으로 완료된 I상 임상 실험에서 이

미 입증된 바와 같이 임의의 독성은 없었다 (Becker et al., *Clin Drug Investig* 2020 May;40(5):433-447).

- [0177] 현재 논의되고 있는 치료 옵션으로서 램데시비스에 비해 우수한 본 발명의 앵타머의 놀라운 이점은 앵타머의 단순성 및 제조 용이성이다. 코로나바이러스 감염을 치료하기 위해 제안된 항-바이러스제에 대한 예로서 램데시비르는 약 70종의 원료 물질, 시약 및 촉매가 필요한 것으로 발표되어 있는데, 이중 일부는 인간에게 매우 위험하다 (Langreth, Robert (14 May 2020). "All Eyes on Gilead". Bloomberg Businessweek. Bloomberg, L.P.).
- [0178] 아울러, 합성에는 약 25개의 시간-소모성 화학 단계가 수반되는 것으로 보이며, 그래서 제약 업체에서 원자재에서 완제품까지 진행하는데 처음 시작부터 끝까지 제조 공정 9-12개월이 소요된다.
- [0179] 이와는 대조적으로, 비-변형된 DNA 분자로서 이용 및 투여할 수 있는 본 발명의 앵타머는 수주 안에 세계적인 수요를 충족시키는 kg에 이르는 대량으로 램데시비르와 같은 비교 항바이러스제에 수반되는 비용의 몇분의 일로 생산할 수 있다.
- [0180] 3.BC 007과 인간 트롬빈 간의 상호작용 및 그에 따른 응고 저해
- [0181] 인간 트롬빈 (250 nM)은 0.1 M 카보네이트 완충제를 이용해 Nunc Maxisorp ELISA-플레이트에 밤새 4°C에서 고정 한 후, 포스페이트 완충화된 염수 (PBS) pH 7.4 중의 1% BSA로 실온에서 1시간 동안 차단 처리하였다. 그런 후, 5'-바이오틴화된 앵타머 BC 007을 다양한 농도 (100 nM, 500 nM 및 1000 nM)로 첨가해, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 트롬빈에 결합된 앵타머를 POD-커플링된 뉴트라비딘으로 검출하였으며, POD의 양은 과산화수소/테트라메틸벤지딘 (TMB) 반응을 통해 확인하고, 플레이트 리더에서 파장 450 nm = 측정 파장 (650 nm 기준 파장)에서 판독하였다. 각 단계 사이에 일반적인 ELISA-세척 완충제로 세척하고; 트롬빈-비처리 플라스틱 플레이트를 대조군으로 사용하였다. 트롬빈 결합 분석의 결과를 도 4에 나타낸다.
- [0182] 응고 저해를 확인하기 위해, 부분 트롬보플라스틴 시간 (PTT)을 다음과 같이 측정하였다. 1 mM 앵타머 용액 (서열번호 1의 BC 007 또는 서열번호 7의 앵타머 AS1411, 기준 앵타머) 50 μ l를 HemosIL 인간 보정 혈장 ((Instrumentation Laboratory, Werfen) 1 mL에 희석하였다. 그런 다음, 이 용액을 HemosIL 보정 혈장에 0.083, 0.028, 0.009, 0.003, 0.001 mg/ml 농도로 1:2로 추가로 연속 희석하였다.
- [0183] 이들 샘플을 제조사의 프로토콜에 따라 인지질 및 완충제와 인큐베이션하였다. 칼슘을 첨가한 후, ACL TOP 응고 시스템 (Werfen)으로 응고 시간을 측정하였다. 그 결과는 도 5A에 나타낸다.
- [0184] 앵타머 BC 007 및 서열번호 7의 기준 앵타머 AS1411의 Quick 값은 당해 기술 분야에서 통상적으로 공지된 바와 같이 결정하였다. 그 결과는 도 5B (Quick 값)에 나타낸다.
- [0185] 4.SARS-CoV-2의 RNA-의존적인 RNA 중합효소의 서열 모티프 2종과 BC 007 간의 상호작용 분석
- [0186] 중중 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2 (NCBI 참조 서열: **YP_009725307.1**)의 RNA-의존적인 RNA 중합효소로부터 취한 서열 단편 2종: HRFYRLAN (His⁶⁵⁰-Arg⁶⁵¹-Phe⁶⁵²-Tyr⁶⁵³-Arg⁶⁵⁴-Leu⁶⁵⁵-Ala⁶⁵⁶-Asn⁶⁵⁷) 및 LYRNRDV (Leu⁷³¹-Tyr⁷³²-Arg⁷³³-Asn⁷³⁴-Arg⁷³⁵-Asp⁷³⁶-Val⁷³⁷)을 BC 007 결합 및 상호작용에 대해 NMR-분광측정으로 분석하였다. 이들 서열 단편 (펩타이드) 2종은 BC 007이 성공적으로 특이적으로 결합하였음을 의미하는 판독 결과인 잘 공지된 사중선 구조를 생성할 수 있었다 (도 6).
- [0187] 도 6의 상단 부분에서 LYRNRDV와 조합한 BC 007의 상단 NMR 스펙트럼은, 펩타이드와의 상호작용에 의해 유도되며 11.5-12.5 ppm에서 이미노 신호에 의해 명확하게 인지되는, BC 007의 사중선 구조 생성을 보여준다. 하단 스펙트럼은 BC 007과 HRFYRLAN 간의 결합을 보여준다.
- [0188] 물질은 어떠한 첨가제 없이 순수한 H₂O/D₂O 혼합물 0.5 ml에 용해하였다. BC 007과 SARS-CoV-2 단백질의 이러한 서열-단편 간의 상호작용을 조사하는 NMR 데이터를, Bruker AV600 분광기 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany)에서 90/10 H₂O/D₂O 중에 298K 하에 600 MHz에서 획득하였다. 용매 신호는 Bruker 펄스 프로그램 zgpgw5에 포함된 Watergate w5 펄스 서열을 이용해 억제하였다. 획득 매개변수는 다음을 포함한다: 시간 도메인 = 65K, 스캔 횟수 = 512, 스윙 폭 = 24 ppm, 및 90° 고 파워 펄스 = 13.8 μ s.
- [0189] HRFYRLAN과 BC 007 간의 결합에 대한 추가적인 분석을 등은 적정 열량 측정법 (ITC)에 의해 수행하였다. ITC 분석 결과는 도 7에 나타내며, 온도기록도는 상단에, 결합 등온도는 하단에 도시한다.
- [0190] ITC 실험은 MicroCal PEAQ-ITC 마이크로열량계 (Malvern Panalytical GmbH, Germany)에서 수행하였다. 상호작용 파트너 둘다 50 mM 소듐 포스페이트, 150 mM NaCl 완충제, pH 7.06에 용해하였다. 실험은 25°C에서 수행하였

다. 일반적인 실험으로, 펩타이드 (3.6 또는 4 mM)를 열량측정 셀에서 앵타머 용액 (200 μ M)에 2 μ l-간격으로 적정하였다. 주입 간의 시간 간격은 열 신호가 기준선으로 회복되는데 충분한 200초로 맞추었다. 반응 혼합물은 750 rpm으로 계속 교반하였다.

[0191] (개별 대조군 실험에서 결정된) 완충제에 펩타이드 첨가와 관련한 희석 열은 측정된 결합 열에 대해 미미한 작은 상수 값이었다. 기준선 적정, 피크 적분 및 주입한 리간드의 몰 양에 대한 반응 열의 정규화뿐 아니라 데이터 피팅 및 결합 매개변수 등식에 대해 장치 소프트웨어 (MicroCal PEAQ-ITC Analysis)를 이용하였다.

[0192] 이러한 ITC 분석에서, 결합 파트너 2중 BC 007과 HRFYRLAN 간의 1:1의 화학량론적 결합이 확인되었으며, 이는 진정한 특이적인 결합을 강하게 뒷받침해준다.

[0193] ITC 분석에 대한 대조군 실험을, SARS-CoV-2의 스파이크 RBD로부터 유래된 고도로 하전된 펩타이드, 즉 NRKRISN (서열번호 11; 이론적인 pI 값 = 12.01) 서열을 가진 펩타이드를 사용해 수행하였다. 그 결과는 도 8에 나타난다. 이 대조군을 이용해, 결합 펩타이드, RNA-의존적인 RNA 중합효소 HRFYRLAN (이론적인 pI 값 = 10.84) 및 LYRNRDV (이론적인 pI 값 = 8.75)와 BC 007 간의 유일한 비-특이적인 정전기적 상호작용을 확실히 배제할 수 있었다.

[0194] 실험을 MicroCal PEAQ-ITC 마이크로열량계 (Malvern Panalytical GmbH, Germany)에서 다시 수행하였다. 상호작용 파트너 둘다 50 mM 소듐 포스페이트, 150 mM NaCl 완충제, pH 7.06에 용해하였다. 실험은 25°C에서 수행하였다. 일반적인 실험으로, 펩타이드 (3.6 또는 4 mM)를 열량측정 셀에서 앵타머 용액 (200 μ M)에 2 μ l-간격으로 적정하였다. 주입 간의 시간 간격은 열 신호가 기준선으로 회복되는데 충분한 200초로 맞추었다. 반응 혼합물은 750 rpm으로 계속 교반하였다. (개별 대조군 실험에서 결정된) 완충제에 펩타이드 첨가와 관련한 희석 열은 측정된 결합 열에 대해 미미한 작은 상수 값이었다. 기준선 적정, 피크 적분 및 주입한 리간드의 몰 양에 대한 반응 열의 정규화뿐 아니라 데이터 피팅 및 결합 매개변수 등식에 대해 장치 소프트웨어 (MicroCal PEAQ-ITC Analysis)를 이용하였다.

[0195] 마지막으로, NMR 분광측정을 또한 수행하여, 대조군 펩타이드, NRKRISN에 대한 BC 007의 잠재적인 결합성을 분석하였다. 그 결과는 도 9에 나타난다. NRKRISN과 조합한 BC 007의 NMR 스펙트럼은 11.5-12.5 ppm에서 누락된 이미노 신호에서 인지가 가능한, BC 007의 사중선 구조의 생성이 거의 완전히 존재하지 않는다는 것을 보여준다. 비교: 상단 스펙트럼: 펩타이드 서열 YRLFRK (SARS-CoV-2의 스파이크 단백질 유래 서열, 이론적인 pI 값 = 11.0)에 대한 BC 007 결합.

[0196] 물질을 어떠한 첨가제 없이 순수한 H₂O/D₂O 혼합물 0.5 ml에 용해하였다. BC 007과 SARS-CoV-2 단백질의 이러한 서열-단편 간의 상호작용을 조사하는 NMR 데이터를, Bruker AV600 분광기 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany)에서 90/10 H₂O/D₂O 중에 298K 하에 600 MHz에서 획득하였다. 용매 신호는 Bruker 펄스 프로그램 zgpgw5에 포함된 Watergate w5 펄스 서열을 이용해 억제하였다. 획득 매개변수는 다음을 포함한다: 시간 도메인 = 65K, 스캔 횟수 = 512, 스위프 폭 = 24 ppm, 및 90° 고 파워 펄스 = 13.8 μ s.

[0197] 5. 활성 SARS-CoV-2 감염으로부터 회복한 환자의 혈청에서 GPCR 자가항체의 동정 및 특징화

[0198] PCR에 의해 검증된 바와 같이 급성 질환으로 회복한 후 환자 25명으로부터 혈청을 입수하였다. 환자 23명은 post-COVID-19 증상을 앓고 있었으며, 2명은 증상이 없었다.

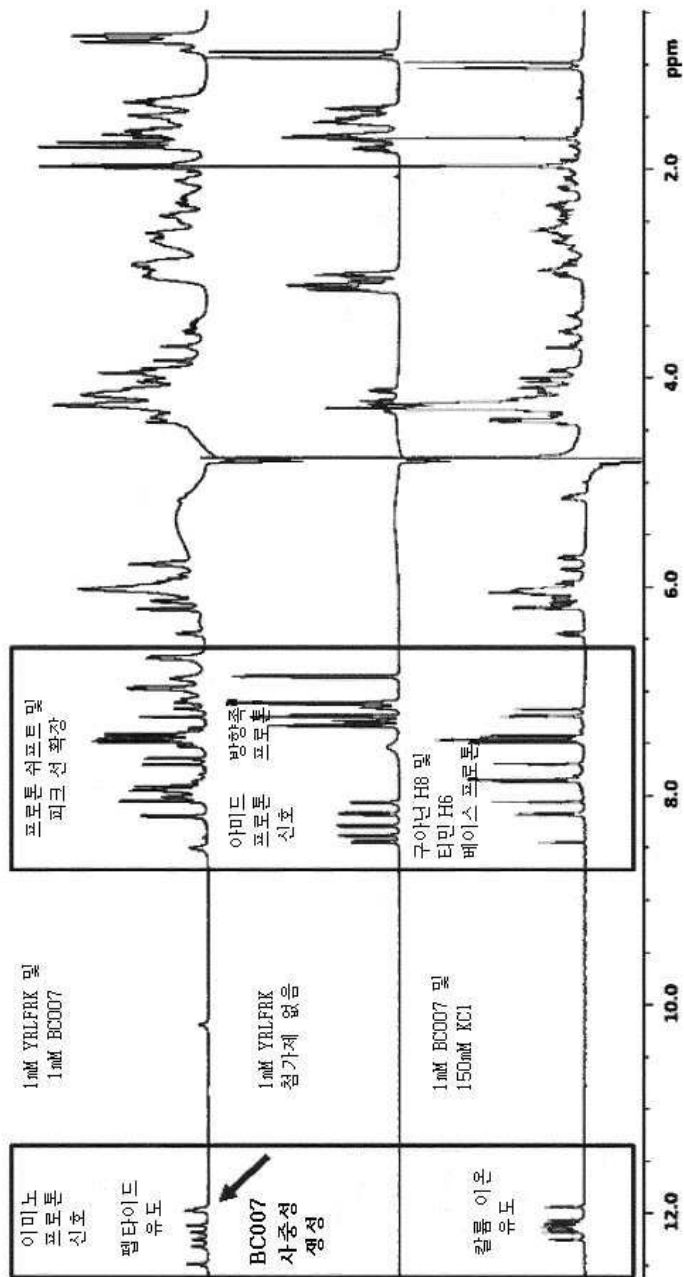
[0199] 안전상의 이유로, COVID-19 환자의 혈청은 사용전 56°C에서 30분간 열 불활화하였다. 그 후, 샘플 0.4 mL을 투석 완충제 (0.15 M NaCl, 10 mM 포스페이트 완충제, pH 7.4; Membra-Cel MD 44, 14 kDa, Serva) 1 L에 대해 24 시간 동안 투석하여, 저-분자량의 생활성 화합물 및 펩타이드를 제거하였다. 마지막으로, 투석 샘플 40 μ l를 생물분석에 첨가하였다 (최종 희석 1:50).

[0200] GPCR-fAAB를 동정 및 특정화하기 위해, β 1-아드레노셉터에 대한 GPCR-fAAB에 대해 Davideit et al. (Davideit H et al (2019) Determination of Agonistically Acting Autoantibodies to the Adrenergic Beta-1 Receptor by Cellular Bioassay. Methods Mol Biol 1901:95-102. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8949-2_8) 및 Wenzel et al. (Wenzel K, Schulze-Rothe S, Haberland A, et al (2017) Performance and in-house validation of a bioassay for the determination of β 1-autoantibodies found in patients with cardiomyopathy. Heliyon 3:e00362. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00362>)에 매우 상세히 기술된 바와 같이, 그리고 수종의 GPCR-fAAB들을 동시 측정하기 위해 기타 GPCR-fAAB에 대해 마찬가지로 (Wallukat et al. (2018) PLoS ONE 13:e0192778), 생물분석을 이용하였다.

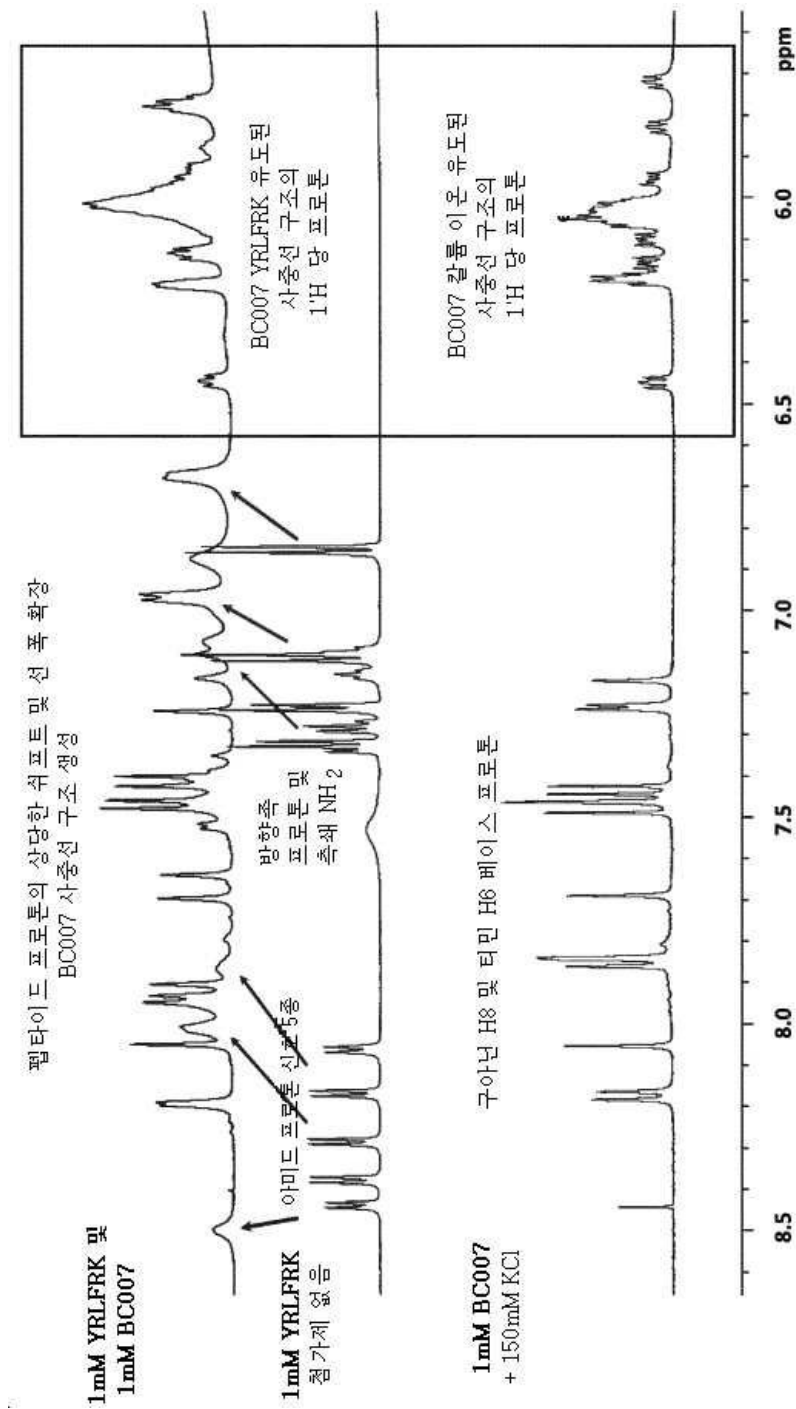
- [0201] 각각의 자가항체와 접촉시킨 후, GPCR을 발현하는 자율 박동하는 심근세포의 기본 박동율의 변화를 측정 신호로 이용하였다. 수용체 특이성을, 이러한 작용을 무효화하는 후속적인 특이 수용체 차단제 첨가에 의해 또는 대응되는 수용체-에피토프-경쟁적인 세포의 루프 펩타이드의 첨가에 의해 확인하였다. 상세하게는, $\beta 2$ -fAAB에 대해서는, 수용체 길항제 ICI118.551 (0.1 μ M)을 사용하였으며, 인간 $\beta 2$ -아드레노CEPT의 제1 또는 제2 세포의 루프에 대응하는 중화 펩타이드를 사용하였다.
- [0202] 음성 크로노트로픽 무스카린성 M_2 수용체-자가항체 (M_2 -fAAB)의 작용은 아트로핀 (1 μ M)으로 차단하였다. 로사르탄 (1 μ M)은 양성 크로노트로픽 AT1-fAAB의 작용을 차단하였으며, A779 (1 μ M)는 음성 크로노트로픽 MAS-fAAB의 작용을 차단하였다. MAS-fAAB를 동정하기 위해, 인간 MAS 수용체의 제1 및 제2 세포의 루프에 해당하는 부가적인 경쟁 펩타이드를 사용하였다.
- [0203] ETA-fAAB는 이의 음성 크로노트로픽 작용은 특이적인 엔도텔린 수용체 길항제 BQ123 (0.1 μ M) 및 또한 수용체의 제1 또는 제2 세포의 루프에 각각 해당하는 경쟁 펩타이드의 첨가를 통해 차단함으로써, 동정하였다.
- [0204] 노시셉틴 수용체 길항제 J113397 (0.1 μ M)을 이용해 양성 크로노트로픽 NOC-fAAB의 작용 및 또한 제1 또는 제2 세포의 루프에 해당하는 경쟁 펩타이드의 작용을 차단하였다. 1 μ M 우라피딜 또는 프라조신 첨가시 $\alpha 1$ -fAAB의 양성 크로노트로픽 작용이 무효화되었다. 모든 펩타이드는 100 μ g/mL 원액 2 μ l를 상응하는 GPCR-fAAB 샘플 40 μ l에 첨가하여, 30분간 인큐베이션한 다음 혼합물을 셀로 옮겼다.
- [0205] 수종의 GPCR-fAAB들이 COVID-19 회복 환자들의 혈청 25개에서 동정되었다. 조사한 환자 25명 모두 2-7종의 GPCR-fAAB를 함유하고 있었다 (도 10).
- [0206] 거의 모든 조사 환자들에서 확인된 기능적으로 활성인 자가항체 2종은 $\beta 2$ -아드레노CEPT ($\beta 2$ -fAAB) 및 무스카린성 M_2 수용체 (M_2 -fAAB)에 대한 것이었다. 이들 fAAB는 이의 표적 수용체에 대해 각각 양성 및 음성 크로노트로픽 반응을 유도하였다.
- [0207] 조사한 post-COVID-19 환자 25명 중 23명 (92%)에 또한 존재하는 다른 fAAB 2종은 안지오텐신 II AT1 수용체 (fAT1-AAB) 및 안지오텐신 1-7 MAS 수용체 (MAS-AAB)에 대한 것이었다. 이들 수용체는 레닌 안지오텐신 시스템 (RAS)에 속하며, 각각의 fAAB에 의해 표적시 각각 양성 및 음성 크로노트로픽 작용을 유발한다.
- [0208] 회복 환자 8명은 감염 후 탈모 (탈모증)를 경험하였다. 이들 환자의 혈청에서 추가적인 GPCR-fAAB 3종이 발견되었다: 음성 크로노트로픽 ETA-fAAB (4/8), 양성 크로노트로픽 NOC-fAAB (5/8), 및 양성 크로노트로픽 $\alpha 1$ -AAB (3/8). 탈모 환자 전부 이들 GPCR-fAAB 3종을 모두 나타낸 것은 아니었다. 대신, 출현은 다양하였으며, 패턴은 검출할 수 없었다. 도 10에 나타낸 바와 같이, 조사한 post COVID-19 환자 25명 중 2명은 어떠한 증상없이 fAAB를 생성하였다.
- [0209] 본 실험의 환자들에서 빈번하게 보고된 증상은 바이러스 추적 검사에서 음성으로 판정된 이후에서 장기간 지속되는 피로-유사 증상이었다 (17/25). 고전적인 코로나바이러스-비의존형 피로 증후군을 가진 환자들에서 $\beta 2$ -fAAB, M_2 -fAAB, 그리고 일부 사례에서는 또한 ETA-fAAB의 발생이 기존에 이미 보고된 바 있다.
- [0210] 본원에서, 거의 모든 조사 혈청에는 $\beta 2$ -fAAB 및 M_2 -fAAB가 함유되어 있었다. $\beta 2$ -fAAB와 M_2 -fAAB의 조합 역시 PoTS 및 자율신경실조증을 앓고 있는 환자의 혈청에서 동정되었는데, 이 2가지 증상은 post-COVID-19 환자들에서 현재 관찰되는 증상이다 (각각 3/25 및 2/25, 중복되지 않음).
- [0211] 아울러, $\beta 2$ -fAAB와 M_2 -fAAB의 조합도 본 발명자들에 의해 이전에 복합 부위 통증 증후군 (CRPS) 환자, 1형 기면증 환자에서 동정되었으며, 본원에서 추가적으로 NOC-fAAB가 소섬유 질환 (small fibre diseases) 환자에서 9/10건에서 동정되었다.
- [0212] 조사한 COVID-19 환자 혈청의 90% 이상 (23/25)에서 관찰된, 동정된 2종의 GPCR-fAAB들은 RAS의 수용체, 즉 안지오텐신 II AT1 수용체와 안지오텐신 (1-7) MAS 수용체에 대한 것이다. 이들 혈관작용성 AT1-fAAB는 악성 고혈압, 요법-내성 고혈압, 전자간증 및 신장 질환을 가진 환자들에서 이전에 동정된 바 있다.

도면

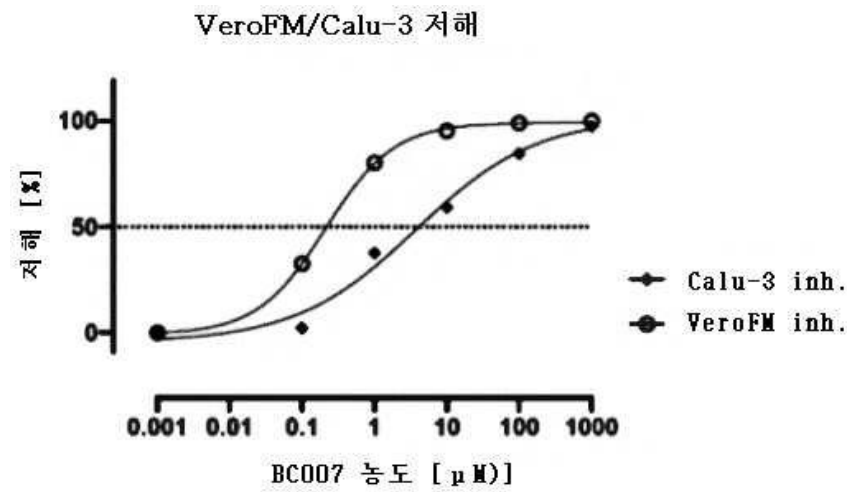
도면1



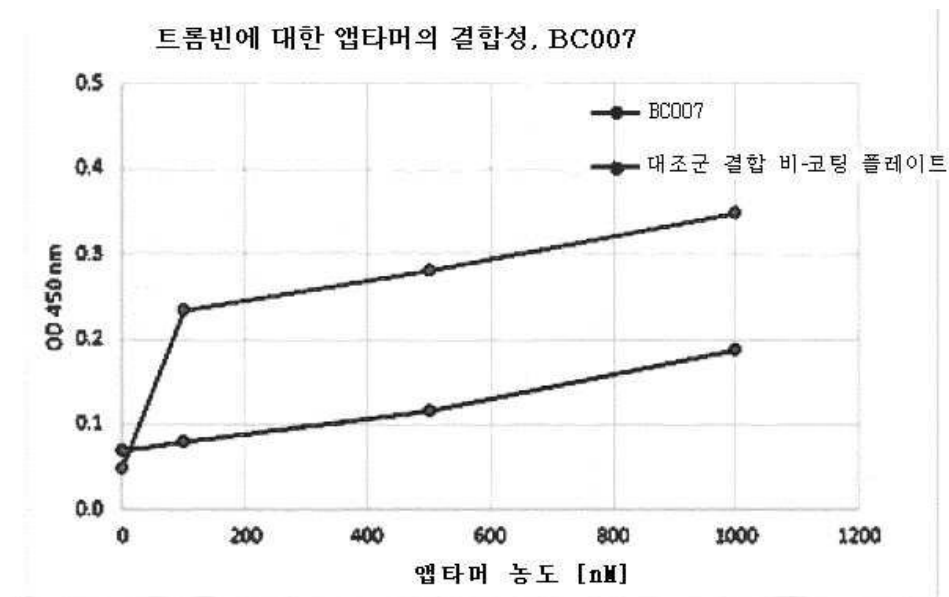
도면2



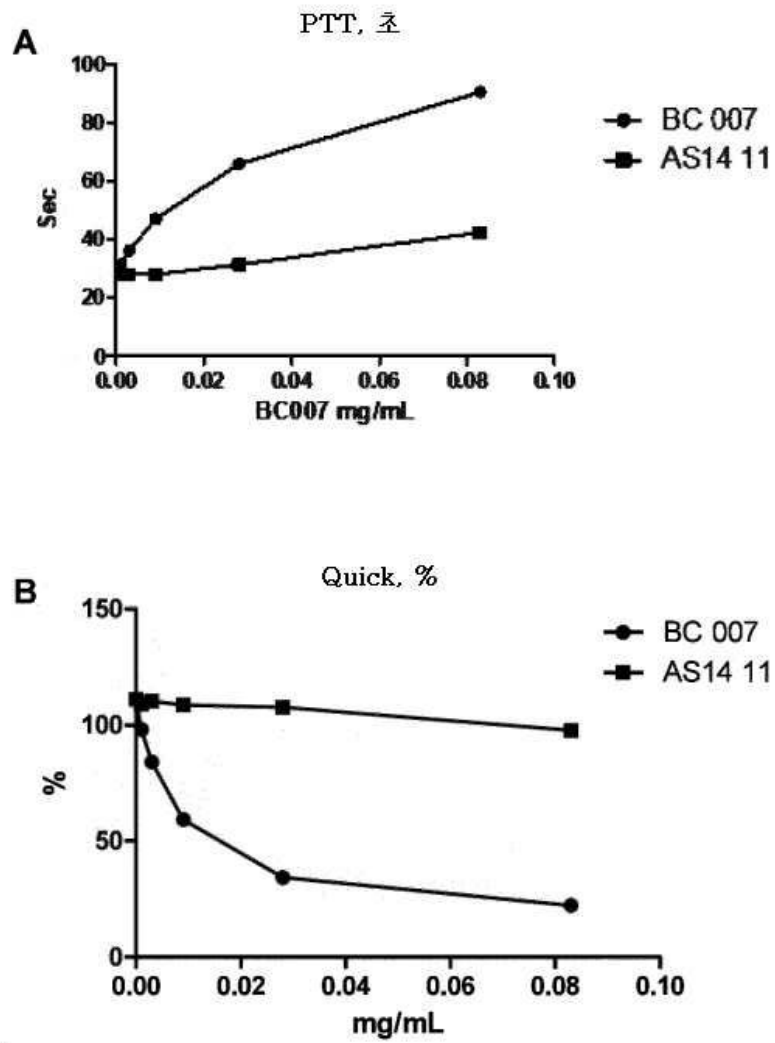
도면3



도면4



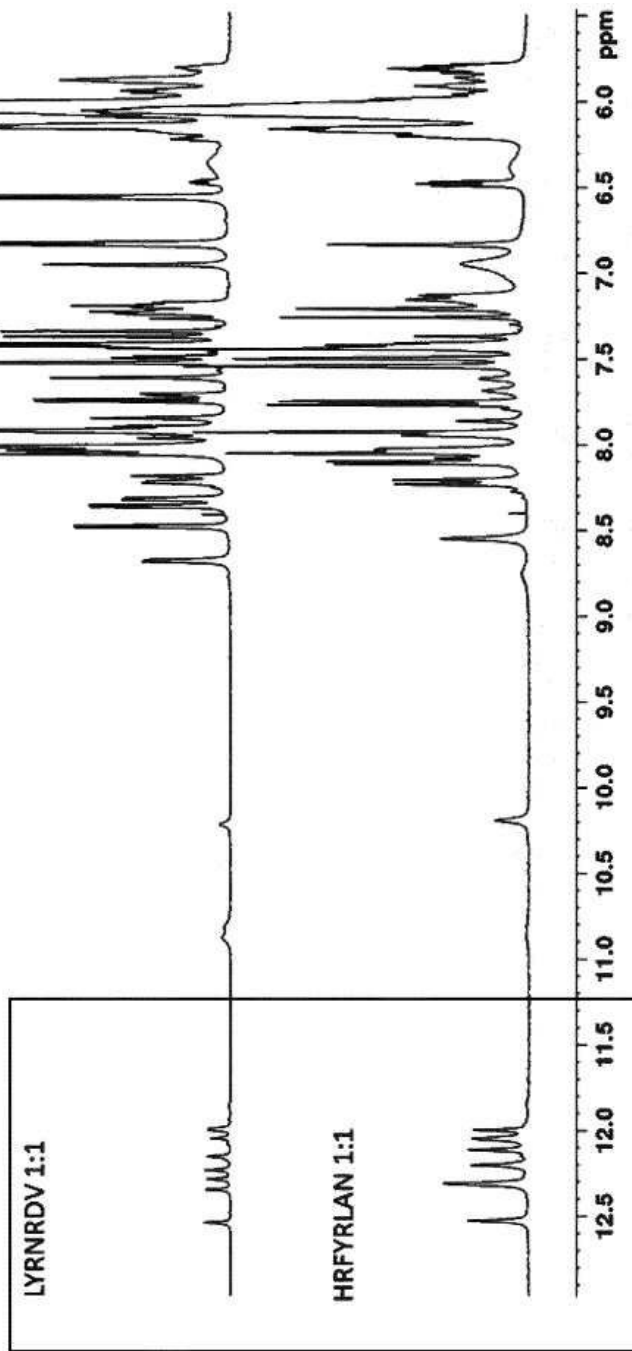
도면5



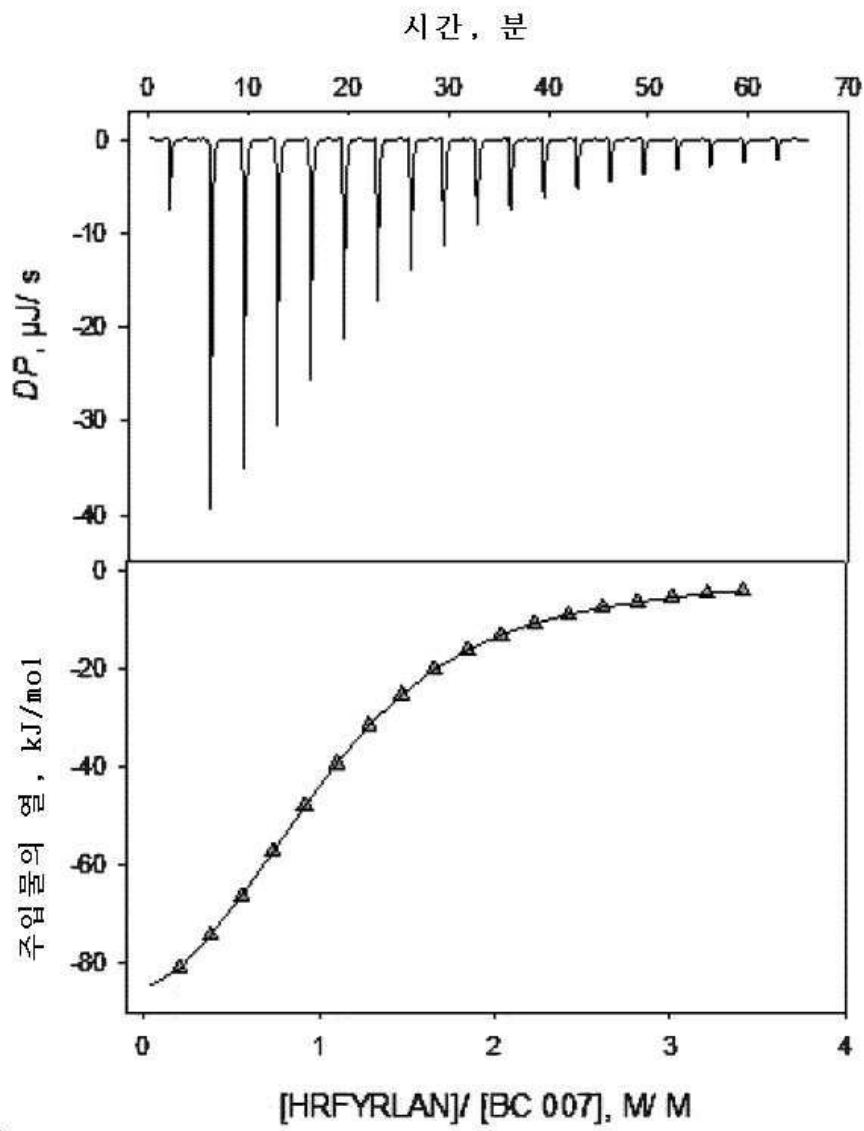
도면6

600MHz-¹H-NMR Spektren von BC007, H₂O/D₂O 90/10 298K mit

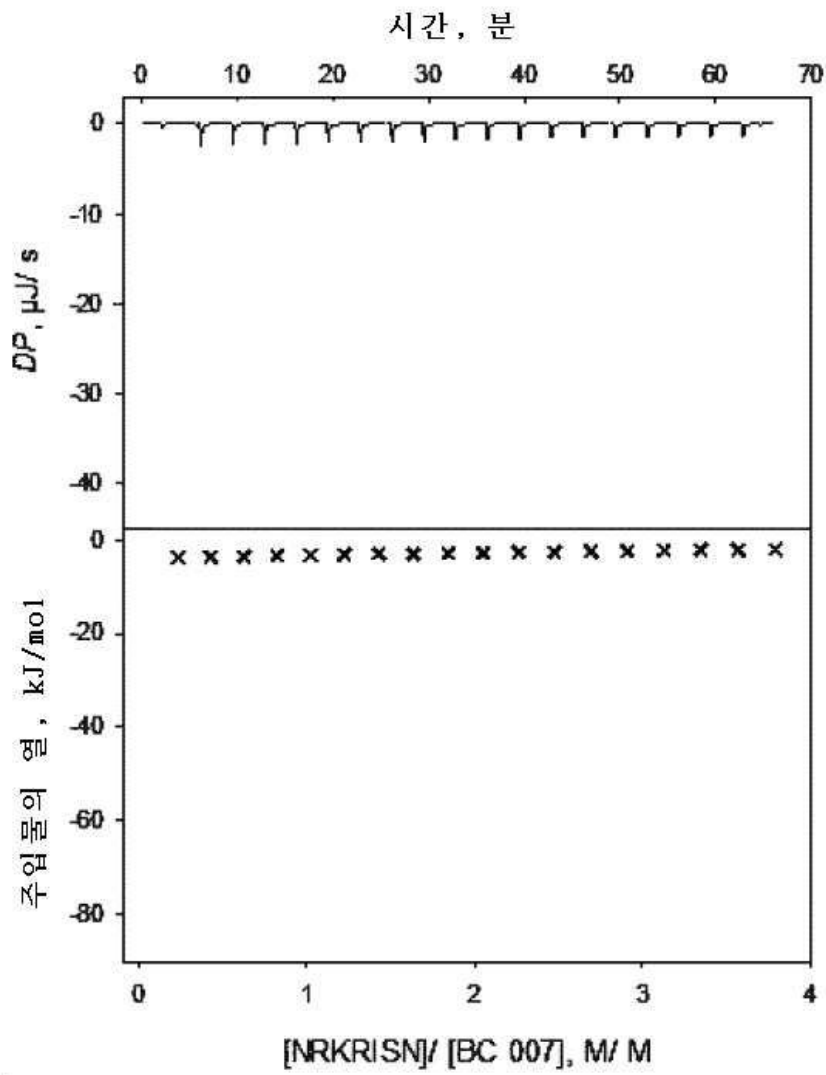
이미노 프로톤 신호 영역-
BC007 사중선 생성



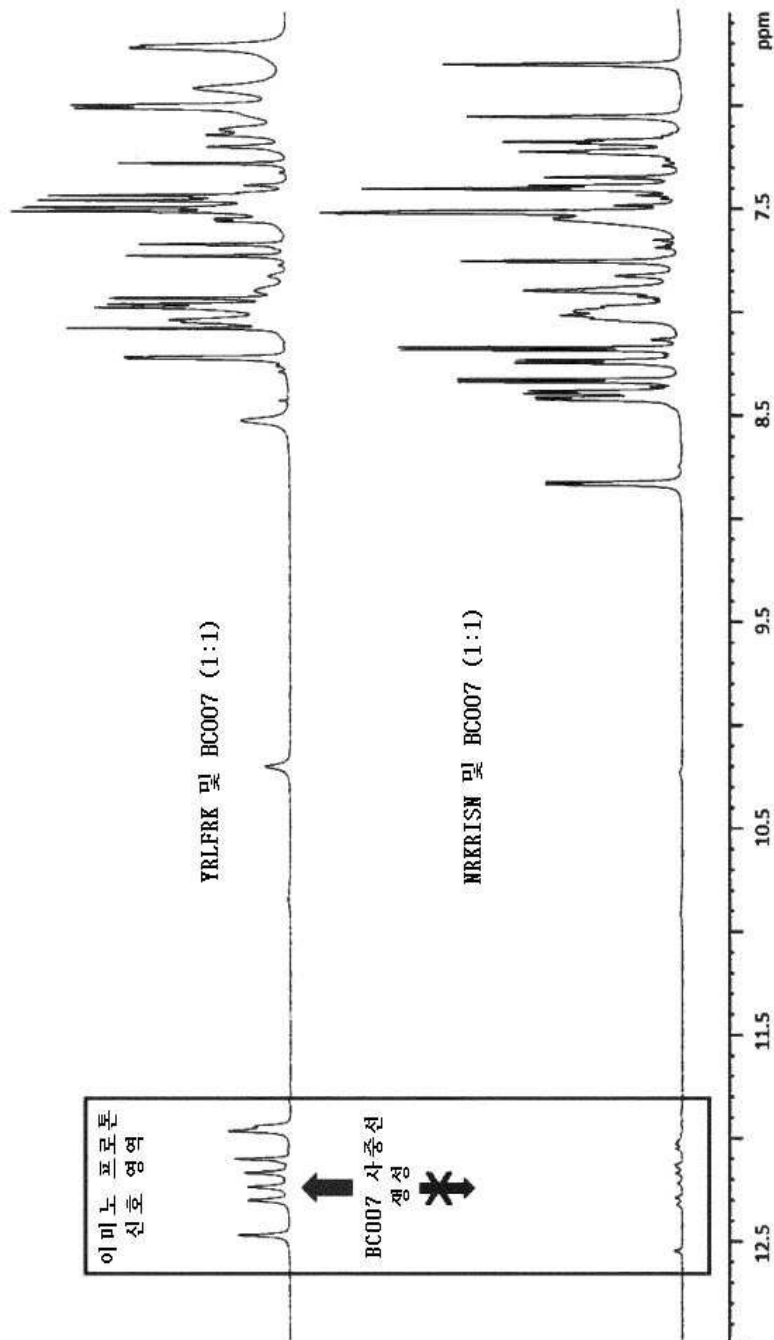
도면7



도면8



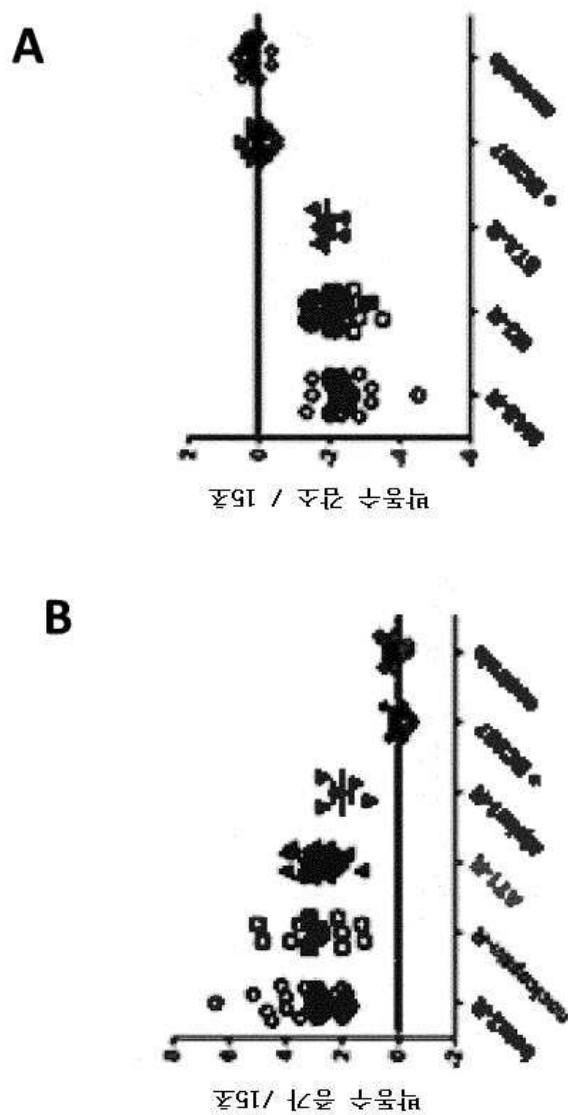
도면9



도면 10

환자 번호	성별	나이 (세)	Run ing mg	증상 유형	증상	신경- 활성 fAABs		혈관작용성 fAABs		신경-및 혈관작용성 fAABs		RAS-특이적인 fAABs	
						Neuro*	Cardiovasc**	Neuro*	Cardiovasc**	β2- fAABs	α1- fAABs		ETA- fAABs
1	f	48	1	X	피로, 탈모, 명칭 실어증	X		X		X	X	X	X
7	f	55	2	X	피로, 탈모	X		X		X	X	X	X
11	f	39	3	X	피로, 탈모	X		X		X	X	X	X
19	f	34	4	X	피로, PotS, 긴장증	X		X		X	X	X	X
22	f	34	5	X	피로, 탈모	X		X		X	X	X	X
3	f	56	6	X	피로, 주의력 결핍	X		X		X	X	X	X
21	f	28	7	X	주의력 결핍, 긴장증, 자율신경실조증	X		X		X	X	X	X
18	f	53	8	X	긴장증, 주의력 결핍	X		X		X	X	X	X
20	m	54	9	X	주의력 결핍	X		X		X	X	X	X
14	f	57	10	X	피로, 명칭 실어증	X		X		X	X	X	X
23	f	50	11	X	습진, 탈모	X		X		X	X	X	X
24	f	33	12	X	피로, PotS	X		X	X		X	X	X
2	m	42	13	X	피로, 탈모	X		X	X		X	X	X
4	m	50	14	X	피로	X		X	X		X	X	X
5	f	45	15	X	피로	X		X	X		X	X	X
6	f	36	16	X	긴장증, 탈모, 자율신경실조증	X		X		X	X	X	X
9	f	50	17	X	피로	X		X		X	X	X	X
10	f	48	18	X	피로	X		X		X	X	X	X
12	f	33	19	X	피로, 주의력 결핍	X		X		X	X	X	X
15	f	46	20	X	피로, 탈모, 다발성신경염	X		X		X	X	X	X
17	f	49	21	X	피로, PotS, 긴장증	X		X		X	X	X	X
25	f	58	22	X	주의력 결핍, 신경병증	X		X		X	X	X	X
13	f	76	23	X	피로	X		X		X	X	X	X
8	m	71	24	X	증상 없음	X		X	X		X	X	X
16	m	54	25	X	증상 없음	X		X		X	X	X	X

도면11



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Berlin Cures GmbH

<120> APTAMERS FOR USE IN THE TREATMENT OF CORONAVIRIDAE INFECTIONS

<130> B73438PC

<150> EP20204036.6

<151> 2020-10-27

<150> EP20180781.5

<151> 2020-06-18

<150> EP20176023.8

<151> 2020-05-22

<150> EP20168929.6

<151> 2020-04-09

<160> 11

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer BC007

<400> 1

ggttggtgtg gttgg

15

<210> 2

<211>

> 223

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2

<220>

<223> Receptor-binding domain (RBD) of S1 Subunit of Spike protein of
SARS-CoV-2

<400> 2

Arg Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn

1 5 10 15

Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val

20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser

35 40 45

Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val

50 55 60

Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp

65 70 75 80

Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln

85 90 95

Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr

100 105 110
 Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly
 115 120 125
 Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys
 130 135 140
 Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr
 145 150 155 160
 Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser

165 170 175
 Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val
 180 185 190
 Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly
 195 200 205
 Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe
 210 215 220

<210> 3

<211> 222

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus

<220>

<223> Receptor-binding domain of S1 subunit of Spike protein of
 SARS-CoV

<400> 3

Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn
 1 5 10 15
 Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser Val
 20 25 30
 Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser
 35 40 45
 Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val

50 55 60
 Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala Asp

65 70 75 80
 Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln
 85 90 95
 Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Met
 100 105 110
 Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser Thr

 115 120 125
 Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu Arg
 130 135 140
 Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Gly Lys
 145 150 155 160
 Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp Tyr
 165 170 175
 Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val Val

 180 185 190
 Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro
 195 200 205
 Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe
 210 215 220
 <210> 4
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Middle East respiratory syndrome-related coronavirus
 <220>
 <223> Receptor-binding domain of S1 subunit of Spike protein of
 MERS-CoV
 <400> 4

 Glu Ala Lys Pro Ser Gly Ser Val Val Glu Gln Ala Glu Gly Val Glu
 1 5 10 15
 Cys Asp Phe Ser Pro Leu Leu Ser Gly Thr Pro Pro Gln Val Tyr Asn
 20 25 30
 Phe Lys Arg Leu Val Phe Thr Asn Cys Asn Tyr Asn Leu Thr Lys Leu

35 40 45
 Leu Ser Leu Phe Ser Val Asn Asp Phe Thr Cys Ser Gln Ile Ser Pro
 50 55 60

 Ala Ala Ile Ala Ser Asn Cys Tyr Ser Ser Leu Ile Leu Asp Tyr Phe
 65 70 75 80
 Ser Tyr Pro Leu Ser Met Lys Ser Asp Leu Ser Val Ser Ser Ala Gly
 85 90 95
 Pro Ile Ser Gln Phe Asn Tyr Lys Gln Ser Phe Ser Asn Pro Thr Cys
 100 105 110
 Leu Ile Leu Ala Thr Val Pro His Asn Leu Thr Thr Ile Thr Lys Pro
 115 120 125

 Leu Lys Tyr Ser Tyr Ile Asn Lys Cys Ser Arg Leu Leu Ser Asp Asp
 130 135 140
 Arg Thr Glu Val Pro Gln Leu Val Asn Ala Asn Gln Tyr Ser Pro Cys
 145 150 155 160
 Val Ser Ile Val Pro Ser Thr Val Trp Glu Asp Gly Asp Tyr Tyr Arg
 165 170 175
 Lys Gln Leu Ser Pro Leu Glu Gly Gly Gly Trp Leu Val Ala Ser Gly
 180 185 190

 Ser Thr Val Ala Met Thr Glu Gln Leu Gln Met Gly Phe Gly Ile Thr
 195 200 205
 Val Gln Tyr Gly Thr Asp Thr Asn Ser Val Cys Pro Lys Leu Glu Phe
 210 215 220
 Ala Asn Asp Thr Lys Ile Ala Ser Gln Leu Gly Asn Cys Val Glu Tyr
 225 230 235 240
 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2
 <220>
 <223> Amino acids 135-140 of SEQ ID NO: 1

<400> 5

Tyr Arg Leu Phe Arg Lys

1 5

<210> 6

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-Influenza Aptamer A22

<400> 6

aattaaccct cactaaaggg ctgagttctca aaaccgcaat acactgggtg tatggtcgaa 60

taagttaa 68

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aptamer AS 1411

<400> 7

ggtgggtggtg gttgtggtgg tgggtg 26

<210> 8

<211> 932

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2

<220>

<223> RNA dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 virus

<400> 8

Ser Ala Asp Ala Gln Ser Phe Leu Asn Arg Val Cys Gly Val Ser Ala

1 5 10 15

Ala Arg Leu Thr Pro Cys Gly Thr Gly Thr Ser Thr Asp Val Val Tyr

20 25 30

Arg Ala Phe Asp Ile Tyr Asn Asp Lys Val Ala Gly Phe Ala Lys Phe

35 40 45

Leu Lys Thr Asn Cys Cys Arg Phe Gln Glu Lys Asp Glu Asp Asp Asn
 50 55 60
 Leu Ile Asp Ser Tyr Phe Val Val Lys Arg His Thr Phe Ser Asn Tyr
 65 70 75 80
 Gln His Glu Glu Thr Ile Tyr Asn Leu Leu Lys Asp Cys Pro Ala Val
 85 90 95
 Ala Lys His Asp Phe Phe Lys Phe Arg Ile Asp Gly Asp Met Val Pro
 100 105 110

 His Ile Ser Arg Gln Arg Leu Thr Lys Tyr Thr Met Ala Asp Leu Val
 115 120 125
 Tyr Ala Leu Arg His Phe Asp Glu Gly Asn Cys Asp Thr Leu Lys Glu
 130 135 140
 Ile Leu Val Thr Tyr Asn Cys Cys Asp Asp Asp Tyr Phe Asn Lys Lys
 145 150 155 160
 Asp Trp Tyr Asp Phe Val Glu Asn Pro Asp Ile Leu Arg Val Tyr Ala
 165 170 175

 Asn Leu Gly Glu Arg Val Arg Gln Ala Leu Leu Lys Thr Val Gln Phe
 180 185 190
 Cys Asp Ala Met Arg Asn Ala Gly Ile Val Gly Val Leu Thr Leu Asp
 195 200 205
 Asn Gln Asp Leu Asn Gly Asn Trp Tyr Asp Phe Gly Asp Phe Ile Gln
 210 215 220
 Thr Thr Pro Gly Ser Gly Val Pro Val Val Asp Ser Tyr Tyr Ser Leu
 225 230 235 240

 Leu Met Pro Ile Leu Thr Leu Thr Arg Ala Leu Thr Ala Glu Ser His
 245 250 255
 Val Asp Thr Asp Leu Thr Lys Pro Tyr Ile Lys Trp Asp Leu Leu Lys
 260 265 270
 Tyr Asp Phe Thr Glu Glu Arg Leu Lys Leu Phe Asp Arg Tyr Phe Lys
 275 280 285
 Tyr Trp Asp Gln Thr Tyr His Pro Asn Cys Val Asn Cys Leu Asp Asp

290 295 300
 Arg Cys Ile Leu His Cys Ala Asn Phe Asn Val Leu Phe Ser Thr Val
 305 310 315 320
 Phe Pro Pro Thr Ser Phe Gly Pro Leu Val Arg Lys Ile Phe Val Asp
 325 330 335
 Gly Val Pro Phe Val Val Ser Thr Gly Tyr His Phe Arg Glu Leu Gly
 340 345 350
 Val Val His Asn Gln Asp Val Asn Leu His Ser Ser Arg Leu Ser Phe
 355 360 365

 Lys Glu Leu Leu Val Tyr Ala Ala Asp Pro Ala Met His Ala Ala Ser
 370 375 380
 Gly Asn Leu Leu Leu Asp Lys Arg Thr Thr Cys Phe Ser Val Ala Ala
 385 390 395 400
 Leu Thr Asn Asn Val Ala Phe Gln Thr Val Lys Pro Gly Asn Phe Asn
 405 410 415
 Lys Asp Phe Tyr Asp Phe Ala Val Ser Lys Gly Phe Phe Lys Glu Gly
 420 425 430

 Ser Ser Val Glu Leu Lys His Phe Phe Phe Ala Gln Asp Gly Asn Ala
 435 440 445
 Ala Ile Ser Asp Tyr Asp Tyr Tyr Arg Tyr Asn Leu Pro Thr Met Cys
 450 455 460
 Asp Ile Arg Gln Leu Leu Phe Val Val Glu Val Val Asp Lys Tyr Phe
 465 470 475 480
 Asp Cys Tyr Asp Gly Gly Cys Ile Asn Ala Asn Gln Val Ile Val Asn
 485 490 495

 Asn Leu Asp Lys Ser Ala Gly Phe Pro Phe Asn Lys Trp Gly Lys Ala
 500 505 510
 Arg Leu Tyr Tyr Asp Ser Met Ser Tyr Glu Asp Gln Asp Ala Leu Phe
 515 520 525
 Ala Tyr Thr Lys Arg Asn Val Ile Pro Thr Ile Thr Gln Met Asn Leu
 530 535 540

Lys Tyr Ala Ile Ser Ala Lys Asn Arg Ala Arg Thr Val Ala Gly Val
545 550 555 560

Ser Ile Cys Ser Thr Met Thr Asn Arg Gln Phe His Gln Lys Leu Leu
565 570 575

Lys Ser Ile Ala Ala Thr Arg Gly Ala Thr Val Val Ile Gly Thr Ser
580 585 590

Lys Phe Tyr Gly Gly Trp His Asn Met Leu Lys Thr Val Tyr Ser Asp
595 600 605

Val Glu Asn Pro His Leu Met Gly Trp Asp Tyr Pro Lys Cys Asp Arg
610 615 620

Ala Met Pro Asn Met Leu Arg Ile Met Ala Ser Leu Val Leu Ala Arg
625 630 635 640

Lys His Thr Thr Cys Cys Ser Leu Ser His Arg Phe Tyr Arg Leu Ala
645 650 655

Asn Glu Cys Ala Gln Val Leu Ser Glu Met Val Met Cys Gly Gly Ser
660 665 670

Leu Tyr Val Lys Pro Gly Gly Thr Ser Ser Gly Asp Ala Thr Thr Ala
675 680 685

Tyr Ala Asn Ser Val Phe Asn Ile Cys Gln Ala Val Thr Ala Asn Val
690 695 700

Asn Ala Leu Leu Ser Thr Asp Gly Asn Lys Ile Ala Asp Lys Tyr Val
705 710 715 720

Arg Asn Leu Gln His Arg Leu Tyr Glu Cys Leu Tyr Arg Asn Arg Asp
725 730 735

Val Asp Thr Asp Phe Val Asn Glu Phe Tyr Ala Tyr Leu Arg Lys His
740 745 750

Phe Ser Met Met Ile Leu Ser Asp Asp Ala Val Val Cys Phe Asn Ser
755 760 765

Thr Tyr Ala Ser Gln Gly Leu Val Ala Ser Ile Lys Asn Phe Lys Ser
770 775 780

Val Leu Tyr Tyr Gln Asn Asn Val Phe Met Ser Glu Ala Lys Cys Trp

785 790 795 800
 Thr Glu Thr Asp Leu Thr Lys Gly Pro His Glu Phe Cys Ser Gln His
 805 810 815

 Thr Met Leu Val Lys Gln Gly Asp Asp Tyr Val Tyr Leu Pro Tyr Pro
 820 825 830
 Asp Pro Ser Arg Ile Leu Gly Ala Gly Cys Phe Val Asp Asp Ile Val
 835 840 845
 Lys Thr Asp Gly Thr Leu Met Ile Glu Arg Phe Val Ser Leu Ala Ile
 850 855 860
 Asp Ala Tyr Pro Leu Thr Lys His Pro Asn Gln Glu Tyr Ala Asp Val
 865 870 875 880

Phe His Leu Tyr Leu Gln Tyr Ile Arg Lys Leu His Asp Glu Leu Thr
 885 890 895
 Gly His Met Leu Asp Met Tyr Ser Val Met Leu Thr Asn Asp Asn Thr
 900 905 910
 Ser Arg Tyr Trp Glu Pro Glu Phe Tyr Glu Ala Met Tyr Thr Pro His
 915 920 925
 Thr Val Leu Gln
 930

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2

<220>

<223> Peptide LYRNRDV (aa 731-737 of SEQ ID NO: 8)

<400> 9

Leu Tyr Arg Asn Arg Asp Val

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2

<220>

<223> Peptide HRFYRLAN (aa 650-657 of SEQ ID NO: 8)

<400> 10

His Arg Phe Tyr Arg Leu Ala Asn

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Control peptide NRKRISN

<400> 11

Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn

1 5