



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0013077
(43) 공개일자 2023년01월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/196 (2006.01) *A61K 31/18* (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01) *A61K 31/44* (2006.01)
A61K 31/4523 (2006.01) *A61K 31/519* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/196 (2013.01)
A61K 31/18 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7044294
- (22) 출원일자(국제) 2022년05월20일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년12월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2021/063485
- (87) 국제공개번호 WO 2021/234097
 국제공개일자 2021년11월25일
- (30) 우선권주장
 20175739.0 2020년05월20일
 유럽특허청(EPO)(EP)
- (71) 출원인
 아트리바 테라퓨틱스 게엠베하
 독일, 72072 튀빙겐, 아이젠반스트라세 1
- (72) 발명자
 루드비히, 슈테판
 독일, 48161 뮌스터, 폰 쇼네벡 링 64
 플란츠, 올리버
 독일, 72581 데팅겐 안 데르 이엠프스, 슈베르트스
 트라세 7
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 김애라

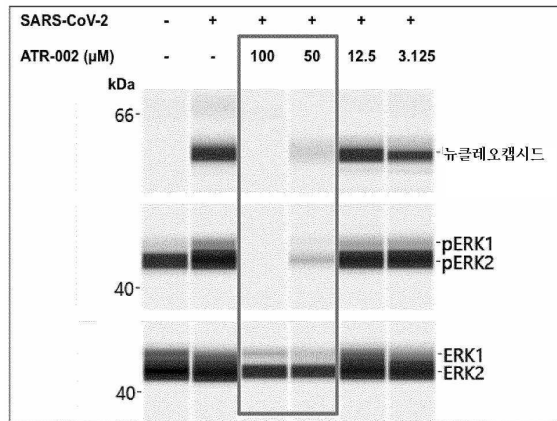
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **코로나바이러스 감염 및/또는 COVID-19 사이토카인 폭풍의 치료 또는 예방을 위한 MEK 억제제**

(57) 요약

본 발명은 코로나바이러스 감염의 치료 방법 및/또는 COVID-19 사이토카인 폭풍의 치료 또는 예방에서 사용하기 위한 MEK 억제제에 관한 것이다. COVID-19와 같은 코로나 바이러스 감염의 치료에서 사용하기 위한, 이러한 억제제를 포함하는 조성물이 또한 제공된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 31/4184 (2013.01)

A61K 31/44 (2013.01)

A61K 31/4523 (2013.01)

A61K 31/519 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

(72) 발명자

호프만, 헬렌 엘리자

독일, 72076 튀빙겐, 로버트-그라트만-베그 4/1

코흐-하이어, 율리아

독일, 72127 쿠스터딩겐, 마르크스트라세 37

선들러, 미카엘

독일, 72770 로이틀링겐, 헤힌거 스트라세 119

명세서

청구범위

청구항 1

인간 대상체에서 코로나바이러스에 의해 유발된 질환의 치료 방법에서의 사용을 위한 MEK 억제제로서, 상기 인간 대상체가 임원한 대상체인, MEK 억제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 질환이 급성 호흡기 질환인, MEK 억제제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 코로나바이러스가 SARS-CoV, SARS-CoV-2 또는 MERS인, MEK 억제제.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 코로나바이러스가 SARS-CoV-2이고 상기 환자가 COVID-19를 앓고 있는, MEK 억제제.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 COVID-19가 II기 COVID-19(Stage II COVID-19)인, MEK 억제제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MEK 억제제가 PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, 비니메티닙, 셀루메티닙, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 및 PD184352, 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염 또는 대사산물로 이루어진 군에서 선택되는, MEK 억제제.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 MEK 억제제가 PD-0184264 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이고, 상기 PD-0184264 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 바람직하게는 인간 대상체에게 100mg 내지 1000mg, 바람직하게는 300 내지 900mg, 가장 바람직하게는 300, 600 또는 900mg의 용량으로 1일 1회 투여되는, MEK 억제제.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자가 SARS-CoV-2에 의해 유발된 COVID-19를 앓고 있는, MEK 억제제.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 SARS-CoV-2가 바람직하게는 D614G, B.1.1.7, B.1.351, P1, P2, B.1.617, B.1.427, B.1.429, B.1.525 또는 B.1.526으로 이루어진 군으로부터 선택되는 변종인, MEK 억제제.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 COVID-19가 II기 COVID-19(Stage II COVID-19)인, MEK 억제제.

청구항 11

제10항에 있어서, MEK 억제제 PD-0184264가 임원 후 1일 내지 21일 연속해서, 바람직하게는 5일 내지 18일 또는 7일 내지 14일 연속해서 인간 대상체에게 투여되는, MEK 억제제.

청구항 12

제7항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MEK 억제제 PD-0184264가 경구 투여 형태로 인간 대상체에게

투여되는, MEK 억제제.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 코로나바이러스가 이전의 항바이러스 치료에 내성이고, 상기 이전의 항바이러스 치료가 바람직하게는 램테시비르의 투여인, 사용을 위한 MEK 억제제.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 입원한 인간 대상체가 60세 이상이거나 코로나바이러스에 대해 초고위험군 또는 고위험군에 속하는, MEK 억제제.

청구항 15

SARS-CoV-2에 의해 감염된 대상체에서 COVID-19 사이토카인 폭풍(cytokine storm)의 치료 또는 예방에서의 사용을 위한 MEK 억제제로서, 상기 MEK 억제제가 바람직하게는 PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, 비니메티닙, 셀루메티닙, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 및 PD184352 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염 또는 대사산물로 이루어진 군으로부터 선택되는, MEK 억제제.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 사용이 대상체에서 IL-1 β 및/또는 TNF- α 수준의 감소, 바람직하게는 대상체에서 TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α 및 MIP-1 β 중 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 모두의 수준의 감소를 포함하는, MEK 억제제.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 SARS-CoV-2가 바람직하게는 D614G, B.1.351, B.1.1.7, P1, P2, B.1.617, B.1.427, B.1.429, B.1.525 및 B.1.526으로 이루어진 군으로부터 선택된 변종인, MEK 억제제.

청구항 18

인간 코로나바이러스에 감염된 무증상 대상체에서 인간 코로나바이러스 감염에 의해 유발된 증상의 전개(development)의 예방 또는 인간 코로나바이러스에 감염된 사람과 밀접 접촉한 대상체에서 인간 코로나바이러스 감염의 예방에서의 사용을 위한 MEK 억제제로서, 상기 MEK 억제제가 바람직하게는 PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, 비니메티닙, 셀루메티닙, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 및 PD184352 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염 또는 대사산물로 이루어진 군으로부터 선택되는, MEK 억제제.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 인간 코로나바이러스가 SARS-CoV, SARS-CoV-2 또는 MERS인, MEK 억제제.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 SARS-CoV-2가 바람직하게는 D614G, B.1.351, B.1.1.7, P1, P2, B.1.617, B.1.427, B.1.429, B.1.525 또는 B.1.526으로 이루어진 군으로부터 선택된 변종인, MEK 억제제.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 사용을 위한 MEK 억제제를 포함하는 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 코로나바이러스 감염의 치료 또는 예방 및/또는 COVID-19 사이토카인 폭풍(cytokine storm)의 치료 또는 예방을 위한 MEK 억제제의 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 코로나바이러스 군은 코로나바이러스 과에 속하는 외피 양성 가닥 RNA 바이러스로 구성되며 알파-, 베타-, 감마- 및 델타 코로나바이러스로 지칭되는 하위유형을 포함한다. 알파 및 베타는 포유동물에 영향을 미치는 한편, 감마는 조류에 영향을 미치며 델타는 둘 다에 영향을 미친다. 코로나바이러스 과는 몇몇 잘 알려진 질환-유발 구성원을 포함한다. 베타코로나바이러스 과는 지금까지 인간에게 가장 큰 위협을 초래하였으며 현재 2003년에 774명의 사망의 원인이 되는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 2012년에 858명의 목숨을 앓아간 것으로 믿어지는 중등 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 및 2020년 5월 초반 부로 전세계적으로 250,000명 이상의 사망자를 유발한, 가장 최근에 출현한 형태인 새로운 코로나바이러스(SARS-CoV-2)를 포함하는 가장 잘 알려진 바이러스 표적을 포함한다. 전체적으로, 코로나바이러스는 인간 생명에 대한 지속적이고 발전하는 위협을 나타낸다.
- [0003] 코로나바이러스의 상이한 하위유형이 상이한 숙주 유형을 감염시킬 수 있지만, 바이러스의 전반적인 생화학적 구조는 유사하다. 코로나바이러스는 빈번한 재조합을 겪는다. 상기 언급한 바와 같이, SARS-CoV-2는 사베코바이러스(*Sarbecovirus*) 아속(베타-CoV 계통 B)의 구성원이다. 이의 RNA 서열은 길이가 약 30,000염기이며 코로나바이러스에 비해 상대적으로 길다. 이의 계놈은 거의 전적으로 다른 코로나바이러스와 공유되는 특성인 단백질 코딩 서열로 구성된다. SARS-CoV-2는 다른 바이러스에서 병원성 및 전염성을 증가시키는 것으로 알려진 특징인 푸린에 의해 절단되는 다염기성 부위를 포함한다는 점에서, 알려진 베타코로나바이러스 중에서 독특하다. 2020년 1월 12일 부로, SARS-CoV-2의 5개 계놈이 우한에서 단리되었으며 중국 질환통제예방센터(Chinese Center for Disease Control and Prevention: CCDC) 및 기타 기관에 의해 보고되었다; 계놈의 수는 2020년 1월 30일까지 42개로 증가하였다. 이러한 샘플의 계통발생학적 분석은 이들이 "공통 조상에 비해 최대 7개의 돌연변이와 높은 관련이 있음"을 보여주었으며, 이는 첫 인간 감염이 2019년 11월 또는 12월에 발생하였음을 암시한다. 2020년 5월 7일 부로, 6개 대륙에서 샘플링된 4,690개의 SARS-CoV-2 계놈이 공개적으로 입수가능하다. 단리주 우한-Hu-1로부터 시퀀싱된 최초의 SARS-CoV-2 계놈은 NCBI 수탁 번호 86693을 가지며 야생형 SARS-CoV-2를 대표하는 것으로 간주된다. 2020년 7월에, 과학자들은 스파이크 단백질 변이체 G614를 갖는 보다 전염성인 SARS-CoV-2 변종이 팬데믹의 지배적인 형태로서 D614를 대체하였다고 보고하였다. SARS-CoV-2의 수천 가지 변종이 있으며, 영국 변종 B.1.1.7, 남아프리카 변종 B.1.351, 브라질 변종 P.1 및 P.2 또는 인도 변종 B.1.617과 같은 이중 몇가지는 상이한 지역들에서 점점 더 우세한 것으로 간주된다.
- [0004] 인간-병원성 코로나바이러스 감염 및 구체적으로 SARS-CoV-2에 대한 백신을 개발하고자 하는 현재의 시도에도 불구하고, 특히 신형 바이러스 변종에 비추어 볼 때, 인간 병원성 코로나바이러스에 의해 유발된 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 대안적 또는 개선된 조성물 및 방법을 제공할 필요성이 남아 있다.
- [0005] SARS-CoV-2에 의해 유발된 2019/2021년의 COVID-19 팬데믹은 코로나바이러스가 전세계 보건 시스템에 강력한 영향을 미친다는 것을 명백히 입증한다. 예방 백신이 이용가능하지 않고, 단 하나의 항바이러스 약물인 렘데시비르만이 COVID-19용으로 잠정적으로 승인되었지만, 현재는 중간 정도의 효과만 있는 것으로 간주된다. 2021년 5월 부로, 몇몇 백신이 개발되어 2020년 말부터 시작하여 이용가능하다. 2021년 말까지 전세계 인구의 일정 비율이 백신접종을 받을 것으로 예상되지만 2021년에 승인된 백신접종이 영국 변종 B.1.1.7, 남아프리카 변종 B.1.351, 브라질 변종 P.1 및 P.2 또는 인도 변종 B.1.617과 같은 현재 및 신형 SARS-CoV-2 변종에 대해 어느 정도로 효과적일지는 불분명하다. 따라서, SARS-CoV-2 변종이 계속 출현하여 COVID-19를 유발할 가능성이 있다. 이용가능한 약물로 COVID-19를 치료하려는 다양한 시도가 있었지만, 지금까지 매우 성공적인 것은 없었다. 이는 일반적으로 코로나바이러스 및 특히 SARS-CoV-2의 감염을 더 잘 통제하기 위한 추가의 효과적인 항바이러스제에 대한 절실한 필요성을 강조한다. 특히, 백신이 이용가능하지 않은 팬데믹의 초기에는, 항바이러스제가 단독 치료법이다. 이것은 백신이 효과적이지 않은 바이러스 변종에도 동일하게 적용된다.
- [0006] COVID-19의 경우, SARS-CoV-2 감염의 임상 스펙트럼은 무증상 감염, 경미한 상기도 질병, 및 호흡 부전 및 심지어 사망을 동반한 중증 바이러스성 폐렴을 포함하여 광범위한 것으로 보이며 많은 환자가 입원 중에 있다. COVID-19 질병이 뚜렷한 임상 소견, 요법에 대한 반응 및 임상 결과에 상응하는 3등급의 증가하는 중증도를 나타냄을 인식하여 3-병기 분류 시스템의 사용이 널리 받아들여지고 있다. 원래 Sars-CoV-2 바이러스에 의한 감염 수가 많음에도 불구하고, 양성으로 판정된 모든 환자의 80%는 경미한 증상만을 경험하였고, 20%는 저산소혈증의 징후를 보여 입원으로 이어졌으며 5%만이 중환자실(ICU)에서의 치료를 필요로 하였다. 그러나, 이러한 통계가 반드시 신형 바이러스 변종에 적용되는 것은 아니며, 특히 인도 변종은 입원 및 집중 치료를 필요로 하는 중증 저산소증 증상을 갖는 더 많은 수의 증상 환자를 야기하는 것으로 보인다. COVID-19를 치료하기 위해서는, 감염

단계를 이해하는 것이 중요하다. 이들 단계는 "COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal"을 표제로 하는 하산(Hasan) 등에 요약되어 있으며 하기에 요약되어 있다.

- [0007] I기로 명명된 초기 병기는 경미한 감염이며 접촉 및 질환의 초기 확립 시에 발생한다. 대부분의 사람들의 경우, 이것은 권태감, 발열 및 마른 기침과 같은 며칠 동안의 경미하고 종종 비특이적인 증상과 관련된 잠복기를 포함한다. 바이러스를 이러한 COVID-19의 병기에 제한된 상태로 유지할 수 있는 환자에서는 예후 및 회복이 우수하다. 이러한 병기에서의 치료는 주로 증상 완화를 목표로 한다. 항바이러스 요법이 유익한 것으로 입증되면, 이 병기 동안 선택된 환자를 대상으로 하여 증상의 지속 기간을 감소시키고 전염성을 최소화하고 중증도의 진행을 예방할 수 있다. 또한, 조기-작용 항바이러스제는 무증상 또는 I기 COVID-19 환자에서 질환의 진행을 예방하는데 유용할 것이다. 일반적인 테스트의 증가로 인해, 질환 진행을 피하기 위한 예방적 치료로부터 혜택을 받을 수 있는 무증상 환자가 더 많이 식별되었다. 현재, 무증상 또는 I기 COVID-19 환자를 위한 치료법은 이용가능하지 않다. 또한, SARS-CoV-2 양성으로 알려진 사람과 밀접 접촉한 경우에 사용될 수 있는 예방학적 또는 예방적 치료는 알려져 있지 않다.
- [0008] II기로 명명된, 확립된 폐 질환의 제2 병기에서는, 폐에서의 바이러스 증식과 국소 염증이 일반적이다. II기는 저산소증이 없는 IIa기 및 저산소증이 있는 IIb기로 명명된 폐 침범을 포함한다. 이 병기 동안, 환자에서는 기침, 발열 및 가능하게는 저산소증을 동반한 바이러스성 폐렴이 발생한다. 질환이 진행되는 동안, 호흡곤란은 증상이 처음 개시된 후 중앙값 13일(범위 9 내지 16.5일) 후에 발생한다. 호흡곤란은 기도, 폐 또는 심장의 심각한 질환의 징후이며 호흡 곤란(difficult breathing 또는 labored breathing) 및 숨가쁨을 특징으로 한다. COVID-19의 경우, 흉부 X-선 또는 컴퓨터 단층촬영에 의한 영상화는 양측 침윤 또는 간유리 혼탁을 보여준다. 이 병기에서 대부분의 COVID-19 환자는 면밀한 관찰 및 관리를 위해 입원해야 할 필요가 있다. 치료는 주로 지원 조치 및 일단 이용가능한 경우 항바이러스 요법으로 구성된다. 그럼에도 불구하고, 환자는 중환자실(ICU)에서의 기계 환기를 필요로 하는 III기로 진행될 가능성이 있다.
- [0009] II기 COVID-19에서는, 전신 염증의 마커가 상승될 수 있지만, 현저하게 높지는 않다. 중국 우한에서 제1 환자군에 대해 수행된 초기 연구에서, 병원에 입원 시 혈장 IL1베타, IL1R알파, IL7, IL8, IL9, IL10, 염기성 FGF, GCSF, GMCSF, IFN감마, IP10, MCP1, MIP1 α , MIP1 β , PDGF, TNF α 및 VEGF 농도는 건강한 성인보다 높은 것으로 밝혀졌다. 또한 ICU의 환자는 IL2, IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1 α 및 TNF α 의 혈장 농도가 입원 시의 환자에서보다 높은 것으로 밝혀졌으며(Huang et al.; The Lancet; Vol 395; pp.: 497-506 February 15, 2020), 이는 이들 사이토카인의 증가가 COVID-19 II기에서 III기로의 전환을 보여주는 전조임을 시사한다.
- [0010] 소수의 COVID-19 환자는 폐외 전신성 과염증 증후군(extra-pulmonary systemic hyperinflammation syndrome)으로서 나타나는 III기라 명명된 제3의 가장 심각한 질병 병기로 전환될 것이다. 이 병기에서는 전신 염증의 마커가 상승된다. 전반적으로, 질병의 이러한 중요한 병기로부터의 예후 및 회복은 열악하다.
- [0011] 따라서, COVID-19의 II기에서 III기로의 진행을 방지하고 COVID-19 감염의 중증도 및 사망률을 감소시킬 수 있는 화합물이 요구된다. 상이한 질환에 대해 이미 승인되었거나 임상 연구를 거친 조성물에 초점을 맞춘 몇몇 다국적 연구가 진행 중이다. COVID-19의 치료를 위해 고려되는 대부분의 화합물은 다음 두 군 중 하나에 속한다:
- [0012] 1. HIV, 에볼라, C형 간염 또는 인플루엔자에 대해 원래 개발된 항바이러스 약제. 이 발상은 이들이 바이러스의 생식을 차단하거나 폐 세포로의 진입을 방지한다는 것이다. 그 중에서도, 여기에는 바이러스에 효과적인 것으로 알려진 오래된 말라리아 약제가 포함된다. 이들 항바이러스제는 바이러스 생명주기의 초기에 작용하기 때문에 Covid-19의 II기 및 II기 초반에 효과적일 수 있다.
- [0013] 2. 류마티스 관절염 또는 염증성 장 질환을 치료하기 위해 개발된 억제성 면역조절제. 이 발상은 이들이 바이러스 자체보다 더 많은 손상을 유발하지 않도록 면역계를 제한할 수 있다는 것이다. 이들은 사이토카인 생성을 억제하기 때문에 후기 II기 및 III기 Covid-19 감염에서 효과적일 수 있다.
- [0014] 램데시비르(RNA 폴리머라제 억제제), 리토나비르 또는 로피나비르(HIV 약제), 베타 인터페론 및/또는 클로로퀸 또는 하이드록시클로로퀸(말라리아 약제)의 효능을 테스트하기 위한 몇몇 다국적 연구가 2020년에 시작되었다. 그러나, 현재까지 이들 중 어느 것도 특별히 효과적인 것으로 밝혀지지 않았고, 따라서 COVID-19 환자를 위한 효과적인 치료 대안이 절실히 필요하다.
- [0015] 2020년 5월 초에, 미국 FDA는 입원한 Covid-19 환자 치료에서 항바이러스제 램데시비르 사용에 대한 긴급 승인을 제공하였다. 램데시비르는 원래 에볼라의 치료용으로 개발된 RNA 폴리머라제 억제제이며, 이는 효과가 없는

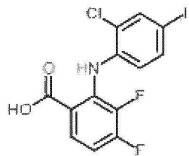
것으로 밝혀졌다. 렘데시비르는 본 발명자들이 III기 COVID-19로서 분류하는 중증 증상을 보이는 병원 환경의 환자를 치료하는 용도로만 승인되었다. 그러나, 렘데시비르는 시험에서 환자의 입원 기간을 감소시키는 것으로 밝혀졌지만, 사망률에는 유의한 효과가 없었다.

[0016] 선행 기술 및 진행 중인 다수의 연구를 고려할 때, 코로나바이러스 감염에 의해 유발된 질환, 특히 COVID-19와 같은 호흡기도 질환의 치료 및 예방에 효과적인 새로운 화합물 및 조성물이 필요하다는 것이 명백하다. 특히, 코로나바이러스, 구체적으로 SARS-CoV-2의 초기 감염을 예방하고 COVID-19 II기 및 III기의 환자를 치료하여 질환 진행을 예방하고 사망률을 감소시키기 위한 약제가 필요하다.

발명의 내용

[0017] 본원에 제공된 상기 문제에 대한 해결책은 코로나바이러스 감염의 치료를 위한 MEK 억제제를 제공하는 것이다. 구체적으로, MEK 억제제는 MEK 키나제를 차단하여 바이러스 전파 및 숙주 세포로부터의 탈출 둘 다를 방지하고 또한 결국 COVID-19의 III기를 초래하는 면역 반응을 감소시키기 때문에, II기 COVID-19의 치료에 유용한 것으로 밝혀졌다. 이러한 이중 메커니즘으로 인해, MEK 억제제 및 구체적으로 PD-0184264로도 명명된 ATR-002는 II기 COVID-19의 치료에 특히 유망하다. 또한, MEK 억제제는 II기에서 III기로의 질환 진행을 예방하고 III기 COVID-19를 치료하는 데 유용할 수 있다.

[0018] MEK 억제제는 원래 화학치료제로서 이미 알려져 있으며 바이러스 감염, 특히 인플루엔자바이러스 및 한타바이러스의 치료 또는 예방에서 사용하기 위해 본 발명자들에 의해 개발 중에 있다. PD-0184264로도 명명된 ATR-002는 2004년에 화학치료제와 관련하여 처음 기재된(Wabnitz et al.) CI-1040의 대사산물로서, 코로나바이러스 감염과 같은 바이러스 질환의 치료 또는 예방에 사용하기 위해 본 발명자들에 의해 개발 중에 있다. ATR-002는 하기에 나타난 화학 구조를 가진다:



[0019]

[0020] PD-0184264는 CI-1040의 몇가지 대사산물 중 하나이다(Wabnitz et al., 2004, LoRusso et al., 2005). 그러나, 코로나바이러스 감염에서의 MEK의 역할과 관련하여 PD-0184264에서 연구된 메커니즘은 다른 MEK 억제제에도 동일하게 적용된다.

[0021] 이러한 이유로 인해, 본 발명은 인간 대상체에서 코로나바이러스에 의해 유발된 질환의 치료 방법에 사용하기 위한 MEK 억제제에 관한 것이며, 여기서 상기 인간 대상체는 입원한 대상체이다. 일부 양상에서, 질환은 SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 또는 MERS에 의해 유발된 것들과 같은 급성 호흡기 질환이다. 본 발명의 맥락에서, 코로나바이러스는 SARS-CoV-2일 수 있고 치료될 상응하는 환자는 COVID-19를 앓고 있다. 본 발명의 MEK 억제제의 사용은 COVID-19가 II기 COVID-19일 때 특히 유용하다.

[0022] 상기 언급된 바와 같이, MEK 억제제는 PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, 비니메티닙, 셀루메티닙, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 및 PD184352 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염 또는 대사산물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, MEK 억제제는 PD-0184264 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0023] 바람직한 투여 형태에서, PD-0184264 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 인간 대상체에게 100 내지 1000mg, 바람직하게는 300 내지 900mg, 가장 바람직하게는 300, 600 또는 900mg의 용량으로 1일 1회 투여된다.

[0024] 구체적으로, PD-0184264는 SARS-CoV-2에 의해 유발된 COVID-19를 앓고 있는 입원한 인간 환자를 치료하는 데 사용된다. 바람직하게는, COVID-19는 II기 COVID-19이다. PD-0184264는 입원 후 1일 내지 21일 연속해서, 바람직하게는 5일 내지 18일 또는 7일 내지 14일 연속해서 인간 대상체에게 투여될 수 있다. 바람직하게는, PD-0184264는 경구 투여 형태로 인간 대상체에게 투여된다.

[0025] 추가 양상에서, 본 발명의 MEK 억제제는 코로나바이러스가 렘데시비르와 같은 이전의 항바이러스 치료에 내성인 입원한 인간 환자를 치료하는 데 사용된다. 또한, MEK 억제제는 60세 이상이거나 코로나바이러스에 대해 감염 고위험군에 속하는 입원한 인간 대상체를 치료하는 데 사용될 수 있다.

- [0026] 본 발명은 추가로 인간 코로나바이러스에 감염된 대상체에서 COVID-19 사이토카인 폭풍을 치료하거나 예방하는 데 있어서 MEK 억제제의 용도에 관한 것이다. MEK 억제제는 바람직하게는 PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, 비니메티닙, 셀루메티닙, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 및 PD184352 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염 또는 대사산물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0027] 대상체에서 COVID-19 사이토카인 폭풍을 치료하거나 예방하는 데 있어 MEK 억제제의 사용은 대상체에서 IL-1 β 및/또는 TNF- α 의 수준을 감소시키는 것, 바람직하게는 대상체에서 TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-8, IL-6, MCP-1, MIP-1 α 및 MIP-1 β 중 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 모두의 수준을 감소시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0028] 상기에 따라, 본 발명은 또한 SARS-CoV-2 감염을 앓고 있는 대상체에서 COVID-19 사이토카인 폭풍을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이며, 여기서 상기 방법은 대상체에게 MEK 억제제를 투여하는 것을 포함한다. 상기 방법은 대상체의 (혈액 또는 혈장)에서 IL-1 β 및/또는 TNF- α 의 수준을 감소시키는 것, 바람직하게는 대상체의 (혈액 또는 혈장)에서 TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α 및 MIP-1 β 중 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 모두의 수준을 감소시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0029] 치료될 SARS-CoV-2는 원래의 야생형 스트레인 및/또는 하나 이상의 변종일 수 있다. 치료될 수 있는 SARS-CoV-2 변종의 예는 D614G, B.1.351, B.1.1.7, P1, P2, B.1.617, B.1.427, B.1.429, B.1.525 및 B.1.526를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 추가 양상에서, 본 발명은 인간 코로나바이러스에 감염된 무증상 대상체에서 인간 코로나바이러스 감염에 의해 유발된 증상의 발달을 예방하거나, 인간 코로나바이러스에 감염된 사람과 밀접 접촉한 대상체에서 인간 코로나바이러스 감염을 예방하기 위해 사용되는 MEK 억제제에 관한 것이며, 여기서 MEK 억제제는 바람직하게는 PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, 비니메티닙, 셀루메티닙, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 및 PD184352 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염 또는 대사산물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다시, 인간 코로나바이러스는 바람직하게는 D614G, B.1.351, B.1.1.7, P1, P2, B.1.617, B.1.427, B.1.429, B.1.525 또는 B.1.526으로 이루어진 군으로부터 선택된 SARS-CoV, SARS-CoV-2 또는 MERS 또는 SARS-CoV-2 변종일 수 있다.
- [0031] 마지막으로, 본원에 기재된 용도 및 의학적 치료를 위한 MEK 억제제를 포함하는 약학적 조성물은 본 발명의 일부이다.

도면의 간단한 설명

- [0032] **도 1: 도 1(a)**는 SARS-CoV-2 감염되고 ATR-002 처리된 CaCo-2 세포의 웨스턴 블롯 분석의 라인 도면을 도시한다. pERK1/2, ERK1/2 및 뉴클레오텐시드 단백질은 ATR-002로 처리된 SARS-CoV-2에 감염된 Caco2 세포에서 검출되었다. 미감염된 세포(모의)를 대조군으로서 사용하였다.
- 도 1 (b) 내지 1(d)**는 ATR-002로 처리된 SARS-CoV-2 감염된 Caco-2 세포의 ERK 인산화 및 뉴클레오텐시드 단백질의 상관관계의 비교를 도시한다.
- 도 1(b)는 ERK-인산화를 도시한다. 피크하 영역을 사용하여 pERK1/2를 ERK1/2에 대해 정규화하고 ERK-인산화%의 값을 계산하였다.
- 도 1(c)는 DMSO 대조군과 비교한 상이한 농도의 ATR-002로 처리된 Caco-2 세포의 뉴클레오텐시드 단백질 농도를 도시한다.
- 도 1(d)는 DMSO 대조군과 비교한 상이한 농도의 ATR-002로 처리된 Caco-2 세포의 바이러스 역가(PFU/mL)를 도시한다.
- 도 2: (a)**는 MEK 억제 시 SARS-CoV-2에 의한 Vero 세포 감염을 도시한다.
- (b)**는 MEK 억제 시 SARS-CoV-2에 의한 감염 동안의 바이러스 유전자 RdRP의 검출을 도시한다.
- 도 3:** Calu-3 세포에서 SARS-CoV-2의 복제 능력과 SARS-CoV-2 동안 가능한 ERK 활성화
- 도 4:** ERK 녹다운은 자손 바이러스 역가의 생산 감소를 유도한다

- 도 5: ATR-002 처리는 상이한 숙주 세포 시스템에서 SARS-CoV-2에 대해 효과적이다
- 도 6: ATR-002에 의한 MEK의 억제제는 감소된 바이러스 역가를 초래한다
- 도 7: ATR-002 처리는 SARS-CoV-2의 남아프리카 변종에 대해 효과적이다.
- 도 8: ATR-002는 급성 폐 손상(ALI) 마우스 모델에서 사이토카인 및 케모카인 유전자 발현을 감소시킨다
- 도 9: ATR-002는 CaCo2 세포의 SARS-CoV-2 감염 후 염증촉진성(pro-inflammatory) 사이토카인/케모카인 반응을 감소시킨다.
- 도 10: ATR-002에 의한 MEK 억제제는 염증촉진성 사이토카인의 발현 감소를 초래한다
- 도 11: ATR-002에 의한 MEK 억제제는 IFN 반응에 영향을 미치지 않지만, 폴리(I:C) 자극 후 염증촉진성 IL-8 발현을 감소시킨다.
- 도 12: ATR-002는 PMBC 세포에서 염증촉진성 사이토카인/케모카인 반응을 감소시킨다.
- 도 13: ATR-002 처리 후 압도적인 사이토카인 반응 조절의 개략도.
- 도 14: ATR-002는 항-CD3 자극, ConA 자극 및 PHA 자극으로 사이토카인/케모카인 자극의 유의한 용량 의존적 억제제를 나타내는 것으로 밝혀졌다
- 도 15: 하산 등에 따른 COVID-19의 병기.
- 도 16: 햄스터 감염 모델에서 SARS-CoV-2에 대한 ATR-002의 효능. (a 내지 e) 개별 데이터 및 중앙값이 제시된다. (f) 감염 당시의 체중과 비교하여 백분율로 표시된 p.i. 4일차의 체중 감소. 데이터는 일원 ANOVA 다중 비교 검정으로 분석하였다. P 값이 제시된다.
- 도 17: ATR-002는 공기-액체-계면 배양에서 자손 바이러스 입자의 생산을 차단한다
- 도 18: SARS-CoV-2 감염 동안 ERK 활성화는 hACE2의 발현에 의존한다
- 도 19: Calu-3 세포에서 ATR-002 처리 후 ACE2 감소
- 도 20: ATR-002는 ACE2 과발현 세포에서 SARS-CoV-2의 복제를 차단할 수 있다
- 도 21 및 22: MEK-억제제는 사전인큐베이션 후 SARS-CoV-2 스파이크 단백질을 보유하는 슈도타입화된 (pseudotyped) VSV의 감염을 예방할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 하기 설명은 본 발명을 이해하는 데 유용할 수 있는 정보를 포함한다. 본원에 제공된 정보 중 임의의 것이 선행 기술이거나 현재 청구된 발명과 관련이 있거나, 구체적으로 또는 암시적으로 참조된 임의의 간행물이 선행 기술이라는 것을 인정하는 것은 아니다.
- [0034] 상술한 바와 같이, 본 발명은 코로나바이러스에 의해 유발된 입원한 환자의 바이러스 질환의 치료 방법에 사용 하기 위한 MEK 억제제에 관한 것이다. 실시예에 나타난 바와 같이, 본 발명자들은 놀랍게도 MEK 억제제가 코로나 바이러스에 의해 유발된 COVID-19와 같은 질환을 치료하는 데 이중 효과를 갖는다는 것을 보여주었다. 본 발 명은 또한 SARS-CoV-2에 감염된 환자에서 COVID-19 사이토카인 폭풍을 치료 또는 예방하는 것에 관한 것이다. 게다가, MEK 억제제는 ACE-2 수용체의 발현을 차단하는 데 효과적이며 따라서 인간 코로나바이러스에 감염된 무 증상 대상체에서 인간 코로나바이러스 감염에 의해 유발된 증상의 발달을 예방하거나, 인간 코로나바이러스에 감염된 사람과 밀접 접촉한 대상체에서 인간 코로나바이러스 감염을 예방하는 데 유용할 수 있음이 밝혀졌다. 이러한 맥락에서, "밀접 접촉"이란 일반적으로 양성으로 판정된 사람과 외부에서 또는 밀폐된 방에서 1.5미터 미만의 거리에서 10분 이상의 시간을 보낸 것으로 정의된다. 2021년 5월 19일 부로 독일 로버트 코흐 연구소 (German Robert Koch Institute: RKI)는 인간 코로나바이러스에 감염된 것으로 알려진 사람과 밀접 접촉한 사람 을 다음과 같은 경우 감염 위험이 증가된 것으로 정의하고 있다:
 - [0035] 1. FFP2 마스크와 같은 적절한 보호구 없이 10분 초과 동안 밀접 접촉(1.5미터 미만),
 - [0036] 2. FFP2 마스크와 같은 적절한 보호구 없이 또는 호흡기 분비물(기침, 재채기)과의 직접 접촉한 상태로 대화 길 이에 관계없이 대면 대화(1.5미터 미만) 및/또는

- [0037] 3. 적절한 보호구를 착용하더라도, 거리에 관계없이 고 농도의 감염성 에어로졸 가능성이 있는 동일한 방에서 접촉자 및 감염된 사람과 함께 10분 초과 동안 동시에 존재.
- [0038] 밀접 접촉한 무리의 예는 다음과 같다:
- [0039] · 동일한 가구의 사람,
- [0040] · 감염된 사람의 분비물 또는 체액, 구체적으로 입맞춤, 기침, 재채기 등을 통한 것과 같은 호흡기 분비물에 직접 접촉한 사람,
- [0041] · 적절한 공기 순환 없이 감염성 에어로졸이 있는 방에 있었던 사람(예컨대, 노래, 스포츠, 파티, 회의, 학교 수업, 종교 의식을 통해),
- [0042] · FFP-2 마스크 착용과 관계없이 비행기에서 감염된 사람에게 노출된 사람 및 비행기에서 감염된 사람과 동일한 줄 또는 감염된 사람의 앞 또는 뒤의 두 줄에 앉아 있던 사람, 승무원 또는 밀접 접촉이 있었던 다른 승객은 상기 2번 항목을 참조한다.
- [0043] 물론 "밀접 접촉"의 정의는 바이러스 변종에 따라 변경될 수 있는 것이 가능하다. 일부 바이러스 변종은 감염에 필요한 거리 및 시간에 영향을 미칠 수 있는 더 높은 전파 속도를 갖는 것으로 나타났다. 이러한 이유로 인해, 예방 효과 및 바이러스 전파에 대한 효과 둘 다를 갖는 항바이러스제가 SARS-CoV-2 신형 변종과 관련하여 특히 유용할 것이다.
- [0044] 구체적으로, 침부된 실시예에서 입증된 바와 같이, ATR-002는 SARS-CoV-2의 바이러스 전파에 대한 직접적인 효과뿐만 아니라, 감소된 사이토카인 방출을 유도하는 면역조절 효과를 나타낸다. 이러한 이중 효과는 놀라운 것이며 MEK 억제제가 COVID-19 II기 환자의 치료에 특히 적합하게 만든다. 상기 배경 섹션에서 설명하고 추가로 정의한 바와 같이, 이들 환자는 아직 집중 치료를 받지 않고 입원한다. 이들 환자에서, MEK 억제는 그후에 III기 COVID-19로 이어지는 사이토카인 폭풍을 예방하는 동시에 바이러스 전파를 억제하여 질환 진행을 중단시키고 사망률을 감소시키는 이중 효과를 갖는다.
- [0045] SARS-CoV-2 감염 후 첫 며칠 동안, 대식세포, 호중구 및 NK 세포가 감염된 폐 조직으로 유출되는 것이 보인다. 그 다음, SARS-CoV-2 바이러스 감염 후 감염된 폐 상피, 단핵구, 수지상 세포 및 폐포 대식세포에 의한 염증 매개체의 방출로 인해 COVID-19가 유발된다. 사이토카인 및 케모카인(예를 들어, TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL6, IL-8, MCP-1, MIP-1 β)의 생성 및 분비는 국소 및 전신 급성 염증 및 적응 면역 반응의 변경을 초래하며, 이것은 "COVID-19 사이토카인 폭풍"(본원에서 "사이토카인 폭풍"으로도 상호교환적으로 언급됨)이라 명명되며 COVID-19 II기에서 III기로의 전환을 보여주는 전조이다. 용어 "COVID-19 사이토카인 폭풍"은 당업계에서 사용되는 이의 일반적인 의미(이와 관련하여, 문헌[Jamilloux et al, 2020] 참조) 내에서 인간 병원성 코로나바이러스, 특히 SARS-CoV-2에 감염된 대상체에서 발생할 수 있는 사이토카인 폭풍을 의미하기 위해 본원에서 사용된다. 실시예에 제시된 예비 연구로부터, 일반적으로 MEK 억제제 및 특히 ATR-002는 사이토카인 방출을 억제함으로써 동시에 바이러스 전파를 감소시키고 사이토카인 폭풍을 예방할 수 있는 것으로 보인다(이와 관련하여, **도 13** 참조). 이러한 이중 효과는 예상치 못한 것이었고 COVID-19의 치료에서의 유용성이 현재 연구되고 있는 다른 항바이러스제, 예컨대 렘데시비스와 상이하다.
- [0046] COVID-19 팬데믹에 비추어, 본 발명자들은 SARS-CoV-2가 바이러스 전파를 위해 MEK 경로를 사용하는지 여부를 결정하는 데 관심이 있었다. 이러한 목적을 위해, 먼저 SARS-CoV-2 단리주(단리주 "FI")를 얻은 다음, 바이러스에 감염될 수 있는 이용가능한 세포를 결정하는 것이 필요하였다. 일반적으로 MEK 억제제 및 특히 ATR-002는 숙주 세포 인자 MEK를 표적화하고, ATR-002의 용량-반응 관계는 바이러스에 의존하지 않고 키나제의 억제에 의존한다. 시험관내 실험에서 ATR-002의 항바이러스 효능은 실험에 사용된 세포주에서의 MEK의 활성화 상태에 크게 의존한다. 하기 SARS-CoV-2 조사에 사용된 CaCo2 세포주는 높은 구성적(constitutive) MEK 활성을 나타낸다. 비교로서, Vero 세포에 대한 실험도 수행되었다. 사용된 구체적인 방법은 **실시예 1**에서 확인할 수 있으며 그 결과는 **도 1** 및 **도 2**에 도시한다. 구체적으로, **도 1**은 SARS-CoV-2(MOI 0.1)에 감염된 CaCo-2 세포를 상이한 농도의 ATR-002로 처리했을 때 ERK 인산화뿐만 아니라 SARS-CoV-2 및 바이러스 마커인 뉴클레오캡시드 단백질의 억제가 50 및 100 μ M ATR-002의 농도에서 나타났다는 것을 보여준다. 억제에 필요한 이러한 다량의 ATR-002는 바이러스 역가와 관련되지 않고, 오히려 구성적으로 활성인 MEK를 가져서 MEK의 억제제를 위해 다량이 필요한 CaCo2 세포의 선택으로 인한 것이다. 이들 실험은 SARS-CoV-2가 바이러스 외수송을 위해 MEK 경로를 사용한다는 것을 보여준다. 추가적으로, **도 2a**는 SARS-CoV-2에 감염되고 50 μ M ATR-002로 처리된 Vero 세포가 전체 관찰 기간에 걸쳐 대조군 세포보다 더 낮은 바이러스 부하(viral load)를 갖는다는 것을 도시하며, **도 2b**에 도시된

SARS-CoV-2 바이러스 유전자 RdRP의 측정은 이러한 조사결과를 확인시켜 주었다. 이는 상기 억제제가 단지 복제 지연을 유발한 것이 아니라 바이러스 전파를 지속적으로 억제한다는 것을 시사한다. **실험 1**로부터, 본 발명자들은 SARS-CoV-2가 바이러스 전파를 위해 MEK 경로를 사용한다고 결론지었다.

[0047] CaCo2 및 Vero 세포에서 나타난 효과를 검증하기 위해, 추가의 테스트를 인간 기관지상피 세포주 Calu-3에서 수행하였다. 먼저 SARS-CoV-2가 Calu-3 세포를 감염시킬 수 있는지 여부를 테스트하였다. 이후, Calu-3 세포에서 SARS CoV-2에 의해 ERK가 활성화되는지 여부 및 언제 활성화되는지를 테스트하였다. 게다가, ATR-002가 Calu-3 세포에서 SARS-CoV-2의 복제를 억제할 수 있는지 여부를 테스트하였다.

[0048] **실시예 2**에 기재된 실험은 Calu-3 세포도 SARS-CoV-2 바이러스에 의해 감염될 수 있음을 보여주었다. Calu-3는 폐암 연구 및 호흡기 질환용 약물 개발에서 통상적으로 사용되는 인간 폐암 세포주이다. Calu-3 세포는 상피세포이며 전임상 적용에서 호흡기 모델로서 작용할 수 있다. Calu-3 세포는 통상적으로 폐암에 대한 약물 개발을 위한 시험관내 모델 및 생체내 모델 둘 다에서 사용된다. 이 세포는 폐 약물 전달 연구에서 사용되어 저분자량 물질을 흡수할 수 있는 능력을 입증하였다. Calu-3 세포는 외래 물질에 대한 이의 반응성으로 인해 공기 흡입 및 폐 손상에 대한 호흡기 모델로서 사용되었다. **실시예 2**에서는, Calu-3 세포가 SARS-CoV-2에 감염될 수 있다는 것이 나타날 수 있었다. ATR-002가 Calu-3 세포에서 SARS-CoV-2를 억제할 수 있는지 여부를 조사하기 위해, 이전에 CaCo2 및 Vero 세포에서 수행된 실험을 반복하였으며 ATR-002는 Calu-3 세포에서 용량 의존적 방식으로 SARS-CoV-2를 억제할 수 있다. Calu-3 세포에서의 SARS-CoV-2 복제 및 SARS CoV-2 수명주기에서의 ERK 활성화 뿐만 아니라 ATR-002에 의한 억제. **도 3**에서 볼 수 있는 바와 같이, SARS-CoV-2는 Calu-3 세포에서 복제할 수 있었다. 추가적으로, SARS-CoV-2 감염은 바이러스 수명 주기의 매우 초기 단계에서 ERK 활성화를 유도하는 것으로 나타났다. ERK 활성화는 p.i. 1시간차에 관찰되었다. 바이러스 수명주기의 후기 단계에서 추가적인 ERK-활성화는 관찰되지 않았으며, 이는 바이러스 감염 동안 초기 과정을 위한 경로 활성화의 가능한 역할을 시사한다.

[0049] SARS-CoV-2 수명주기 동안 ATR-002의 항바이러스 작용이 표적외 효과(off-target effect)가 아니라는 것을 검증하기 위해, 본 발명자들은 유전적 수단에 의해 Raf/MEK/ERK 경로를 차단하였다. 따라서, MEK의 직접적인 다운스트림 표적인 키나제 ERK의 발현은 실시예 2B에 설명된 바와 같이 Calu-3 세포에서 특이적 siRNA에 의해 녹다운되었다. ERK-녹다운은 **도 4**에서 볼 수 있는 바와 같이 자손 바이러스 역가의 생산 감소를 초래하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, ERK의 녹다운은 스파이크 단백질의 발현 및 자손 바이러스 입자의 생산의 감소를 유도하는 것으로 나타났으며, 이는 바이러스 수명 주기 동안의 MEK/ERK의 역할을 확인시켜 준다.

[0050] 그 다음, MEK 억제제가 **실시예 1**의 CaCo2 및 Vero 세포에서 나타난 감소와 유사한 방식으로 Calu-3 세포에서 SARS-CoV-2 역가를 감소시킬 수 있는지 여부를 테스트하였다. 구체적으로, 바이러스 수율 감소 분석을 위해, 95% 컨플루언트(confluent) Caco-2, Vero E6 및 Calu-3 세포를 갖는 24웰 플레이트를 준비하였다. 웰을 웰당 200 μ L 감염 배지에서 1시간 동안 SARS-CoV-2(MOI 0.01)에 감염시키기 전 감염 배지로 1회 세척하였다. 그후, 바이러스 접종물을 완전히 제거하고, 웰을 감염 배지로 1회 세척한 다음, 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 1% DMSO를 갖는 감염 배지 중의 상이한 농도의 ATR-002(100 μ M, 75 μ M, 50 μ M, 0 μ M)로 웰당 1mL씩 처리하였다. 감염 24시간 후에 상청액을 수거하고 4°C에서 5분 동안 최대 속도에서 원심분리하여 세포 파편을 제거하였다. 상청액 중 140 μ L의 분취량을 준비하고 -80°C에서 저장하였다. 샘플의 바이러스 역가를 RT-qPCR(실시간 정량적 폴리머라제 연쇄 반응)을 통해 결정하였다. 바이러스 RNA 카피의 검출을 위해 사용된 프로브는 SARS-CoV-2 N 유전자에 대해 지시되었으며 결과가 제시된다. **도 5**에서 볼 수 있는 바와 같이, 모든 세포 유형에서 보이는 효과는 유사하였다.

[0051] 다음 단계에서, Calu-3 세포를 증가되는 양의 ATR-002과 함께 24시간, 48시간 또는 72시간에 걸쳐 인큐베이션하였다. **도 6**에 도시된 바와 같이, 자손 바이러스 입자 생산의 농도 의존적 감소가 무독성 농도 범위에서 관찰되었다. 이러한 효과는 72시간의 총 감염 시간 동안 유지되었으며, 이는 ATR-002에 의한 경로 억제제가 바이러스 수명 주기에 장기간 효과를 미친다는 것을 시사한다. 추가적으로, **도 6d**는 ATR-002로 처리된 세포가 SARS-CoV-2에 감염된 세포의 특징적인 세포 손상을 보여주지 않았음을 도시하기 때문에 흥미로운 것이며, 이는 ATR-002가 폐 손상을 예방한다는 것을 시사한다.

[0052] MEK 억제제가 종 또는 변종과 무관하게 인간 코로나바이러스의 효과적인 치료임을 검증하기 위해, SARS-CoV-2 SA 변종 B.1351에 대한 ATR-002의 시험관내 효능을 **실시예 3**에서 테스트하였다. ATR-002가 남아프리카 SARS-CoV-2 변종 B.1351에 대해 효과적인지 여부를 알기 위해 실시예 1 및 2에서와 동일한 실험 설정을 사용하였다. Vero 세포 및 Calu-3 세포를 **도 7**에서 볼 수 있는 바와 같이 0.1, 1 및 10의 MOI에서 SARS-CoV-2 SA에 감염시키고 ATR-002로 처리하였다. 이들 실험은 MEK 억제제, 구체적으로 ATR-002가 코로나바이러스 및 구체적으로 SARS-

CoV-2 변종을 억제할 수 있음을 보여주었다.

[0053]

추가 단계에서, 본 발명자들은 **실시예 4**에 제시된 급성 폐 손상(ALI) 마우스 모델에서 이전에 얻은 데이터를 검토하였다. 구체적으로, 마우스 ALI 모델에서, LPS 유도된 사이토카인 및 케모카인 발현은 바이러스 감염의 부재 하에 ATR-002의 면역조절 효능을 조사할 수 있게 한다. **도 9**는 ALI 마우스의 ATR-002 처리가 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-8, MCP-1 및 MIP-1 β 의 감소를 유도한다는 것을 도시한다. 상기 배경 섹션에서 논의한 바와 같이, 후양(Huang) 등에 따르면, 이러한 모든 사이토카인은 COVID-19 환자에서 증가하고, TNF- α , IP-10 및 MIP-1 β 는 II기 COVID-19로 인한 입원 시의 수준과 비교하여 III기 COVID-19 환자에서 증가한다. 이는, SARS-CoV-2 감염과 무관하게, ATR-002가 포유동물에서 사이토카인 및 케모카인 유전자 발현을 감소시킬 수 있음을 시사한다.

[0054]

ATR-002가 SARS-CoV-2 감염 후 염증촉진성 사이토카인/케모카인 반응을 감소시키는지 확인하기 위해, 추가의 시험관내 실험을 실시예 5에 설명된 바와 같이 CaCo2 세포에서 수행하였다. CaCo2 세포를 SARS-CoV-2에 감염시키고 ATR-002로 처리하였다. MCP-1의 양을 측정하고 결과를 **도 9**에 도시한다. 구체적으로, ATR-002가 SARS-CoV-2 감염된 세포에서 MCP-1 발현을 감소시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다. 그러나, 실시예 1에서 논의된 바와 같이 이를 위해서는 다량의 ATR-002가 필요하며, 이는 CaCo2 세포에서 MEK 경로의 구성적 활성화 때문이다. 체세포 드라이버 돌연변이(driver mutation)로 인해, SARS-CoV-2에 감염된 CaCo-2 세포에서 MCP-1 발현을 억제하기 위해서는 다량의 ATR-002가 요구된다. 본 발명자들은 ATR-002가 Calu-3 세포에서 염증촉진성 사이토카인의 발현을 감소시킬 수 있는지에 대한 의문을 추가로 다루었다. 따라서, 본 발명자들은 **실시예 2**에 설명된 바와 같이 Calu-3 세포를 SARS-CoV-2에 감염시키고 이들을 증가되는 양의 ATR-002로 처리하였다. IL-6, IL-8, MCP-1, IP-10 및 CCL5 mRNA의 발현을 정량적 실시간 PCR로 분석하였다. 결과는 모의 감염된 세포의 n배 mRNA 발현으로서 **도 10**에 도시되어 있다. 이 결과는 ATR-002가 이전 실시예에 나타난 바와 같이 자손 바이러스 입자의 생산을 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라, 나아가 염증촉진성 사이토카인의 발현을 감소시킬 수 있음을 확인시켜 준다. 이는 바이러스 감염 동안 사이토카인 폭풍의 가능성을 감소시키는 ATR-002 처리의 추가적인 이점이다. 제2 단계에서는, 항-바이러스 인터페론 및 염증촉진성 사이토카인의 발현에 미치는 ATR-002 처리의 일반적인 효과를 조사하기 위해, A549 세포를 바이러스 RNA의 작용을 모방하는 데 통상적으로 사용되는 합성 유사체인 폴리I:C로 24시간 동안 형질감염시켰다. 동시에, 세포를 증가되는 양의 ATR-002로 처리하였다. ATR-002에 의한 MEK 억제는 I형 인터페론 반응에 영향을 미치지 않지만 폴리(I:C) 자극 후 염증촉진성 IL-8 발현을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 이들 실험의 결과는 **도 11**에 도시한다. ATR-002 처리는, 엄격한 I형 IFN 의존성 유전자 MxA mRNA의 지속적인 발현에 대해 예시된 바와 같이, 항-바이러스 I형 인터페론 시스템의 자극에 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다. 대조적으로, ATR-002의 낮은 농도를 사용했을 때에도 염증촉진성 IL8 발현의 강력한 감소가 발견되었다.

[0055]

이러한 효과가 다른 세포 유형에서도 나타나는지 알기 위해, MEK 억제제의 효과를 **실시예 6**에 기재된 바와 같이 LPS 유도된 1차 인간 말초혈 단핵 세포(PMBC)에서 연구하였다. 다시, ATR-002가 PMBC에서 염증촉진성 사이토카인/케모카인 반응을 감소시킨다는 것이 밝혀졌다. 구체적으로, IP10, TNF- α 및 MCP-1 발현량을 연구하였고, **도 12**에서 볼 수 있는 바와 같이, 모든 3가지는 ATR-002로 처리한 후 감소되었으며, 이는 10 μ g/ml ATR-002가 인간 PMBC에서 >90%의 LPS 유도된 MCP-1을 억제하기에 충분하다는 것을 시사한다. PMBC에 대한 추가 연구는 ATR-002가, **도 14**에서 볼 수 있는 바와 같이, 항-CD3 자극, ConA 자극 및 PHA 자극에 의한 사이토카인/케모카인 자극의 유의한 용량 의존적 억제를 보여준다는 것을 확인시켜 주었다.

[0056]

마지막으로, COVID-19 팬데믹용 치료제 제공의 시급성으로 인해 그리고 본원에 설명된 **실시예**로부터의 전도유망한 데이터뿐만 아니라 ATR-002의 I상 안전성 연구의 긍정적인 데이터를 고려하여, II상 연구가 진행 중이다. 이러한 II상 연구는 **실시예 7**에 기재되어 있다. 상기 연구는 **RESPIRE** - 중등도 코로나바이러스 질환(COVID-19)을 갖는 입원한 성인 환자에서 ATR-002의 안전성 및 효능을 평가하기 위한 무작위화, 이중 맹검, 위약 대조, 임상 연구(Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Clinical Study to Evaluate the Safety and Efficacy of ATR-002 in Adult Hospitalized Patients with Moderate Coronavirus Disease (COVID-19))라 명명된다. 이 연구의 주요 목적은 15일차의 임상적 중증도 상태에 의해 평가된 COVID-19 환자의 치료에서, 각각 표준 치료(standard of care)인 위약과 비교하여 ATR-002의 효능을 입증하는 것이다. **실시예 1 내지 6**에 의해 결정된 바와 같이, ATR-002는 (1) 항바이러스제 및 (2) 면역조절(사이토카인 폭풍을 방해하기 위한)인 이중 이점(효과)이 있는 이의 작용 방식으로 인해 COVID-19를 치료할 가능성을 갖는다. 본 임상 연구는 중등도 코로나바이러스 질환 II기를 앓고 있는 총 200명의 성인 입원 환자를 등록할 것이다. 이후 SARS-CoV-2의 존재를 확인하기 위해 무작위화 직전에 비인두 면봉을 채취할 것이다.

- [0057] 모든 무작위화된 환자는 지역 표준에 따라 표준 치료를 받게 될 것이다. 100명의 환자는 ATR-002 900mg을 1일 1회 경구 투여받도록 무작위화되고, 100명의 환자는 매치되는 위약을 투여받게 될 것이다. ATR-002 또는 위약은 5일 동안 대조된 이중 맹검 방식으로 제공될 것이다.
- [0058] 연구의 주요 목적은 7점 서수 스케일 [1] 입원하지 않음, 제한 없음, [2] 입원하지 않음, 제한 있음, [3] 입원함, 보충 산소가 필요하지 않음, [4] 입원함, 보충 산소가 필요, [5] 입원함, 비침습적 환기 또는 고유량 산소 장치 사용, [6] 입원함, 침습적 기계 환기 또는 ECMO 사용, [7] 사망에서 임상적 중증도 상태로 측정된, 위약 대비 ATR-002의 효능을 평가하는 것이다.
- [0059] 2차 결과는 임상 징후 및 증상, 환자가 보고한 결과, 치료 관련 이상반응(Treatment Emergent Adverse Events), 심각한 이상반응(Serious Adverse Events), 도출된 임상 매개변수, 점수 및 연구 사건, 실험실 값 및 ATR-002 혈장 수준의 변화뿐만 아니라, 정량적 SARS-CoV-2 샘플의 변화에 의해 측정될 것이다.
- [0060] 모든 환자는 안전상의 이유로 그리고 생존 상태를 결정하기 위해 연구 약물 처리의 종료 후 90일차까지 추적 관찰될 것이다.
- [0061] 연구를 위해 선택된 환자는 스크리닝 시 입원을 필요로 하는 18세 이상의 성인이며, 37.3°C(겨드랑이) 이상, 38.0°C(구강) 이상 또는 38.6°C(직장 또는 고막) 이상의 온도로서 정의된 발열 및 실내 공기에서 SpO₂ ≤94%를 갖거나 SpO₂>94%를 유지하기 위해 보충 산소를 필요로 하는 것으로 정의된 COVID-19 감염의 임상 징후를 나타낸다. 실시예에 나타난 항바이러스 및 사이토카인/케모카인 연구 및 I상 임상 연구로부터의 추가 데이터에 기반하여, 바이러스 부하 및 사이토카인/케모카인 발현을 50% 초과로 감소시키기 위해 MEK 활성의 >50% 내지 90% 억제 가 필요하다. 상술한 의도된 RESPIRE 연구 및 실시예 5에서, II기 COVID-19를 앓고 있는 환자가 치료될 것이다.
- [0062] 실시예 7에 설명된 RESPIRE 임상 시험을 개시하기 전에, 실시예 8에 설명된 SARS-CoV-2 감염을 연구하기 위한 바람직한 모델 유기체인 시리안 햄스터 모델에서 실험을 수행하였다. ATR-002의 인간 등가 용량의 항바이러스 효능을 SARS-CoV-2 챌린지 후 햄스터 모델에서 테스트하였다. 동물은 감염 당일 또는 감염 후 24시간차에 처리하였고, 이후 면봉 및 비갑개 조직에서의 폐 병변 및 바이러스 부하의 백분율과 같은 매개변수를 챌린지 후 3 내지 4일차에 분석하였다. ATR-002 처리는 도 16에서 볼 수 있는 바와 같이 SARS-CoV-2 시리안 햄스터 감염 모델에서 바이러스 역가 및 폐 병변의 유의한 감소를 초래하였다. 제1 처리를 위한 100mg/kg의 선택된 투여량에 이어서 1일 1회의 75mg/kg은 900mg에 이어서 600mg 인간 용량에 대한 햄스터 등가 용량을 나타내며, 이는 ATR-002 2상 임상 시험을 위해 사용된다. 따라서, 본 결과는 ATR-002 임상 시험의 용량 타당성을 완벽하게 뒷받침하고 SARS-CoV-2 치료에서 ATR-002의 생체내 효과를 뒷받침한다.
- [0063] 또한, 호흡기도의 실제 인간 세포에서의 바이러스 복제에 미치는 ATR-002의 효과를 연구하기 위해 4명의 건강한 성인의 인후 면봉으로부터 수득된 1차 인간 공기-액체 간섭(ALI) 배양물을 사용하였다. 4개의 ALI 배양물 중 3개를 SARS-CoV-2에 감염시킬 수 있었고 실시예 9에 설명된 바와 같이 2가지의 상이한 농도를 사용하여 ATR-002로 처리하였다. 도 17은 하나의 실험의 결과를 도시한다. 사용된 두 농도(50 μM 및 100 μM) 모두는 이들 3개의 배양물에서 자손 바이러스 입자의 생산을 완전히 차단하였으며, 이는 ATR-002가 1차 인간 ALI 배양물에서 SARS-CoV-2 감염에 대해 매우 효과적임을 시사한다. 이것은 ATR-002가 인간 코로나바이러스 감염 및 구체적으로 SARS-CoV-2 II기를 치료하는 데 효과적이라는 것을 입증할 우수한 지표이다.
- [0064] "COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal"을 표제로 하는 하산 등의 논문으로부터 유래하는 도 15에서 볼 수 있고 하기에 요약되어 있는 바와 같이, II기 COVID-19에서는 바이러스 반응 단계와 숙주 반응 단계 둘 다 진행 중이므로, 이는 MEK 억제제의 사용이 가장 유용할 수 있는 병기일 것이다. 하산 등에 의해 결정된 COVID-19의 병기는 하기에 다시 요약한다.
- [0065] I기로 명명된 초기 병기는 경미한 감염이며 집중 및 질환의 초기 확립 시에 발생한다. 대부분의 사람들의 경우, 이것은 권태감, 발열 및 마른 기침과 같은 며칠 동안의 경미하고 종종 비특이적인 증상과 관련된 잠복기를 포함한다. 바이러스를 이러한 COVID-19의 병기에 제한된 상태로 유지할 수 있는 환자에서는 예후 및 회복이 우수하다. 이러한 병기에서의 치료는 주로 증상 완화를 목표로 한다. 항바이러스 요법이 유익한 것으로 입증되면, 이 병기 동안 선택된 환자를 대상으로 하여 증상의 지속 기간을 감소시키고 전염성을 최소화하고 중증도의 진행을 예방할 수 있다.
- [0066] II기로 명명된, 확립된 폐 질환의 제2 병기에서는 바이러스 증식 및 폐의 국소 염증이 일반적이다. II기는 저산소증이 없는 IIa기 및 저산소증이 있는 IIb기로 명명된 폐 침범을 포함한다. 이 병기 동안, 환자에서는 기침,

발열 및 가능하게는 저산소증을 동반한 바이러스성 폐렴이 발생한다. 질환의 과정 동안, 호흡곤란은 증상이 처음 개시된 후 중앙값 13일(범위 9 내지 16.5일) 후에 발생한다. 호흡곤란은 기도, 폐 또는 심장의 심각한 질환의 징후이며 호흡 곤란(difficult breathing 또는 labored breathing) 및 숨가쁨을 특징으로 한다. COVID-19의 경우에, 흉부 X-선 또는 컴퓨터 단층촬영에 의한 영상화는 양측 침윤 또는 간유리 혼탁을 보여준다. 이 병기에서 대부분의 COVID-19 환자는 면밀한 관찰 및 관리를 위해 입원해야 할 필요가 있다. 치료는 주로 지원 조치 및 일단 이용가능한 경우 항바이러스 요법으로 구성된다. 그럼에도 불구하고, 환자는 중환자실(ICU)에서의 기계 환기를 필요로 하는 III기로 진행될 가능성이 있다.

[0067] II기 COVID-19에서, 전신 염증의 마커가 상승될 수 있지만, 현저하게 높지는 않다. 중국 우한에서 제1 환자군에 대해 수행된 초기 연구에서, 병원에 입원 시 혈장 IL1 β , IL1RA, IL7, IL8, IL9, IL10, 염기성 FGF, GCSF, GMCSF, IFN γ , IP10, MCP1, MIP1 α , MIP1 β , PDGF, TNF- α 및 VEGF 농도는 건강한 성인보다 높은 것으로 밝혀졌다. 또한, ICU의 환자는 IL2, IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1 α 및 TNF α 의 혈장 농도가 입원 시의 환자에서보다 높은 것으로 밝혀졌으며(Huang et al.; The Lancet; Vol 395; pp.: 497-506 February 15, 2020), 이는 이들 사이토카인의 증가가 COVID-19 II기에서 III기로의 전환을 보여주는 전조임을 시사한다. 이러한 전환은 "COVID-19 사이토카인 폭풍"(본원에서 "사이토카인 폭풍"으로도 명명됨)이라 불리는 갑작스럽고 빠르게 진행되는 임상적 악화로 표시된다. 문헌[Jamilloux et al. (Autoimmunity Reviews 2020)]에 상세히 설명된 바와 같이, 여기서 IL-1 β , IL-R α , IL-6, TNF- α 및 sIL2R α 와 같은 전신 염증의 마커가 상승된다. 이것은 상기 논의된 후양 등이 보여준 것과 일치한다.

[0068] 소수의 COVID-19 환자들은 COVID-19 사이토카인 폭풍, 및 폐외 전신성 과염증 증후군으로서 나타나는, III기라 명명된 질병의 제3의 가장 중증 병기로의 전환을 경험할 것이다. 전반적으로, 질병의 이러한 중요한 병기로부터의 예후 및 회복은 열악하다.

[0069] 이러한 이유로 인해, MEK 억제에 의해 제공되는 이중 메커니즘은 III기로 진행하는 것을 방지하여 사망률을 감소시키는 데 중요하다.

[0070] SARS-CoV2 감염의 메커니즘을 더 잘 이해하기 위해, SARS-CoV-2 감염을 예방하는 데 있어 MEK 억제제의 역할에 대한 추가 연구를 실시예 10에 설명된 바와 같이 수행하였다. 구체적으로, SARS-CoV2는 ACE2/TMPRSS2를 통해 세포에 진입할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, Raf/MEK/ERK 신호전달 경로의 활성화에 미치는 ACE2 및 TMPRSS2 발현의 가능한 효과가 다루어졌다. ACE2 및 TMPRSS2 과발현 A549 세포를 SARS-CoV-2에 감염시키고 ERK의 인산화 상태를 p.i. 1시간차에 분석하였다. 도 18에는 3회의 독립적인 실험 중 하나의 결과가 도시된다. A549 세포에서 ACE2의 과발현이 SARS-CoV-2 감염 동안 ERK 활성화를 유도한다는 것이 밝혀졌다.

[0071] 이후, ACE2 발현이 ATR-002 처리를 통한 MEK 억제 후 세포에서 감소되는지 여부를 테스트하였다. Calu-3 세포를 24시간 동안 ATR-002로 처리하고 그 결과를 면역형광현미경 및 WES 기술을 통해 분석하였다. 결과는 도 19에서 볼 수 있으며, 여기서 ATR-002가 Calu-3 세포에서 ACE2의 감소를 유도한다는 것이 명백하다.

[0072] 다음 단계에서는, ATR-002가 ACE2 과발현 A549 세포에서 SARS-CoV-2의 복제를 차단할 수 있는지 여부를 테스트하였다. 따라서, A549-ACE2, A549-ACE2/TMPRSS2 또는 Calu-3 세포를 상술한 바와 같이 SARS-CoV-2에 감염시키고 ATR-002로 처리하였다.

[0073] ATR-002는, Calu-3 및 A549-ACE2/TMPRSS2 세포가 0.001의 MOI로 감염된 경우 이들 세포에서 자손 바이러스 입자의 생산을 감소시켰다. 놀랍게도, ATR-002 처리는 바이러스 접종물의 농도가 10배 더 높을 때(MOI: 0.01) A549-ACE2/TMPRSS2 세포에서 자손 바이러스 입자의 생산에 영향을 미치지 않았다. SARS-CoV-2는 2가지 상이한 경로를 통해 세포에 진입할 수 있다. 바이러스와 세포 막의 융합을 초래하는 TMPRSS2에 의한 스파이크 단백질의 직접적인 활성화를 통해, 또는 카텝신 L에 의한 스파이크 단백질의 엔도솜 내재화 및 활성화에 의해.

[0074] 마지막으로, MEK-억제제로의 처리가 ACE2의 발현을 감소시킬 수 있는지 여부를 분석하기 위해, Vero 세포를 MEK 억제제 CI-1040 또는 ATR-002와 함께 사전인큐베이션하고, 그 표면에 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질을 보유하고 성공적인 감염 및 내재화 시 리포터 유전자 GFP를 발현하는 VSV 슈도타입 바이러스에 감염시켰다. 양성 세포를 광학 현미경으로 분석하였다. 도 21 및 도 22에 도시된 데이터는 3회의 독립적인 실험의 평균 \pm SD를 나타내며 CI-1040 또는 ATR-002와의 사전인큐베이션이 VSV-S 슈도타입 바이러스의 내재화의 감소를 초래함을 보여준다. 이 효과는 시간 의존적이었다. CI-1040 또는 ATR-002와의 사전인큐베이션이 길수록 감염에 대한 관독값인 GFP 양성 세포의 양은 낮아진다. 이러한 결과는 CI-1040 및 ATR-002와 같은 MEK 억제제가 ACE2의 세포 발현을 감소시키고 따라서 바이러스가 세포로 진입하는 것을 방지하는 데 유용할 수 있음을 시사한다.

- [0075] 상술한 실험은 MEK 억제제가 ACE2 수용체를 차단하여 SARS-CoV-2 감염을 예방하고 무증상이지만 인간 코로나바이러스에 양성으로 판정된 환자에서 SARS-CoV-2의 진행을 예방하는 데 역할을 할 수 있음을 시사한다. 이것은 초기 인간 코로나바이러스 감염과 관련하여 MEK 억제의 예방적 또는 예방학적 효과를 제공할 수 있기 때문에 중요하다.
- [0076] 본 발명의 MEK 억제제는 치료 및/또는 예방 방법에 사용될 수 있다. 이와 같이 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 증상을 완화하거나 개선할 목적으로 코로나바이러스 감염을 앓고 있는 대상체에게 바람직하게는 약학적 조성물의 형태의 MEK 억제제를 투여하는 것을 포함한다. 유사하게, 증상을 완화하거나 개선할 목적으로 COVID-19 사이토카인 폭풍을 앓고 있는 대상체에게 바람직하게는 약제 형태의 MEK 억제제를 투여하는 것이 포함된다.
- [0077] 게다가, 본원에서 사용되는 용어 "예방하다"는 질환을 예방하는 것이 목적인 의학적 절차를 의미한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "예방하다", "예방" 및 "예방하는"은 COVID-19 사이토카인 폭풍과 같은 코로나바이러스 감염으로 진단된 환자에서 소정의 병태를 획득하거나 발생할 위험의 감소를 지칭한다. 또한 "예방"은 대상체에서 COVID-19 사이토카인 폭풍과 같은 전신성 과염증의 위험을 감소시키기 위한, SARS-CoV-2와 같은 코로나바이러스 감염으로 진단된 대상체에서 TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-8, MCP-1 및/또는 MIP-1 β 와 같은 전신성 과염증의 마커의 감소 또는 억제를 의미한다.
- [0078] "MEK 억제제"는 MEK(미토젠-활성화 단백질 키나제 키나제)를 억제함으로써 세포 또는 대상체에서 유사분열 신호 전달 캐스케이드 Raf/MEK/ERK를 억제한다. 이 신호 캐스케이드는 많은 바이러스, 특히 인플루엔자 바이러스 및 코로나바이러스에 의해 강탈(hijack)되어 바이러스 복제를 촉진한다. 따라서, 병목 MEK에서 Raf/MEK/ERK 경로의 특이적 차단은 바이러스, 특히 코로나바이러스의 성장을 손상시킨다. 추가적으로, MEK 억제제는 인체에서 낮은 독성을 나타내고 유해 부작용을 거의 나타내지 않는다. 바이러스 내성을 유도하는 경향도 없다(Ludwig, 2009). 본 발명의 맥락에서, MEK 억제제는 PD-0184264, CI-1040, GSK-1120212, GDC-0973, 비니메티닙, 셀루메티닙, PLX-4032, AZD6244, AZD8330, AS-703026, RDEA-119, RO-5126766, RO-4987655, PD-0325901, TAK-733, AS703026, PD98059 및 PD184352 또는 이들의 약학적으로 허용되는 염 또는 대사산물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특히 바람직한 억제제는 PD-0184264이다.
- [0079] 코로나바이러스에 의해 유발된 "질환"은 SARS-CoV, SARS-CoV-2 또는 MERS에 의해 유발된 급성 호흡기 질환일 수 있다. 구체적으로, 바람직한 실시양태에서 코로나바이러스는 SARS-CoV-2이고 환자는 COVID-19를 앓고 있다. 가장 바람직한 버전에서, 질환은 II기 COVID-19이다.
- [0080] "코로나바이러스"는 SARS-CoV, SARS-CoV-2 또는 MERS 또는 관련된 새로운 인수공통 또는 돌연변이 코로나바이러스일 수 있다. 하나의 구체적인 실시양태에서, 코로나바이러스는 렘데시비르와 같은 이전의 항바이러스 치료에 내성이 있다.
- [0081] 억제제, 특히 본 발명의 MEK 억제제에 의해 치료될 수 있는 "대상체"는 코로나바이러스 감염으로 진단된 인간 대상체이다. 일 실시양태에서, 대상체는 입원한 대상체이다. 대상체는 임의의 연령일 수 있으며 0세 내지 10세의 아동, 10세 내지 18세의 십대 또는 18세 이상의 성인일 수 있다. 대상체는 임의로 50세 내지 65세, 18세 내지 50세, 또는 65세 초과일 수 있다. 다른 실시양태에서 대상체는 적어도 60세인 대상체, 만성 치료 시설에 거주하는 대상체, 폐 또는 심혈관계의 만성 장애를 갖는 대상체, 만성 대사 질환, 신장 기능장애, 혈액소병증, 또는 면역억제 때문에 전년도 동안 정기적인 의학적 추적 관찰 또는 입원을 필요로 하는 대상체로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0082] 하나의 구체적인 양상에서, 대상체는 "COVID-19 사이토카인 폭풍"을 예방 또는 치료하기 위해 MEK 억제제로 치료될 수 있다. 상기 언급한 바와 같이, 이 용어는 당업계에서 사용되는 이의 일반적인 의미(이와 관련하여, 문헌[Jamilloux et al, 2020] 참조) 내에서 인간-병원성 코로나바이러스, 특히 SARS-CoV-2에 감염된 대상체에서 발생할 수 있는 사이토카인 폭풍을 의미하기 위해 사용된다. 이러한 사이토카인 폭풍은 빠른 임상적 악화를 특징으로 하며 염증촉진성 사이토카인의 증가는 COVID-19 II기에서 III기로의 전환을 보여주는 전조이다. 구체적으로, 후양 등 및 야미유(Jamilloux) 등은 모두, 아마도 TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-8, MCP-1 및 MIP-1 β 중 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 모두의 증가와 함께 IL-1 β 및/또는 TNF- α 의 갑작스러운 증가가 관찰되었다고 언급하고 있다. 하나의 양상에서, MEK 억제제는 대상체에서 IL-1- β 및/또는 TNF- α 의 수준을 감소시키기 위해 사용되며, 바람직하게는 대상체에서 TNF- α , IL-1 β , IP-10, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α 및 MIP-1 β 중 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 또는 6개 모두의 수준을 감소시킨다.
- [0083] 상기 인용된 염증성 사이토카인 및 케모카인은 당업계에 잘 알려져 있다. 구체적으로, 용어 TNF- α , IL-1 β ,

IP-10, IL-8, MCP-1 및 MIP-1β는 UNIPROT 및 GENE BANK에서 다음의 수탁 번호 하에 알려진 인간 단백질 서열을 지칭한다:

유전자	GeneBank 수탁번호	Uniprot 수탁번호	종
TNF-α	NM_000594	P01375	인간
IL-1β	NM_000576	P01584	
IP-10	NM_001565	P02778	
IL-8	NM_000584	P10145	
MCP-1	NM_002982	P13500	
MIP-1β	NM_002984	P13236	

[0084]

[0085]

PD-0184264와 같은 MEK 억제제를 포함하는 본 발명의 사용을 위한 약학적 조성물은 코로나바이러스에 의해 유발된 질환을 앓고 있고 입원한 인간 환자에게 투여된다. 하나의 양상에서, 인간 환자는 60세 이상이거나 코로나바이러스 감염에 대해 고위험군 또는 초고위험군에 속한다. COVID-19의 경우에, 초고위험군은 다음과 같은 환자를 포함한다:

[0086]

· 70세 이상의 환자

[0087]

· 장기 이식을 받은 환자

[0088]

· 활성 화학요법을 받고 있는 환자

[0089]

· 폐암에 대한 근치적 방사선 요법을 받고 있는 환자

[0090]

· 백혈병, 림프종 또는 골수종과 같은 혈액암 또는 골수암을 앓고 있으며 임의의 치료 단계에 있는 환자

[0091]

· 암에 대한 면역요법 또는 기타 지속적인 항체 치료를 받고 있는 환자

[0092]

· 면역계에 영향을 줄 수 있는 다른 표적화 암 치료를 받고 있는 환자

[0093]

· 지난 6개월 이내에 골수 또는 줄기 세포 이식을 받았거나 여전히 면역억제 약물을 복용하고 있는 환자

[0094]

· 낭포성 섬유증, 중증 천식, 허파 섬유증(pulmonary fibrosis), 폐 섬유증(lung fibrosis), 간질성 폐 질환 및 중증 COPD를 포함한 중증 호흡기 질환을 갖는 환자

[0095]

· 매우 높은 감염 위험을 제공하는 병태(예컨대, SCID, 동형접합 겸상적혈구)를 갖는 환자

[0096]

· 감염 가능성을 훨씬 더 높이는 약제(예컨대, 고 용량의 스테로이드 또는 면역억제 요법)를 복용하고 있는 환자

[0097]

· 중증 심장 질환을 갖고 임신 중인 환자

[0098]

고위험군은 다음과 같은 사람들을 포함한다:

[0099]

· 60세 이상의 사람

[0100]

· 학습 장애를 갖는 사람

[0101]

· 심각하지 않은 폐 병태(예컨대, 천식, COPD, 폐기종 또는 기관지염)를 갖는 사람

[0102]

· 심장 질환(예컨대, 심부전증)을 갖는 사람

[0103]

· 높은 혈압(고혈압)을 갖는 사람

[0104]

· 당뇨병을 갖는 사람

[0105]

· 만성 신장 질환을 갖는 사람

[0106]

· 간 질환(예컨대, 간염)을 갖는 사람

[0107]

· 호흡에 영향을 줄 수 있는 의학적 병태를 갖는 사람

[0108]

· 암을 갖는 사람

- [0109] · 약한 면역계를 갖는(면역억제된) 사람
- [0110] · 뇌혈관 질환을 갖는 사람
- [0111] · 뇌 또는 신경에 영향을 주는 병태(예컨대, 파킨슨병, 운동 신경 질환, 다발성 경화증 또는 뇌성마비)를 갖는 사람
- [0112] · 비장에 문제가 있거나 비장을 제거해야 하는 사람
- [0113] · 감염(예컨대, HIV, 루푸스 또는 피부경화증)될 위험이 높은 것을 의미하는 병태를 갖는 사람
- [0114] · 면역계에 영향을 줄 수 있는 약제(예컨대, 저 용량의 스테로이드)을 복용하고 있는 사람.
- [0115] · 비만을 갖는 사람.
- [0116] 본 발명의 방법에서, PD-0184264는 경구, 정맥내, 흉막내, 근육내, 국소적으로 또는 흡입을 통해 투여될 수 있다. 바람직하게는, PD-0184264는 흡입을 통해 또는 경구 투여된다. 바람직한 실시양태에서, PD-0184264는 입원 후 1일 내지 21일 동안 연속해서, 바람직하게는 5일 내지 18일 또는 7일 내지 14일 동안 연속해서 100mg 내지 1000mg, 바람직하게는 300mg, 600mg 또는 900mg의 경구 투여량으로 1일 1회 투여된다.
- [0117] 구체적으로, 이전에 설명된 바와 같이, I상 임상 연구에서 PD-0184264는 단일 상승 용량/다중 상승 용량(SAD / MAD) 요법에 따라, 7개의 아암에서 100 mg의 개시 용량 및 최대 3회의 증량(escalation) 단계로 투여되었다. 투여 계획은 PD-0184264 1회 용량으로 100 mg에서 900 mg으로 증량(SAD)한 후에, PD-0184264를 7일에 걸쳐 100 mg에서 600 mg QD으로 증량하는 7회 용량(MAD)이었다. 각각의 용량 코호트는 안전성 검토 위원회(SRC)에 의해 안전한 것으로 간주되었으며, 그 다음의 더 높은 용량(각각 최대 SAD 900 mg 및 MAD 600 mg)에 대해 방출이 허용되었다. 관찰된 약물동태학적 프로파일은 추가 임상 개발을 위해 의도된 1일 1회 요법을 뒷받침하며 900mg의 용량이 테스트를 위해 의도되었다.
- [0118] 시험 동안 전체적으로 단지 몇 건의 이상반응만이 있었으며 심각한 이상반응은 관찰되지 않았다. 따라서, PD-0184264는 안전하고 내약성이 양호한 것으로 간주된다. I상 연구에서 약물동태학 노출 및 MEK 억제제의 결정이 검증되었고 임상적으로 관련된 혈액 수준의 유지가 확인된다.
- [0119] 본 발명은 또한 상이한 조성물, 바람직하게는 약학적 조성물을 구상한다. 본 발명은 SARS-CoV-2와 같은 코로나 바이러스에 의해 유발된 질환의 치료 방법에서 사용하기 위한 PD-0184264를 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0120] 상기 언급한 바와 같이, MEK 억제제를 포함하는 조성물은 약학적 조성물일 수 있다. 약학적 조성물의 바람직한 실시양태는 PD 0184264를 포함한다. 바람직하게는, 이러한 조성물은 담체, 바람직하게는 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다. 조성물은 경구 투여가능한 현탁액 또는 정제, 비강 스프레이, 흡입 장치용 제제, 멸균 주사가가능한 제제(정맥내, 흉막내, 근육내), 예를 들어 멸균 주사가가능한 수성 또는 유성 현탁액 또는 좌제의 형태일 수 있다.
- [0121] MEK 억제제는 바람직하게는 치료적 유효량으로 투여된다. PD-0184264 또는 각 활성 화합물/억제제에 대한 "치료적 유효량"은, 당업자에게 명백할 수 있는 바와 같이, 사용되는 화합물의 활성, 환자의 체내에서의 활성 화합물의 안정성, 완화될 병태의 중증도, 치료되는 환자의 총 체중, 투여 경로, 신체에 의한 화합물의 흡수, 분포 및 배설의 용이성, 치료될 환자의 연령 및 민감성, 이상반응 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 요인에 따라 달라질 수 있다. 투여량은 시간이 지남에 따라 다양한 요인이 변화함에 따라 조정될 수 있다.
- [0122] 본원에 기재된 억제제, 방법 및 용도는 인간 요법에 적용가능하다. 본원에 기재된 화합물, 특히 PD-0184264는 본원에 기재된 바와 같이 생리학적으로 허용되는 담체 중에서 대상체에게 투여될 수 있다. 도입 방식에 따라, 화합물은 하기에서 논의되는 바와 같이 다양한 방식으로 제형화될 수 있다. 제형 중 치료적 활성 화합물의 농도는 약 0.1 내지 100중량%로 달라질 수 있다. 제제는 단독으로 또는 다른 치료와 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, II기 COVID-19의 치료를 위해, PD-0184264는 10 내지 100 mg/kg PD-0184264 범위, 바람직하게는 25 내지 75 mg/kg PD-0184264 범위의 투여량으로 투여될 수 있다. 바람직한 투여는 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 및 900 mg과 같은 임의의 투여량을 포함한, 100 내지 1000 mg의 1일 1회 투여량이다. 바람직한 실시양태에서, 투여는 1일 1회이고 투여량은 경구 투여되는 600mg 또는 900mg이다. PD-0184264는 입원 후 1일 내지 21일 이상 연속한 기간 동안, 바람직하게는 5일 내지 18일 동안 및 가장 바람직하게는 7일 내지 14일 동안 투여될 수 있다.
- [0123] 본 발명의 방법에서 약제 화합물은 임의의 적합한 단위 투여 형태로 투여될 수 있다. 적합한 경구 제형은 정제,

캡슐, 현탁액, 시럽, 주입검, 웨이퍼, 엘릭시르 등의 형태일 수 있다. 결합제, 부형제, 윤활제 및 감미제 또는 향미제와 같은 약학적으로 허용되는 담체가 경구 약학적 조성물에 포함될 수 있다. 원하는 경우, 특수한 형태의 맛, 색상 및 모양을 개질하기 위한 통상적인 제제가 또한 포함될 수 있다.

[0124] 주사가능한 제형의 경우, 약학적 조성물은 적합한 바이알 또는 튜브에서 적합한 부형제와 혼합된 동결건조된 분말일 수 있다. 입장에서 사용하기 전에, 약물은 정맥내 또는 근육내 주사에 적합한 조성물을 형성하기 위해 동결건조된 분말을 적합한 용매 시스템에 용해시킴으로써 재구성될 수 있다.

[0125] 일 실시양태에서, 바이러스 감염의 감소는 플라크 형성 단위(PFU)/ml의 감소이다. "플라크 형성 단위"는 바이러스 입자와 같이 단위 용적당 플라크를 형성할 수 있는 입자의 수를 측정한 것이다. 이는 입자의 절대량을 측정한 것이라기 보다는 기능적 측정이다: 결합이 있거나 이의 표적 세포를 감염시키지 못하는 바이러스 입자는 플라크를 생성하지 않을 것이므로 계수되지 않을 것이다. 예를 들어, 1,000 PFU/ μ l의 농도를 갖는 코로나바이러스 용액은, 1 μ l의 용액이 세포 단층에서 1000개의 감염성 플라크를 생성하기에 충분한 바이러스 입자를 보유함을 나타낸다. 본 발명의 경우에, 억제제로 처리된 세포 배양물은 PD-0184264와 같은 MEK 억제제로 처리하기 전의 배양물과 비교할 때, 처리 후 배양물에서 감소된 수의 플라크 형성 단위를 나타낸다.

[0126] 본 발명의 목적을 위해, 상기 정의된 바와 같은 활성 화합물은 또한 이의 약학적으로 허용되는 염(들)을 포함한다. 본원에서 사용되는 어구 "약학적으로 허용되는 염(들)"은 원하는 투여 형태를 위해 안전하고 효과적인 본 발명의 화합물의 이러한 염을 의미한다. 약학적으로 허용되는 염은 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유도된 것들과 같은 음이온으로 형성된 염, 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화제이철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도된 것들과 같은 양이온으로 형성된 염을 포함한다.

[0127] ***

[0128] 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 명백히 달리 나타내지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다는 점에 유의해야 한다. 따라서, 예를 들어, "시약"에 대한 언급은 이러한 상이한 시약 중 하나 이상을 포함하고 "방법"에 대한 언급은 본원에 기재된 방법을 변형시키거나 대체할 수 있는, 당업자에게 공지된 동등한 단계 및 방법에 대한 언급을 포함한다.

[0129] 본 개시내용에 인용된 모든 간행물 및 특허는 그 전문이 참조로 포함된다. 참조로 포함된 자료가 본 명세서와 모순되거나 일치하지 않는 경우, 본 명세서가 임의의 이러한 자료를 대신할 것이다.

[0130] 달리 지시되지 않는 한, 일련의 요소 앞에 오는 용어 "적어도"는 일련의 모든 요소를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 본원에 기재된 본 발명의 구체적 실시양태에 대한 많은 등가물을 단순히 일상적인 실험만을 통해서 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0131] 본 명세서 및 뒤따르는 청구범위 전반에 걸쳐, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다(comprise)", 및 "포함한다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"과 같은 변형은 명시된 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 균의 포함을 의미하나, 다른 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 균의 배제를 의미하는 것은 아니라는 점이 이해될 것이다. 본원에서 사용되는 경우 용어 "포함하는(comprising)"은 용어 "함유하는(containing)"으로 대체될 수 있거나, 때때로 본원에서 사용되는 경우 용어 "갖는(having)"으로 대체될 수 있다

[0132] 본원에서 사용되는 경우 "로 이루어진(consisting of)"은 청구항 요소에 특정되지 않은 임의의 요소, 단계, 또는 성분을 배제한다. 본원에서 사용되는 경우, "로 본질적으로 이루어진(consisting essentially of)"은 청구범위의 기본적인이고 신규한 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 물질 또는 단계를 배제하지 않는다.

[0133] 본원의 각각의 경우에 용어 "포함하는", "로 본질적으로 이루어진" 및 "로 이루어진" 중 임의의 것은 다른 두 용어 중 하나로 대체될 수 있다.

[0134] 본 명세서의 본문 전반에 걸쳐 몇몇 문서가 인용된다. 상기 또는 하기에 있든, 본원에 인용된 문서 각각(모든 특허, 특허 출원, 과학 간행물, 제조업체의 사양, 지침 등을 포함)은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 본원에서의 어떠한 내용도 본 발명이 선행 발명으로 인해 이러한 개시내용보다 선행할 자격이 없음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0135] **실시예**

[0136] 하기 실시예는 본 발명을 예시한다. 이들 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 실

시에는 예시의 목적으로 포함되며 본 발명은 청구범위에 의해서만 제한된다.

재료:

1. 세포주

설명	종	기원	공급원
Caco-2	호모 사피엔스	상피 세포, 결장, 결장직장 선암종	튀빙겐 대학병원 바이러스학 및 역학 연구소(University Hospital Tubingen Institute of Medical Virology and Epidemiology)
Vero E6	아프리카 녹색 원숭이(<i>Cercopithecus aethiops</i>), 신장	상피 세포, 신장, 정상	ATCC (아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)) 카탈로그 번호 CRL-1586
A549	호모 사피엔스	상피 세포, 암종 폐포 기저 상피 세포	ATCC (아메리칸 타입 컬처 컬렉션) 카탈로그 번호 CCL-185
Calu-3	호모 사피엔스	상피 세포, 폐 선암종 세포	ATCC (아메리칸 타입 컬처 컬렉션) 카탈로그 번호 HTB-55;

2. 바이러스

설명	종	공급원
SARS-CoV-2	중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스	SARS-CoV-2 단리주 hCoV-19/독일/FI1103201/2020 (GSAID EPI-ISL_463008) "FI"
SARS-CoV-2 SA 변종	중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스	SARS-CoV-2 단리주 hCoV-19/독일 B.1351 남아프리카 변종 "SA" (210211_SAv)는 2021년 2월에 단리되었으며 B.1.351 SARS-CoV-2 계통에 속한다. 이 단리주는 NGS에 의해 시퀀싱되었고 돌연변이 N501Y, K417N, 및 E484K는 rtPCR에 의해 검출되었다.

3. 약물

ATR-002(PD0184264)[2-(2-클로로-4-요오도페닐아미노)-N-3,4-디플루오로 벤조산], (M = 409,55 g/mol)은 ChemCon GmbH(독일 프라이부르크)에서 합성되었다. 모든 세포 배양 실험을 위해, ATR-002의 10mM 원액을 DMSO(Merck-Millipore, 독일 님슈트타)에서 제조하고 각 배지에 추가로 희석하였다.

실시예 1: SARS-CoV-2는 MEK 경로를 사용한다

본 초기 실험에서, 본 발명자들은 MEK 경로의 억제제가 바이러스 전파의 억제를 유도하는지 여부를 알아내는 데 관심이 있었다. ATR-002는 숙주 세포 인자 MEK를 표적화하지만, ATR-002의 용량-반응 관계는 바이러스가 아니라 키나제의 억제와 관련된다. 시험관내 실험에서, ATR-002의 항바이러스 효능은 실험을 위해 사용된 세포주에서 MEK의 활성화 상태에 크게 의존한다. 하기에서 SARS-CoV-2 조사를 위해 사용된 CaCo2 세포주는 높은 구성적 MEK 활성을 나타낸다. 비교로서, Vero 세포에서의 실험을 또한 수행하였다.

방법:

A. 바이러스 수율 감소 분석(VYR)

바이러스 수율 감소 분석을 위해, 95% 컨플루언트 Caco-2 세포를 갖는 24웰 플레이트(Greiner Bio-One, Cat. 662-160)를 준비하였다. 웰을 5% FCS(Capricorn, Cat. FBS-12A), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Sigma Aldrich, Cat. P4333) 및 1% 비펄수 아미노산(NEAA)(Merck, Cat. K 0293)이 보충된 Caco-2 감염 배지 DMEM(Gibco, Cat. 41965-039)으로 1회 세척하였다. 세포를 웰당 200 µL Caco-2 감염 배지에서 1시간 동안 SARS-CoV-2(MOI 0.1)에 감염시켰다. 그 후, 바이러스 접종물을 완전히 제거하고 세포를 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 1% DMSO를 갖는 Caco-2 감염 배지 중의 상이한 농도(100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM, 3.125 µM, 1.56 µM, 0.78 µM, 0.39 µM, 0.195 µM, 0.098 µM, 0 µM)의 ATR-002로 웰당 1mL씩 처리하였다. 상청액을 감염 후 24시간차에 수거하고 4°C에서 최대 속도에서 5분 동안 원심분리하여 세포 파편을 제거하였다. 200 µL의 분취량을 준비하고 -80°C에서 저장하였다. 포스파타제 및 프로테아제 억제제 카테일이 보충된 50 µL의 변형된 RIPA 완충액을 첨가하여 각 웰의 세포층을 용해시키고, 4°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 용해물을 4°C에서 최대 속도에서 5분 동안 원심분리하여 세포 파편을 제거하였다. 용해물을 -80°C에서 저장하였다.

[0149] **B. MEK 억제 시 SARS-CoV-2에 의한 Vero 세포의 플라크 분석 감염**

[0150] 바이러스 역가를 결정하기 위해 표준 플라크 분석을 수행하였다. Vero 세포를 SARS-CoV-2 스트레인 FI(MOI 0.01)에 감염시켰다. 감염 1시간 후, 세포를 50 μ M ATR-002 또는 대조군으로서 각각의 양의 DMSO로 처리하였다. 화합물은 완전한 감염 시간 동안 배양 배지에 존재하였다. 24, 36 및 48 hpi 후, 상청액을 수집하고 하기의 플라크 분석으로 바이러스 역가를 정량화하였다. 3개의 생물학적 복제물을 사용한 단일 실험의 데이터는 **도 2a**에 도시한다.

[0151] Vero E6 세포를 6웰 플레이트(Greiner Bio-One, Cat. 657-160)에 100% 컨플루언시로 시딩하였다. 바이러스 샘플의 6배 희석액을 5% FCS(Capricorn, Cat. FBS-12A) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Sigma Aldrich Cat. P4333)이 보충된 Vero E6 감염 배지(IMDM, Gibco, Cat. 12440-053)에서 제조하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂에서 1시간 동안 웰당 1mL의 바이러스 희석액으로 감염시키기 전에 Vero E6 감염 배지로 1회 세척하였다. 그 후, 바이러스 접종물을 완전히 제거하고 세포를 아비셀(Avicel)-배지(1,25% Avicel(FMC BioPolymer, Cat. RC581), 10% MEM(Gibco, Cat. 21430-20), 0,01% DEAE로-텍스트란(Sigma Aldrich, Cat. No.: D9885), 2,8% NaHCO₃(Merck, Cat. No: 1.06329.1000), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Sigma Aldrich, Cat. P4333), 0,2% BSA(Carl Roth, Cat. 9163.4), 1% L-글루타민(Sigma Aldrich, Cat. G7513)으로 오버레이하였다. 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션. 72시간 후, 아비셀-배지를 제거하였다. 세포를 PBS(Gibco, Cat. 14190-094)로 2회 세정하고, 4°C에서 30분 동안 PBS(Lonza, Cat. 17515Q) 중 4% Roti-Histofix(Carl Roth, Cat. A146.1)로 고정하고 크리스탈 바이올렛 용액(ddH₂O 중 1% 크리스탈 바이올렛(Merck, Cat. 1408), 10% 에탄올(SAV-IP, Cat. ETO-5000-99-1))으로 염색하였다. 바이러스 역가를 웰당 플라크 수 및 각각의 희석 계수에 기반하여 계산하였다.

[0152] **C. MEK 억제 시 SARS-CoV-2 감염 동안 바이러스 유전자 RdRP의 검출.** Vero 세포를 FI(MOI 0.01)로 감염시켰다. 감염 1시간 후, 세포를 50 μ M ATR-002 또는 대조군으로서 각각의 양의 DMSO로 처리하였다. 화합물은 완전한 감염 시간 동안 배양 배지에 존재하였다. 24, 36 및 48 hpi 후, 상청액을 수집하고 RNA 추출을 위해 사용하였다. 24, 36 및 48 hpi 후 표준 곡선에 기반한 RdRP 유전자 ml당 외삽된 게놈 카피 수. 3개의 생물학적 복제물을 사용한 단일 실험의 데이터는 **도 2b**에 도시한다.

[0153] **D. Wes 분석**

[0154] ProteinSimple[®]의 Wes[™] 모세관 전기영동을 사용하여 pERK1/2, ERK1/2 및 SARS-CoV-2 핵단백질을 식별하고 정량화하였다. 세포 용해물을 0.1X 샘플 완충액(ProteinSimple, Abingdon, 영국 옥스포드)을 사용하여 라인당 약 50ng 총 단백질로 희석하고 특이적 항체를 사용하여 분석하였다. 1차 항체 pERK1/2(포스포-p44/42 MAPK(Erk1/2)(Thr202/Tyr204)(D13.14.4E) XP[®] 토끼 항체, Cat. 43702) 및 ERK1/2(p44/42 MAPK(Erk1/2)(137F5) 토끼 mAb, Cat. 4695)는 Cell Signaling Technology(Cell Signaling Technology, 미국 매사추세츠주 댄버스)에서 구입하여 항체 희석제(ProteinSimple, Abingdon, 영국 옥스포드) 중 1:50(pERK1/2의 경우) 및 1:100(ERK1/2) 희석율로 사용하였다. SARS-CoV-2 핵단백질 항체, 단클론 마우스 Ab는 ProSci(Cat. 35.580)에서 구입하여 항체 희석제(ProteinSimple, Abingdon, 영국 옥스포드) 중에서 1 μ g/ml로 사용하였다. WES 분석을 위한 항-토끼 2차 항체(ProteinSimple, Cat. DM-001) 및 항-마우스 2차 항체(ProteinSimple, Cat. DM-002) 및 모든 기타 시약도 ProteinSimple에서 구입하였고 바로 사용할 수 있었다.

[0155] **결과:**

[0156] 상기 방법의 결과는 **도 1** 및 **도 2**에서 볼 수 있다. **도 1**은 SARS-CoV-2(MOI 0.1)에 감염된 CaCo-2 세포를 상이한 농도의 ATR-002로 처리하였을 때, ERK의 억제뿐만 아니라 SARS-CoV-2 및 바이러스 마커인 뉴클레오캡시드 단백질의 억제가 50 및 100 μ M ATR-002 농도에서 관찰되었음을 도시한다. 억제에 필요한 이러한 다량의 ATR-002는 바이러스 역가와 관련이 있는 것이 아니라, 오히려 구성적으로 활성인 MEK를 가져서 MEK의 억제체를 위해 다량이 필요한 CaCo2 세포의 선택으로 인한 것이다. 이들 실험은 SARS-CoV-2가 바이러스 외수송을 위해 MEK 경로를 사용한다는 것을 보여준다.

[0157] 추가적으로, **도 2**는 SARS-CoV-2에 감염되고 50 μ M ATR-002로 처리된 Vero 세포가 24시간, 36시간 및 48시간의 전체 관찰 기간 동안 대조군 세포보다 더 낮은 바이러스 부하를 갖는다는 것을 보여주며, 이는 억제가 단지 바이러스 복제의 지연을 유발한 것이 아니라, 전파를 지속적 방식으로 억제하였다는 것을 시사한다. 이것은 SARS-CoV-2 바이러스 유전자 RdRP의 측정으로 확인되었다.

[0158] 실시예 2: Calu-3 세포에서의 SARS-CoV-2 복제 및 SARS CoV-2 수명 주기에서의 ERK 활성화 및 ATR-002에 의한 억제

[0159] CaCo2 및 Vero 세포에서 나타난 효과를 검증하기 위해, 인간 기관지상피 세포주 Calu-3에서 추가 테스트를 수행하였다. 먼저, SARS-CoV-2가 Calu-3 세포를 감염시킬 수 있는지(A)와 감염이 Calu-3 세포에서 ERK의 활성화(인산화)를 유도하는지(B) 여부를 테스트하였다. 또한, ATR-002가 Calu-3 세포에서 SARS-CoV-2를 억제할 수 있는지(C) 여부를 테스트하였다.

[0160] A. Calu-3 세포의 SARS-CoV-2 감염

[0161] 인간 기관지상피 세포주 Calu-3를 10% 표준화된 태아 소 혈청(FBS Advance; Capricorne), 2 mM L-글루타민, 100 U/mL 페니실린 및 0.1 mg/mL 스트렙토마이신이 보충된 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM)에서 배양하였다. 모든 세포를 37°C 및 5% CO₂에서 가습된 인큐베이터에서 배양하였다. Calu-3 세포를 감염-PBS(0.2% BSA, 1% CaCl₂, 1% MgCl₂, 100 U/mL 페니실린 및 0.1 mg/mL 스트렙토마이신을 함유)에서 SARS-CoV-2 단리주 hCoV-19/독일/FI1103201/2020(EPI-ISL_463008)으로 2의 MOI에서 감염시키거나 모의 감염시켰다. 새로 생성된 SARS-CoV-2 바이러스 입자 및 상청액의 역가를 p.i. 4시간차에서 시작하여 분석하였다. 도 3a는 3회의 독립적인 실험의 결과를 도시한다. 도 3b는 표시된 시점 후에 생성된 웨스턴 블롯 용해물을 도시한다. 도 3c 및 3d는 감염의 시간 경과 동안 SARS-CoV-2 N 및 S 단백질 발현 및 키나제 인산화의 정량화를 도시한다. 3회의 독립적인 실험의 평균 ± SD가 도시되어 있다. 데이터는 일원 ANOVA에 이어서 더넷(Dunnett) 다중 비교 검정(* p ≤ 0.0332; **** p ≤ 0.0001)을 통과하였다. 점선은 0시간 감염 수준을 나타낸다. (c,d) (b)에 도시된 정량화의 예시적인 웨스턴 블롯 분석. 도 3(e)에 도시된 추가 실험에서, Calu-3 세포를 상이한 MOI를 사용하여 SARS-CoV-2(FI)에 감염시켰다. ERK 활성화는 p.i. 1시간차에 분석하였다.

[0162] 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, SARS-CoV-2는 Calu-3 세포에서 복제할 수 있었다. 추가적으로, SARS-CoV-2 감염은 바이러스 수명 주기의 매우 초기 단계에서 ERK 활성화를 유도하는 것으로 나타났다. ERK 활성화는 1 hpi에서 관찰되었다. 바이러스 수명 주기의 후기 단계에서 추가적인 ERK-활성화는 관찰되지 않았으며, 이는 바이러스 감염 동안 초기 과정을 위한 경로 활성화의 가능한 역할을 시사한다.

[0163] B. Calu-3 세포에서 SARS CoV-2에 의한 ERK 활성화

[0164] SARS-CoV-2 수명 주기 동안 Raf/MEK/ERK 경로에서 MEK의 직접적인 표적인 ERK의 중요성을 분석하기 위해, ERK1/2 녹다운을 Calu-3 세포에 도입하였다. 72 h.p.t.에 세포를 SARS-CoV-2에 감염시키고 바이러스 스파이크 단백질의 발현 및 자손 바이러스 입자의 생산을 평가하였다. 도 4(a 내지 c: MOI: 1.0; d: MOI: 0.1)에서 볼 수 있는 바와 같이, ERK-녹다운은 자손 바이러스 역가의 감소된 생산을 초래하는 것으로 밝혀졌다. 도 4a는 p.i. 8 시간차에 분석된 바이러스 S₀ 단백질의 발현을 도시한다. 면역 블롯을 준비하고 항-S, 항-ERK1/2 및 항-튜블린 항체로 프로빙하였다. 3회의 독립적인 실험 중 하나의 결과를 도시한다. 도 4b는 S₀ 단백질 발현 및 녹다운 효능의 정량화를 도시한다. 3회의 독립적인 실험의 평균 ± SD가 도시된다. 데이터는 독립표본 양측 t-검정(unpaired two-tailed t-test)(* p ≤ 0.0332, **** p ≤ 0.0001)을 통과하였다. (a)의 역가는 도 4c에 도시되어 있다. 각각 2반복으로 수행된 3회의 독립적인 실험의 평균 ± SD가 도시된다. PFU/ml: 데이터는 웰치(Welch) 보정을 사용한 독립표본 양측 t-검정을 통과하였다. 백분율: 데이터는 대응표본 양측 t-검정(paired two-tailed t-test)을 통과하였다(* p ≤ 0.0332; *** p ≤ 0.0002). 도 4d는 p.i. 24시간차의 역가 분석을 도시한다. 각각 2반복으로 수행된 3회의 독립적인 실험의 평균 ± SD가 도시된다. PFU/ml: 데이터는 웰치 보정을 사용한 독립표본 양측 t-검정을 통과하였다. 백분율: 데이터는 대응표본 양측 t-검정을 통과하였다(* p ≤ 0.0332; **** p ≤ 0.0001).

[0165] 따라서, ERK의 녹다운은 스파이크 단백질의 발현 및 자손 바이러스 입자의 생산의 감소를 유도하는 것으로 나타났다, 이는 바이러스 수명 주기 동안의 ERK의 역할을 확인시켜줄 뿐만 아니라 유전적 수단에 의해 SARS-CoV-2 전파에서 MEK/ERK 키나제 모듈의 기능을 검증한다.

[0166] C. ATR-002는 Calu-3 세포에서 SARS-CoV-2를 억제할 수 있다

[0167] 그 다음, MEK 억제제가 실시예 1의 CaCo2 및 Vero 세포에서 나타난 감소와 유사한 방식으로 Calu-3 세포에서 SARS-CoV-2 역가를 감소시킬 수 있는지 여부를 테스트하였다. Calu-3 세포를 SARS-CoV-2에 감염시키고 실시예 1과 동일한 바이러스 수율 프로토콜을 사용하여 100 μM, 75 μM 또는 50 μM ATR-002로 처리하였다. 구체적으로, 바이러스 수율 감소 분석을 위해 95% 컨플루언트 Vero E6, CaCo2 및 Calu-3 세포를 갖는 24웰 플레이트를 준비

하였다. 웰을 웰당 200 μ L 감염 배지에서 1시간 동안 SARS-CoV-2 SA(MOI 0.1, 1 및 10)에 감염시키기 전에 감염 배지로 1회 세척하였다. 이후, 바이러스 접종물을 완전히 제거하고, 웰을 감염 배지로 1회 세척한 다음, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 24시간 동안 1% DMSO를 갖는 감염 배지 중의 상이한 농도의 ATR-002(100 μ M, 75 μ M, 50 μ M, 0 μ M)로 웰당 1mL씩 처리하였다. 각각의 조건에 대해 3개의 웰을 준비하였다. 조건당 3개 웰의 상청액을 감염 후 24시간차에 모으고 4 $^{\circ}$ C에서 최대 속도에서 5분 동안 원심분리하여 세포 파편을 제거하였다. 상청액 중 140 μ L의 분취량을 준비하고 -80 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. 샘플의 바이러스 역가를 기술적 3반복으로 RT-qPCR(실시간 정량적 폴리머라제 연쇄 반응)을 통해 결정하였다. 따라서, 바이러스 RNA를 단리하고 바이러스 RNA 카피의 검출에 사용된 프로브를 SARS-CoV-2 N 유전자에 대해 지시하였다.

[0168] 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 모든 세포 유형에서 보이는 효과는 유사하였다.

[0169] 다음 단계에서, Calu-3 세포를 증가되는 양의 ATR-002과 함께 24, 48 또는 72시간에 걸쳐 인큐베이션하였다. 구체적으로, Calu-3 세포를 0.01의 MOI를 사용하여 SARS-CoV-2(FI)에 감염시켰다. p.i. 1시간차에 세포를 ATR-002로 처리하였다. 모의, SARS-CoV-2 및 DMSO는 대조군으로서 사용하였다. 도 6a는 ATR-002(10 내지 150 μ M) 처리 후 Calu-3 세포에서 SARS-CoV-2의 역가 감소를 도시한다. 미처리(SARS-CoV-2) 및 DMSO(0.1%) 처리된 세포는 음성 대조군으로서 사용하였다. 데이터는 각각 3반복으로 수행된 3회의 독립적인 실험의 평균 \pm SD를 나타낸다. 데이터는 각 시점에 대해 개별적으로 일원 ANOVA에 이어서 더넷 다중 비교 검정(** $p \leq 0.0021$; *** $p \leq 0.0002$; **** $p \leq 0.0001$)을 통과하였다. DMSO를 참조로서 사용하였다. 도 6b는 (a)로부터의 값의 EC50 계산을 도시한다. (c)와 조합된 데이터를 사용하여 CC50 값 및 선택도 지수(SI)를 계산하였다. 도 6c는 72시간 처리 후 Calu-3 세포에서의 ATR-002의 세포독성 평가를 도시한다. 데이터는 3회의 독립적인 실험의 평균 \pm SD를 나타낸다. 도 6d는 (a)의 3회의 독립적인 실험 중 하나의 광학현미경 사진을 도시한다. 본 발명자들은 자손 바이러스 입자의 생산의 농도 의존적 감소를 관찰할 수 있었다. 무독성 농도 범위에서. 이러한 효과는 72시간의 총 감염 시간 동안 유지되었으며, 이는 ATR-002를 사용한 경로 역제가 바이러스 수명 주기에 장기간 효과를 미친다는 것을 시사한다.

[0170] 실시예 3: SARS-CoV-2 SA 변종 B.1351에 대한 ATR-002의 시험관내 효능

[0171] ATR-002가 남아프리카 SARS-CoV-2 변종 B.1351에 대해 효과적인지 여부를 알기 위해 실시예 1 및 2와 동일한 실험 설정을 사용하였다. 도 5와 비교하여 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이, Vero 세포와 Calu-3 세포를 0.1, 1, 10의 MOI에서 SARS-CoV-2 SA에 감염시키고 20.48, 30.72, 40.96 μ g/ml(50, 75, 100 μ M에 상응함) ATR-002로 처리하였다.

[0172] 구체적으로, 바이러스 수율 감소 분석을 위해, 95% 컨플루언트 Vero E6 및 Calu-3 세포를 갖는 24웰 플레이트를 준비하였다. 웰을 웰당 200 μ L 감염 배지에서 1시간 동안 SARS-CoV-2 SA(MOI 0.1, 1 및 10)에 감염시키기 전에 감염 배지로 1회 세척하였다. 이후, 바이러스 접종물을 완전히 제거하고, 웰을 감염 배지로 1회 세척한 다음, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 24시간 동안 1% DMSO를 갖는 감염 배지 중의 상이한 농도의 ATR-002(100 μ M, 75 μ M, 50 μ M, 0 μ M)로 웰당 1mL씩 처리하였다. 각각의 조건에 대해 3개의 웰을 준비하였다. 조건당 3개 웰의 상청액을 감염 후 24시간에 모으고 4 $^{\circ}$ C에서 최대 속도에서 5분 동안 원심분리하여 세포 파편을 제거하였다. 상청액 중 140 μ L의 분취량을 준비하고 -80 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. 샘플의 바이러스 역가를 기술적 3반복으로 RT-qPCR(실시간 정량적 폴리머라제 연쇄 반응)을 통해 결정하였다. 따라서, 바이러스 RNA를 단리하고 바이러스 RNA 카피의 검출에 사용된 프로브를 SARS-CoV-2 N 유전자에 대해 지시하였다.

[0173] 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이, ATR-002에 의한 바이러스 수율 감소는 SARS-CoV-2 SA 변종의 경우 Vero와 Calu-3 둘 다에서 볼 수 있다.

[0174] 실시예 4: ATR-002는 급성 폐 손상(ALI) 마우스 모델에서 사이토카인 및 케모카인 유전자 발현을 감소시킨다

[0175] LPS 유도된 사이토카인 및 케모카인 발현의 ALI 마우스 모델은 생체내 바이러스 감염의 부재 하에 ATR-002의 면역조절 효능을 조사할 수 있게 한다.

[0176] 방법:

[0177] 마우스를 케타민(10 mg/kg) 용액을 i.p. 주사하여 마취시켰다. 두 처리군 모두를 i.p 경로를 통해 PBS에서 제조된 5mg/kg LPS로 자극하였다. 자극 1시간 후, 처리군을 i.p 경로를 통해 25 mg/kg ATR-002로 처리하였다. 처리 6시간 후 마우스를 안락사시키고 폐를 RNAlater에서 직접 보존하였다. RNA를 제조업체의 지침에 따라 RNeasy plus universal Midi 키트(Qiagen, 독일 힐덴)를 사용하여 폐로부터 단리하였다. RNA 용출을 RNase 무함유 물

을 사용하여 2라운드로 수행하고 추가 분석을 위해 -20°C에서 저장하였다. RNA 품질을 NanoDrop 분광광도계 (ThermoFisher Scientific)를 사용하여 결정하고 RT² First Strand 키트(Qiagen, 독일 힐텐)를 사용하여 역전사 시켰다. 이후, cDNA는 RT² SYBR[®] Green qPCR Mastermix와 조합하여 실시간 RT² 프로파일러 PCR 어레이에서 사용하였다. 최적의 성능을 위해, 어레이를 데이터 정규화를 위해 사용될 84개의 유전자와 5개의 하우스-키팅 유전자를 포함하도록 맞춤화하였다. 품질 관리를 위해, 마우스 게놈 DNA 오염 테스트, 3가지의 역전사 효율 테스트 및 3가지의 PCR 어레이 재현성 테스트를 포함시켰다. 중등도 및 중증 COVID-19에 관여하는 사이토카인 및 케모카인을 코딩하는 유전자의 발현 결과가 제시된다.

[0178] 다음의 서열을 사용하였다:

유전자	GeneBank 수탁번호	Uniprot 수탁번호	종
TNF	NM_013693	P06804	종
IL-1b	NM_008361	P10749	
IP-10	NM_021274	P17515	
CXCL1			
(KC)(IL8)	NM_008176	P12850	마우스
MCP-1	NM_011333	P10148	
MIP-1β	NM_013652	P14097	

[0179]

[0180] **결과:**

[0181] 도 8은 ALI 마우스의 ATR-002 처리가 사이토카인 TNF-알파, IL-1베타, IP-10, IL-8, MCP-1 및 MIP-1베타의 감소를 유도한다는 것을 도시한다. 상기 배경 섹션에서 논의한 바와 같이, 후양 등에 따르면, 이러한 모든 사이토카인은 COVID-19 환자에서 증가되고, TNF-알파, IP-10 및 MIP-1베타는 II기 COVID-19로 인한 입원 시 수준과 비교하여 III기 COVID-19 환자에서 증가한다. 이는, SARS-CoV-2 감염과 무관하게, ATR-002가 포유동물에서 사이토카인 및 케모카인 유전자 발현을 감소시킬 수 있음을 시사한다.

[0182] **실시예 5: ATR-002는 CaCo2 세포 및 Calu-3 세포에서 SARS-CoV-2 감염 후 염증촉진성 사이토카인/케모카인 반응을 감소시킨다**

[0183] CaCo2 세포를 실시예 1에 설명된 바와 같이 SARS-CoV-2에 감염시키고 ATR-002로 처리하였다. MCP-1의 양을 측정하였고 그 결과를 도 9에 도시한다. 구체적으로, ATR-002는 SARS-CoV-2 감염된 세포에서 MCP-1 발현을 감소시킬 수 있다. 그러나, 실시예 1에서 논의된 바와 같이 이를 위해서는 다량의 ATR-002가 필요하며, 이는 CaCo2 세포에서 MEK 경로의 구성적 활성화 때문이다. 체세포 드라이버 돌연변이로 인해, SARS-CoV-2 감염된 CaCo2 세포에서 MCP-1 발현을 억제하기 위해 다량의 ATR-002가 요구된다. 본 발명자들은 ATR-002가 Calu-3 세포에서 염증촉진성 사이토카인의 발현을 감소시킬 수 있는지에 대한 의문을 추가로 다루었다. 따라서, 본 발명자들은 실시예 2에 설명된 바와 같이 Calu-3 세포를 SARS-CoV-2에 감염시키고 증가되는 양의 ATR-002로 처리하였다. Calu-3 세포를 0.01의 MOI를 사용하여 SARS-CoV-2(FI)에 감염시켰다. p.i. 1시간차에 세포를 ATR-002로 처리하였다. 모의, SARS-CoV-2 및 DMSO는 대조군으로서 사용하였다. 정량적 실시간 PCR에 의한 IL-6, IL-8, MCP-1, IP-10 및 CCL5 mRNA의 발현 분석. 결과는 모의 감염된 세포의 n배 mRNA 발현으로서 도 10에 도시한다. 데이터는 각각 3반복으로 수행된 3회의 독립적인 실험의 평균 ± SD를 나타낸다. 데이터는 각 시점에 대해 개별적으로 일원 ANOVA에 이어서 더넷 다중 비교 검정(* p≤0.0332; ** p≤0.0021; *** p≤0.0002; **** p≤0.0001)을 통과하였다. DMSO를 참조로서 사용하였다. 결과는 ATR-002가 이전 실시예에 나타낸 바와 같이, 자손 바이러스 입자의 생산을 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라, 나아가 염증촉진성 사이토카인의 발현을 감소시킬 수 있음을 확인시켜 준다. 이는 바이러스 감염 동안 사이토카인 폭풍의 가능성을 감소시키는 ATR-002 처리의 추가적인 이점이다.

[0184] 제2 단계에서는, 항-바이러스 인터페론 및 염증촉진성 사이토카인의 발현에 미치는 ATR-002 처리의 일반적인 효과를 조사하기 위해, A549 세포를 폴리I:C로 24시간 동안 형질감염시켰다. 동시에, 세포를 증가되는 양의 ATR-002로 처리하였다. DMSO는 대조군으로서 사용하였다. ATR-002에 의한 MEK 억제는 IFN 반응에 영향을 미치지 않지만 폴리(I:C) 자극 후 염증촉진성 IL-8 발현을 감소시키는 것으로 밝혀졌다.

[0185] 구체적으로, 인간 폐 상피 A549 세포(2x10⁵/ml)를 리포펙타민 2000을 통해 100 ng/ml 폴리(I:C)로 형질감염시키고 표시된 농도에서 MEK 억제제 ATR-002로 24시간 동안 처리하였다. 형질감염 배지는 형질감염 6시간 후에 교체하였다. 비자극된 대조군을 또한 동등한 농도의 자극된 세포에서 리포펙타민을 함유하는 형질감염 배지에 노

출시했다. 이들 실험의 결과는 도 11에 도시한다. 도 11a는 24시간의 억제제 처리 후에 취하고 pERK/ERK, pSTAT/STAT 및 튜블린에 대한 1차 항체를 사용한 면역블롯팅에 의해 분석한 웨스턴 블롯팅의 세포 용해물을 도시한다. 단백질 발현은 HRP-연결된 2차 항체 및 강화된 화학발광에 의해 검출하였다. 도 11b에서 RNA를 보충된 프로토콜에 따라 Qiagen Rneasy 미니 키트를 사용하여 24시간의 억제제 처리 후에 분리하였다. LightCycler 480(Roche)에서 합성된 cDNA, SYBR Green 및 상응하는 프라이머 쌍을 사용하여 RT-qPCR을 수행하여 MxA 및 IL8 mRNA 발현 수준을 결정하였다. 데이터는 각각 3반복으로 수행된 3회의 독립적인 실험의 평균 \pm SD를 나타낸다. 데이터는 각 시점에 대해 개별적으로 일원 ANOVA에 이어서 더넷 다중 비교 검정(** $p \leq 0.0021$; *** $p \leq 0.0002$)을 통과하였다. 모의를 참조로 사용하였다. ATR-002 처리는, MxA mRNA의 지속적인 발현에 대해 나타난 바와 같이, 항-바이러스 인터페론 시스템의 자극에 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다. 대조적으로, ATR-002의 낮은 농도를 사용했을 때에도 염증촉진성 IL8 발현의 강력한 감소가 발견되었다.

[0186] **실시예 6: ATR-002는 말초혈 단핵 세포(PMBC)에서 염증촉진성 사이토카인/케모카인 반응을 감소시킨다**

[0187] 사이토카인 감소에 필요한 ATR-002 농도를 확인하기 위해, IP10, TNF-알파 및 MCP-1 발현량을 ATR-002 처리 후 LPS 유도된 PMBC 세포에서 연구하였다. 도 12에서 볼 수 있는 바와 같이, 3가지 모두 10 μ g/ml의 ATR-002 처리 후 감소되었으며, 이는 10 μ g/ml ATR-002가 인간 PMBC에서 LPS 유도된 MCP-1의 >90%를 억제하기에 충분함을 시사한다.

[0188] 추가 연구에서, 특정 사이토카인의 방출로 측정되는, 인간 T-세포 염증을 억제하는 화합물 ATR-002의 능력을 연구하였다. 이 화합물은 세(3)명의 인간 공여자로부터의 말초혈 단핵 세포(PMBC) 및 24시간의 노출 시간을 사용하여 생물학적 3반복으로 세(3)가지 농도(100, 50 및 25 μ M)에서 테스트하였다. 항-CD3, ConA 및 PHA는 T-세포 자극제로서 개별적으로 사용하였다.

[0189] **방법:**

[0190] **T-세포 염증 억제 분석 프로토콜(항-CD3 자극)**

[0191] 1일차

[0192] · 고 결합 플레이트를 PBS 1x를 사용하여 항-CD3(클론 UCHT-1, 100 ng/웰) 및 이소형 IgG1로 코팅하고 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0193] 2일차

[0194] · 냉동보존된 PMBC를 적하 해동하고 적절한 밀도로 희석하고 웰당 228 μ L의 배양 배지(RPMI 1640, 10% 열-불활성화 FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 2mM L-글루타민)를 U 바닥 96웰 폴리프로필렌 플레이트에 시딩하였다.

[0195] · 세포를 테스트 화합물을 첨가하기 전에 37°C, 5% CO2에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0196] · 테스트 화합물을 PBS에 용해시키고 세포 배양 배지로 20X로 추가 희석하였다. 테스트 화합물을 12 μ L(1X)의 용적으로 PMBC에 3반복으로 첨가하고 37°C, 5% CO2에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0197] · 참조 화합물의 경우, 12 μ L의 텍사메타손(100nM)을 플레이트 맵에 따라 대조군 웰에 첨가하고 37°C, 5% CO2에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0198] · 1시간 인큐베이션 후, 테스트 화합물 또는 대조군으로 처리된 200 μ L의 세포(1x105)를 항-CD3 코팅된 플레이트로 옮기고 37°C, 5% CO2에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.

[0199] · 양성 및 음성 대조군의 경우, 200 μ L(1x105)의 세포를 항-CD3 또는 이소형 IgG1을 갖는 코팅된 플레이트로 옮겼다.

[0200] · 플레이트를 200 x g에서 10분 동안 원심분리하였다. 세포 배양 상청액을 수집하고 분석에 필요할 때까지 -80°C에서 저장하였다.

[0201] **T-세포 염증 억제 분석 프로토콜(ConA 및 PHA 자극)**

[0202] · 냉동보존된 PMBC를 점적 해동하고 적절한 밀도로 희석한 후 웰당 150 μ L의 배양 배지(RPMI 1640, 10% 열-불활성화 FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 2mM L-글루타민)를 96웰 폴리스티렌 플레이트(웰당 2 x105 세포)에 시딩하였다.

[0203] · 세포를 테스트 화합물을 첨가하기 전에 37°C, 5% CO2에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

- [0204] · 테스트 화합물을 DMSO에 용해시키고 세포 배양 배지로 20X로 추가 희석하였다. 화합물을 10 μL(1X) 용적으로 PBMC에 3반복으로 첨가하고 37°C, 5% CO₂에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0205] · 참조 화합물의 경우, 10 μL의 텍사메타손(100 nM)을 플레이트 맵에 따라 대조군 웰에 첨가하고 37°C, 5% CO₂에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0206] · 1시간 인큐베이션 후, 40 μL의 ConA(30 μg/mL) 및 PHA(10 μg/mL)를 테스트 화합물 또는 대조군 웰에 첨가하여 200 μL의 최종 분석 용적을 제공하였다. 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0207] · 대조군을 10 μL의 희석된 작업 스톱의 용적으로 PBMC에 첨가한 후, 화합물 첨가를 모방하기 위해 적절하게 희석된 비히클 10 μL를 첨가하여, 200 μL의 최종 분석 용적을 제공하였다. 분석에서 최종 DMSO 비히클 농도는 0.1%였다.
- [0208] · 24시간 인큐베이션 후, 플레이트를 200 x g에서 10분 동안 원심분리하였다. 세포 배양 상청액을 수집하고 분석에 필요할 때까지 -80°C에서 저장하였다.
- [0209] **데이터 분석 및 분석물 검출 한계**
- [0210] **측정된 사이토카인/케모카인**
- [0211] **항-CD3 자극**
- [0212] GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, MIP-1 α 및 TNF α
- [0213] **ConA 자극**
- [0214] GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-1RA, IL-6, MIP-1 α 및 TNF α
- [0215] **PHA 자극**
- [0216] IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, MIP-1 α 및 TNF α
- [0217] 모두 Luminex 분석 완충액에 1:20 희석된 세포 배양 상청액에서 사이토카인 수준의 Luminex 평가를 표준 범위 3.23.2, 16, 80, 400, 2000, 10,000 pg/mL로 Millipore Sigma로부터의 인간 사이토카인/사이토카인 자기 비드 패널(카탈로그 번호 HCYTOMAG-60K)을 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 수행하였다.
- [0218] 각 사이토카인의 유도 수준을 5점 비선형 회귀 분석을 사용하여 표준 곡선으로부터 보간하였으며, 여기서 y는 $(A + ((B - A) / (1 + (((B - E) / (E - A)) * ((x / C)^D))))$ 이다. 중간 형광 단위 형태의 원시 데이터를 테스트 농도(pg/mL)로 보간하였다.
- [0219] **결과:**

[0220] 자극과 비교한 P-값(요약됨)

	PHA				ConA				항-CD3			
	텍사메 타손	40μ g/ml	20μ g/ml	10μ g/ml	텍사메 타손	40μ g/ml	20μ g/ml	10μ g/ml	텍사메타 손	40μ g/ml	20μ g/ml	10μ g/ml
GM- CSF					0,0002	0,00 01	0,00 01	0,00 28	0,0001	0,00 01	0,00 01	0,00 01
IFNγ	0,0001	0,00 01	0,00 01	0,00 01	0,0001	0,00 01	0,00 01	0,00 01	0,0001	0,00 01	0,00 01	0,00 01
IL-10	0,0151	0,01 95	0,70 9	0,94 6					0,0001	0,00 01	0,00 01	0,00 01
IL-13	0,0008	0,00 01	0,01 81	0,45 86								
IL-17									0,0001	0,00 01	0,00 01	0,00 01
IL- 1RA					0,0001	0,00 01	0,70 69	0,99 9				
IL-1β	0,0023	0,00 01	0,01 51	0,46 6	0,003	0,00 01	0,00 01	0,00 12	0,0001	0,00 01	0,00 01	0,00 01
IL-2	0,0001	0,00 01	0,00 01	0,00 01					0,0001	0,00 01	0,00 01	0,00 01
IL-4	0,0001	0,00 01	0,01 94	0,53 95								
IL-5	0,0001	0,00 01	0,00 23	0,32 91								
IL-6	0,0302	0,00 2	0,00 31	0,05 88	0,0002	0,00 01	0,00 01	0,00 01	0,0001	0,00 01	0,00 01	0,00 01
IL-8	0,002	0,00 03	0,00 27	0,07 45					0,0001	0,00 01	0,00 01	0,00 01
MIP- 1a	0,001	0,00 01	0,00 7	0,22 04	0,0001	0,00 01	0,00 01	0,68 7	0,0001	0,00 01	0,00 01	0,00 01
TNFα	0,0002	0,00 01	0,00 01	0,00 28	0,0012	0,00 01	0,00 04	0,03 36	0,0001	0,00 01	0,00 01	0,00 01

[0221]

[0222] 요약:

[0223] ATR-002는 도 14에서 볼 수 있는 바와 같이 항-CD3 자극, ConA 자극 및 PHA 자극으로 사이토카인/케모카인 자극의 유의한 용량 의존적 억제제를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 텍사메타손 억제제는 감소된 사이토카인/케모카인 분비를 제어하여 분석의 성능을 확인시켜 준다.

[0224] 실시예 7:

[0225] RESPIRE - 중등도 코로나바이러스 질환(COVID-19)을 갖는 입원한 성인 환자에서 ATR-002의 안전성 및 효능을 평가하기 위한 무작위화, 이중 맹검, 위약 대조, 임상 연구(Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Clinical Study to Evaluate the Safety and Efficacy of ATR-002 in Adult Hospitalized Patients with Moderate Coronavirus Disease (COVID-19)). 본 연구의 주요 목적은 15일차에 임상적 중증도 상태에 의해 평가된 COVID-19 환자의 치료에서, 각각 표준 치료인 위약과 비교하여 ATR-002의 효능을 입증하는 것이다. ATR-002는 (1) 항바이러스제 및 (2) 면역조절(사이토카인 폭풍을 방해하기 위한)인 이중 이점(효과)이 있는 이의 작용 방식으로 인해 COVID-19를 치료할 가능성을 갖는다. 본 임상 연구는 중등도 코로나바이러스 질환 II기를 앓고 있는 총 200명의 성인 입원 환자를 등록할 것이다. 이후 SARS-CoV-2의 존재를 확인하기 위해 무작위화 직전에 비인두 면봉을 채취할 것이다.

[0226] 모든 무작위화된 환자는 지역 표준에 따라 표준 치료를 받게 될 것이다. 100명의 환자는 ATR-002 900mg을 1일 1회 경구 투여받도록 무작위화되고, 100명의 환자는 매치되는 위약을 투여받게 될 것이다. ATR-002 또는 위약은 5

일 동안 대조된 이중 맹검 방식으로 제공될 것이다.

[0227] 연구의 주요 목적은 7점 서수 스케일 [1] 입원하지 않음, 제한 없음, [2] 입원하지 않음, 제한 있음, [3] 입원함, 보충 산소가 필요하지 않음, [4] 입원함, 보충 산소가 필요, [5] 입원함, 비침습적 환기 또는 고유량 산소장치 사용, [6] 입원함, 침습적 기계 환기 또는 ECMO 사용, [7] 사망에서 임상적 중증도 상태로 측정된, 위약 대비 ATR-002의 효능을 평가하는 것이다. 2차 결과는 임상 징후 및 증상, 환자가 보고한 결과, 치료 관련 이상반응, 심각한 이상반응, 도출된 임상 매개변수, 점수 및 연구 사건, 실험실 값 및 ATR-002 혈장 수준의 변화뿐만 아니라, 정량적 SARS-CoV-2 샘플의 변화에 의해 측정될 것이다.

[0228] 모든 환자는 안전상의 이유로 그리고 생존 상태를 결정하기 위해 연구 약물 처리의 종료 후 90일차까지 추적 관찰될 것이다.

[0229] 연구를 위해 선택된 환자는 스크리닝 시 입원을 필요로 하는 18세 이상의 성인이며, 37.3℃(겨드랑이) 이상, 38.0℃(구강) 이상 또는 38.6℃(직장 또는 고막) 이상의 온도로서 정의된 발열 및 실내 공기에서 SpO₂ ≤94%를 갖거나 SpO₂>94%를 유지하기 위해 보충 산소를 필요로 하는 것으로 정의된 COVID-19 감염의 임상 징후를 나타낸다. 첫 번째 환자는 2021년 4월 14일에 치료를 받았지만, 치료 결과는 아직 입수가 가능하지 않다. 그러나, 본 발명자들은 ATR-002가 II기 COVID-19 환자를 치료하고 II기에서 III기 COVID-19로의 전환과 관련된 사이토카인 폭풍을 예방하는 데 효과적인 것으로 입증될 것이라고 확신한다.

[0230] 실시예 8:

[0231] 시리안 햄스터 감염 모델에서 SARS-COV-2에 대한 ATR-002의 효능

[0232] 본 연구의 목적은 햄스터 모델에서 SARS-CoV-2 챌린지 후 화합물 ATR-002의 치료 효능을 조사하는 것이었다. 동물을 100mg/kg 부하 용량에 이어서 75mg/kg로 1일 1회 처리하였다. 이는 상기 실시예 7에서 사용된 900mg 부하에 이어서 1일 1회 600mg의 인간 등가 용량을 의미한다.

[0233] 방법

[0234] 햄스터 모델에서 SARS-COV-2를 치료하는 데 있어 ATR-002의 효능을 조사하기 전에, 3가지 상이한 용량을, 이들 용량을 사용하였을 때 Raf/MEK/ERK 신호전달 경로를 80% 초과로 억제하고 결과적으로 SARS-CoV-2의 생체내 감염에 대해 효과적인 순환 수준이 도달될 것으로 예상된 경구 경로에 의해 테스트하였다. 본 연구의 결과를 사용하여 효능 연구에서 투약 수준 및 요법(regimen)을 결정하였다. 동물을 비강내 감염에 의해 1x10³ TCID₅₀ SARS-CoV-2(복제 적격 바이러스의 양)에 감염시켰다. 처리 요법은 다음과 같이 정의되었다:

군	군당 동물의 수	처리 요법	처리 요법 및 용량			
			0 일	1 일	2 일	3 일
1	6	치료 화합물 p.i. 4 시간차	a.m. 100mg/kg	a.m. 75mg/kg	a.m. 75mg/kg	a.m. 75mg/kg
2	6*	치료 화합물 p.i. 24 시간차	없음	a.m. 100mg/kg	a.m. 75mg/kg	a.m. 75mg/kg
3	6	치료 비히클 p.i. 4 시간차	a.m. 비히클	a.m. 비히클	a.m. 비히클	a.m. 비히클

[0235] *1마리의 동물이 흡인성 폐렴으로 사망하였고, 따라서 5마리만이 결과에 표시된다.

[0237] SARS-CoV-2에 감염된 햄스터의 처리는 감염 후(p.i.) 4시간 또는 24시간차에 100mg/kg 부하 용량의 ATR-002로 시작한 후, p.i. 3일차까지 75mg/kg ATR-002로 매일 처리하였다. 복제 적격 바이러스의 양(TCID₅₀)을 결정하기 위해 p.i. 3일차에 인후 면봉을 채취하였다. p.i. 4일차에 동물을 안락사시키고, 감염성 바이러스 역가의 정량

화를 위해 비갑개를 수집하고, 폐엽을 이환된 부위에 대해 검사하였다.

[0238] 동물

종	시리안 햄스터 (메소크리세투스 아우라투스(<i>Mesocricetus auratus</i>))
공급업체	Janvier
미생물학적 상태	SPF
수	36마리
성별	수컷
연령	실험 시작 시 약 7 내지 9주령
체중 범위	약 100 내지 50그램
식별	동물은 실험을 시작하기 전에 동물 마커를 사용하여 고유하게 식별되었다.

[0239]

[0240] 동물 취급

[0241] 마취

[0242] 모든 동물 절차마다, 동물을 이소플루란(3 내지 4%/O₂)으로 진정시켰다.

[0243] 경구 투여당

[0244] 테스트 항목의 경구 투여는 500 μl/150g의 용적의 설명된 용량으로 위관 바늘을 사용하여 수행하였다. 따라서, 동물을 칭량하고 사용되는 용량 용적을 기록된 체중에 따라 조정하였다. 그 다음, 동물을 회복 동안 모니터링하였다.

[0245] 비강내 투여

[0246] 비강내 투여를 위해, 동물을 등에 업고 피펫을 사용하여 점종물(100ul)을 양쪽 비공에 균등하게 분배하였다. 완전한 점종물이 흡입될 때까지 동물을 등에 업고 있다가, 이후 회복을 위해 다시 케이지에 넣었다.

[0247] 임상 관찰

[0248] 관찰은 실험실 기술자에 의해 매일 켈린지 후에 동물 시설 기술자에 의해 매일 수행되고 기록되었다(동물 복지 및 임상 관찰). 여기에는 헝클어진 털, 등을 구부린 자세, 가속된 호흡 및 혼수 상태가 포함되며 관찰 시 기록되었다.

[0249] 동물은 연구 동안 전자 저울을 사용하여 정기적인 시점에서 칭량하였다(내부 개별 저울 번호 및 성능은 적절한 양식으로 문서화될 것이다). 체중을 적절한 양식으로 기록하였다.

[0250] 예방조치

[0251] 취해야 할 예방조치는 동물의 취급, 날카로운 물건의 조작 및 BSL(DM)3 조건 하의 작업에 대한 예방조치였다(외부 전임상 시설 매뉴얼).

[0252] 접종 후 샘플링

[0253] 호흡기도를 연구 동안 정기적인 시점에서 샘플링하였다. 요컨대, 인후 면봉을 바이러스 수송 배지에 수집하고 분취하고 저장하였다. 부검 시, 조직 샘플을 수집하고 조직병리학을 위해 10% 포르말린 중에 저장하고 바이러스 분석을 위해 동결시켰다. 바이러스학적 분석을 위해, 조직 샘플을 칭량하고 감염 배지에서 균질화하고 역가측정 전에 잠시 원심분리하였다.

[0254] 맹검/편향-감소 방법

[0255] 데이터의 해석이 필요한 임상 관찰 및 실험실 분석을 수행하는 모든 직원은 연구가 완료되기 전 임의의 시점에서 무작위 처리 할당 키(Random Treatment Allocation Key)를 알지 못하였고, 고유한 샘플 번호를 수집된 각 샘플에 할당함으로써 블라인드되었다.

[0256] 복제 적격 바이러스의 검출

[0257] 상술한 바와 같이 Vero E6 세포의 컨플루언트 층에서 바이러스 역가를 결정하기 위해 4중 10배 연속 희석을 사용하였다(Vero E6 세포에서의 SARS-CoV-2 역가측정). 이를 위해, 샘플(인후 면봉 및 조직 균질물)의 연속 희석액을 제조하고 37도에서 1시간 동안 Vero E6 단층에서 인큐베이션하였다. Vero E6 단층을 세척하고 37도에서 4 내지 6일 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 WST8(비색 평가)을 사용하여 점수를 매겼다. 플레이트를 마이크로

플레이트 판독기를 사용하여 450nm(OD450)에서 광학 밀도에 대해 측정하였다. 바이러스 역가(TCID₅₀)는 스피어맨-카버(Spearman-Karber)의 방법을 사용하여 계산하였다.

[0258] **바이러스 RNA의 검출**

[0259] 이후 면봉과 균질화된 조직 샘플을 사용하여 바이러스 RNA를 검출하였다. 이를 위해, RNA를 단리하고, 코르만 (Corman) 등(Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3))에 의해 설명된 바와 같이 특이적 프라이머(E_사베코_F: ACAGGTACGTTAATAG TTAATAGCGT 및 E_사베코_R: ATATTGCAGCAGTACGCACACA) 및 프로브(E_Sarbeco_P1: AACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG)를 사용하여 Taqman PCR 을 수행하였다. 상이한 샘플 중의 바이러스 카피의 수를 계산하였다.

[0260] **육안-병리학**

[0261] 모든 동물(감염 후 죽은 것으로 발견되거나, 인도적 종점에 도달하여 안락사되거나, 실험적 종점에 도달함)에 대한 부검 시, 육안 병리학을 각 동물에 대해 수행하고 모든 이상을 기재하였다. 모든 폐엽을 검사하고, 등쪽에서 보아서 이환된 폐 조직의 백분율 추정을 기재하였으며, 또한 전신 육안 병리학 동안 다른 장기에서 관찰된 기타 이상도 기록하였다.

[0262] 좌측 폐엽 및 비갑개를 조직병리학을 위해 10% 중성 완충된 포르말린에 보존하고, 후속적으로 이들 조직의 우측을 균질화되고 Taqman PCR 및 바이러스 역가측정하였다.

[0263] **결과:**

[0264] 이후 면봉을 p.i. 3일차에 수집하고 Vero E6 세포에 대한 TCID₅₀ 분석 및 이와 함께 qPCR로 바이러스 부하에 대해 분석하였다. ATR-002 처리는 이후 면봉에서 자손 바이러스의 감소를 초래하였다. 각각 p.i 4시간차(도 16a) 및 p.i. 24시간차 (도 16a)에 처리된 군에서 1.1 log₁₀(P=0.0134) 및 1.3 log₁₀(P=0.0191) 감소가 주목되었다. 이들 결과는 1.1 log₁₀(P=0.0089) 및 1.2 log₁₀(P=0.0090) 감소를 나타내는 PCR에 의해 뒷받침되었다(도 16b).

[0265] p.i 4일차에 비갑개에서 감염성 바이러스 부하에 대해 유사한 패턴이 관찰된 반면, p.i. 4시간차에 시작된 처리는 감염성 바이러스 역가를 유의하게 감소시켰지만(도 16c), p.i. 24시간차에 시작된 처리는 그렇지 않았다(도 16c). p.i. 4시간차에 처리를 시작한 햄스터의 비갑개에서 감염성 바이러스 역가(TCID₅₀/조직 g)의 감소는 1.3 log₁₀이었다(P=0.0335)(도 16c). 다시, 이들 데이터는 PCR에 의해 확인되었다. 1.1 log₁₀(P=0.0145) 감소(도 16d; 적색 점)는 처리가 p.i. 4시간차에 시작되었을 때 확인되었다.

[0266] p.i. 4일차에, 감염된 동물의 폐 병변을 검사하고 이환된 폐 영역의 백분율을 추정하였다. 각각의 처리는 유의하게 감소된 이환된 폐 조직을 초래하였다(각각, P=0.0282, P=0.0314)(도 16e).

[0267] 두 군 모두의 처리는 유의한 체중 감소 없이(도 16f) 또는 비히클을 투여받은 군과 비교하여 임의의 명백한 유해 효과 없이 양호하게 허용되었다.

[0268] **요약**

[0269] ATR-002의 인간 등가 용량의 항바이러스 효능을 SARS-CoV-2 챌린지 후 햄스터 모델에서 테스트하였다. 동물을 감염 당일 또는 감염 후 24시간차에 처리하고, 이후 면봉 및 비갑개 조직 내의 폐 병변 및 바이러스 부하의 백분율과 같은 매개변수를 챌린지 후 3 내지 4일에 분석하였다. ATR-002 처리는 SARS-CoV-2 시리안 햄스터 감염 모델에서 바이러스 역가 및 폐 병변의 유의한 감소를 초래하였다. 제1 처리를 위한 100mg/kg에 이어서 1일 1회 75mg/kg의 선택된 용량은 실시예 7에 기재된 ATR-002 2상 임상 시험을 위해 사용되는 900mg에 이어서 600mg 인간 용량에 대한 햄스터 등가 용량을 나타낸다. 따라서, 본 결과는 ATR-002 임상 시험의 용량 타당성을 완벽하게 뒷받침한다.

[0270] **실시예 9: 1차 인간 공기-액체 간섭(ALI) 배양에서 바이러스 복제에 미치는 ATR-002의 효과**

[0271] ALI 세포 배양물을 4명의 건강한 성인의 이후 면봉으로부터 얻었다. 면봉으로부터의 세포를 증대시킨 다음, 트랜스웰 챔버 인레이의 다공성 막의 정점 측에서 추가로 배양하였다. 거의 컨플루언시까지 침지 성장(submerged growth)한 후, 배지를 정점 구획으로부터 제거하여 공기에 노출시 세포 분화될 수 있도록 하였다. 4개의 ALI 배양물 중 3개는 SARS-CoV-2에 감염시킬 수 있었으며 2가지 상이한 농도를 사용하여 ATR-002로 처리하였다. ALI 세포를 1.0의 MOI를 사용하여 SARS-CoV-2(FI)에 감염시켰다. p.i. 1시간차에 세포를 ATR-002(50 μM, 100 μM)로 처리하였다. 미처리(SARS-CoV-2) 및 DMSO(0.1%) 처리된 세포를 음성 대조군으로서 사용하였다. 도 17은 한

가지 실험의 결과를 도시한다. 두 농도(50 μM 및 100 μM) 모두는 이들 3개의 배양물에서 자손 바이러스 입자의 생산을 완전히 차단하였으며, 이는 ATR-002가 ALI 배양물에서 SARS-CoV-2 감염에 대해 매우 효과적임을 시사한다.

[0272] 실시예 10: SARS-CoV-2 감염의 예방에서 MEK 억제제의 역할에 대한 추가 연구

[0273] SARS-CoV-2는 ACE2/TMPRSS2를 통해 세포에 진입할 수 있는 것으로 알려져 있다. Raf/MEK/ERK 신호전달 경로의 활성화에 미치는 ACE2 및 TMPRSS2 발현의 가능한 효과는 그 다음의 실험 세트에서 다루어졌다. ACE2 및 TMPRSS2 과발현 A549 세포를 SARS-CoV-2에 감염시키고 ERK의 인산화 상태를 p.i. 1시간차에 분석하였다. A549 세포 및 Calu-3 세포를 각각 음성 및 양성 대조군으로서 사용하였다.

[0274] 구체적으로, Calu-3 세포를 2.0의 MOI를 사용하여 SARS-CoV-2(FI)에 감염시켰다. 면역블롯을 p.i. 1시간차에 준비하고 항-pERK1/2, 항-ERK1/2 및 항-튜불린 항체로 프로빙하였다. 도 18에는 3회의 독립적인 실험 중 하나의 결과가 도시되어 있다. 모의 감염된 세포는 음성 대조군으로서 사용하였다. A549 세포에서 ACE2의 과발현은 SARS-CoV-2 감염 동안 ERK 활성화를 유도한다.

[0275] 이후, ATR-002 처리 후 세포에서 ACE2 발현이 감소하는지 여부를 테스트하였다. Calu-3 세포를 24시간 동안 ATR-002로 처리하고 그 결과를 면역형광현미경 및 WES 기술을 통해 분석하였다. 구체적으로, Calu-3 세포를 24 웰 플레이트의 유리 커버 슬립 상에 웰당 1x10⁵개 세포로 시딩하고 37°C, 5% CO₂에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 배지(10% FBS 및 1% P/S를 갖는 IMDM)로 세척한 후, 배지 중 1mL의 100 μM ATR-002 또는 배지 중 1mL 1% DMSO(용매 대조군)를 웰에 첨가하고 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.

[0276] 그 다음, 웰을 PBS로 1회 세척하고 실온에서 10분 동안 PBS 중 300 μL/웰 4% PFA로 고정하였다. PBS를 이용한 또 다른 세척 단계 후, 세포를 진탕기(100 rpm)에서 실온에서 1시간 동안 PBS 중 1% BSA에서 200 μL/웰의 1차 항체(염소-항-ACE2 항체(R&D systems; Cat.: AF933; Lot.:HOK0320061)(1:20)과 함께 인큐베이션하기 전에 실온에서 PBS 중 1% BSA로 1시간 동안 차단하였다. 그 후, 세포를 진탕기에서 실온에서 45분 동안 PBS 중 1% BSA에서 200 μL/웰의 2차 항체 당나귀 항-염소 IgG(H+L) 고도로 교차-흡수된 2차 항체, Alexa Fluor Plus 647(Invitrogen; Ref.: A32849TR; Lot.:VE306231)(1:200)과 함께 인큐베이션하기 전에 PBS로 3회 세척하였다. PBS를 이용한 또 다른 3회의 세척 단계 후, 200 μL 로다민 팔로이딘(Invitrogen; Ref.: R415; Lot.: 2157163)(PBS 중 1% BSA에서 1:40)을 각 웰에 첨가하고 진탕기에서 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. PBS를 이용한 2회의 최종 세척 단계 후, 커버 슬립을 웰로부터 제거하고 Roti®-Mount FluorCare DAPI(Roth; Art.-Nr.: HP20.1; Lot.: 080293945)를 이용하여 현미경 슬립 상에 표본제작하였다. 슬라이드를 암실에서 4°C에서 건조시킨 다음, 공초점 레이저 주사현미경(LSM800, Zeiss)을 사용하여 분석하였다.

[0277] 결과는 도 19에서 볼 수 있으며, 여기서 ATR-002가 Calu-3 세포에서 ACE2의 감소를 초래한다는 것이 명백하다.

[0278] 다음 단계에서는, ATR-002가 ACE2 과발현 A549 세포에서 SARS-CoV-2의 복제를 차단할 수 있는지 여부를 테스트하였다. 따라서, A549-ACE2, A549-ACE2/TMPRSS2 또는 Calu-3 세포를 상술한 바와 같이 SARS-CoV-2에 감염시키고 ATR-002로 처리하였다.

[0279] 세포주를 0.001 또는 0.01의 MOI를 사용하여 SARS-CoV-2(FI)에 감염시켰다. p.i. 1시간차에 세포를 ATR-002로 처리하였다. 미처리 및 DMSO 처리된 세포를 대조군으로서 사용하였다. 역가는 p.i. 8시간, 24시간, 48시간 및 72시간 후에 분석하였다. ATR-002(100 μM) 처리 후 상이한 세포주에서 SARS-CoV-2의 역가 감소. 미처리(SARS-CoV-2) 및 DMSO(0.1%) 처리된 세포는 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0280] Calu-3 및 A549-ACE2/TMPRSS2 세포가 0.001의 MOI로 감염된 경우, ATR-002는 이들 세포에서 자손 바이러스 입자의 생산을 감소시켰다. 놀랍게도, ATR-002 처리는 바이러스 접종물의 농도가 10배 더 높을 때(MOI: 0.01) A549-ACE2/TMPRSS2 세포에서 자손 바이러스 입자의 생산에 영향을 미치지 않았다. SARS-CoV-2는 2가지 상이한 경로를 통해 세포에 진입할 수 있다. 바이러스와 세포막의 융합을 초래하는 TMPRSS2에 의한 스파이크 단백질의 직접적인 활성화를 통해, 또는 카텝신 L에 의한 스파이크 단백질의 엔도솜 내재화 및 활성화에 의해.

[0281] 마지막으로, MEK-억제제로의 처리가 ACE2의 발현을 감소시킬 수 있는지 여부를 분석하기 위해, Vero 세포를 MEK 억제제 CI-1040 또는 ATR-002와 함께 사전-인큐베이션하고 SARS-CoV-2 스파이크 단백질을 보유하는 VSV 슈도타입 바이러스 시스템으로 감염시켰다. 양성 세포를 광학현미경으로 분석하였다. 구체적으로, Vero 세포를 VSV ΔG/GFP-Luc+SΔ21(MOI 0.01)로 1시간 감염시키기 전에 1시간, 2시간, 4시간 및 24시간 동안 20 μM CI-1040 또는 100 μM ATR-002와 함께 인큐베이션하였다. GFP-양성 세포를 p.i. 24시간차에 분석하였다. DMSO는 음성 대조

군으로서 사용하였으며 100%로 설정하였다. 도 21 및 22에 도시된 데이터는 각각 CI-1040 및 ATR-002 사전-인큐베이션 동안 3회의 독립적인 실험의 평균 \pm SD를 나타낸다. 데이터는 이원 ANOVA 검정에 이어서 시닥(Sidak) 검정을 통과하였다(* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$).

[0282] CI-1040 또는 ATR-002와의 사전-인큐베이션은 VSV 슈도타입 바이러스의 내재화의 감소를 유도하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 효과는 시간 의존적이었다. CI-1040 또는 ATR-002와의 사전-인큐베이션이 길수록, 감염에 대한 관독값인 GFP 양성 세포의 양이 낮아진다. 이러한 결과는 CI-1040 및 ATR-002와 같은 MEK 억제제가 ACE2의 세포 발현을 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0283] **참조문헌**

Haasbach, E. et al (2017). The MEK-inhibitor CI-1040 displays a broad anti-influenza virus activity in vitro and provides a prolonged treatment window compared to standard of care in vivo. *Antiviral research* 142, 178-184.

Hasan et al (2020). COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal. *J Heart Lung Transplant*. 2020 Mar 20

Huang et al.; *The Lancet*; Vol 395; pp.: 497-506 February 15, 2020

Jamilloux et al.; Should we stimulate or suppress immune response in COVID-19? Cytokine and anti-cytokine interventions, *Autoimmunity Reviews*, AUTREV 102567 accepted 28 April 2020.

LoRusso, P., Adjei, A., Varterasian, M., Gadgeel, S., Reid, J., Mitchell, D., et al. (2005). Phase I and Pharmacodynamic Study of the Oral MEK Inhibitor CI-1040 in Patients With Advanced Malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 23(23), 5281-5293.

Ludwig, S. (2009). Targeting cell signaling pathways to fight the flu: towards a paradigm change in anti-influenza therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 1-4.

Mackey, T.K., Liang, B.A., 2012. Lessons from SARS and H1N1/A: employing a WHO-WTO forum to promote optimal economic-public health pandemic response. *J Public Health Policy* 33, 119-130.

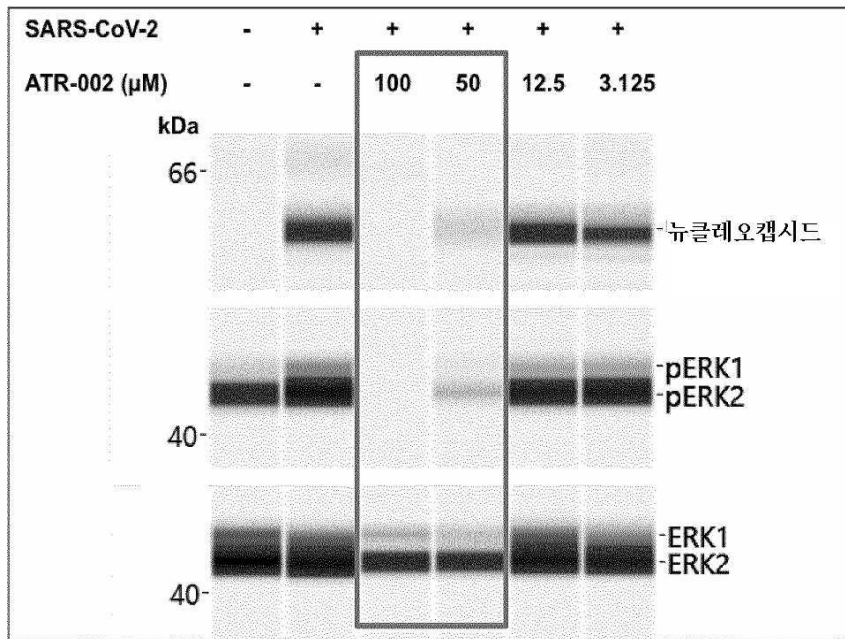
Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U.R., Ludwig, S., 2001. Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* 3, 301-305.

Wabnitz, A., Mitchell, D, and Wabnitz, D. (2004). In Vitro and in Vivo Metabolism of the Anti-Cancer Agent CI-1040, a MEK Inhibitor, in Rat, Monkey, and Human. *Pharmaceutical Research* 21(9), 1670-1679.

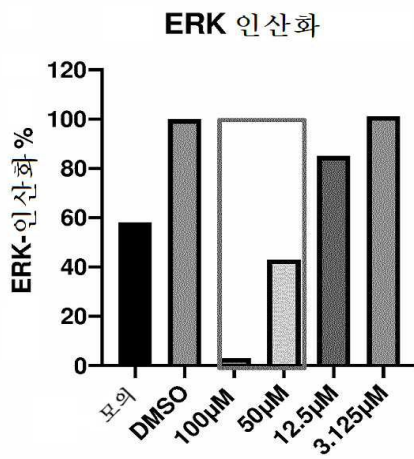
[0284]

도면

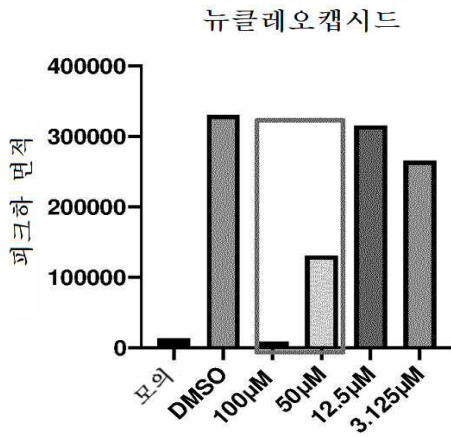
도면1a



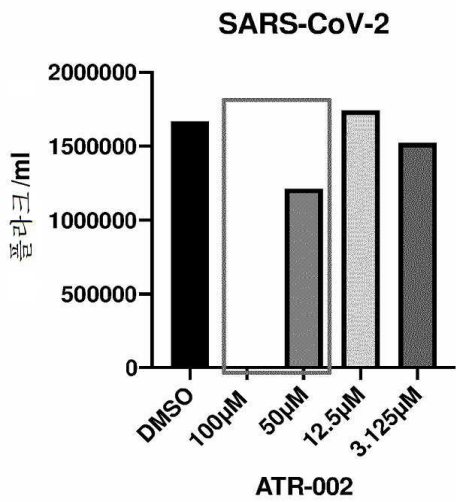
도면1b



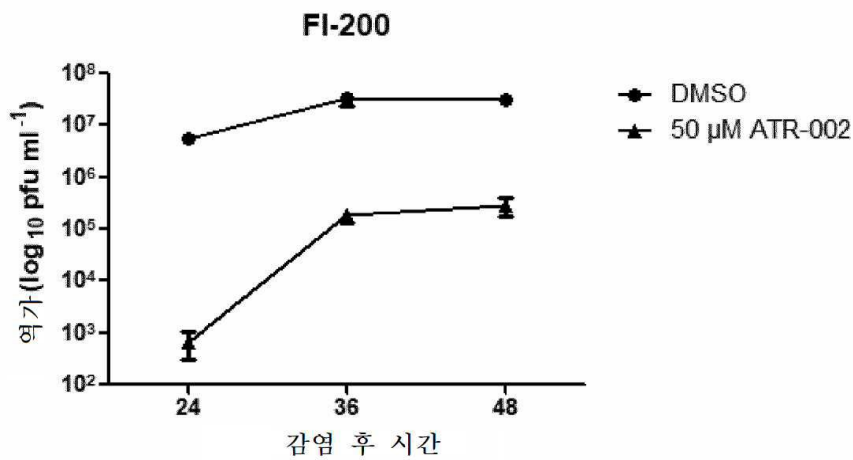
도면1c



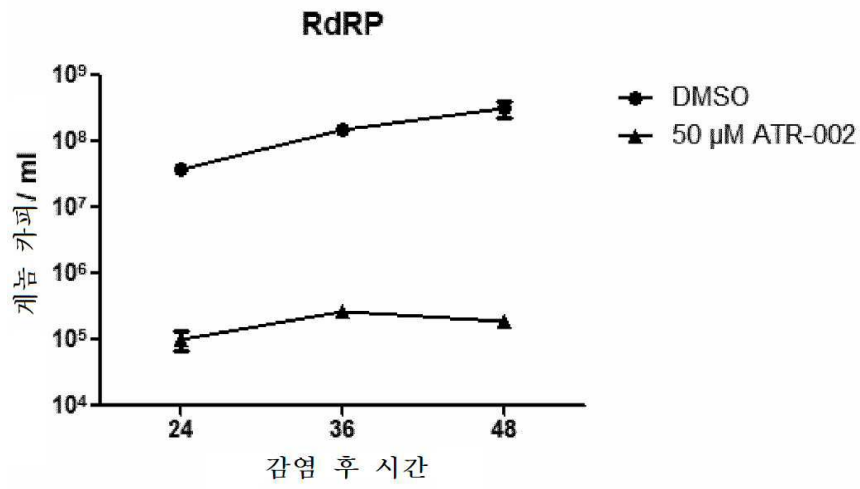
도면1d



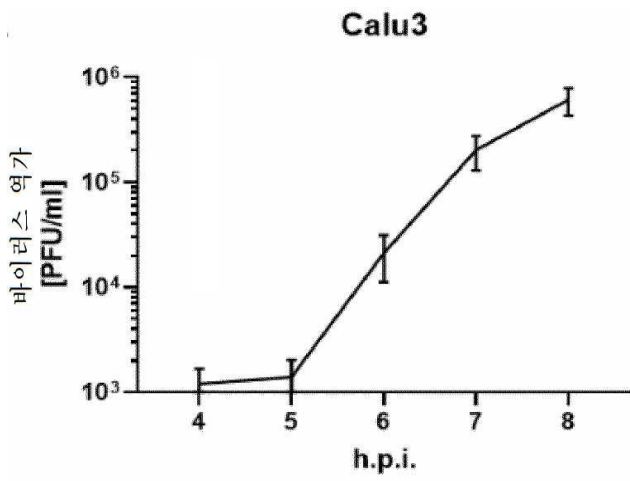
도면2a



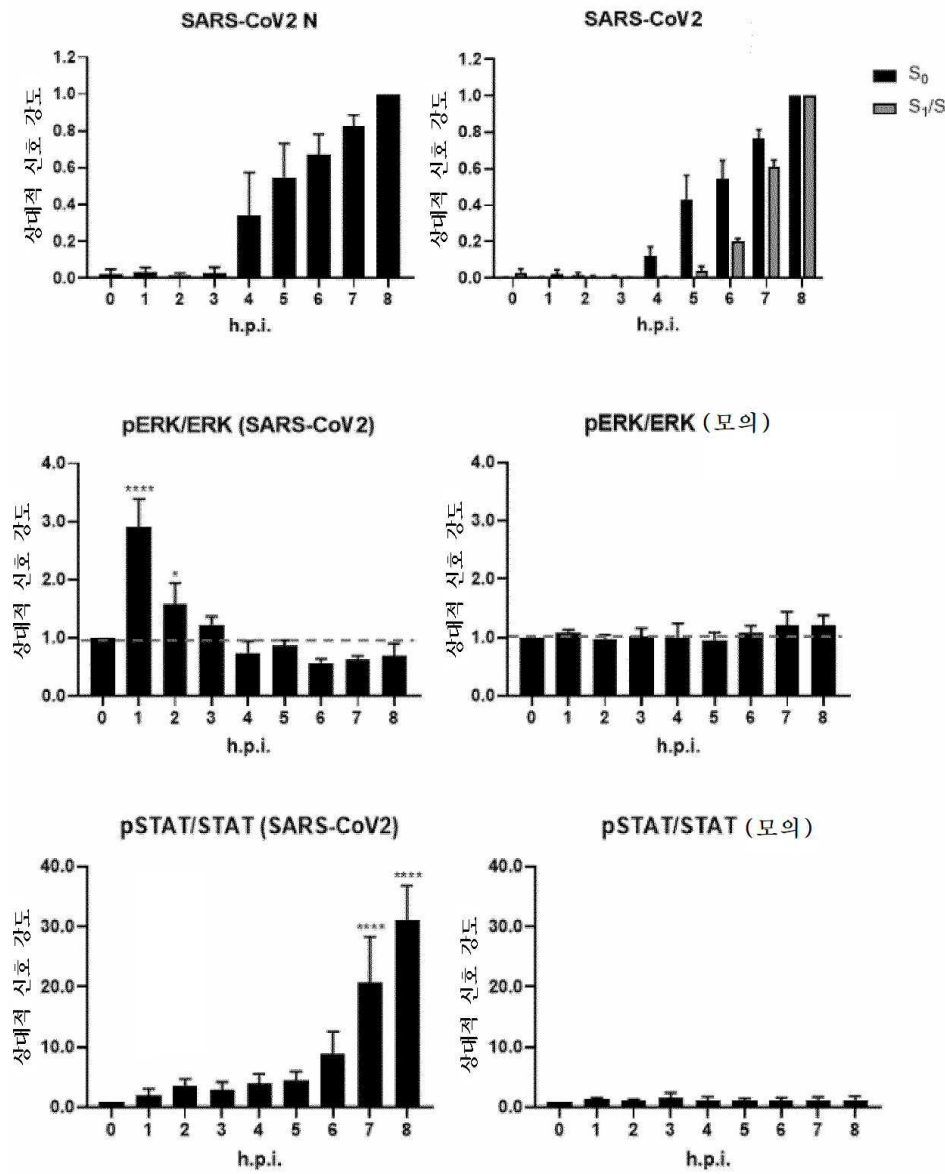
도면2b



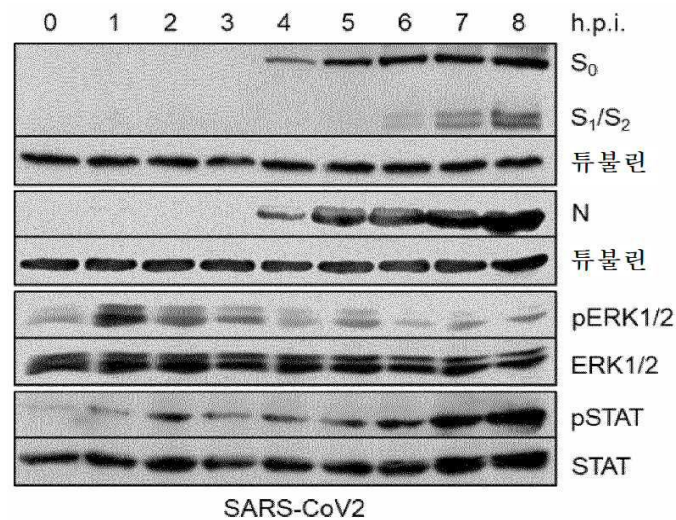
도면3a



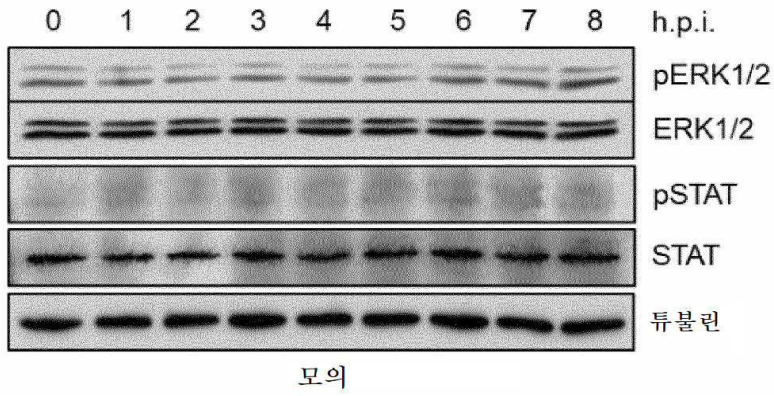
도면3b



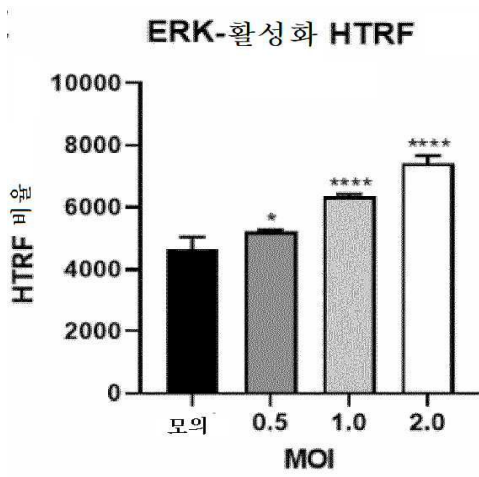
도면3c



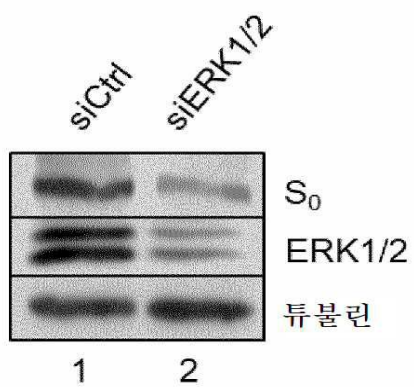
도면3d



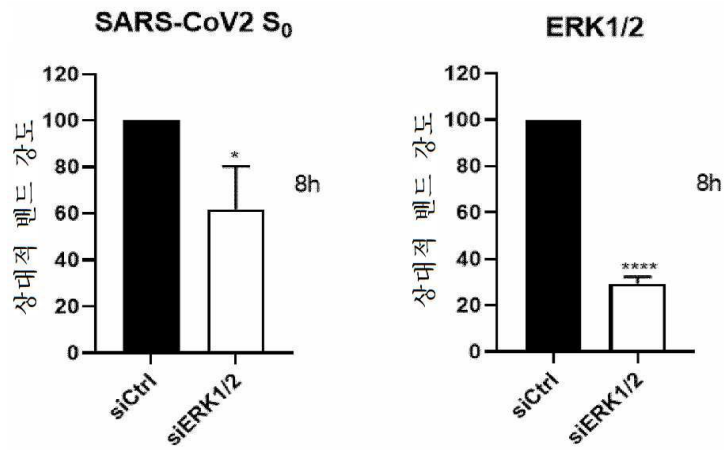
도면3e



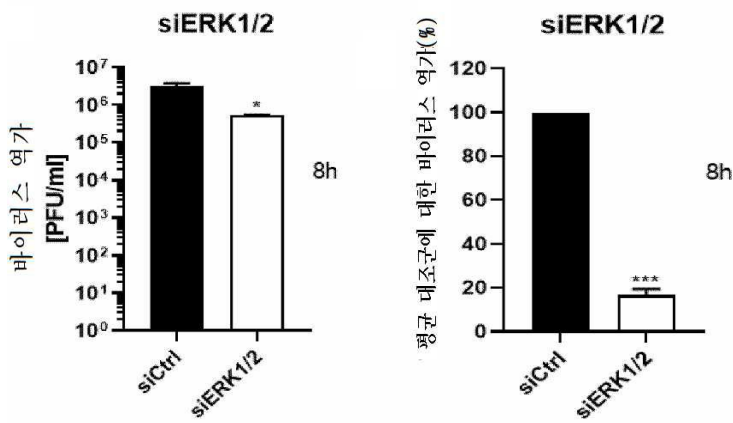
도면4a



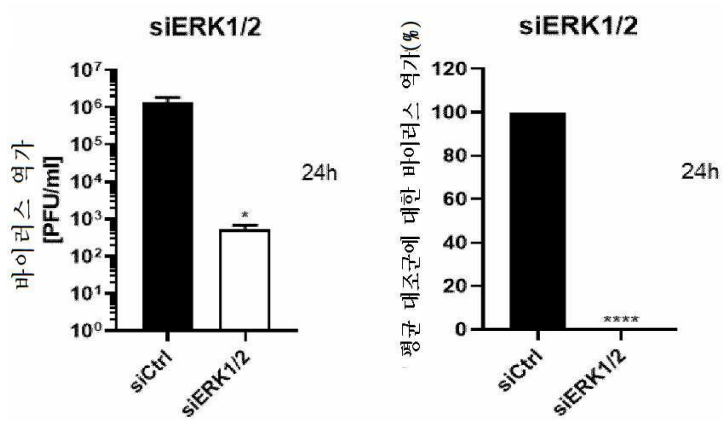
도면4b



도면4c

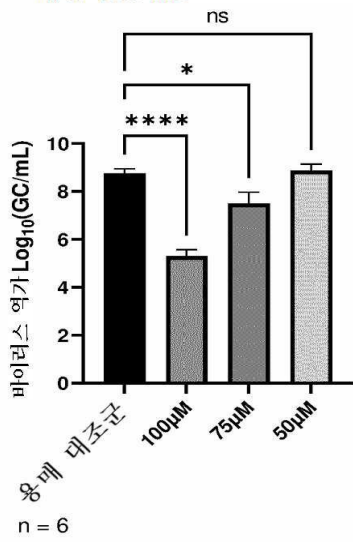


도면4d

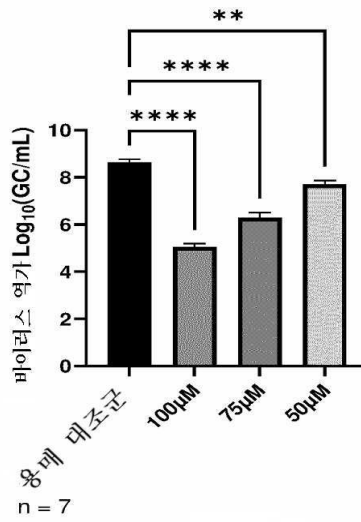


도면5

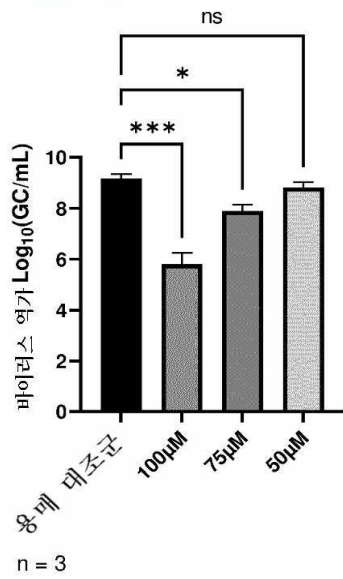
VeroE6 세포에서 SARS-CoV-2에 대한 ATR-002



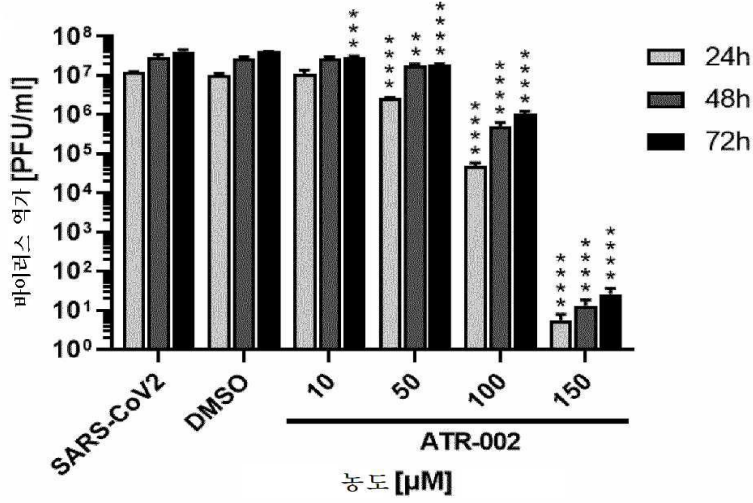
Calu-3 세포에서 SARS-CoV-2에 대한 ATR-002



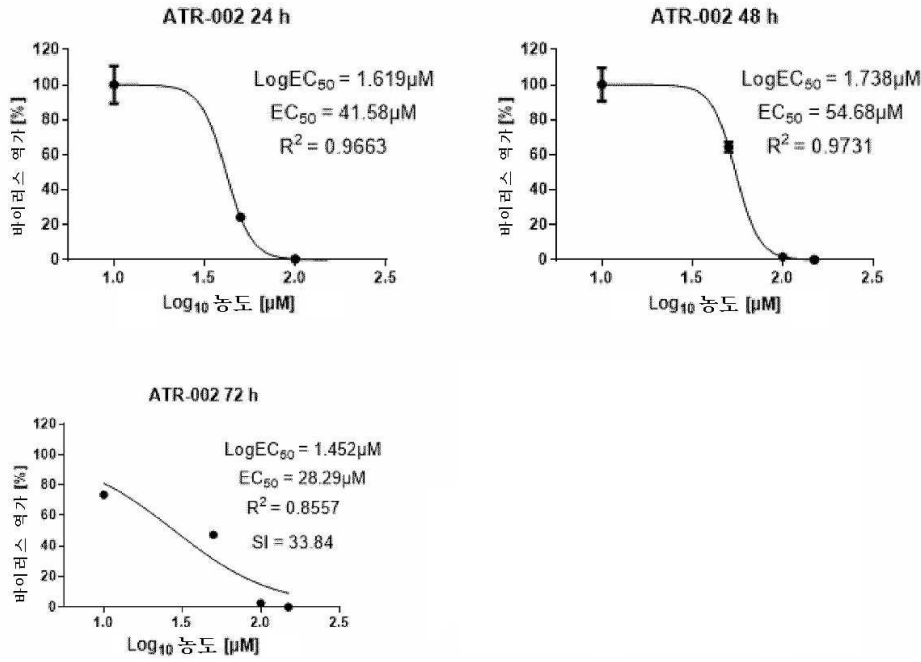
Caco-2 세포에서 SARS-CoV-2에 대한 ATR-002



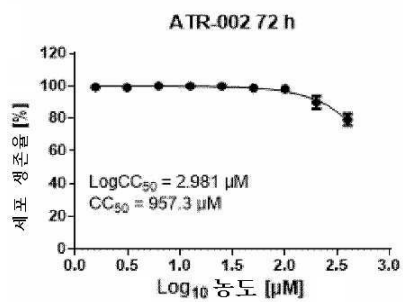
도면6a



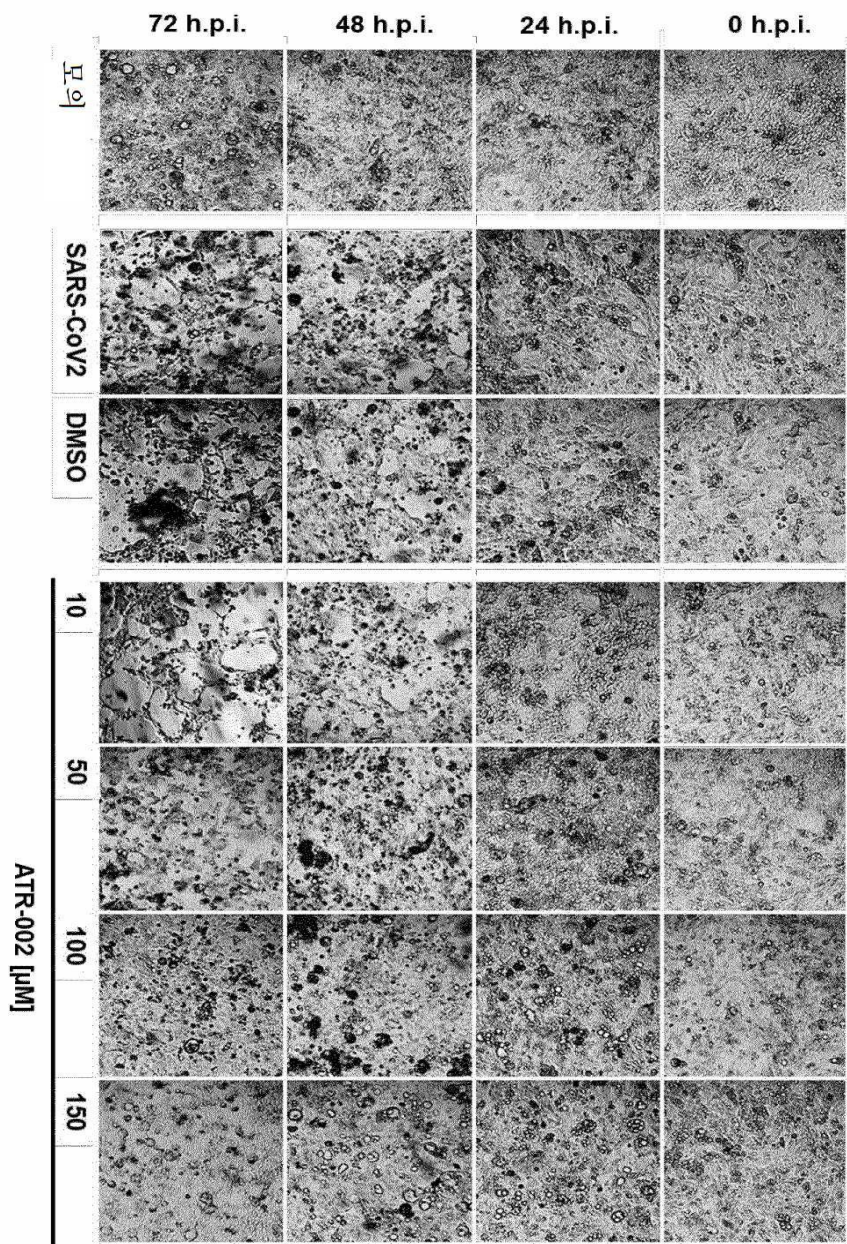
도면6b



도면6c

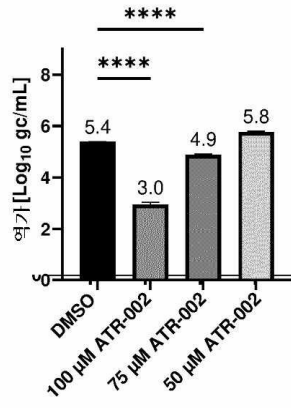


도면6d

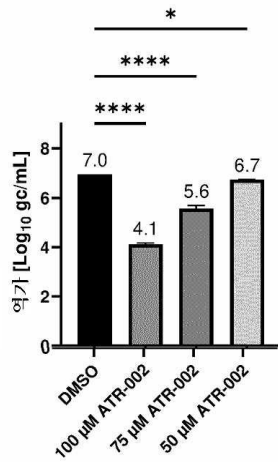


도면7a

SARS-CoV-2 SA MOI 0.1에 감염된
Vero E6 세포의 ATR-002 처리

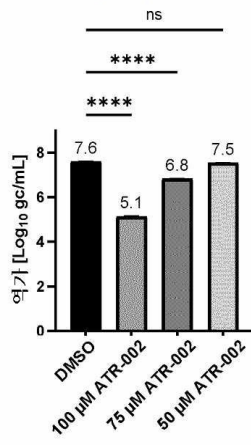


SARS-CoV-2 SA MOI 1에 감염된
Vero E6 세포의 ATR-002 처리

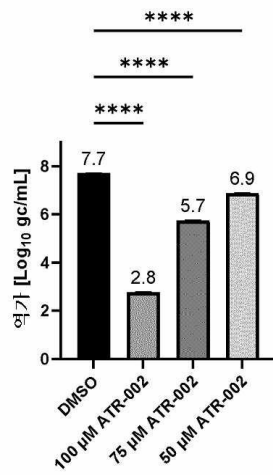


도면7b

SARS-CoV-2 SA MOI 10에 감염된
Vero E6 세포의 ATR-002 처리

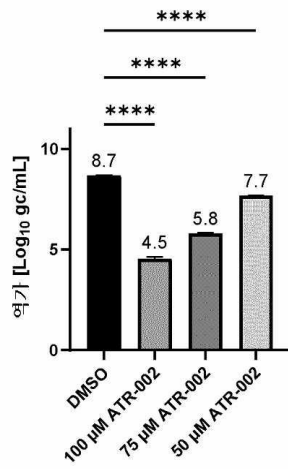


SARS-CoV-2 SA MOI 0.1에 감염된
Calu-3 세포의 ATR-002 처리

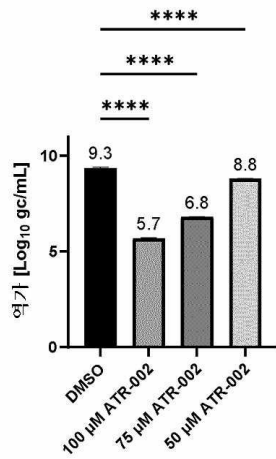


도면7c

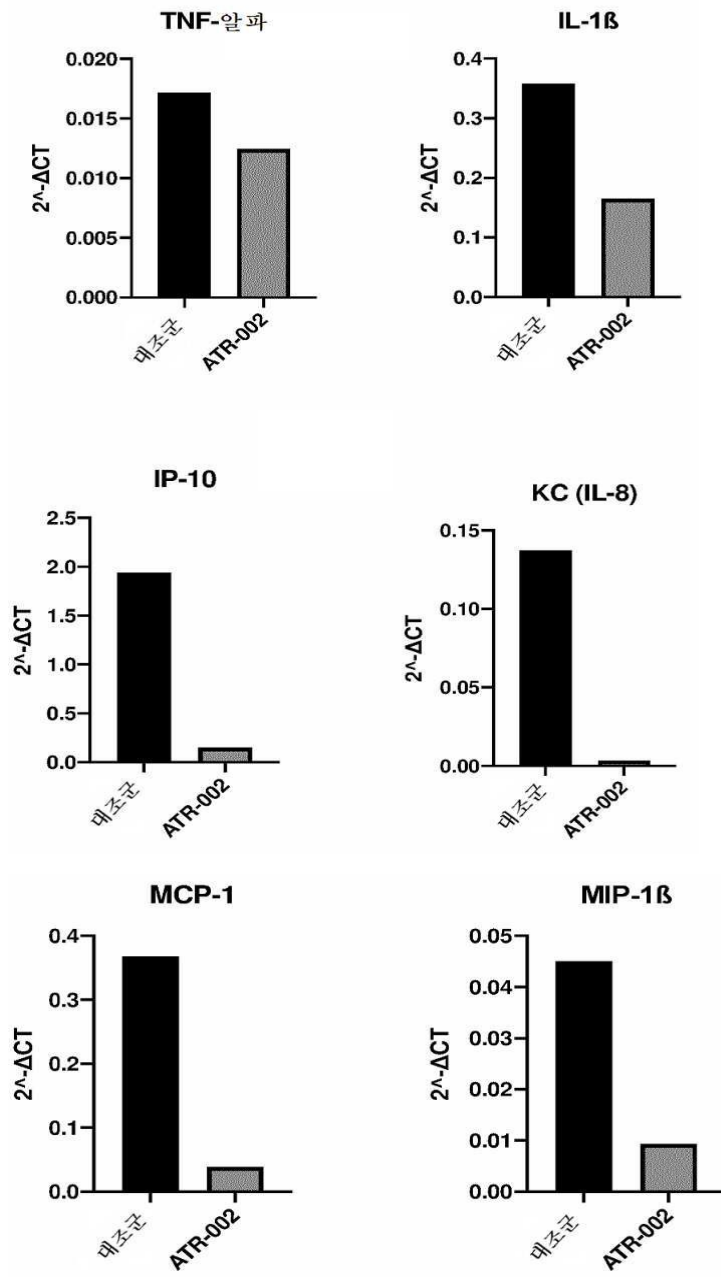
SARS-CoV-2 SA MOI 1에 감염된 Calu-3 세포의 ATR-002 처리



SARS-CoV-2 SA MOI 10에 감염된 Calu-3 세포의 ATR-002 처리

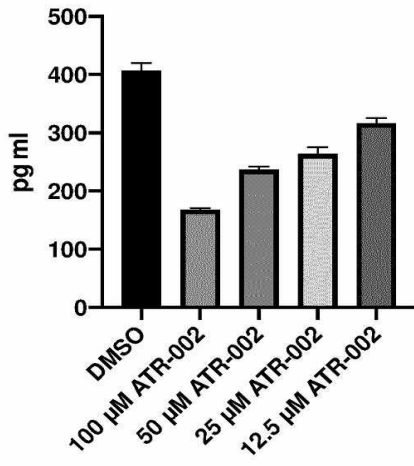


도면8

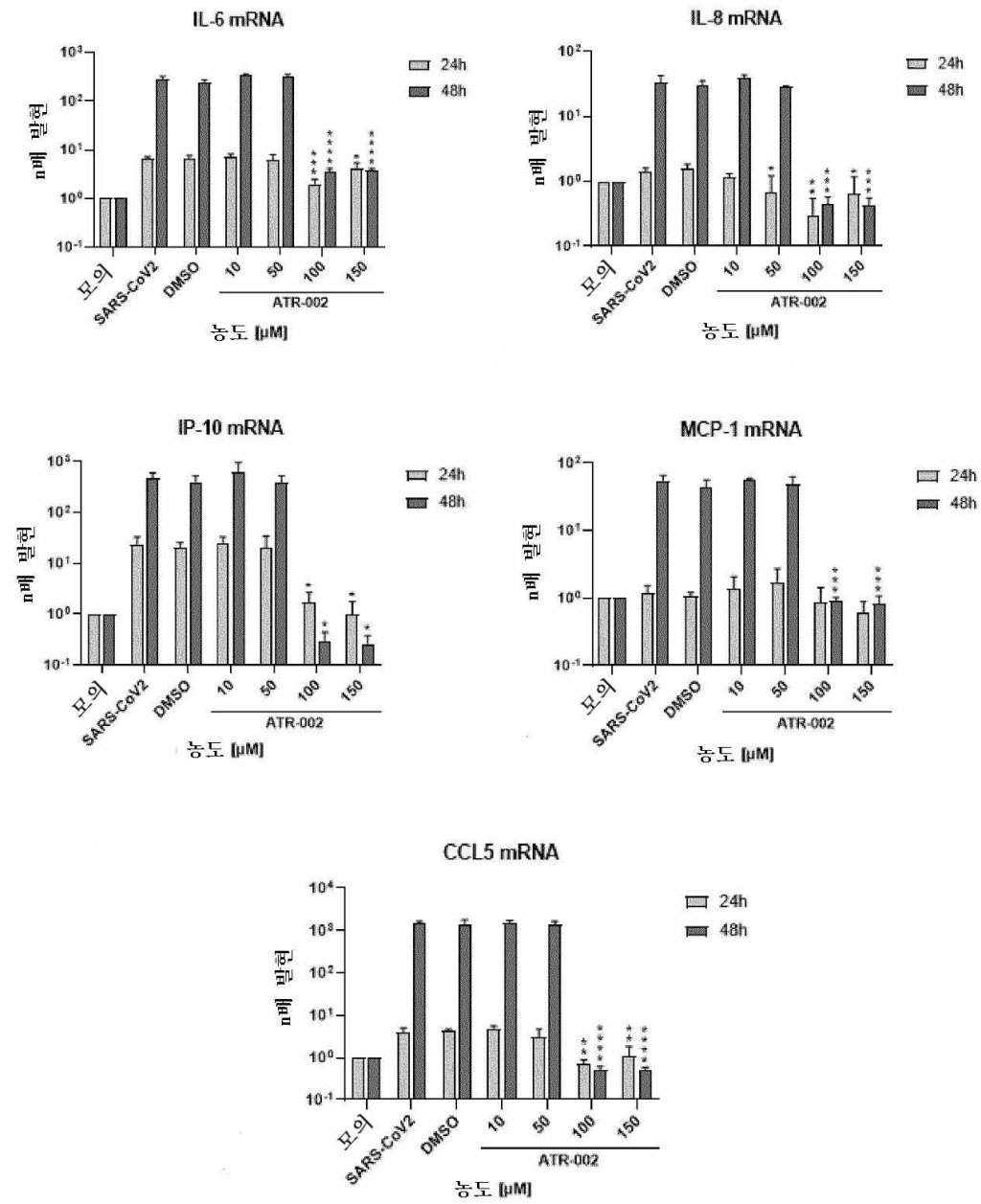


도면9

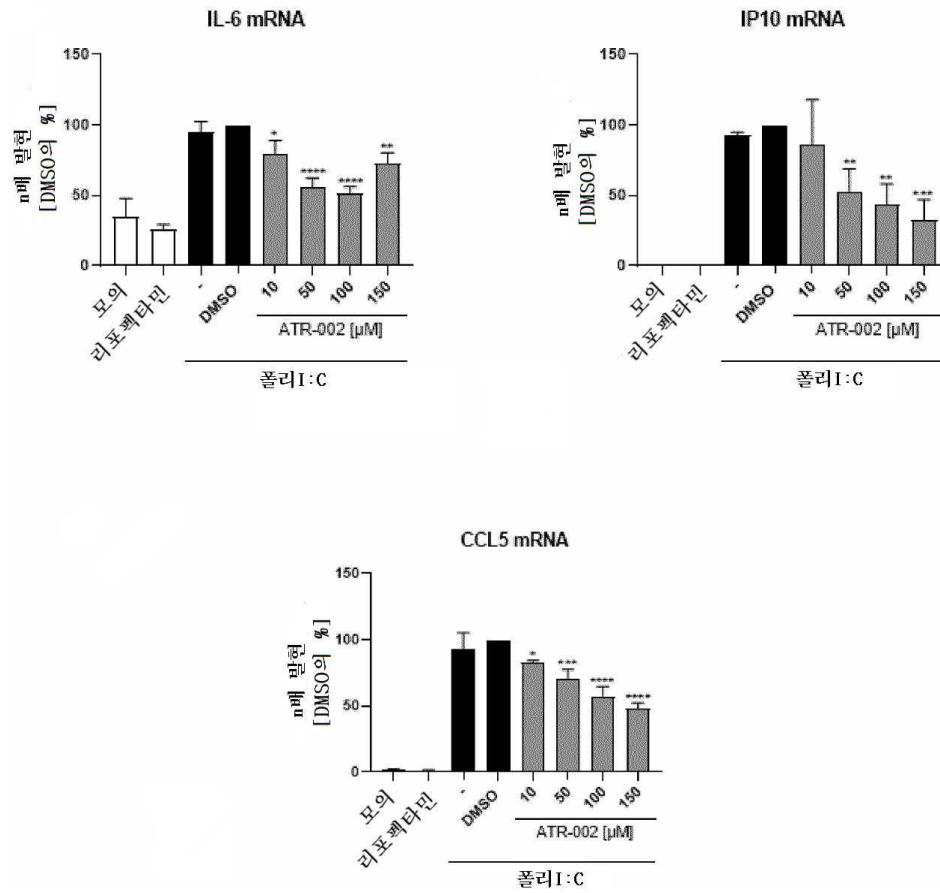
SARS-CoV-2 감염된 CaCo-2에서 ATR-002
처리 후 MCP-1 감소



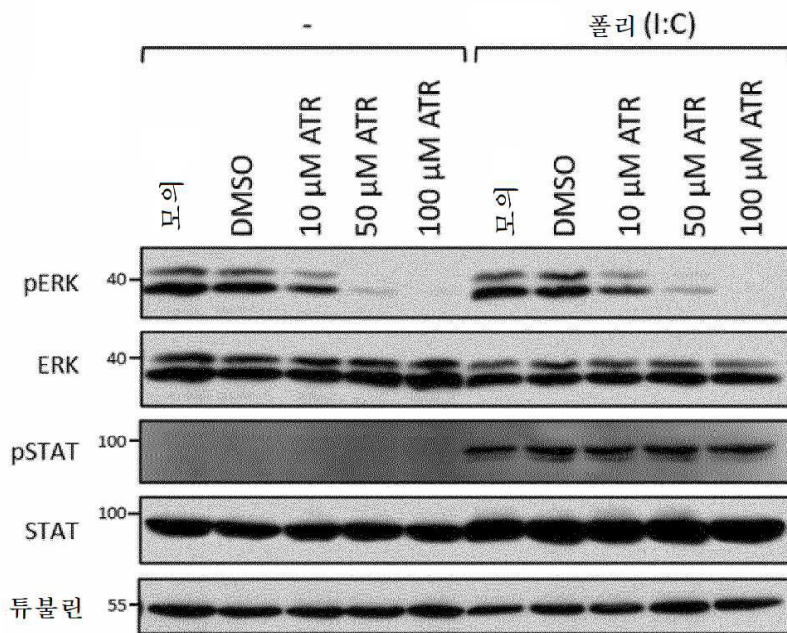
도면10a



도면10b

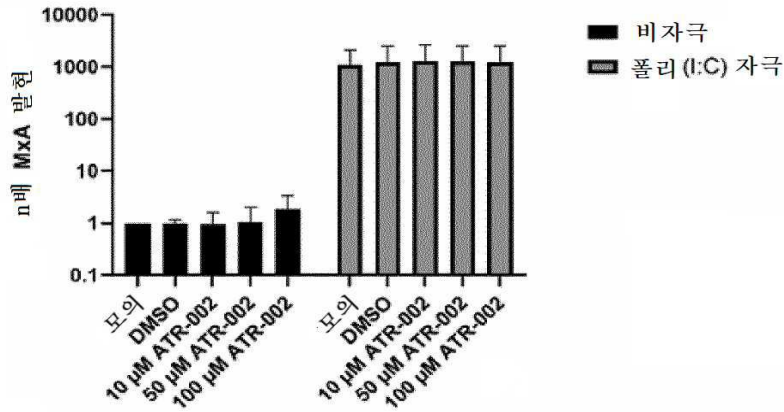


도면11a

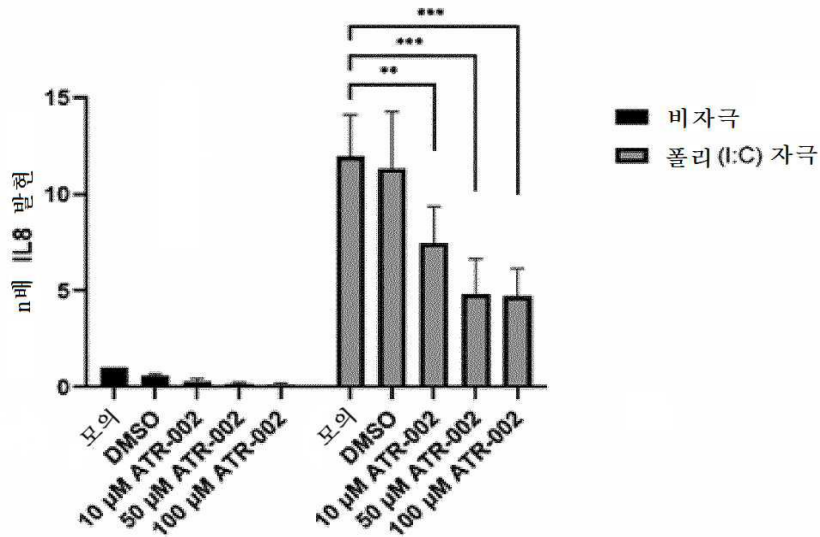


도면11b

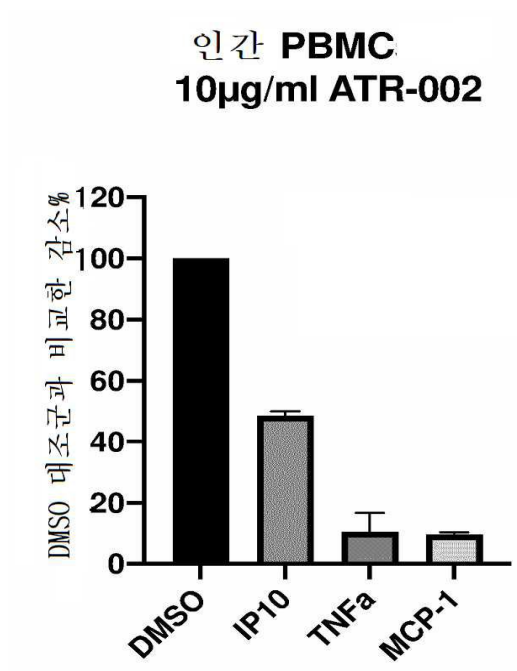
24시간 ATR 처리 후 MxA mRNA



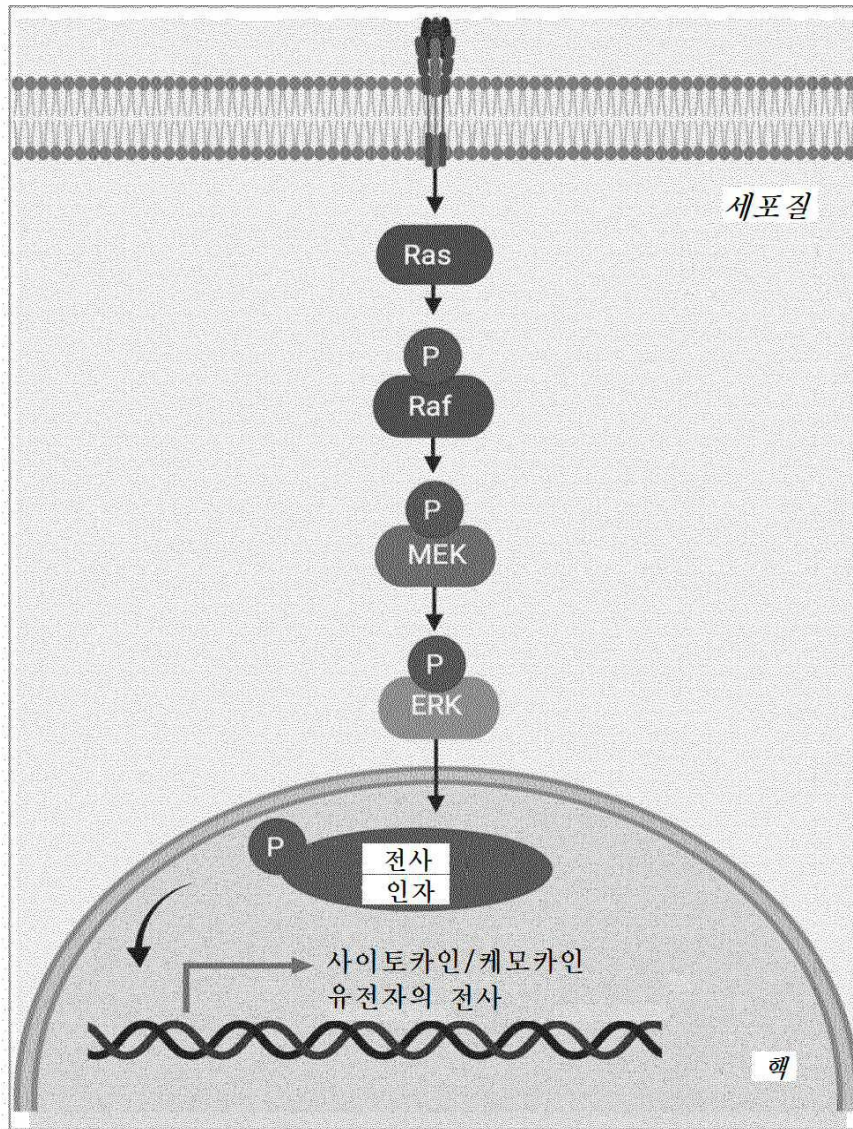
24시간 ATR 처리 후 IL8 mRNA



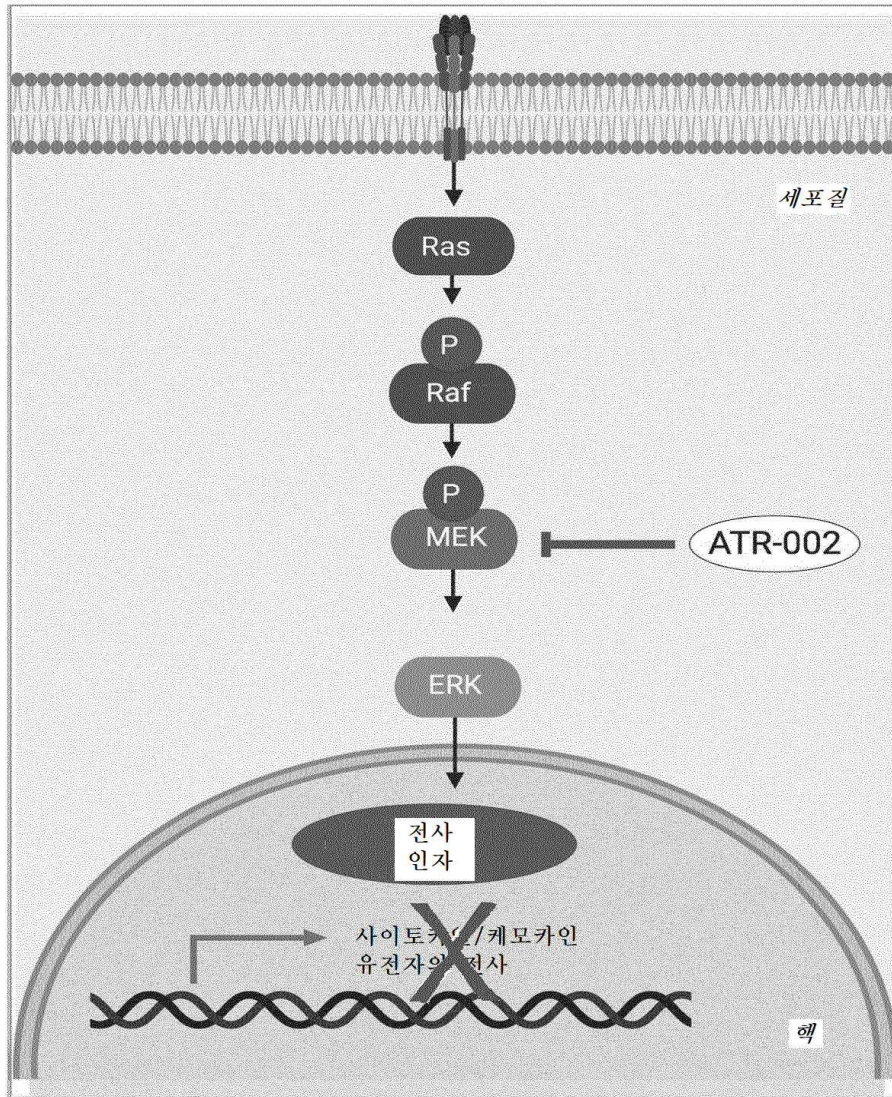
도면12



도면13a

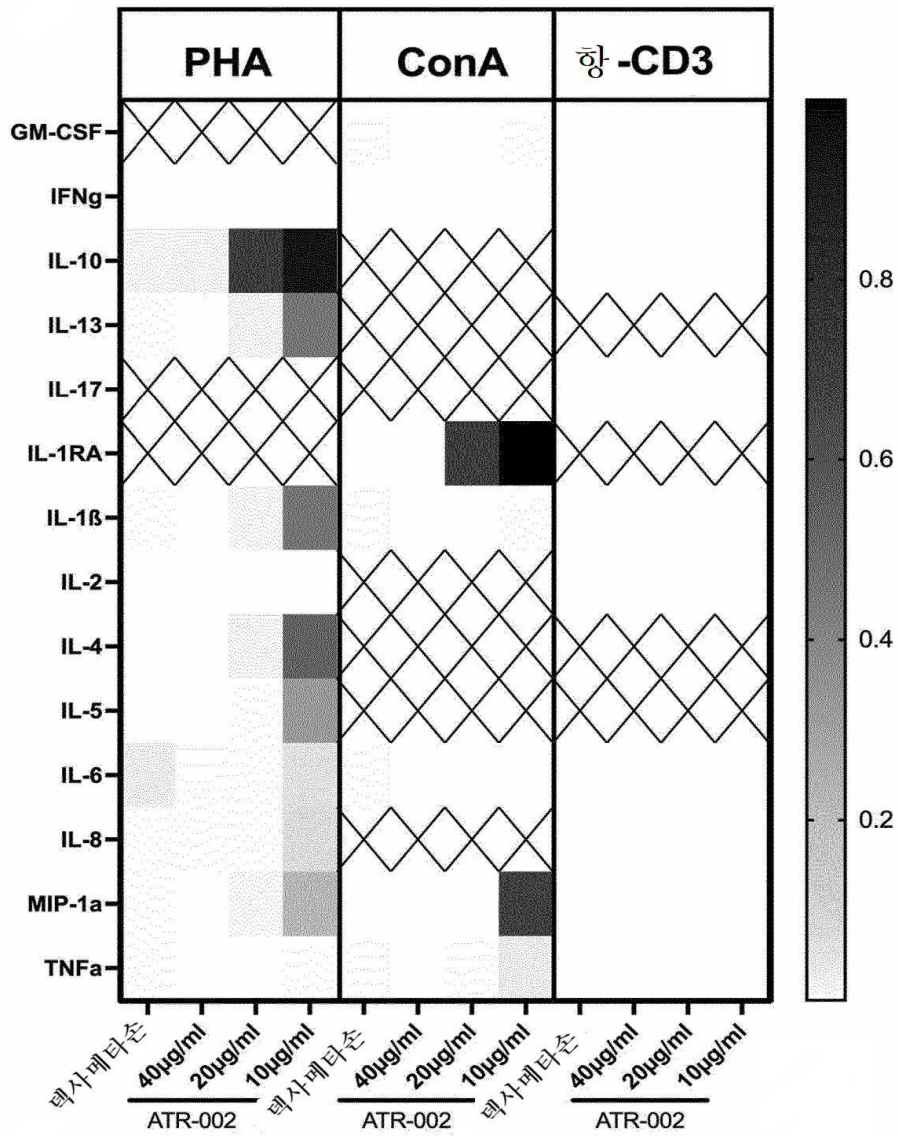


도면13b

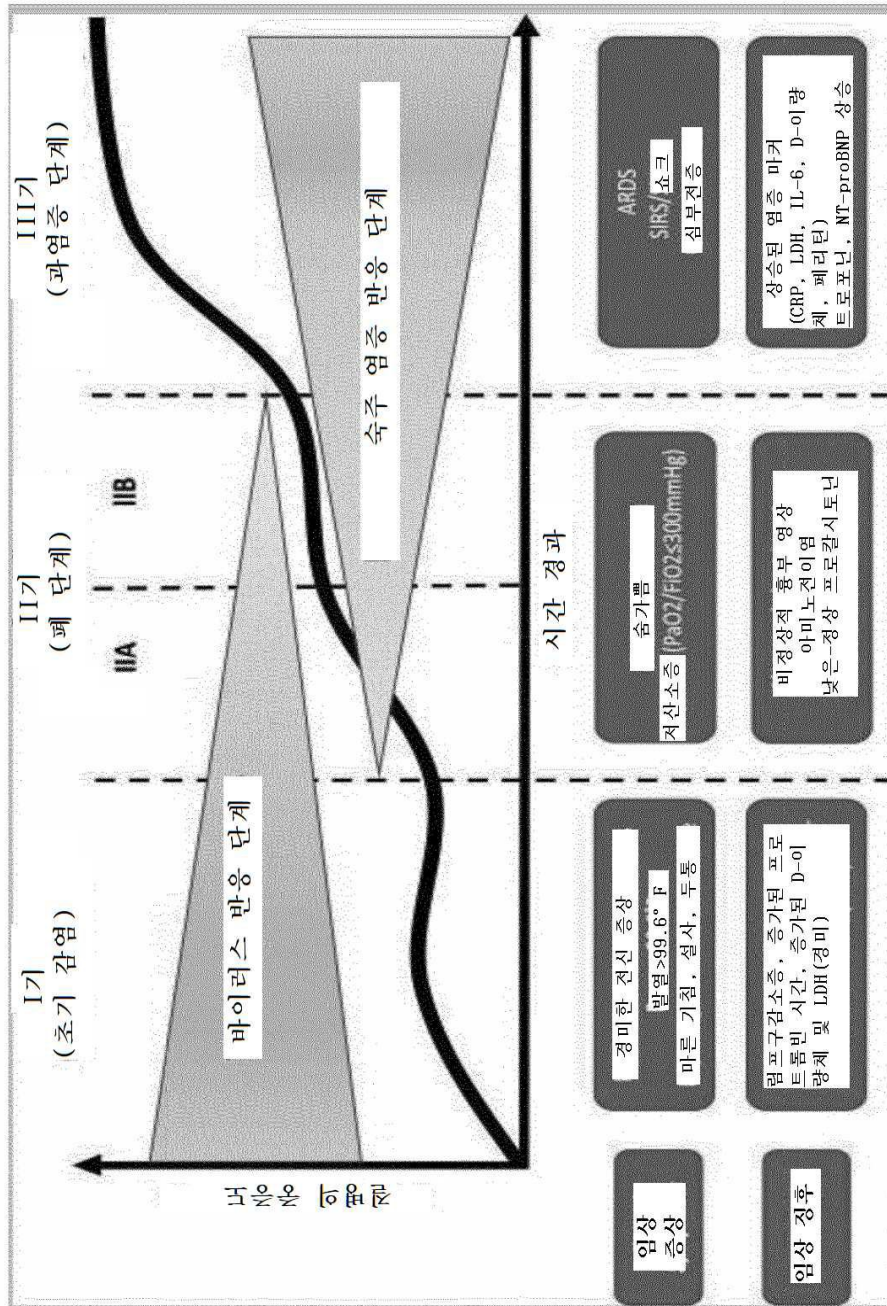


도면14

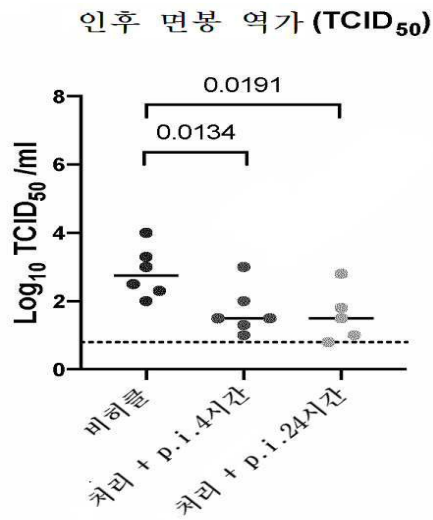
자극과 비교한 P-값



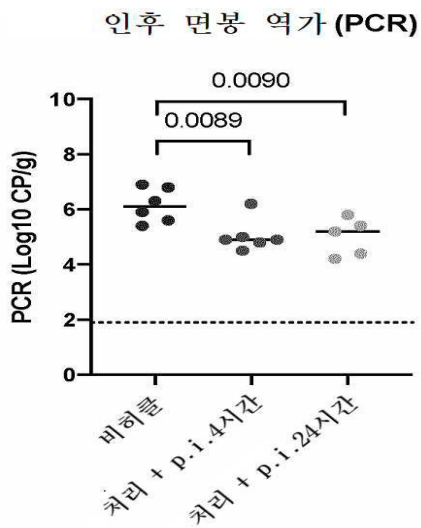
도면15



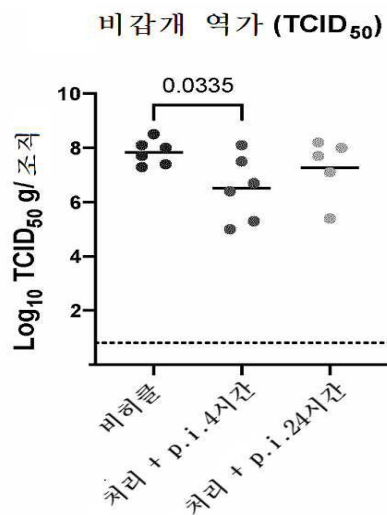
도면16a



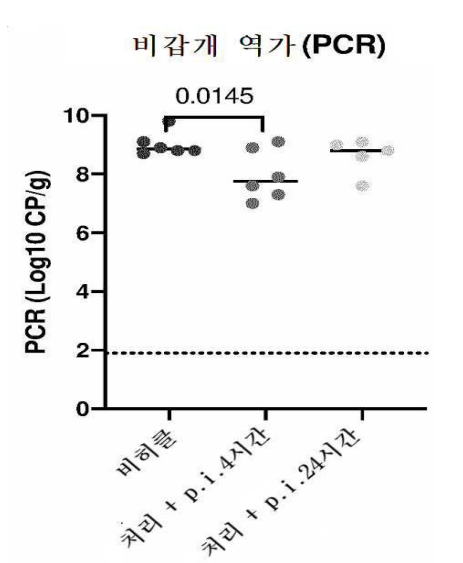
도면16b



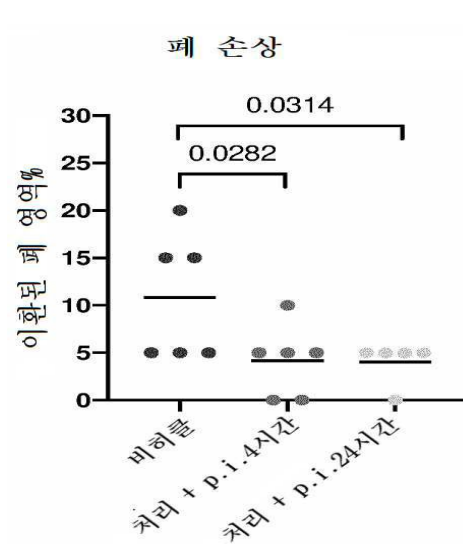
도면16c



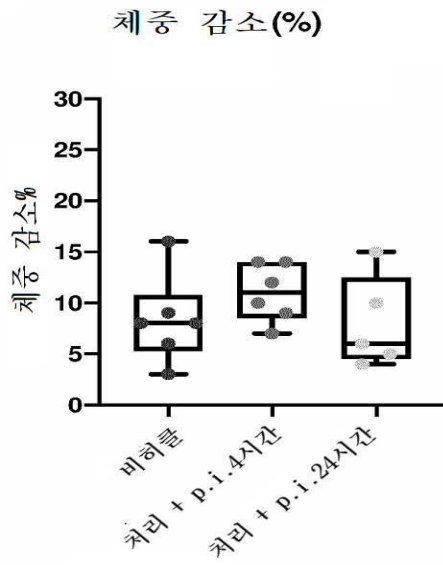
도면16d



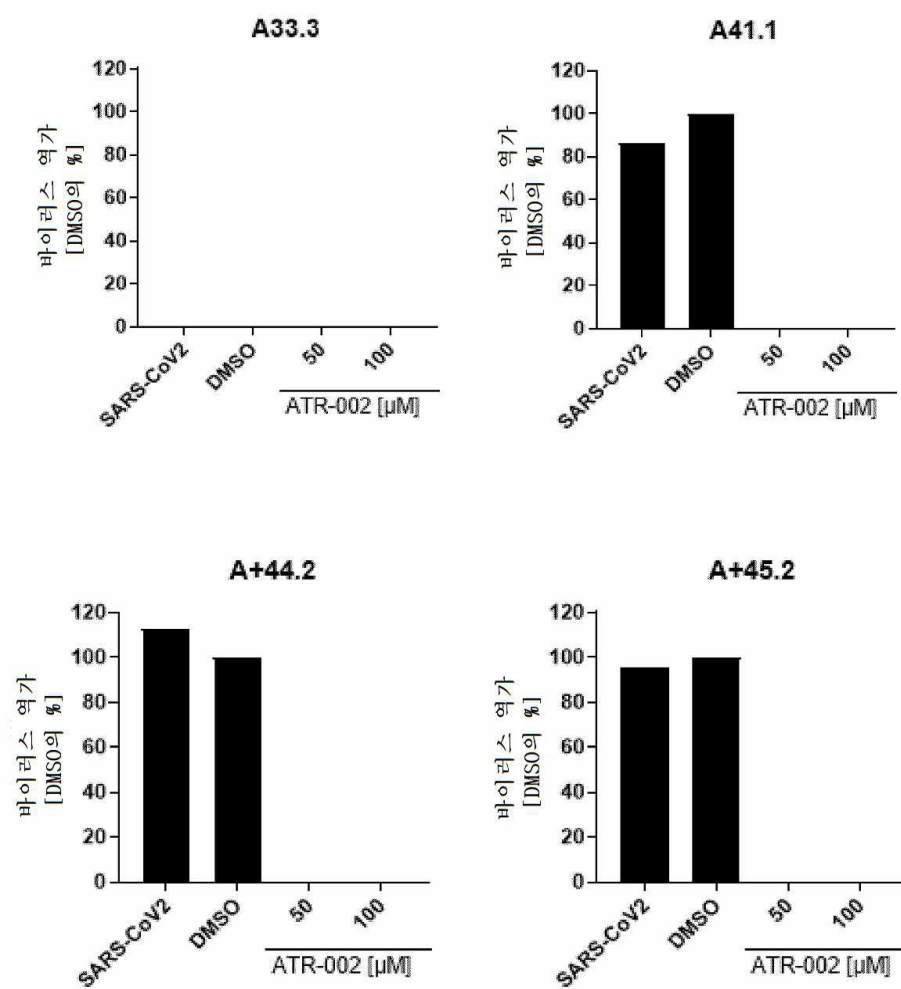
도면16e



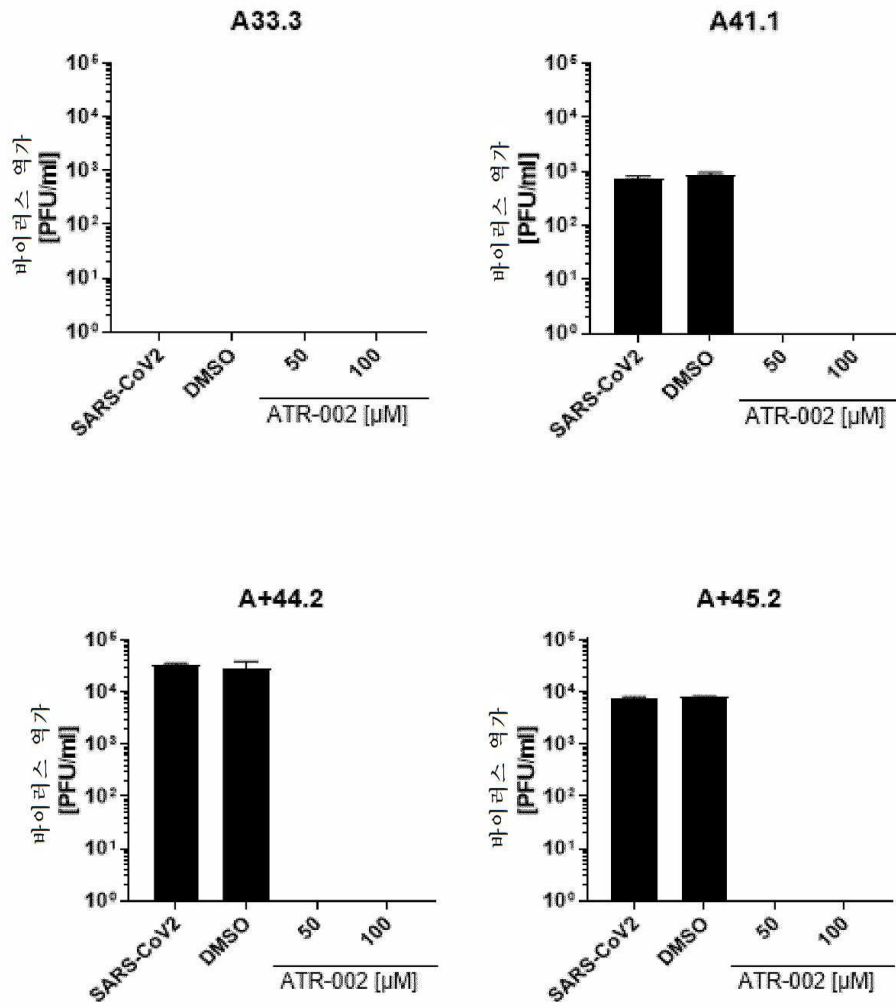
도면16f



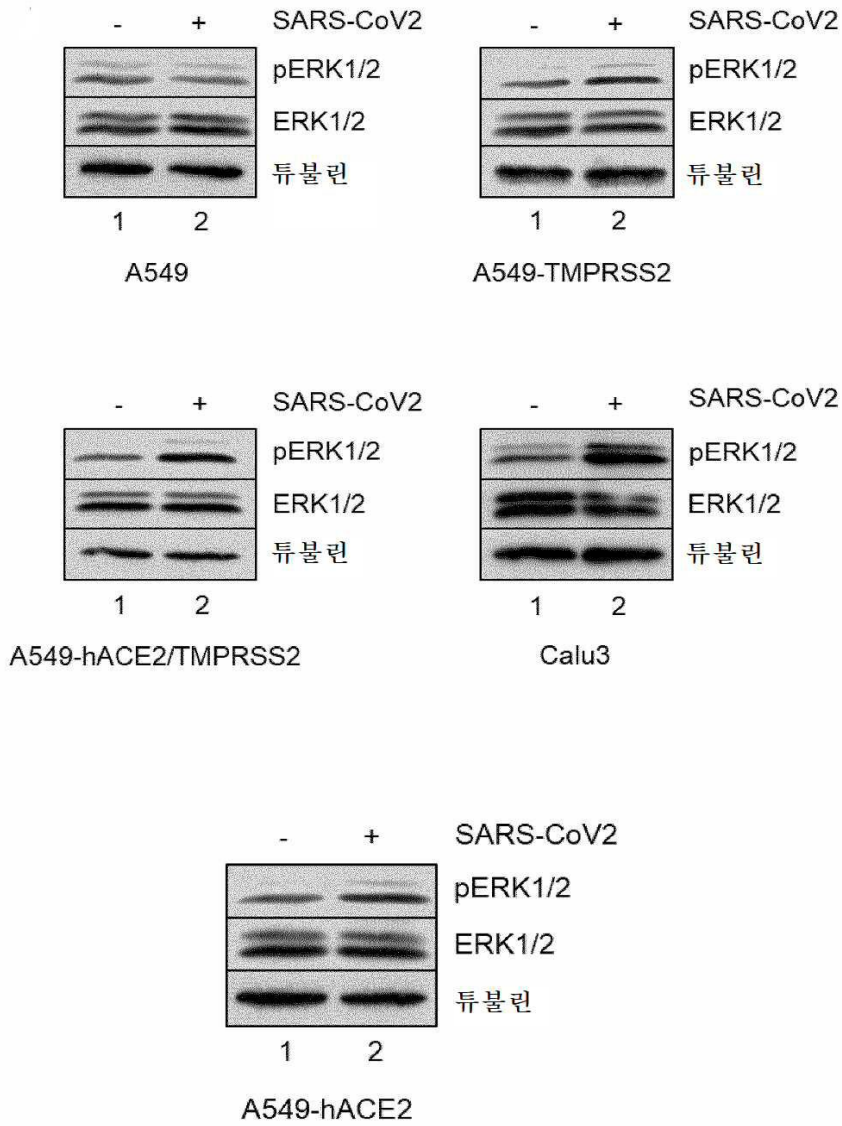
도면17a



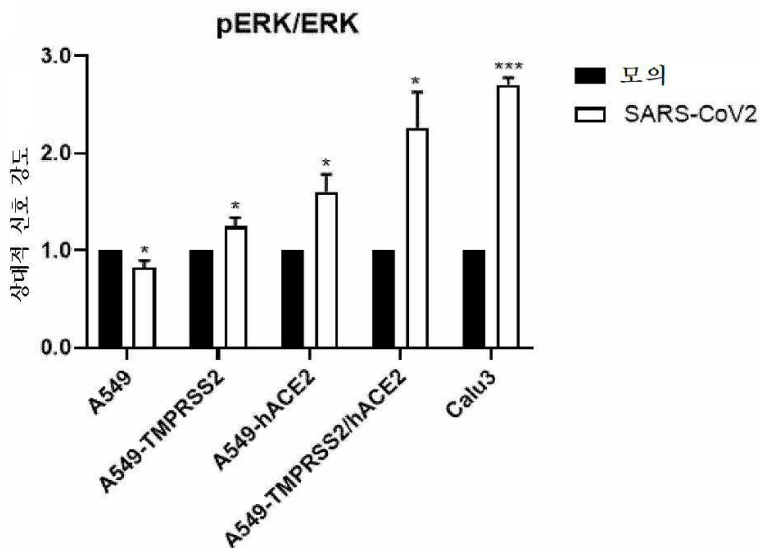
도면17b



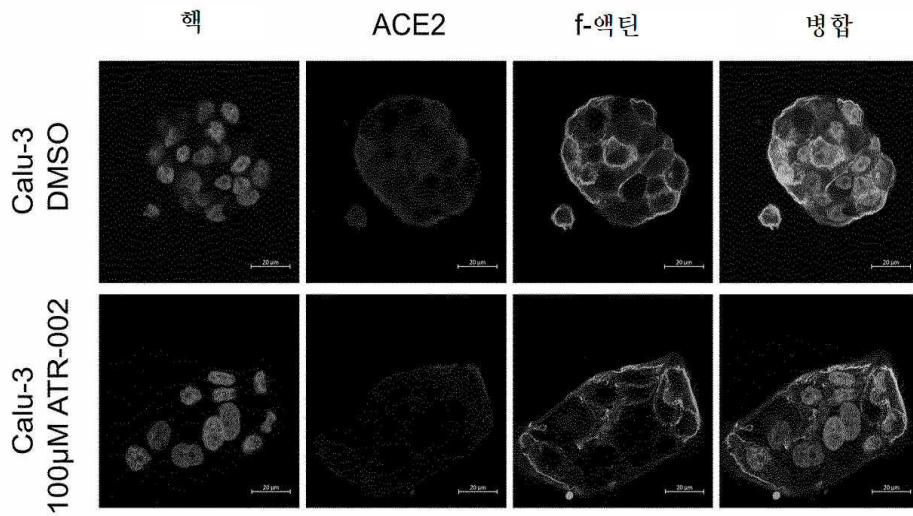
도면18a



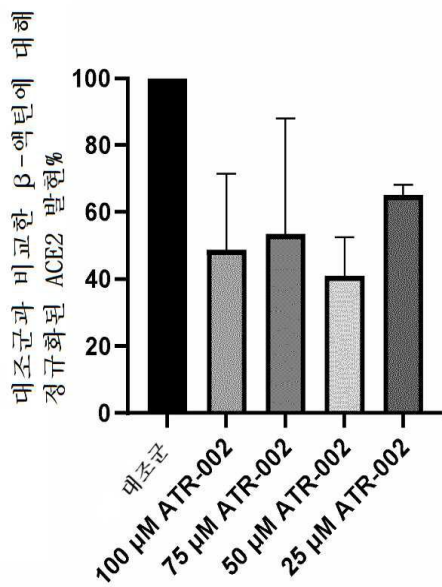
도면18b



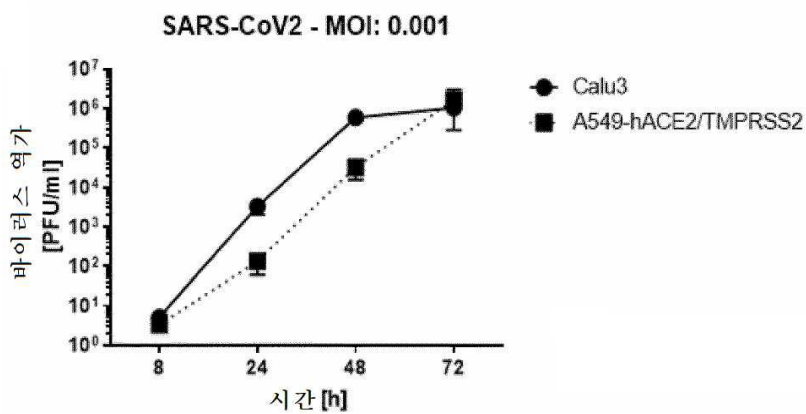
도면19



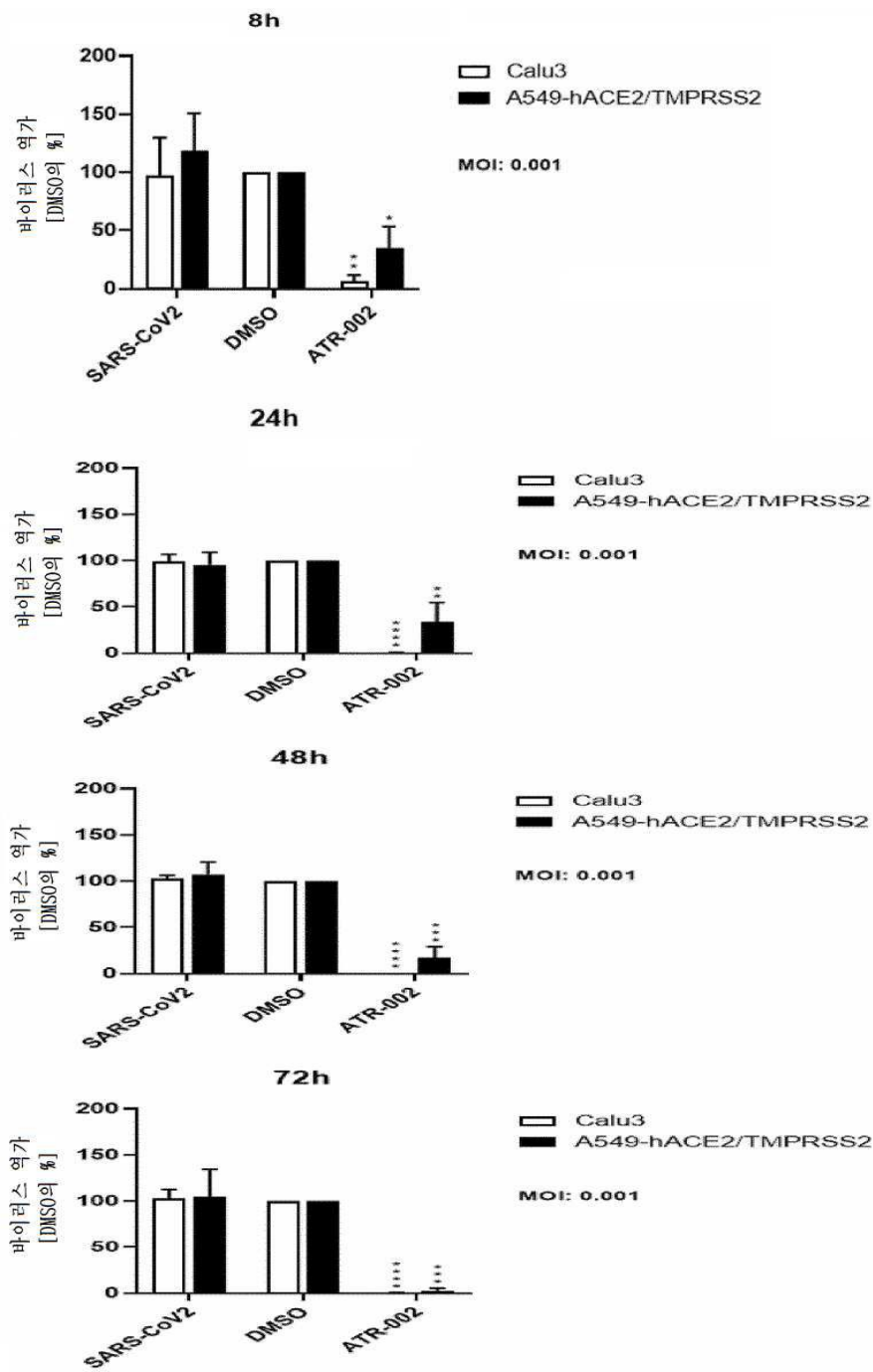
ATR-002 처리 후 ACE2 감소



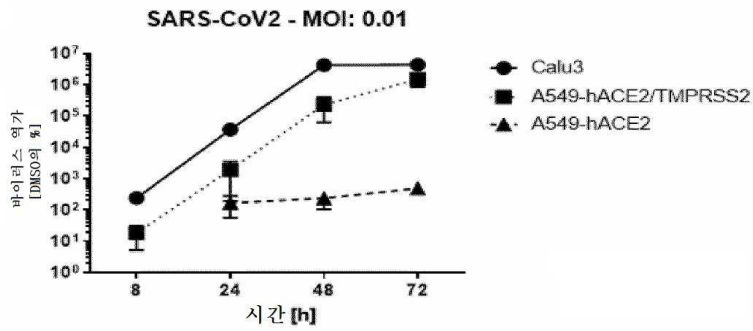
도면20a



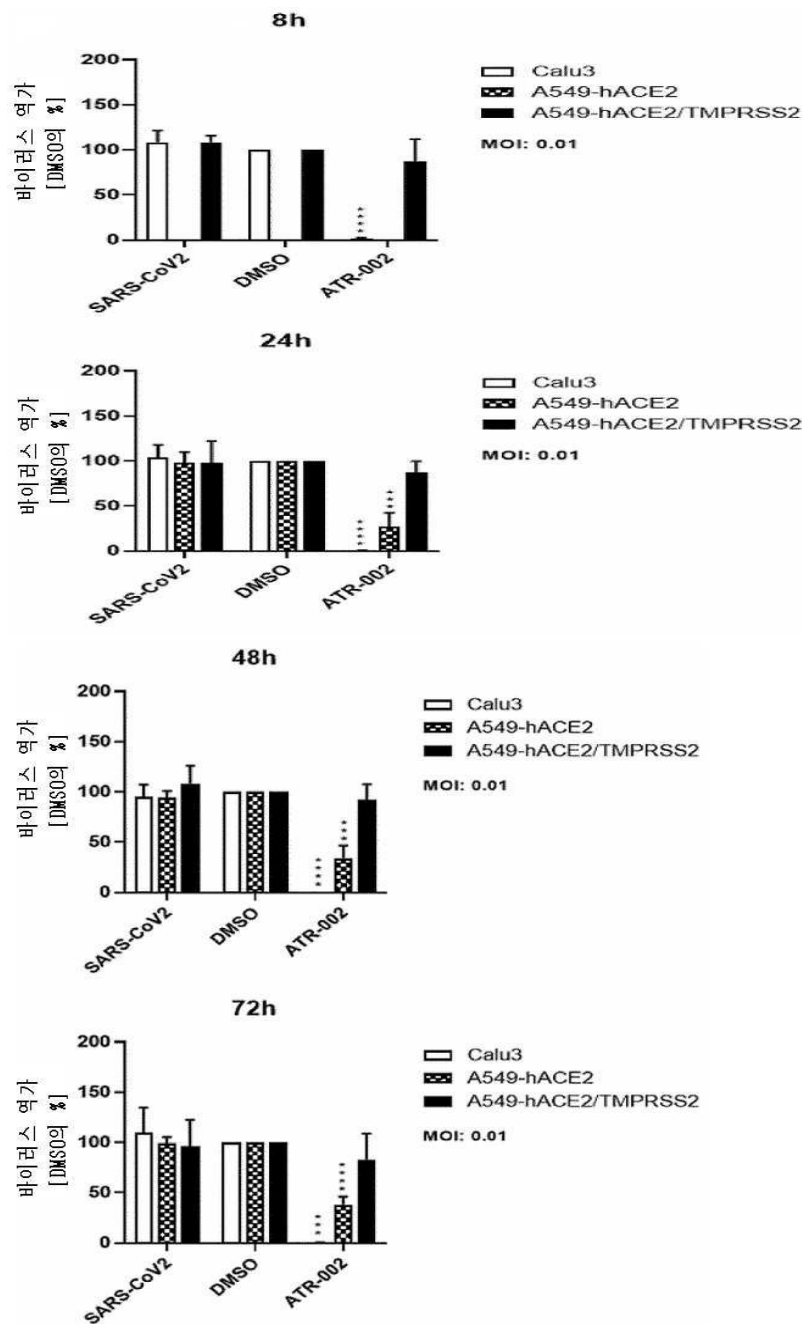
도면20b



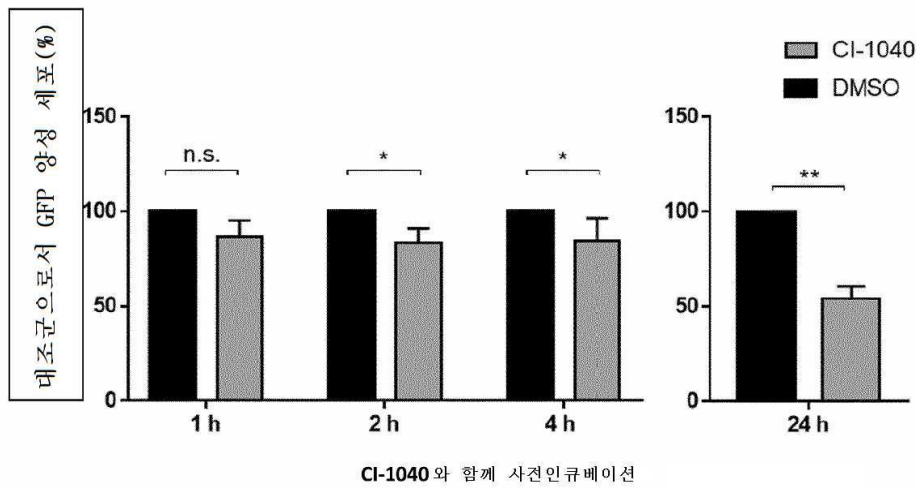
도면21c



도면21d



도면21



도면22

