(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0023588
(43) 공개일자 2024년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/409 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 31/4439 (2006.01) *A61K 8/49* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) *A61Q 17/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/409 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2024-0021367(분할)
(22) 출원일자 2024년02월14일
심사청구일자 2024년02월14일
(62) 원출원 특허 10-2021-0104190
원출원일자 2021년08월06일
심사청구일자 2021년08월06일
(30) 우선권주장
1020200120799 2020년09월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김경규
서울특별시 강남구 삼성로51길 37, 109동 2902호
송문정
서울특별시 강남구 역삼로 307, 203동 2004호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

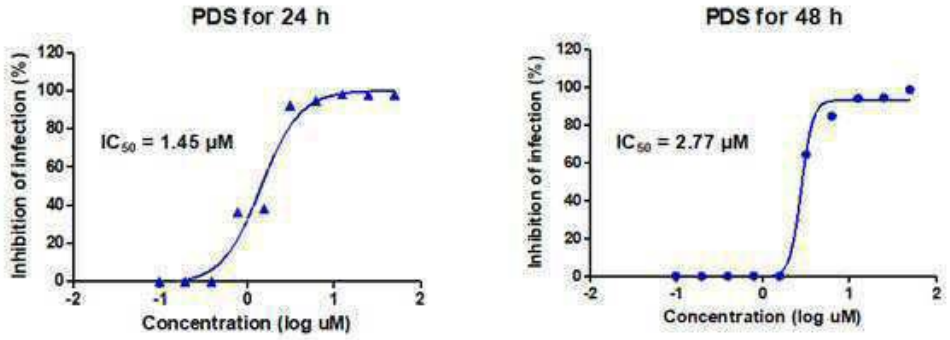
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 포함하는 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다. 본 발명에 따른 화합물은 코로나바이러스 G4 구조에 결합해 G4 구조를 안정화 시키고, 코로나바이러스의 단백질 발현을 감소시킬 뿐 아니라 바이러스의 세포 감염을 효과적으로 저해할 수 있으므로, 이를 이용하여 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료에 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도14a



(52) CPC특허분류
A61K 31/4439 (2013.01)
A61K 8/4913 (2013.01)
A61K 8/4926 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)
A61Q 17/00 (2021.05)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)
(72) 발명자
박만성
서울특별시 강남구 삼성로 417, 104동 704호
안진현
경기도 수원시 장안구 이목로 24, 104동 3001호
마리아 라자큐
경기도 수원시 장안구 정자천로13번길 138-3, 201호
수부라마니얌 라비찬드란
경기도 수원시 장안구 화산로125번길 10-16, 201호
한지호
서울특별시 노원구 덕릉로 780, 101동 1511호
김재현
경기도 의정부시 오목로 171, 204동 601호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711134426
과제번호 2021M3A9I2080487
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 CoV-X 대비 코로나바이러스 역유전학시스템 및 구조기반 세포진입 특성 연구 기술개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.04.01 ~ 2025.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711135171
과제번호 2020R1A4A1018019
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 바이러스 유전체 G-quadruplex 기능 연구실
기 여 율 1/2
과제수행기관명 성균관대학교
연구기간 2020.07.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

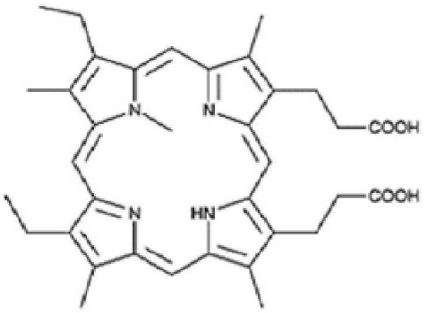
청구범위

청구항 1

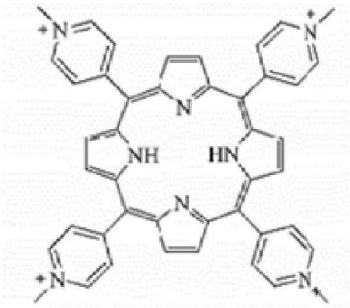
코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 화합물은 하기 화학식 3 및 화학식 6로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 3]



[화학식 6]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 코로나바이러스는 인간 코로나바이러스 229E(HCoV-229E), 인간 코로나 바이러스 OC43(HCoV-OC43), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 인간 코로나바이러스 NL63(HCoV-NL63, 뉴헤븐 코로나바이러스), 인간 코로나바이러스 HKU1, 중동호흡기증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 및 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-Cov-2)로 이루어지는 군에서 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화합물은 코로나바이러스의 G4 구조를 안정화 시키는 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또

는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화합물은 코로나바이러스 단백질 Nsp1(non-structural protein 1), Nsp3(non-structural protein 3) 및 뉴클레오캡시드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

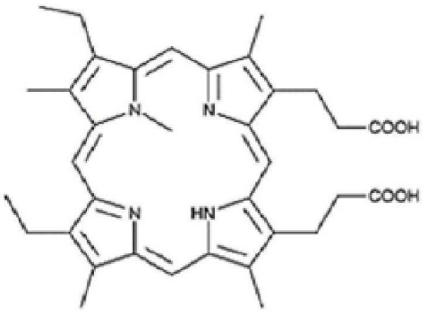
상기 화합물은 코로나바이러스 비리온 생산을 억제하는 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

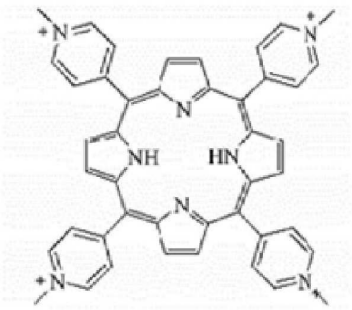
코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물로서,

상기 화합물은 하기 화학식 3 및 화학식 6로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 3]



[화학식 6]

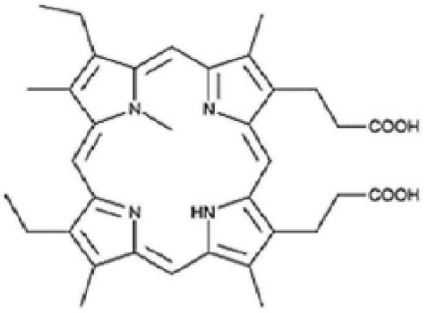


청구항 7

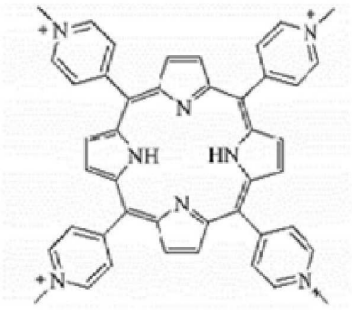
코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약외품 조성물로서,

상기 화합물은 하기 화학식 3 및 화학식 6로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약외품 조성물.

[화학식 3]



[화학식 6]



청구항 8

제7항에 있어서,

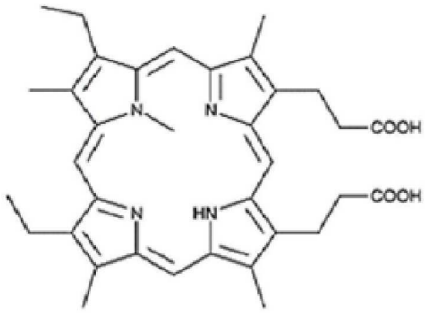
상기 의약외품은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시 및 연고제로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약외품 조성물.

청구항 9

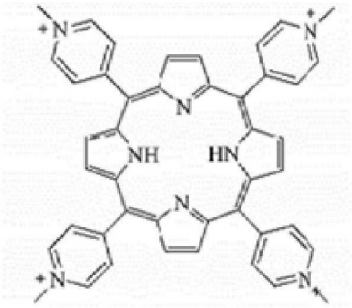
코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스에 대한 항바이러스용 조성물로서,

상기 화합물은 하기 화학식 3 및 화학식 6로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스에 대한 항바이러스용 조성물.

[화학식 3]



[화학식 6]



청구항 10

제9항에 있어서,

상기 코로나바이러스는 인간 코로나바이러스 229E(HCoV-229E), 인간 코로나바이러스 OC43(HCoV-OC43), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 인간 코로나바이러스 NL 63(HCoV-NL63, 뉴헤븐 코로나바이러스), 인간 코로나바이러스 HKU1, 중동호흡기증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 및 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-Cov-2)로 이루어지는 군에서 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스에 대한 항바이러스용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 포함하는 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 중국 우한을 중심으로 세계적으로 코로나바이러스감염증19(COVID-19) 대유행(pandemic)을 유발한 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스2(SARS-CoV-2 또는 2019-nCoV)는 2021년 7월 20일 기준으로 190,877,071 명의 확진자를 발생시켰으며, 사망자도 4,095,650 명에 이르는 것으로 보고되었다. 이에 따라 전세계적으로 치료법과 예방법이 요구되고 있는 실정이다.

[0004] SARS-CoV-2(2019-nCoV)는 인체 세포 표면의 안지오텐신 전환효소 2(ACE2; angiotensin-converting enzyme 2)를 리셉터로 활용하여 침투하는 것으로 알려져 있다. ACE2 는 주로 폐, 동맥 혈관, 신장, 심장 및 소장 등에 널리

분포되어 있으며, 이에 따라 호흡기를 통하여 전파되며 Sever Acute Respiratory Syndrome(SARS) 를 유발하는 것으로 알려져 있다. SARS-CoV-2(2019-nCoV)의 경우 스파이크 단백질(spike(S) protein)이라고 불리는 스파이크 모양의 단백질의 여러 서브 유닛이 숙주 세포의 ACE2 와 작용하여 감염되는 것으로 이해된다. 현재 개발 중인 치료제는 대부분 바이러스의 스파이크 단백질, 단백질 가수분해 효소 또는 핵산 중합효소에 결합하는 저분자 물질을 이용해서 만든다.

[0005] 수많은 SARS-CoV-2 변종들이 COVID-19 대유행을 통해 전 세계적으로 출현하고 순환하고 있다. 이러한 변종들의 대부분은 N501Y, E484K 및 D614G 돌연변이와 같은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 돌연변이를 나타낸다. 스파이크 단백질은 대부분의 코로나19 백신의 표적이지만 많은 변이체가 높은 전파율을 보이며 중화항체를 회피하는 능력을 갖고 있다. 바이러스 단백질을 표적으로 하는 예방 백신과 약물은 바이러스 감염을 퇴치하기 위한 기본적인 방법이지만, 동일한 바이러스 패밀리 내에서 보존되는 게놈 부위를 표적으로 하는 것이 새로운 항바이러스 요법을 개발할 수 있는 새로운 기회를 제공할 수 있다.

[0006] 세포 내의 DNA은 일반적으로 이중 나선 구조를 갖는데, 특정한 세포환경이나 세포작용 중에 다양한 구조를 갖는다는 것이 알려져 있다. 이러한 특수한 구조 중에 4가닥의 DNA 혹은 RNA가 만드는 4중 나선 구조가 잘 알려져 있는데, 이러한 구조를 G4(G-quadruplex) 혹은 G4 구조라고 부른다. G4 구조는 DNA 혹은 RNA 염기 중 구아닌이 연이어 있을 때 잘 만들어진다. DNA 가닥의 구아닌들이 결합해 사각 판 구조를 형성하고, 이러한 판이 연달아 쌓여 육면체 모양의 안정적인 매듭을 만든다. G4 구조는 유전자 발현이나 DNA 복제 혹은 단백질 번역 과정을 조절한다고 알려져 있다.

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 코로나바이러스에 존재하는 25개의 G4 구조를 대상으로 연구하던 중, 화합물과 결합에 의한 G4 구조의 안정화를 통해 코로나바이러스의 주요한 단백질 발현을 효과적으로 저해하고 바이러스의 세포 감염을 효과적으로 저해할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2021-0014601호(2021.02.09.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 코로나바이러스에 존재하는 25개의 G4 구조를 대상으로 연구하던 중, 화합물과 결합에 의한 코로나바이러스 G4 구조의 안정화를 통해 코로나바이러스의 주요한 단백질의 발현을 효과적으로 저해하고 바이러스의 세포 감염을 효과적으로 저해할 수 있음을 확인함으로써, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료 효과를 확인한 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 이에 본 발명의 목적은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약외품 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스에 대한 항바이러스용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스에 대한 항바이러스용 조성물을 제공한다.

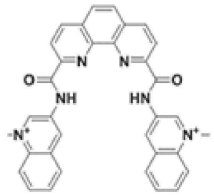
[0021] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물 또는 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용도를 제공한다.

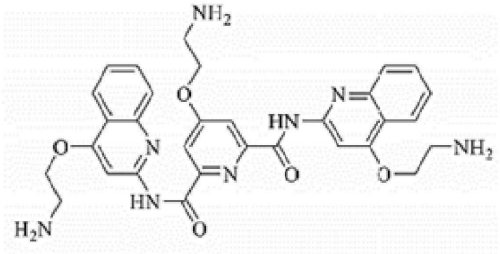
[0023] 또한, 본 발명은 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료 약제 제조를 위한 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물의 용도를 제공한다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에서 상기 화합물은 하기 화학식 1 내지 화학식 7로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

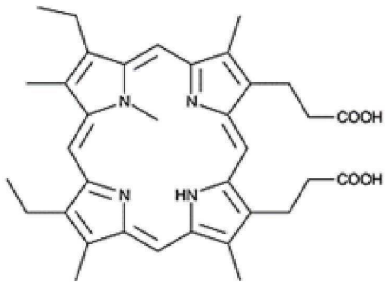
[0025] [화학식 1]

[0026] 

[0028] [화학식 2]

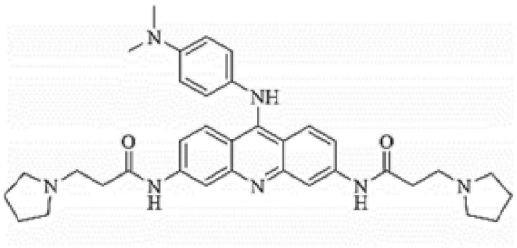
[0029] 

[0031] [화학식 3]



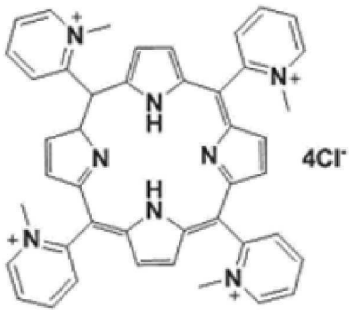
[0032]

[0034] [화학식 4]



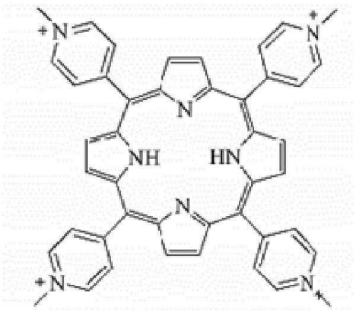
[0035]

[0037] [화학식 5]



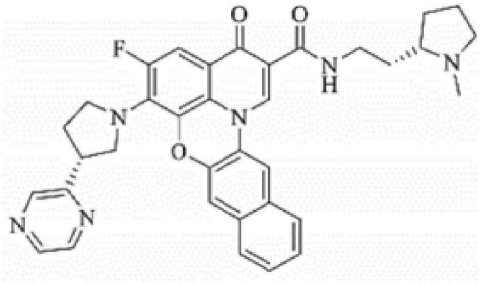
[0038]

[0040] [화학식 6]



[0041]

[0043] [화학식 7]



[0044]

[0045] 본 발명의 다른 구현예에서 상기 코로나바이러스는 인간 코로나바이러스 229E(HCoV-229E), 인간 코로나바이러스 OC43(HCoV-OC43), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 인간 코로나바이러스 NL63(HCoV-NL63, 뉴헤븐 코로나바이러스), 인간 코로나바이러스 HKU1, 중동호흡기증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 및 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-Cov-2)로 이루어지는 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 화합물은 코로나바이러스의 G4 구조를 안정화 시키는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 화합물은 코로나바이러스 단백질 Nsp1(non-structural protein 1), Nsp3(non-structural protein 3), 및 뉴클레오캡시드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

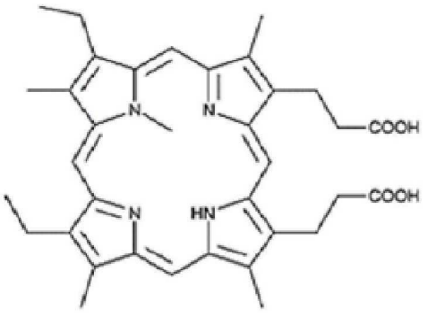
[0048] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 화합물은 코로나바이러스 비리온 생산을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 의약외품은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시 및 연고제로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

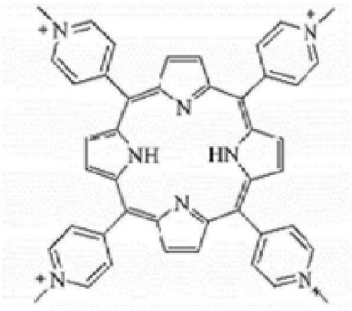
[0052] 상기 화합물은 하기 화학식 3 및 화학식 6로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0053] [화학식 3]



[0054]

[0055] [화학식 6]



[0056]

[0057] 또한, 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물로서,

[0058] 상기 화합물은 상기 화학식 3 및 화학식 6로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0059] 또한, 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약외품 조성물로서,

[0060] 상기 화합물은 상기 화학식 3 및 화학식 6로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0061] 또한, 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스에 대한 항바이러스용 조성물로서,

[0062] 상기 화합물은 상기 화학식 3 및 화학식 6로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 코로나바이러스에 대한 항바이러스용 조성물을 제공한다.

[0063] 또한, 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물로서,

[0064] 상기 화합물은 상기 화학식 3 및 화학식 6로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0065] 또한, 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물로서,

[0066] 상기 화합물은 상기 화학식 3 및 화학식 6로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물의 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료용도를 제공한다.

[0067] 또한, 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물로서,

[0068] 상기 화합물은 상기 화학식 3 및 화학식 6로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물의 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료 제제를 제조하기 위한 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0070] 본 발명에 따른 화합물은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합해 G4 구조를 안정화 시키고 코로나바이러스의 단백질 발현을 감소시킬 뿐만 아니라 바이러스의 세포 감염을 효과적으로 저해할 수 있으므로, 이를 이용하여 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0072] 도 1은 SARS-CoV-2의 유전자 및 G4의 분포를 나타낸 것이다.

도 2a 및 2b는 코로나바이러스에 존재하는 25개의 G4의 CD 스펙트럼을 나타낸 것이다. x축은 파장(nm), y축은 타원율(mdeg)을 나타낸 것이다.

도 3a 및 3b는 코로나바이러스에 존재하는 25개의 G4의 열 용융 곡선을 나타낸 것이다. x축은 파장(nm), y축은 정규화된 타원율(mdeg)을 나타낸 것이다.

도 4는 WT-G-353, WT-G-644 및 WT-G-3467과 Mut-G-353, Mut-G-644 및 Mut-G-3467의 CD 스펙트럼과 열 용융 곡선을 나타낸 것이다.

도 5a 및 5b는 코로나바이러스에 존재하는 25개의 G4의 CD 스펙트럼을 G4 결합 화합물 CX-3543, PDS 및 PhenDC3 결합 유무에 따라 나타낸 것이다.

도 6a 및 6b는 코로나바이러스에 존재하는 25개의 G4의 열 용융 곡선을 G4 결합 화합물 CX-3543, PDS 및 PhenDC3 결합 유무에 따라 나타낸 것이다.

도 7a는 HEK293T 세포에 PDS가 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5.5, 7.5, 10, 25, 50, 75 μM 처리되었을 때 세포 생존율을 나타낸 것이다. x축은 농도(μM), y축은 생존율을 나타낸다.

도 7b는 Vero 세포에 PDS가 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5.5, 7.5, 10, 25, 50, 75 μM 처리되었을 때 세포 생존율을 나타낸 것이다. x축은 농도(μM), y축은 생존율을 나타낸다.

도 7c는 HEK293T 세포에 PhenDC3가 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5.5, 7.5, 10, 25, 50, 75 μM 처리되었을 때 세포 생존율을 나타낸 것이다. x축은 농도(μM), y축은 생존율을 나타낸다.

도 7d는 Vero 세포에 PhenDC3가 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5.5, 7.5, 10, 25, 50, 75 μM 처리되었을 때 세포 생존율을 나타낸 것이다. x축은 농도(μM), y축은 생존율을 나타낸다.

도 8은 T7-WT-G-353, T7-WT-G-644, T7-WT-G-3467, T7-Mut-G-353, T7-Mut-G-644 및 T7-Mut-G-3467에 대해서 61, 63, 65, 67, 69℃에서 실행된 Gradient PCR 결과를 나타낸 것이다. M은 250bp 내지 10kb 범위의 1kb DNA 마커를 나타낸다.

도 9a 내지 9c는 N1-WT-G-353, N1-WT-G-644, N1-WT-G-3467에서 G4 결합 화합물 PDS가 5, 15, 25, 50 μM 처리되었을 때, IVT 분석 결과를 웨스턴 블롯의 밴드강도 그래프로 나타낸 것이다. x축은 농도(μM), y축은 밴드 강도를 나타낸다.

도 10a 내지 10c는 N1-WT-G-353, N1-WT-G-644, N1-WT-G-3467에서 G4 결합 화합물 PhenDC3가 5, 15, 25, 50 μM 처리되었을 때, IVT 분석 결과를 웨스턴 블롯의 밴드강도 그래프로 나타낸 것이다. x축은 농도(μM), y축은 밴드 강도를 나타낸다.

도 11a 및 11b는 N1-WT-G-353, N1-WT-G-644에서 G4 결합 화합물 PDS가 5, 10, 15, 20, 25, 50 μM 처리되었을 때, IVT 분석 결과를 웨스턴 블롯으로 나타낸 것이다.

도 11c는 N1-WT-G-3467에서 G4 결합 화합물 PDS가 5, 15, 25, 50 μM 처리되었을 때, IVT 분석 결과를 웨스턴 블롯으로 나타낸 것이다.

도 11d는 N1-Mut-G-3467에서 G4 결합 화합물 PDS가 5, 15 25, 50 μM 처리되었을 때, IVT 분석 결과를 웨스턴 블롯으로 나타낸 것이다.

도 12a 및 12b는 N1-WT-G-353, N1-WT-G-644에서 G4 결합 화합물 PhenDC3가 5, 10, 15, 20, 25, 50 μM 처리되었을 때, IVT 분석 결과를 웨스턴 블롯으로 나타낸 것이다.

도 12c는 N1-WT-G-3467에서 G4 결합 화합물 PhenDC3가 5, 15, 25, 50 μM 처리되었을 때, IVT 분석 결과를 웨스턴 블롯으로 나타낸 것이다.

도 12d는 N1-Mut-G-3467에서 G4 결합 화합물 PhenDC3가 5, 15, 25, 50 μM 처리되었을 때, IVT 분석 결과를 웨스턴 블롯으로 나타낸 것이다.

도 13은 SARS-CoV-2에 감염된 Vero 세포내에서 N 단백질 발현에 대한 항바이러스 활성을 G4 결합 화합물 NMM,

PDS, PhenDC3, BRACO19 농도에 따른 SARS-CoV-2 감염저해의 용량 반응 곡선 분석 결과로 나타낸 것이다. ●은 해당 화합물의 SARS-CoV-2 감염저해율(inhibition of infection)을 나타낸다. ■는 각 화합물의 세포 독성(cytotoxicity)으로, 각 웰의 세포수를 mock 그룹 웰들의 평균 세포수로 정규화하여 그래프에 'cell number to mock'으로 표기하였다.

도 14a는 SARS-CoV-2에 감염된 Vero 세포의 배양액에서 비리온 생산에 대한 항바이러스 활성을 G4 결합 화합물 PDS 농도에 따른 SARS-CoV-2의 감염저해의 용량 반응 곡선 분석 결과로 나타낸 것이다. x축은 농도(log μM), y축은 SARS-CoV-2의 감염 저해율(%)을 나타낸다.

도 14b는 SARS-CoV-2에 감염된 Vero 세포의 배양액에서 비리온 생산에 대한 항바이러스 활성을 G4 결합 화합물 PhenDC3 농도에 따른 SARS-CoV-2의 감염저해의 용량 반응 곡선 분석 결과로 나타낸 것이다. x축은 농도(log μM), y축은 SARS-CoV-2의 감염 저해율(%)을 나타낸다.

도 15는 SARS-CoV-2에 감염된 Vero 세포의 배양액에서 비리온 생산에 대한 항바이러스 활성을 G4 결합 화합물 NMM 농도에 따른 SARS-CoV-2의 감염저해의 용량 반응 곡선 분석 결과로 나타낸 것이다. x축은 농도(log μM), y축은 SARS-CoV-2의 감염 저해율(%)을 나타낸다.

도 16은 HCoV-OC43 바이러스에 감염된 HCT-8 세포의 배양액에서 비리온 생산에 대한 항바이러스 활성을 G4 결합 화합물 NMM, TMPyP2, TMPyP4, 또는 CX3543 농도에 따른 HCoV-OC43 바이러스의 감염저해의 용량 반응 곡선 분석 결과로 나타낸 것이다. x축은 농도(log μM), y축은 HCoV-OC43 바이러스의 감염 저해율(%)과 세포생존율(%)을 나타낸다. 도 16 내의 표는 각 G4 결합 화합물의 IC_{50} 값을 나타낸다. 진한 빨간 색 ●은 HCT-8 세포에서의 각 화합물에 대한 세포독성으로, 각 화합물의 농도별 세포독성은 G4 결합 화합물 처리군을 DMSO 또는 증류수 대조군으로 정규화하여 그래프에 상대적인 세포생존율(%)으로 표기하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073] 본 발명의 발명자들은 화합물이 코로나바이러스 G4 구조에 결합하여, G4 구조를 안정화시켜 코로나바이러스의 단백질 발현을 감소시킬 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0074] 본 발명의 일 실시예에서는 G4 결합 화합물 유무에 따른 CD 스펙트럼과 열 용융 곡선을 통해, 화합물 PhenDC3, PDS가 G4를 안정화시키는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0075] 본 발명의 다른 실시예에서는 HEK293T 및 Vero 세포에서 화합물 PhenDC3, PDS의 세포 독성이 없음을 확인하였다(실시예 5 참조).

[0076] 본 발명의 다른 실시예에서는 IVT(In-Vitro transcriotion/trnaslation)분석을 통해 G4 결합 화합물 PDS 및 PhenDC3의 Nsp1 및 Nsp3 발현 억제를 확인하였다(실시예 7 참조).

[0077] 본 발명의 다른 실시예에서는 SARS-CoV-2에 감염된 세포에서 G4 결합 화합물(NMM, PDS, PhenDC3, BRACO19)에 따른 N 단백질 발현에 대한 항바이러스 활성을 확인하였다(실시예 8 참조).

[0078] 본 발명의 다른 실시예에서는 SARS-CoV-2에 감염된 세포에서 G4 결합 화합물(PDS, PhenDC3, NMM)에 따른 비리온 생산에 대한 항바이러스 활성을 확인하였다(실시예 9 참조).

[0079] 본 발명의 다른 실시예에서는 HCoV-OC43 바이러스에 감염된 세포에서 G4 결합 화합물(NMM, TMPyP2, TMPyP4, CX3543)에 따른 비리온 생산에 대한 항바이러스 활성을 확인하였다(실시예 10 참조).

[0080] 상기와 같은 실시예 결과를 통해 본 발명에 따른 화합물이 코로나바이러스 G4 구조를 안정화시키고, 코로나바이러스의 단백질 발현을 감소시키는 것을 확인하였는바, 화합물은 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있다.

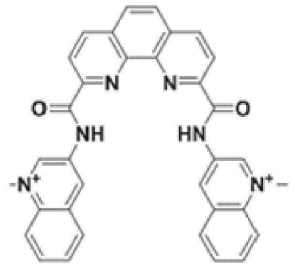
[0082] 이하 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0084] 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

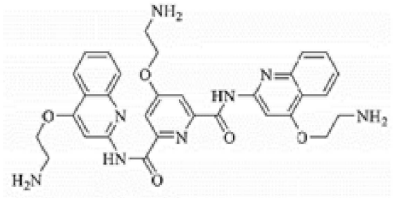
[0085] 본 발명에서, 상기 화합물은 하기 화학식 1 내지 화학식 7로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하

나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

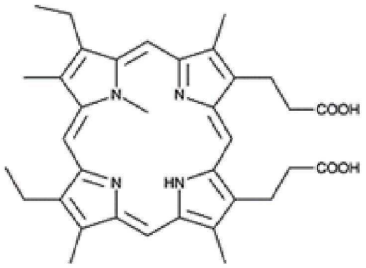
[0086] [화학식 1]

[0087] 

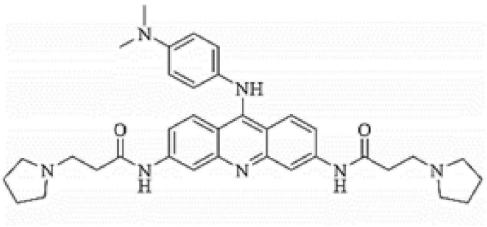
[0089] [화학식 2]

[0090] 

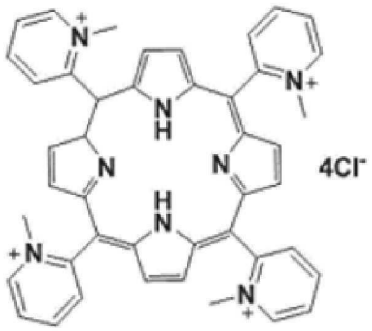
[0092] [화학식 3]

[0093] 

[0095] [화학식 4]

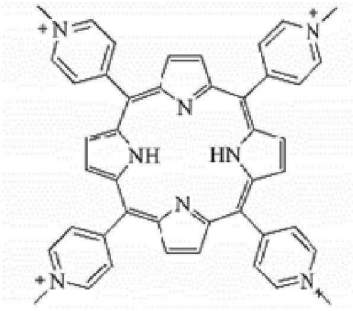
[0097] 

[0099] [화학식 5]



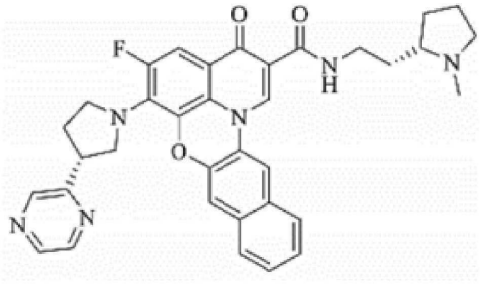
[0100]

[0102] [화학식 6]



[0103]

[0105] [화학식 7]



[0106]

[0109] 본 발명에서, 상기 화학식 1의 화합물은 PhenDC3으로 명명될 수 있으며, 2-N,9-N-bis(1-methylquinolin-1-ium-3-yl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxamide의 IUPAC 네임을 가질 수 있다. 또한, 분자량은 550.6, 화학식은 $C_{34}H_{26}N_6O_2$ 일 수 있다.

[0110] 본 발명에서, 상기 화학식 2의 화합물은 Pyridostatin(PDS)으로 명명될 수 있으며, 4-(2-Aminoethoxy)-N2,N6-bis(4-(2-aminoethoxy)quinolin-2-yl)pyridine-2,6-dicarboxamide의 IUPAC 네임을 가질 수 있다. 또한, 분자량은 596.6, 화학식은 $C_{31}H_{32}N_8O_5$, 끓는점은 753.8±60.0℃, 인화점은 409.7±32.9℃ 일 수 있다.

[0111] 본 발명에서, 상기 화학식 3의 화합물은 N-Methyl Mesoporphyrin IX (NMM9)으로 명명될 수 있으며, 3-[18-(2-carboxyethyl)-7,12-diethyl-3,8,13,17,22-pentamethyl-23H-porphyrin-2-yl]propanoic acid의 IUPAC 네임을 가질 수 있다. 또한, 분자량은 580.7, 화학식은 $C_{35}H_{40}N_4O_4$, 밀도는 1.26g/cm^3 일 수 있다.

[0112] 본 발명에서, 상기 화학식 4의 화합물은 BRACO-19로 명명될 수 있으며, N-[9-[4-(dimethylamino)anilino]-6-(3-pyrrolidin-1-ylpropanoylamino)acridin-3-yl]-3-pyrrolidin-1-ylpropanamide의 IUPAC 네임을 가질 수 있다. 또한 분자량은 593.8, 화학식은 $C_{35}H_{43}N_7O_2$, 끓는점은 854.95℃, 인화점은 470.857℃, 밀도는 1.275g/cm^3 일 수 있다.

[0113] 본 발명에서, 상기 화학식 5의 화합물은 TMPyP2로 명명될 수 있으며, 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridin-1-ium-2-yl)-21,23-dihydroporphyrin의 IUPAC 네임을 가질 수 있다. 또한 분자량은 678.8, 화학식은 $C_{44}H_{38}N_8^{4+}$ 일 수 있다.

[0114] 본 발명에서, 상기 화학식 6의 화합물은 TMPyP4로 명명될 수 있으며, 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridin-1-ium-4-yl)-21,23-dihydroporphyrin의 IUPAC 네임을 가질 수 있다. 또한, 분자량이 678.8, 화학식은 $C_{44}H_{38}N_8^{4+}$일 수 있다.

[0115] 본 발명에서, 상기 화학식 7의 화합물은 CX 3543으로 명명될 수 있으며 15-fluoro-N-[2-[(2S)-1-methylpyrrolidin-2-yl]ethyl]-18-oxo-14-(3-pyrazin-2-ylpyrrolidin-1-yl)-12-oxa-1-azapentacyclo[11.7.1.$0^{2,11}$.$0^{4,9}$.$0^{17,21}$]henicosa-2,4,6,8,10,13(21),14,16,19-nonaene-19-carboxamide의 IUPAC 네임을 가질 수 있다. 또한, 분자량이 604.673, 화학식은 $C_{35}H_{33}FN_6O_3$, 끓는점은 845.3±65.0℃ 일 수 있다.

[0116] 본 발명에서, 상기 코로나바이러스는 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-Cov-2 또는 2019 novel coronavirus 또는 2019-nCoV)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0117] 본 발명에서 사용된 용어, "코로나바이러스"는 니도바이러스목, 코로나바이러스과, 코로나바이러스아과 혹은 Torovirinae에 포함된 바이러스속인 종에 해당한다. 코로나바이러스는 +ssRNA와 나선형 대칭형 뉴클레오캡시드로 감싸진 바이러스이다. 또한, 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)는 지금까지 사람을 감염시키는 7번째 코로나바이러스이고, 나머지는 인간 코로나바이러스 229E(HCoV-229E), 인간 코로나바이러스 OC43(HCoV-OC43), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 인간 코로나바이러스 NL63(HCoV-NL63, 뉴헤븐 코로나바이러스), 인간 코로나바이러스 HKU1, 중동호흡기증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 이다. 코로나바이러스들의 전반적인 구조에 기여하는 단백질들은 스파이크, 외피 및 뉴클레오캡시드(Nucleocapsid)이다. SARS 코로나바이러스의 경우, 스파이크(spike(S)) 위에 있는 확정된 결합수용기 도메인이 바이러스의 부착부분을 이것의 세포 수용기인 안지오텐신 전환효소 2(ACE2)로 중재한다. 몇몇 코로나바이러스(특히, 베타코로나바이러스 하위집단 구성원)는 또한 항체 에스테라아제라고 불리는 단백질 같은 짧은 스파이크를 가진다. 코로나바이러스는 바이러스성 폐렴이나 2차적인 세균성 폐렴을 일으킬 수 있으며, 직접적인 바이러스성 기관지염이나 2차적인 세균성 기관지염도 일으킬 수 있다. 2003년에 발견된 인간 코로나바이러스는 중증급성호흡기증후군(SARS)를 일으키는 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV)로, 상부 및 하부 호흡기 감염을 유발한다.

[0118] 또한, 본 발명에서 사용된 용어, "SARS-CoV-2" 또는 "2019-nCoV"는, 신종 코로나바이러스를 지칭하는 것으로서, RNA 바이러스로서 사스와 메르스의 변종을 나타낸다. SARS-CoV-2는 사스와 약 79.7%의 서열 동일성을, 메르스와 약 50%의 서열 동일성을 공유한다. 하지만, 사스와 메르스와는 대조적으로, 2019-nCoV의 spike glycoprotein은 1 개의 RBD domain이 위로 돌출된 형태의 구조를 형성하며, 이로 인해 타겟 리셉터(receptor)인 ACE2(angiotensin)와 100 내지 1,000배 더 강력한 결합력을 나타낸다. 이러한 강력한 결합력은 세포 내로 침투를 더욱 더 용이하게 하여 전염력을 높이는 원인으로 작용한다.

[0119] 본 발명에서, 상기 코로나바이러스 감염증은 코로나 바이러스 호흡기 감염 질환일 수 있다. 상기 바이러스성 호흡기 감염질환은 기침, 재채기, 두통, 코막힘, 인후통, 설사, 손가락 또는 발가락의 변색, 결막염, 고열, 천명, 기관지염, 세기관지염, 폐렴, 천식, 후각 및 미각 상실, 및 호흡기 부전 등의 증상을 나타낼 수 있다. 상기 코로나 바이러스가 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-Cov-2)인 경우에는, 발열과 호흡기 증상(기침, 인후통, 호흡곤란)을 주요 증상으로 하고, 이와 더불어 두통, 근육통, 객혈과 오심, 오한, 가슴 통증, 설사 등의 증상을 나타낼 수 있다. 또한, 상기 코로나바이러스감염증은 코로나바이러스감염증19(COVID-19)일 수 있다.

[0120] 본 발명에서, 상기 바이러스는 생존을 위하여 복제와 감염을 통해 게놈을 조정할 수 있다. 바이러스 RNA 게놈은 구조 도메인, 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 폴리시스트론 mRNA, 중첩 판독 프레임 및 RNA 슈도노트 구조와 같은 다양한 영역을 보유하여 게놈의 발현 및 복제를 제어한다. 예를 들어, 게놈 RNA의 특정 영역이 안정적인 비

정규 구조로 접히는 것은 바이러스 RNA 대사에 대한 장애물로 작용할 수 있다.

[0121] 본 발명에서 사용된 용어, "스파이크(spike) 단백질" 또는 "S protein"은 코로나바이러스 표면 단백질을 지칭한다.

[0122] 본 발명에서 사용된 용어, “G4 구조” 또는 “G4(G-quadruplex)”는 구아닌(G, Guanine)이 풍부한 DNA 또는 RNA 서열에서 형성되는 4가닥의 핵산 2차 구조이다. G4 구조는 DNA와 RNA 바이러스 게놈 모두에 널리 분포되어 있다. 예를 들어, 엡스타인바 바이러스(EBV), 지카 바이러스(ZIKV), C형 간염 바이러스(HCV), 인유두종 바이러스(HPV), 인간 단순 포진 바이러스(HSV), 에볼라 바이러스, 인간 면역 결핍 바이러스-1(HIV-1), 인플루엔자 바이러스(H1N1) 및 인간 거대 세포 바이러스(HCMV)와 레트로바이러스 및 렌티바이러스의 긴 말단 반복 영역에서 발견되어 보고되었다. 최근 G4의 특이적인 항체와 화합물을 사용하여 얻은 전체 게놈과 전사체에 대한 생물정보학 분석에서 G4의 유전학적 위치가 밝혀졌다. DNA-G4는 텔로미어, 유사분열 및 감수분열의 이중가닥 절단 부위, 전사 개시 부위 및 복제 기점에서 중요한 역할을 한다. RNA-G4는 splicing, RNA 처리 및 수송에서 mRNA 번역에 이르기까지 RNA 대사의 많은 단계를 조정한다(Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 2884).

[0123] 본 발명에서, 상기 화합물은 G4를 안정화 시키는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 Braco-19는 Nipah 바이러스에서 G4 harboring gene의 발현에 대한 억제 활성을 보여 바이러스 진입 및 복제를 중지하는 화합물이다. 또한, 상기 CX-3543은 유암종과 신경내분비종양에 대한 생체 내 임상 2상 시험을 통과한 유일한 G4 결합 화합물이다. 또한, 상기 PDS는 EBV, 가성 광견병 바이러스 및 헤르페스 바이러스 miRNA에서 보존된 G4를 안정화함으로써 유전자 발현을 감소시키는 것으로 알려져 있는 화합물이다. 또한, 상기 PhenDC3는 세포 독성 없이 세포에서 HCV 및 EBV 바이러스 복제를 억제하는 것으로 알려진 화합물이다.

[0124] 본 발명에서, 상기 화합물은 코로나바이러스 단백질 Nsp1(non-structural protein 1), Nsp3(non-structural protein 3)및 뉴클레오캡시드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질의 발현을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0125] 본 발명에서 사용된 용어, “Nsp1(non-structural protein 1)”은 바이러스 복제와 숙주 면역 반응을 방해하는 다양한 역할을 하는 가장 중요한 독성 인자이다. SARS-CoV-2에서 Nsp1은 540bp 길이의 RNA ORF(Opne reading frame)에 G4-353 및 G4-644를 포함한다. Nsp1은 주로 I형 인터페론 발현과 항바이러스 신호 전달 경로를 표적으로 하여 숙주 mRNA 번역을 억제하고 숙주의 선천성 면역 기능을 억제한다.

[0126] 본 발명에서 사용된 용어, “Nsp3(non-structural protein 3)”는 다양한 기능을 가진 SARS-CoV-2에서 가장 큰 다중 도메인 유전자(5.83Kbp)이다. Nsp3-MAC1 도메인은 618 bp 이며 G4-3467을 포함한다. Nsp3-MAC1 도메인은 poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs)에 의해 촉매되는 항바이러스성 de-ADPribosylating 활성을 통해 숙주의 선천성 면역에 대항한다. Nsp3-Mac1 도메인에 의한 STAT1의 de-mono-ADP-ribosylation이 COVID-19의 중증 사례에서 관찰되는 염증성 사이토카인 폭풍을 유발할 수 있다.

[0127] 본 발명에서 사용된 용어 “뉴클레오캡시드(Nucleocapsid(N))”는 코로나바이러스의 바이러스성 포장, 바이러스성 핵 생성, 바이러스 RNA를 합성하는데 중요한 역할을 한다. 구조 단백질의 하나로서 여러 기능을 하고 바이러스 생활 주기의 중요한 역할을 하는 단백질인바, 코로나바이러스를 억제하거나 검출할 수 있는 좋은 타겟이다.

[0128] 본 발명에 있어서, 상기 화합물은 코로나바이러스 비리온 생산을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0129] 본 발명에서 사용된 용어 “비리온(Virion)”은 캡시드와 핵산으로 이루어진 온전한 형태의 바이러스 입자를 의미한다. 일반적으로 감염이 가능한 바이러스 입자(infectious virus particle)를 의미한다. 따라서 비리온의 생산은 바이러스 복제 원활성과 연관되어 있다.

[0130] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0131] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캅셀제, 연질캅셀제, 서방캅셀제, 장용캅셀제, 환제, 틴크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고

제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0132] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0133] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0134] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셸락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 덱스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에칠렌글리콜 4000, 폴리에칠렌글리콜 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에칠렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[0135] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스텔류(트윈에스텔), 폴리옥시에칠렌모노알킬에텔류, 라놀린에텔류, 라놀린에스텔류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0136] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0137] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[0138] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[0139] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 덱스트로스주사액, 덱스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모니움), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨($NaHSO_3$), 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($Na_2S_2O_5$), 아황산나트륨

(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0140] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텝솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스판, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아뎁스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M ,Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[0141] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0142] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0143] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0144] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0145] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

[0146] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0147] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0148] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0149] 또한, 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0150] 본 발명의 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 화합물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 또는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0151] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0152] 본 발명에 따른 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 디사카라이드, 덱스트린 및 시클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 0.01-0.20g, 또는 약 0.04-0.10g 이다.

[0153] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0154] 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0155] 본 발명에 따른 "코로나바이러스 감염증 예방 또는 억제용 의약외품 조성물"에 있어서, 의약외품은 약사법 제2조 제7호 다목에 기재된 감염병 예방을 위하여 살균·살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제로서, 사람 또는 동물의 보건을 위해 사용되는 파리, 모기 등의 기피제, 구제제, 방지제, 방제제 또는 유인살충제를 의미할 수 있다.

[0156] 또한, 상기 의약외품은 피부외용제 및 개인위생용품을 포함할 수 있다. 예를 들어, 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 또는 연고제일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0157] 본 발명에 따른 상기 의약외품 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용 할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0158] 본 발명의 의약외품 조성물은 일 예로, 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조된 것일 수 있다. 예를 들어, 로션 등과 같은 유액, 크림, 연고, 스프레이, 오일젤, 젤, 오일, 에어로졸, 연막제와 같은 제형을 가질 수 있으나, 본 발명의 해충 방제 유도 효과를 나타내는 것이라면 제한되지 않고 사용할 수 있다. 또한 상기 의약외품 조성물은 각각의 제형에 일반적으로 의약외품 조성물에 배합되는 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제 또는 향료 등을 필요에 따라 적절히 배합하여 사용할 수 있다.

[0159] 본 발명은 코로나바이러스의 G4 구조에 결합하는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 코로나바이러스에 대한 항바이러스용 조성물을 제공한다.

[0160] 본 발명에 있어서, “항바이러스”는 체내에서 바이러스의 증식을 억제하여 체내에 침입한 바이러스의 작용을 약하게 하거나 소멸하게 하는 것을 의미하며, 보다 상세하게는 바이러스의 핵산 합성과정, 유전자 발현 과정, 또는 바이러스 복제 과정 등을 저해함으로써 바이러스의 증식을 억제하는 것을 의미하고, 본 발명에서는 코로나바이러스를 대상으로 한다

[0161] 본 발명에 있어서, 상기 항바이러스용 조성물은 인간 코로나바이러스 229E(HCoV-229E), 인간 코로나바이러스 OC43(HCoV-OC43), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 인간 코로나바이러스 NL63(HCoV-NL63, 뉴헤븐 코로나바이러스), 인간 코로나바이러스 HKU1, 중동호흡기증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) 및 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-Cov-2 또는 2019 novel coronavirus 또는 2019-nCoV)에 대한 항바이러스 활성을 가질 수 있다.

[0162] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0163] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0165] **[실험방법]**

[0166] **1. 올리고뉴크레오타이드의 제작**

[0167] 제조사의 프로토콜에 따라 200 μl의 뉴클레아제가 없는 물에 RNA 올리고뉴클레오타이드(Bioneer,Korea)를 녹여 100 μM의 원액을 준비하였다. 본 발명에 사용된 RNA G4 올리고뉴클레오타이드는 하기 표 1에 나타냈다.

표 1

[0168]

서열번호	Genome position	G4 sequence	G4 sequence length
1	353	GGCUUUGGAGACUCCGUGGAGGAGG	25
2	644	GGUAAUAAAGGAGCUGGUGG	20
3	1463	GGUGGUCGCACUAUUGCCUUUGGAGG	26
4	1574	GGUGUUGUUGGAGAAGGUUCCGAAGG	26
5	2714	GGCGGUGCACCAACAAAGGUUACUUUUGG	29
6	3467	GGAGGAGGUGUUGCAGG	17
7	4162	GGUUAUACCUACUAAAAAGGCUGGUGG	27
8	4261	GGGUUUAAAUGGUUACACUGUAGAGGAGG	29
9	8687	GGAUACAAGGCUAUUGAUGGUGG	23
10	10267	GGCUGGUAAUGUUCAACUCAGGGUUAUUGG	30
11	13385	GGUAUGUGGAAAGGUUAUGG	20
12	14947	GGUUUUCCAUUUAAUAAAUGGGGUAAGG	28
13	15208	GGAACAAGCAAAUUCUAUGGUGGUUGG	27
14	15448	GGCGGUUCACUAUAUGUUAAACCAGGUGG	29
15	18296	GGAUUGGCUUCGAUGUCGAGGGG	23
16	22316	GGUGAUUCUUCUUCAGGUUGGACAGCUGG	29
17	24215	GGUUGGACCUUUGGUGCAGG	20
18	24268	GGCUUAUAGGUUUAAUGGUAUUGG	24
19	25197	GGCCAUGGUACAUUUGGCUAGG	22
20	25951	GGUGGUUAUACUGAAAAAUGGGAAUCUGG	29
21	26746	GGAUCACCGGUGGAAUUGCUAUCGCAAUGG	30
22	28781	GGCUUCUACGCAGAAGGGAGCAGAGGCGG	29
23	28903	GGCUGGCAAUGGCGG	15
24	29123	GGAAAUUUUGGGGACCAGG	19
25	29234	GGCAUGGAAGUCACACCUUCGGGAACGUGG	30

[0170] **2. 원편광 이색성(CD) 스펙트럼 측정**

[0171] RNA 올리고뉴클레오타이드 15μM를 Thermoblock에서 10mM Tris-HCl(pH 7.5) 및 100mM KCl을 포함하는 완충액에서 어닐링 하였다(95° C에서 10분 동안 변성 후 4° C까지 0.5° C/분으로 냉각). 실험을 수행하기 전에 샘플을 4° C에서 밤새 보관하였다. CD 스펙트럼은 1mm 석영 큐벳을 사용하고, 20° C, 100nm/min의 스캔 속도, 1nm의 데이터 피치 및 1nm의 대역폭으로 하여 220~320nm 파장 사이에서 측정되었다. 또한, 각 스펙트럼은 3회 측정하고 평균을 나타내었다. CD 실험은 Jasco CDC-426F Peltier 온도 컨트롤러가 장착된 Jasco J-810 CD 분광편광계에서 수행되었다.

[0173] **3. CD 열 용융 분석**

[0174] CD 용융을 위해 샘플은 2℃/분 및 0.5℃의 데이터 피치로 25-95℃에서 가열되었다. CD 용융 분석은 G4 결합 화합물의 유무를 달리하여 수행되었다. RNA:G4 결합 화합물의 비율은 1:2의 몰비로 하였다. RNA G4 15μM에 G4 결합 화합물 30μM를 처리하여 30분 동안 실온으로 10mM Tris-HCl(pH 7.5) 및 100mM KCl을 포함하는 완충액에서 인큐베이션하였다. 타원율은 265 nm에서 측정하였다. 그 후, 데이터를 정규화하고 OriginPro 2017에 플롯하여 Tm 값을 계산하였다.

[0176] **4. 세포 배양**

[0177] 인간 배아 신장(HEK293T) 세포 및 Vero 세포는 10% 소태아혈청(FBS) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 보충된 고 포도당 둘베코수정이글배지(DMEM ;high-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 유지되었고, 37° C, 5% CO_2하에 가습 인큐베이터에서 배양하였다.

[0179] **5. 시험관 내(in vitro) 발현을 위한 peYFP-N1 리포터 벡터의 제작**

[0180] pEYFP-N1 리포터(Promega) 벡터는 eYFP 융합 단백질을 인코딩하기 위해 eYFP 코딩 영역과 프레임 내 표적 유전자(WT-G4-353, 644, 3467)를 클로닝하여 생성되었다. PCR 증폭 클로닝에 사용되는 프라이머는 하기 표 2에 나타내었다. WT G4-353, 644, 3467에 대한 표적 유전자 삽입물은 PUC-GW-Amp(공여자 플라스미드)(Cosmogenetech)에 의해 합성되었고, 수용 플라스미드 pEYFP-N1 벡터의 Xho1/BamH1 제한 부위 사이로 서브 클로닝 된 다음, 컴피턴트 E. coli DH5α 세포로 형질전환 시켰다. 명명된 재조합 플라스미드(N1-WT-G4-353, 644 및 3467)를 각각 시퀀싱으로 확인하였다.

표 2

[0181]

Name	서열번호	Primer sequence	Reference
WT G4-353 (Fwd)	26	TATAGCTCGAGATGGAGAGCCTTGTCC	This study
WT G4-353 (Rev)	27	TATACGGATCCACATGACCATGAGGTGC	This study
WT G4-644 (Fwd)	28	TATACCTCGAGATGGTTGAGCTGGTAGC	This study
WT G4-644 (Rev)	29	TATACGGATCCCCGTTAAGCTCACGC	This study
WT G4-3467 (Fwd)	30	GATAACTCGAGATGGAACTTACACCAGTTGTTCAGAC	This study
WT G4-3467 (Rev)	31	AATATAGGATCCGGAATCTCAGCGATCTTTTGTTC	This study
Mut G4-353 (Fwd)	32	CGCGACGTGCTCGTACGTGACTTTGAAGACTCCGTAGAAGAAGTC	This study
Mut G4-353 (Rev)	33	GACTTCTTCTACGGAGTCTTCAAAGTCACGTACGAGCACGTCGCG	This study
Mut G4-644 (Fwd)	34	CGGTAATAAAAGAGCTAGTAGCCATAGTTACGGCGCCG	This study
Mut G4-644 (Rev)	35	CGGCGCCGTAACTATGGCTACTAGCTCTTTTATTACCG	This study
Mut G4-3467 (Fwd)	36	CATGGAAGAAGTGTTGCAAGAGCCTTAAATAAGGCTAC	This study
Mut G4-3467 (Rev)	37	GTAGCCTTATTTAAGGCTCTTGCAACACTTCTTCCATG	This study
T7-G4-353 (Fwd)	38	AGTAATACGACTCACTATAGGGATGGAGAGCCTTGTCC	This study
T7-G4-644 (Fwd)	39	AGTAATACGACTCACTATAGGGATGGTTGAGCTGGTAGCAG	This study
T7-G4-3467 (Fwd)	40	AGTAATACGACTCACTATAGGGATGGAACTTACACCAGTTGTTC	This study
T7-EYFP (Rev)	41	TTACTTGTACAGCTCGTCCATG	This study

[0183] **6. 위치 지정 돌연변이 유발**

[0184] G4-353, G4-644, G4-3467 내에 G4 형성을 방해하는 위치 지정 돌연변이를 도입하기 위해 QuikChange site-directed mutagenesis의 프로토콜(Stratagene)에 따라 PCR 반응을 수행하였다. 돌연변이 유발에 사용되는 프라이머는 상기 표 2에 나타내었다. 돌연변이 유발 후, 야생형 벡터 골격은 DpnI으로 37℃에서 밤새 분해되고 DH5α 컴피턴트 세포로 형질전환 시켰다. 얻은 양성 클론은 시퀀싱에 의해 확인되었다. 명명된 돌연변이 G4 플라스미드(N1-Mut-G4-353, 644 및 3467)는 시퀀싱으로 확인하였다.

[0186] **7. 천연 폴리아크릴아미드 겔 전기영동**

[0187] 천연 폴리아크릴아미드 겔 전기영동은 50 mM KCl을 포함하는 1X TBE 완충액에서 15% 폴리아크릴아미드 겔에 대해 3시간 동안 80V, 4℃로 수행되었다. 겔은 SYBR Gold 핵산 염료로 염색하고 Bio-Rad Gel Doc UV-트랜스일루미네이터로 관찰하였다.

[0189] **8. 세포 생존율 분석**

[0190] 세포독성은 EZ Cytox assay kit(DogenBio, Korea)를 이용하여 분석하였다. HEK293T 및 Vero 세포를 100 ㎕/웰의 배지 부피에서 $2x10^4$ 세포/웰의 밀도로 96웰-플레이트에 넣고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 세포를 다양한 농도의 G4 결합 화합물(0.1, 0.5, 1, 2.5, 5.5, 7.5, 10, 25, 50, 75 μM)을 처리하고 37℃에서 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다. 세포 생존율(%)은 455 nm에서의 흡광도 값을 측정하고(Luminescence multi-mode microplate reader Synergy™ Neo2) 하기 식 1을 사용하여 계산하였다. 모든 실험은 3중으로 수행되었으며 화합물이 처리되지 않은 세포를 대조군으로 사용하였다. EZ Cytox 시약이 있는 DMEM를 blank로 사용하였다.

[0192] **[식 1]**

[0193] 세포 생존율(%) = $[(A_{455(\text{시험 시료})} - A_{455(\text{Blank})}) / (A_{455(\text{대조 시료})} - A_{455(\text{Blank})})]*100$

[0195] **9. 세포 형질감염**

[0196] 제조사의 프로토콜(TurboFect™ Transfection Reagent, Invitrogen, USA)에 따라 HEK293T 및 Vero 세포에서 형질감염을 수행하였다. 1.5×10^5 세포 또는 7.5×10^4 세포를 6 웰-플레이트 안 2ml DMEM 배지에 각각 넣고 37℃에서 배양하였다. 24시간 후 제조업체의 지침에 따라 형질감염 하였다. 10시간 후, G4 결합 화합물이 있거나 없는 배지로 교체하여 화합물을 처리하였다. 그 후, 24 또는 48시간 동안 세포를 배양하였고, 추가 실험을 위하여 세포를 채취하였다.

[0198] **10. IVT(In-Vitro transcription/translation) 분석**

[0199] WT-G4 및 Mut-G4 서열을 T7 프로모터 부위로 설계된 특정 프라이머에 의해 PCR 증폭시켰다. PCR 산물은 1Kbp 이하의 길이로, T7 프로모터 부위와 eGFP 유전자를 포함하였다. IVT에 사용되는 프라이머는 상기 표 2에 나타내었다. PCR 산물은 TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System(Promega)을 이용하여 전사 및 번역되었으며, PCR-DNA 주형(0.5㎍)은 1 mM 메티오닌을 포함하는 50㎕ 반응 혼합물에서 90분 동안 30℃로 번역되었다. 번역된 산물은 12% SDS-PAGE를 사용하여 용해하고 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

[0201] **11. 웨스턴 블롯**

[0202] 세포를 1X-RIPA 완충액에서 용해시켰다. 분리된 단백질을 Bio-Rad 반건식 이송 시스템을 사용하여 이소불화비닐(PVDF ; polyvinylidene fluoride) 멤브레인(Western blotting용 Immobilon®-P PVDF membrane, Merck KGaA,

Darmstadt, Germany)으로 옮겼다. 비특이적 단백질 결합은 0.05% Tween-20(TBS-T) 완충액을 포함하는 Tris 완충 식염수에서 5% 무지방 우유로 1시간 동안 차단되었다. 그 후, membrane을 TBST 완충액으로 세척하고, 1:5000으로 희석된 1차 항체인 마우스 단일클론 항-EYFP 항체(MAB 8759, Abnova)를 이용하여 4℃에서 1시간 동안 프로브하였다. 이후, 상온에서 1시간 동안, HRP가 결합되어 있고 1:5000으로 희석된 2차 염소-항 마우스 항체(SC-2031, Santa Cruz Biotechnology, South Korea)를 이용하여 단백질 검출을 수행하였다. 발광 이미지 분석기 LAS3000에 의해 enhanced chemiluminescence(ECL) 웨스턴 블롯 기질을 사용하여 밴드를 검출하였다. EYFP 및 강도는 하우스키핑 유전자 GAPDH 밴드 강도로 정규화 되었다. 밴드 강도는 ImageJ를 사용하여 정량화되었다.

[0204] **12. 통계적 분석**

[0205] 상기 실험 10 내지 11의 데이터는 GraphPad Prism 소프트웨어 버전 8.3.0을 사용하여 분석되었다. One way ANOVA 테스트는 EYFP 번역 억제에 의해 약물이 처리되지 않은 샘플과 처리된 샘플 간의 유의한 차이를 결정하는데 사용되었다. 데이터는 평균±SEM 또는 평균±SD로 표시되었다. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

[0207] **13. SARS-CoV-2 용량 반응 곡선(DRC; Dose Responsive Curve) 분석-N 단백질 발현 관련**

[0208] **13-1. 바이러스 및 세포주**

[0209] SARS-CoV-2는 한국질병관리본부(KCDC)에서 제공되었으며, Vero 세포는 ATCC(ATCC-CCL81)로부터 획득하였다.

[0211] **13-2. 시약**

[0212] 기준 화합물로 사용한 chloroquine, lopinavir, remdesivir은 각각 Sigma-Aldrich, SelleckChem, MedChemExpress에서 구입하였다. 항-SARS-CoV-2 뉴클레오캡시드(N) 단백질에 특이적인 1차 항체는 Sino Biological 에서 구입하였으며, 2차 항체인 Alexa Fluor 488 염소 항-토끼 IgG와 Hoechst 33342는 Molecular Probes에서 구입하였다.

[0214] **13-3. 면역 형광법에 의한 용량반응곡선(DRC) 분석**

[0215] Vero 세포를 2% FBS가 보충된 DMEM에서 1.2×10^4 세포/웰의 세포 밀도로 384 웰-플레이트에 접종하였다. 24시간 후, DMSO에 2 배 연속 희석하여 10 포인트로 준비된 G4 결합 화합물(NMM, BRACO19, PDS 및 PhenDC3)을 0.08 내지 50 μM 범위의 농도로 세포에 처리하였다. 양성 대조군으로는 항바이러스 활성이 잘 알려진 chloroquine diphosphate(C6628, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), lopinavir(S1380, SelleckChem, Houston, TX) 및 remdesivir(HY-104077, MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ)를 사용하였다. 약 1 시간 후, BSL3 시설에서 세포에 SARS-CoV-2 (0.0125 MOI)를 감염시키고 37℃에서 24 시간 동안 배양하였다. 이후 4% 파라포름알데이히드(PFA; paraformaldehyde)로 세포를 고정한 뒤, 투과화하였다. 그 후, 항-SARS-CoV-2 뉴클레오캡시드(N) 1차 항체를 처리하고, Alexa Fluor 488 염소 항-토끼 IgG 2차 항체와 Hoechst 33342를 처리하여 세포를 염색하였다. 감염된 세포의 형광 이미지는 대용량 이미지 분석 기기인 Operetta(Perkin Elmer)를 이용하여 얻었다.

[0217] **13-4. 이미지 분석**

[0218] 획득된 이미지는 Columbus 소프트웨어를 이용하여 분석되었다. 웰 당 총 세포수는 Hoechst 로 염색된 핵 수로 산출하였고, 감염된 세포 수는 바이러스 N 단백질을 발현하는 세포수로 산출하였다. 감염도(infection ratio)는 (N 단백질을 발현하는 세포수)/(총 세포수)로 계산하였다. 각 웰당 감염도는 동일한 플레이트에서 감염되지 않은 세포(mock)를 포함한 웰들의 평균 감염도와 0.5% DMSO(v/v)가 처리된 감염세포를 포함한 웰들의 평균 감염도로 정규화하였다. 화합물 농도에 따른 반응 곡선과 IC_{50}, CC_{50} 값은 XLFit 4 (IDBS) 소프트웨어의 하기 식 2를 활용하여 도출하였다.

[0220] [식 2]

[0221] $Y = Bottom + (Top-Bottom)/(1 + (IC_{50}/X)^{Hillslope})$

[0223] 모든 IC_{50} 와 CC_{50} 값은 두 번의 반복실험으로 획득한 적합 용량반응곡선(fitted dose-response curve)에서 산출하였고, 선택지수 (Selectivity index; SI) 값은 CC_{50}/IC_{50}으로 계산되었다.

[0225] **14. SARS-CoV-2 용량 반응 곡선(DRC; Dose Responsive Curve) 분석-비리온 생산 관련**

[0226] Vero 세포를 $2x10^5$ 세포/웰의 세포 밀도로 12 웰-플레이트에 접종하였다. 24시간 후, BSL3 시설에서 1시간 동안, 2배 연속 희석하여 10 포인트로 준비된 G4 결합 화합물(PDS, PhenDC3 및 NMM)을 0.08 내지 50μM 범위의 농도로 세포에 처리하였다. 세포를 PBS로 한 번 세척한 다음 SARS-CoV-2(0.01 MOI)으로 1시간 동안 감염시켰다. 바이러스 접종물을 제거하고 세포를 PBS로 1회 세척한 후, 각각의 농도에서 상기와 동일한 G4 결합 화합물을 함유하는 2% FBS DMEM 배지로 교체하고 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다. DMSO 및 증류수 vehicle도 각각의 화합물에 대한 대조군으로 추가하였다. 감염 24시간 또는 48시간 후, 바이러스 상등액을 수집하고 PROMEGA Maxwell® RSC48 기기를 이용한 자동 핵산 정제를 통해 총 RNA를 추출하였다. RT-qPCR은 THERMO QuantStudio™ 3 시스템을 이용하여 샘플 당 이중으로 SARS-CoV-2 RdRp에 특이적인 프라이머를 사용하여 수행되었다. ΔΔCt 방법으로 바이러스 게놈 RNA 전사 수준을 분석하고, G4 결합 화합물 처리군을 DMSO 또는 증류수 대조군으로 정규화하여 상대적인 감염 저해율(inhibition of infection)을 계산하였다. 각 화합물에 대한 IC_{50}은 Graphpad Prism 5.0 소프트웨의 하기 식 3를 활용하여 도출하였다.

[0228] [식 3]

[0229] $Y = Bottom + (Top-Bottom)/(1 + (IC_{50}/X)^{Hillslope})$

[0231] **15. HCoV-OC43 용량 반응 곡선(DRC; Dose Responsive Curve) 분석-비리온 생산 관련**

[0232] 인간 대장암 세포주인 HCT-8 세포를 $2x10^5$ 세포/웰의 세포 밀도로 12 웰-플레이트에 접종하였다. 24 시간 후 1시간 동안, 2배 연속 희석하여 10 포인트로 준비된 G4 결합 화합물(CX3543, NMM, TMPyP4 및 TMPyP2)을 0.08 내지 50μM 범위의 농도로 세포에 처리하였다. 세포를 PBS로 한 번 세척한 다음 HCoV-OC43(0.05 MOI)으로 1시간 동안 감염시켰다. 바이러스 접종물을 제거하고 세포를 PBS로 1회 세척한 후, 각각의 농도에서 상기와 동일한 G4 결합 화합물을 함유하는 2% FBS DMEM 배지로 교체하고 72시간 동안 배양하였다. DMSO 및 증류수 vehicle도 각각의 화합물에 대한 대조군으로 추가하였다. 감염 72시간 후, 바이러스 상등액을 수집하고 감염성 바이러스의 역가를 플라크어세이를 통해 정량하였다.

[0233] 플라크어세이는 하루 전에 12 웰-플레이트에 접종한 Vero 세포에, 10배로 연속 희석한 바이러스 상등액을 각각 2개 웰에 이중으로 접종하고, 1시간 배양 후 제거하였다. DMEM 배양액에 0.5% 메틸셀룰로스(methylcellulose)를 포함하는 플라크어세이용 오버레이(overlay) 미디어를 넣어 5-6일간 배양하였다. 배양 5-6일 후, 오버레이 미디어를 제거하고 20% 에탄올에 2% 크리스탈바이올렛(crystal violoet) 염색액을 포함하는 용액으로 세포를 고정·염색하여 플라크 수를 계수, 바이러스의 역가를 측정하였다. 각 시료의 바이러스 역가에서 G4 결합 화합물 처리군을 DMSO 또는 증류수 대조군으로 정규화하여 상대적인 감염 저해율(inhibition of infection)을 계산하였다. 각 화합물에 대한 IC_{50}은 Graphpad Prism 5.0 소프트웨의 상기 식 3를 활용하여 도출하였다.

[0234] HCT-8 세포에서의 세포독성은 96 웰-플레이트에 접종한 세포에 상기 용량 분석 실험과 동일한 농도로 준비한 G4 결합화합물을 이중으로 처리하고 72시간 후, 5mg/ml 의 농도의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 10 μl를 각 웰에 3시간 동안 37℃에서 처리하였다. 처리 후, 상등액을 제거하여 세포를 PBS로 한 번 세척한 다음, 100μl DMSO를 넣고 1시간 암흑 속에서 추가 처리한 후 540nm 파장의 흡광

도를 측정하여 분석하였다. 각 화합물의 농도별 세포독성은 G4 결합 화합물 처리군을 DMSO 또는 증류수 대조군으로 정규화하여 상대적인 세포독성을 계산하였다.

[0236] [실시예]

[0237] 실시예 1. 생물정보학 분석을 통한 SARS-CoV-2 genome의 G4 확인

[0238] 최대 길이 30bp의 기준으로 SARS-CoV-2 게놈에 QGRS 매퍼를 적용하였고, 최소 G그룹 길이는 2이고 루프 크기는 0 내지 36인 25개의 G4를 식별하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0239] 도 1에 나타난 바와 같이, G4는 ORF-1ab, 스파이크(S), ORF3a, 멤브레인(M) 및 뉴클레오캡시드(N) 유전자의 오픈 리딩 프레임 영역에 위치하였다. 또한 G4는 Nsps(ORF1 ab에 의해 인코딩 됨)를 코딩하는 게놈 영역에서 더 높은 밀도로 나타났고, 구조 단백질을 코딩하는 게놈 영역에서 더 낮은 밀도로 나타났다. 또한, SARS-CoV-2의 게놈에서 G그룹 길이가 3 또는 4인 G4는 발견되지 않았다.

[0241] 실시예 2. SARS-CoV-2에서 예측된 G4의 안정적인 G4 구조 형성

[0242] G4의 형성 및 구조적 안정성을 확인하기 위해, G4에 해당하는 RNA 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 SARS-CoV-2에서 예측된 모든 G4에 대하여 생물물리학적 연구를 수행하였다. 원평광 이색성(CD) 스펙트럼을 측정하여 G4 구조의 형성을 확인하였고, CD 열 용융 분석을 통해 G4의 구조적 안정성을 확인하였다. 그 결과는 도 2a 및 2b, 도 3a 및 3b에 나타내었다.

[0243] 도 2a 및 2b에 나타난 바와 같이, 모든 SARS-CoV-2 G4의 CD 스펙트럼은 약 265nm에서 강한 양의 피크와 약 240nm에서 음의 피크를 특징으로 하는 G4 topology를 확인하였다.

[0244] 또한, 도 3a 및 3b에 나타난 바와 같이, SARS-CoV-2 G4는 50~75℃ 범위의 Tm을 나타내었다. 이는 SARS-CoV-2에서 예측된 G4 서열이 시험관 내에서 안정한 G4 구조로 접힐 수 있음을 의미한다.

[0246] 실시예 3. Nsp1, Nsp3에 대한 위치지정 돌연변이 도입에 따른 G4의 불안정성

[0247] Nsp1, Nsp3에 위치한 G4(G4-353, G4-644, G4-3467)는 하기 표 4와 같이 PDS, PhenDC3로 처리했을 때, 가장 높은 ΔTm을 보였고 중요한 생물학적 기능을 가지고 있기 때문에 돌연변이 대상으로 선택하였다. Nsp1 및 Nsp3에서 SARS-CoV-2 G4 타겟팅의 영향을 시각화하기 위해, WT-G4 시퀀스에서 빨간색으로 강조된 구아닌(G)는 아데닌(A)으로 돌연변이 시켜서 G4 형성을 방해하는 Mut-G4을 만들었다. 이는 하기 표 3에 나타내었다. 그 후, WT 및 Mut G-353, G-644, G-3467의 CD 스펙트럼을 확인하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0248] 도 4에 나타낸 바와 같이, WT-G4의 CD 스펙트럼과 비교하여 Mut-G4는 최대값이 약 260nm에서 약 270nm로 이동하여 G4 topology가 파괴되었음을 나타냈다. 또한, CD 열 용융 분석에서 Mut-G4는 WT-G4보다 낮은 Tm 값을 보였다. 이는 Mut-G4에서 G4의 불안정성을 의미한다.

표 3

[0250]

Name	WT-G4 sequences	WT-G4 Tm in °C	Mut-G4 sequences	Mut-G4 Tm in °C
G-353	GGCUUUGGAGACUCCGUGGAGG AGG(서열번호 1)	71.59	GACUUUGAAGACUCCGUAGAAG AAG(서열번호 42)	36.22
G-644	GGUAAUAAAGGAGCUGGUGG (서열번호 2)	47.73	GGUAAUAAAAGAGCUAGUAG (서열번호 43)	46.64
G-3467	GGAGGAGGUGUUGCAGG (서열번호 6)	65.55	GGAAGAAGUGUUGCAAG (서열번호 44)	45.83

[0252] **실시예 4. G4 결합 화합물 처리에 따른 SARS-CoV-2 G4 안정성**

[0253] RNA 올리고뉴클레오타이드 15μM를 10mM Tris-HCl(pH 7.5) 및 100mM KCl에서 어닐링 하였다. 그 후, 화합물 30μM를 처리하여 인큐베이션 하였다. 다음으로 원평광 이색성 분석기를 통해서 나오는 spectra의 특징을 통해 SARS-CoV2에 존재하는 25개의 G4를 확인하였다. 각 스펙트럼은 3회 측정의 평균치이다. 그 결과는 도 5a 및 5b에 나타내었다.

[0254] 도 5a 및 5b에 나타난 바와 같이, G4 결합 화합물을 처리한 경우, CD 스펙트럼은 약 265 nm에서 양의 피크 및 약 240 nm에서 음의 피크를 가져, 실시예 2의 스펙트럼에서 상당한 변화를 나타내지 않았다. 이는 G4 결합 화합물이 G4 topology를 변경시키지 않는다는 것을 의미한다.

[0255] 또한, RNA G4 15μM에 화합물 30μM를 처리하여 인큐베이션 하고, G4 결합 화합물의 유무를 달리하여, RNA G4(15μM)의 CD 열 용융 곡선을 얻었다. 또한, 용융 온도의 차이(ΔTm)를 측정하여 SARS-CoV-2 G4의 안정성에 대한 G4 결합 화합물의 영향을 확인했다. 그 결과는 도 6a 및 6b에 나타내었다.

[0256] 도 6a 및 6b에 나타낸 바와 같이, CX-3543의 ΔTm은 눈에 띄는 변화를 나타내지 않은 반면, PhenDC3 및 PDS의 ΔTm은 CX-3543에 비해 크게 나타났다. 이는 CX-3543에 비해, PhenDC3 및 PDS가 대부분의 G4를 상당히 안정화시켰다는 것을 의미한다. 자세한 수치는 하기 표 4에 나타내었다. 또한, 각 화합물 사이 ΔTm의 비교를 하기 표 5에 나타내었다.

[0257] 표 5에 나타난 바와 같이, SARS-CoV-2에서 예측된 25개의 G4 중 PDS는 G4의 36%에서 ΔTm>20℃인 반면, PhenDC3은 G4의 72%에서 ΔTm>20℃ 이었다. 이는 화합물에 의해 안정화되는 G4의 비율은 PhenDC3가 PDS보다 높다는 것을 의미한다.

표 4

[0258]

G4 No.	Gene Position	Tm (°C)	Tm in °C with CX-3543	Tm in °C with PDS	Tm in °C with PhenDC3	$\Delta Tm_{CX-3543}$	ΔTm_{PDS}	$\Delta Tm_{PhenDC3}$	Gene Name
1	353	71.59	72.64	87.66	82.00	1.05	16.07	10.41	NsP1
2	644	48.1	53.32	70.59	71.44	5.59	22.86	23.71	NsP1
3	1463	55.52	66.55	60.04	91.3	11.03	4.52	35.78	NsP2
4	1574	53.38	53.43	NA	47.74	0.05	NA	-5.64	NsP2
5	2714	71.14	57.69	86.49	91.7	-13.45	15.35	20.56	NsP2+NsP3
6	3467	65.55	63.54	88.65	98.81	-2.01	23.1	33.25	NsP3
7	4162	56.89	58.94	56.03	NA	2.05	-0.86	NA	NsP3
8	4261	50.31	63.89	79.18	85.41	13.58	28.87	35.1	NsP3
9	8687	46.86	49.83	84.44	NA	2.97	37.58	NA	NsP4
10	10261	47.89	50.24	60.66	63.49	2.35	12.77	15.6	NsP5
11	13385	45.6	52.87	63.07	NA	7.27	17.47	NA	NsP10
12	14947	57.21	58.11	82.16	82.96	0.9	24.95	25.75	NsP12
13	15208	57.17	63.87	60.16	NA	6.7	2.99	NA	NsP12
14	15448	52.62	58.58	56.5	NA	5.96	3.88	NA	NsP12
15	18296	58.83	63.64	82.4	86.32	4.81	23.57	27.49	NsP12
16	22316	48.28	49.56	55.62	NA	1.28	7.34	NA	Surface glycoprotein
17	24215	55.42	57.16	62.93	NA	1.74	7.51	NA	Surface glycoprotein
18	24268	40.47	40.42	46.11	NA	-0.05	5.64	NA	Surface glycoprotein
19	25197	71.19	66.57	68.63	57.51	-4.62	-2.56	-13.68	Surface glycoprotein
20	25951	48.74	53.87	92.26	NA	5.13	43.52	NA	ORF3a protein
21	26746	62.66	59.29	68.77	79.68	-3.37	6.11	17.02	Membrane protein
22	28781	64.7	82.9	NA	70.40	18.2	NA	5.7	Nucleocapsid protein
23	28903	57.11	63.45	60.46	60.21	6.34	3.35	3.1	Nucleocapsid protein
24	29123	54.4	62.59	73.83	NA	8.19	19.43	NA	Nucleocapsid protein
25	29234	62.17	58.52	80.2	NA	-3.65	18.03	NA	Nucleocapsid protein

표 5

[0260]

ΔTm range	CX-3543	PDS	PhenDC3
1-5°C	9	4	1
5-10°C	7	4	1
10-15°C	2	1	1
ΔTm 15-20°C	1	5	2
ΔTm >20°C	0	9	18
Destabilized	6	2	2

[0262] **실시예 5. 세포 독성 확인**

[0263] HEK293T 세포와 Vero 세포에서 PDS 및 PhenDC3의 독성을 확인하였다. 그 결과는 도 7a 내지 도 7d에 나타내었다.

[0264] 도 7a 및 7c에 나타난 바와 같이, HEK293T 세포에서 PDS는 75μM까지 사용하기에 안전했지만, PhenDC3은 75μM에서 48시간 후 생존율이 25% 감소하였다. 또한, 도 7b 및 7d에 나타난 바와 같이, Vero 세포에서 48시간 후 75μM까지 PDS 및 PhenDC3에 대해 세포 독성이 관찰되지 않았다.

[0266] **실시예 6. T7 프로모터를 포함하는 WT-G4, Mut-G4의 PCR 증폭**

[0267] IVT(In-Vitro transcriotion/trnaslation)분석에 대하여, N1-WT-G4-353, 644, 3467 및 N1-Mut-G4-353, 644, 3467를 T7 프로모터 부위로 PCR 증폭하고 T7-WT-G4-353, 644, 3467 및 T7-Mut-G4-353, 644, 3467로 명명하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[0268] 도 8에 나타난 바와 같이, 65℃에서 겔에서 용출되는 증폭된 생성물의 명확한 단일 밴드가 관찰되었다.

[0270] **실시예 7. IVT(In-Vitro transcriotion/trnaslation)분석**

[0271] IVT 분석으로 다양한 농도의 G4 결합 화합물의 번역에 대한 영향을 확인하였다. 번역이 억제 되는 경우, 해당 화합물이 G4 구조의 안정화에 효과 있다는 것을 의미한다. 이를 시각화하기 위하여 EYFP(enhanced yellow fluorescent protein) 리포터 시스템을 구축하였으며, 화합물 처리 48시간 후, 세포를 채취하여 EYFP 발현을 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 그 결과는 도 9a 내지 9c, 도 10a 내지 10c, 도 11a 내지 11d, 도 12a 내지 12d에 나타내었다.

[0272] 도 9a 및 10a, 도 11a 및 도 12a에 나타난 바와 같이, N1-WT-G4-353에서 PDS 및 PhenDC3이 각각 50μM에서 처리되었을 때 EYFP 발현은 65% 및 90% 감소하였다. 50 μM 미만의 농도는 EYFP 리포터 발현을 억제하는 데 효과적이지 않았다.

[0273] 도 9b 및 10b, 도 11b 및 도 12b에 나타난 바와 같이, N1-WT-G4-644에서 PDS가 25 및 50 μM 처리되었을 때, EYFP 발현은 80-90% 감소하였지만, PhenDC3이 5 μM 처리되었을 때에도 EYFP 발현은 50% 감소하였다.

[0274] 도 9c 및 10c, 도 11c 및 도 12c에 나타난 바와 같이, N1-WT-G4-3467에서 PDS가 15 내지 50 μM 처리되었을 때, EYFP 발현을 60% 억제했으며 약물 농도 증가에 따른 어떠한 변화도 보이지 않았다. PhenDC3가 50μM 처리되었을 때, EYFP 발현의 70% 감소와 함께, 농도 의존적 감소를 나타내었다.

[0275] 도 11d 및 도 12d에 나타난 바와 같이, N1-Mut-G4-3467에 PDS 및 PhenDC3가 처리되면 농도 의존 방식으로 EYFP 발현을 억제하지 않았다.

[0276] 상기 결과는 PDS와 PhenDC3가 코로나바이러스 G4 구조를 안정화함으로써 Nsp1 및 Nsp3 mRNA의 번역을 억제한다는 것을 의미한다. 또한, PhenDC3이 PDS보다 SARS-CoV-2 G4를 안정화하는 데 더 높은 효과가 있다는 것을 의미

한다.

[0278] **실시예 8. SARS-CoV-2에 대한 G4 결합 화합물의 항바이러스 효능 확인 - N 단백질 발현관련**

[0279] N 단백질은 구조 단백질의 하나로 코로나 바이러스의 바이러스성 포장, 바이러스성 핵 생성, 바이러스 RNA 합성에 중요한 역할을 한다. 화합물의 항바이러스 활성을 확인하고자 감염세포 내에서 N 단백질의 발현의 정도를 분석하였다.

[0280] 도 13에 나타난 바와 같이, G4 결합 화합물 중 에서 PDS와 PhenDC3은 각각 9.45μM 및 23.21μM의 IC_{50}으로 SARS-CoV-2 감염을 억제하는 데 가장 효과적이었다. 또한, NMM과 BRACO19는 높은 농도에서 SARS-CoV-2 감염을 억제하였다. 특히 PDS의 IC_{50}은 cholorquine(9.63μM), remdesivir(8.78μM), lopinavir(12.13μM)와 같은 양성 대조군과 유사한 바, PDS가 SARS-CoV-2에 대해 강력한 항바이러스 활성을 나타냄을 의미한다.

[0282] **실시예 9. SARS-CoV-2에 대한 G4 결합 화합물의 항바이러스 효능 확인 - 비리온 생산 관련**

[0283] 비리온은 캡시드와 핵산으로 이루어진 온전한 형태의 바이러스 입자로서, 비리온의 생산은 바이러스 복제 원활성과 연관이 있다. 화합물의 항바이러스 효능을 확인하고자 비리온 생산을 상등액에 존재하는 SARS-CoV-2 바이러스의 RNA 게놈을 정량하여 분석하였다.

[0284] 도 14에 나타난 바와 같이, PDS는 감염 후 24시간 및 48시간에 각각 1.45μM 및 2.77μM의 IC_{50} 값으로 비리온 생산에 대한 강력한 항바이러스 활성을 나타내었다. PhenDC3는 또한 SARS-CoV-2 비리온 생성을 억제했으며 IC_{50} 값은 감염 후 24시간 및 48시간에 각각 24.47μM 및 23.17μM인 것으로 추정되었다. 이는 실시예 8의 결과와 같이, PDS와 PhenDC3가 Vero 세포에서 SARS-CoV-2 복제를 억제하는 데 강력함을 시사한다.

[0285] 도 15에 나타난 바와 같이, NMM의 IC_{50}은 PhenDC3의 IC_{50}과 유사한 바, NMM은 Vero 세포에서 SARS-CoV-2의 비리온 생성을 억제하는 데 효과적이었다.

[0286] 종합하면 G4 결합 화합물 PDS, PhenDC3 및 NMM 이 SARS-CoV-2 전사체에서 G4 구조를 안정화함으로써 SARS-CoV-2 복제를 억제하는 효과가 우수하다는 것을 의미한다.

[0288] **실시예 10. HCoV-OC43 바이러스에 대한 G4 결합 화합물의 항바이러스 효능 확인 - 비리온 생산 관련**

[0289] 비리온은 캡시드와 핵산으로 이루어진 온전한 형태의 바이러스 입자로서, 비리온의 생산은 바이러스 복제 원활성과 연관이 있다. 이에 G4 결합 화합물의 항바이러스 효능을 확인하고자 비리온 생산을 상등액에 존재하는 감염성 바이러스를 플라크어세이로 정량하여 분석하였다.

[0290] 도 16에 나타난 바와 같이, NMM은 감염 후 2.10μM의 IC_{50} 값으로 비리온 생산에 대한 강력한 항바이러스 활성을 나타내었다. G4 결합 화합물 TMPyP2, TMPyP4 및 CX3543 또한 HCoV-OC43 바이러스의 비리온 생성을 억제했으며 IC_{50} 값은 감염 후 각각 11.7μM, 2.80μM, 1.40μM인 것으로 추정되었다. 이는 CX3543, NMM, TMPyP4 및 TMPyP2가 Vero 세포에서 HCoV-OC43 바이러스 복제를 억제하는 데 강력함을 시사한다.

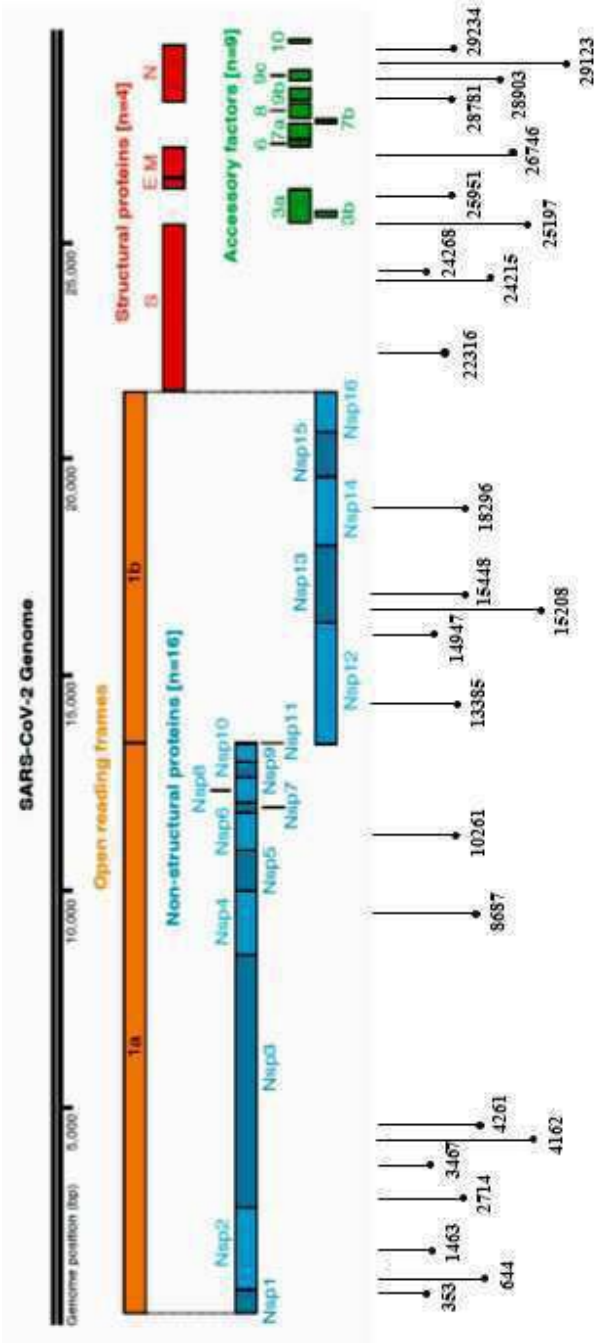
[0291] 이는 G4 결합 화합물 NMM, TMPyP2, TMPyP4 및 CX3543이 HCoV-OC43 바이러스의 G4 구조를 안정화함으로써 HCoV-OC43 바이러스 복제를 억제하는 효과가 우수하다는 것을 의미한다.

[0292] 따라서, 본 발명의 G4 구조에 결합하는 화합물을 이용하여 SARS-CoV-2 및 HCoV-OC43 바이러스를 포함하는 코로나 바이러스의 감염증을 치료할 수 있을 것으로 기대된다.

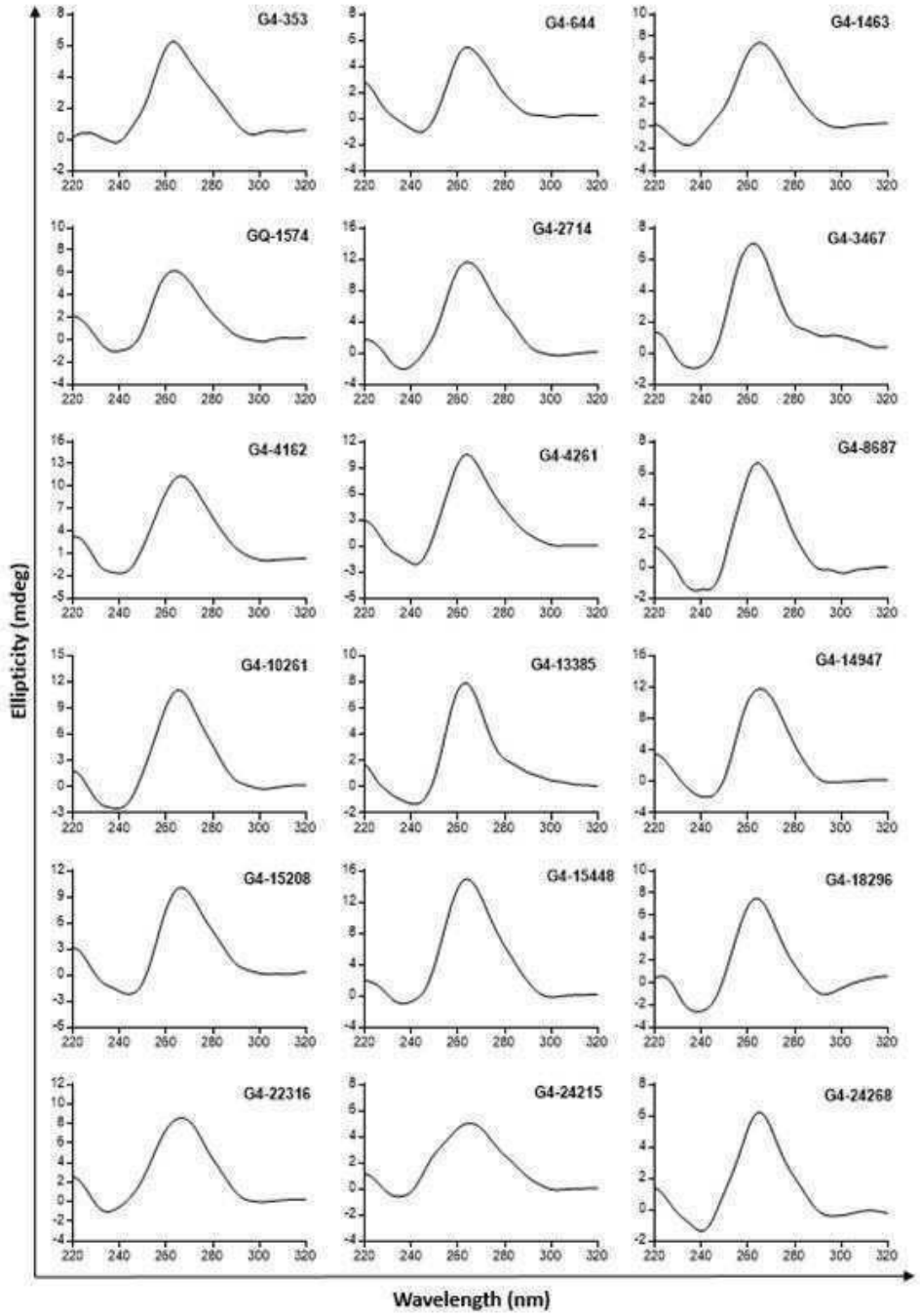
[0294] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

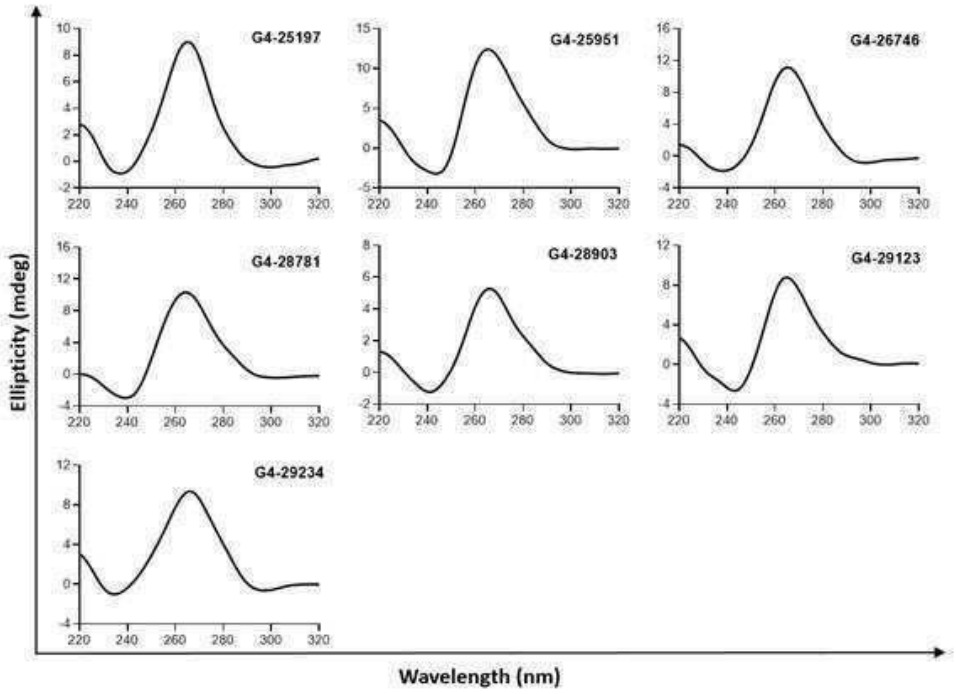
도면1


SARS-CoV-2 Genome
Genome position (bp)
5,000
10,000
15,000
20,000
25,000
Open reading frames
1a
1b
Non-structural proteins [n=16]
Nsp1
Nsp2
Nsp3
Nsp4
Nsp5
Nsp6
Nsp7
Nsp8
Nsp9
Nsp10
Nsp11
Nsp12
Nsp13
Nsp14
Nsp15
Nsp16
Structural proteins [n=4]
S
E
M
N
Accessory factors [n=9]
3a
3b
6
7a
7b
8
9c
10
265
805
2715
3467
4261
4162
8687
10261
13385
14947
15448
15208
18296
22316
24215
24268
25197
25951
26746
28781
28903
29234
29123

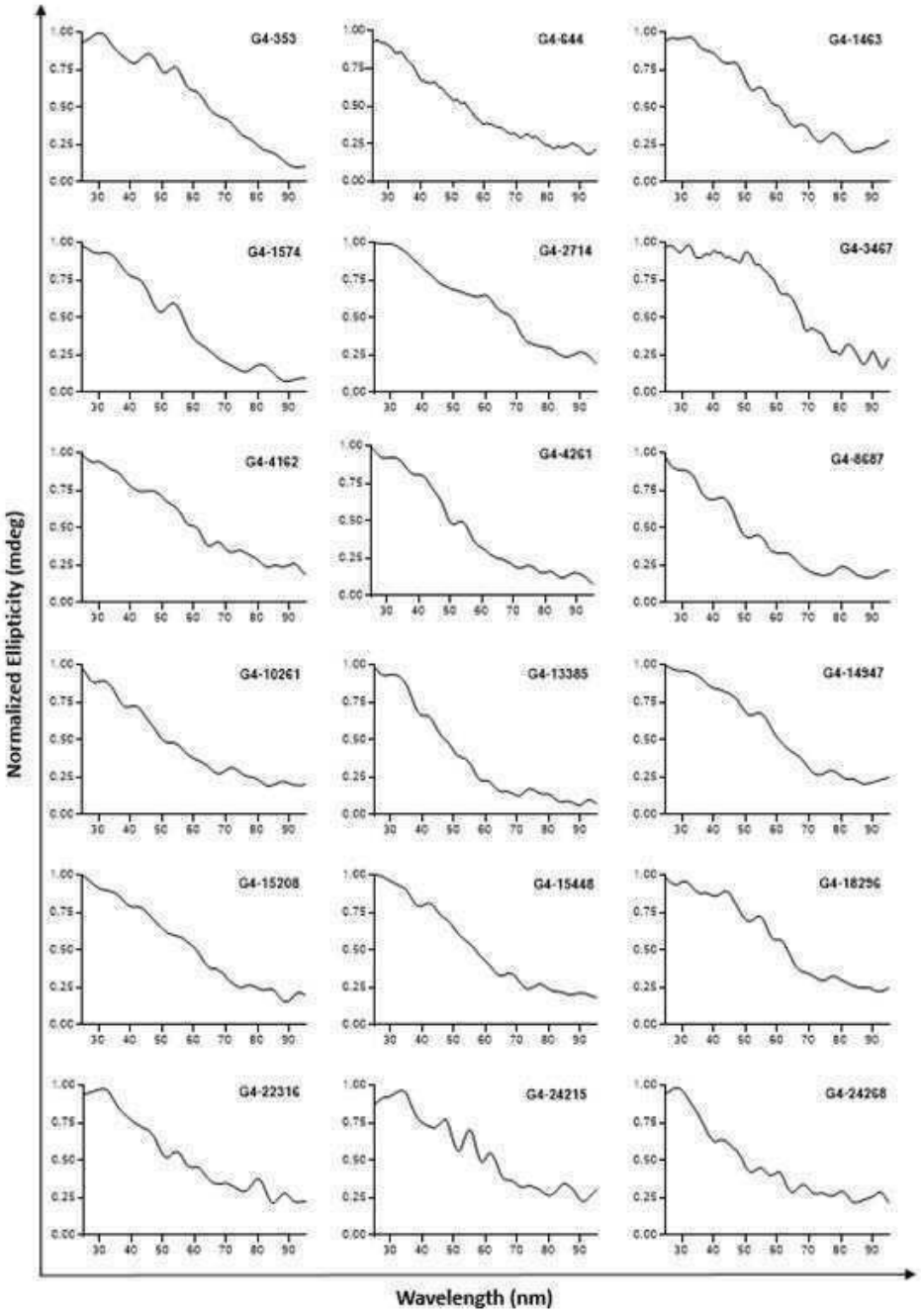
도면2a


G4-353
G4-644
G4-1463
GQ-1574
G4-2714
G4-3467
G4-4162
G4-4261
G4-8687
G4-10261
G4-13385
G4-14947
G4-15208
G4-15448
G4-18296
G4-22316
G4-24215
G4-24268
Ellipticity (mdeg)
Wavelength (nm)

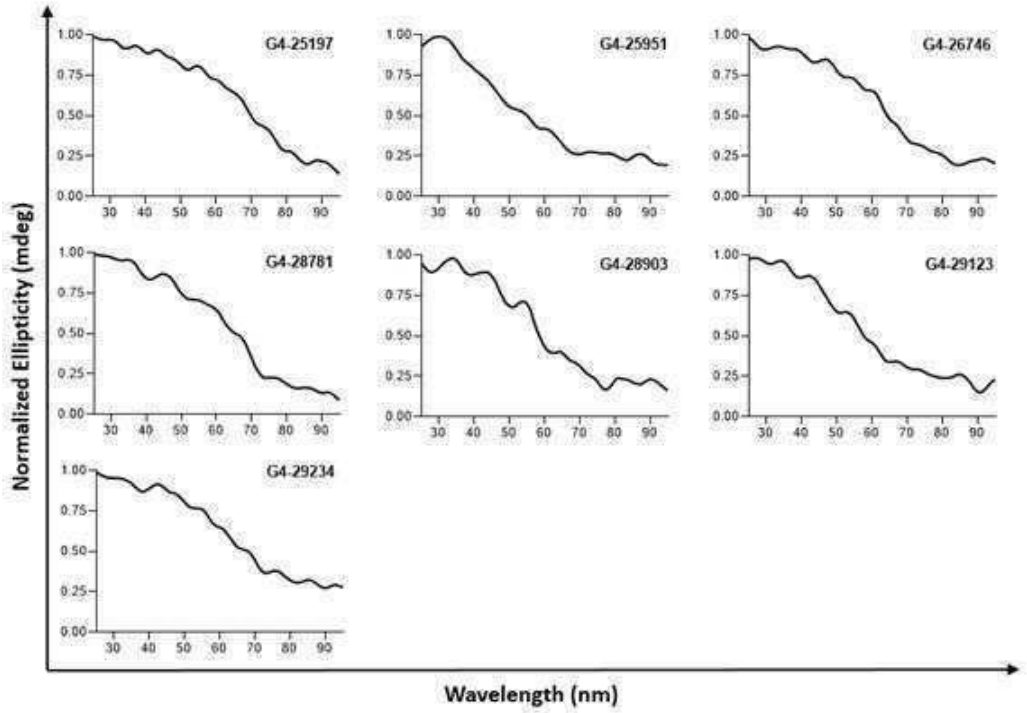
도면2b


G4-25197
G4-25951
G4-26746
G4-28781
G4-28903
G4-29123
G4-29234
Ellipticity (mdeg)
Wavelength (nm)

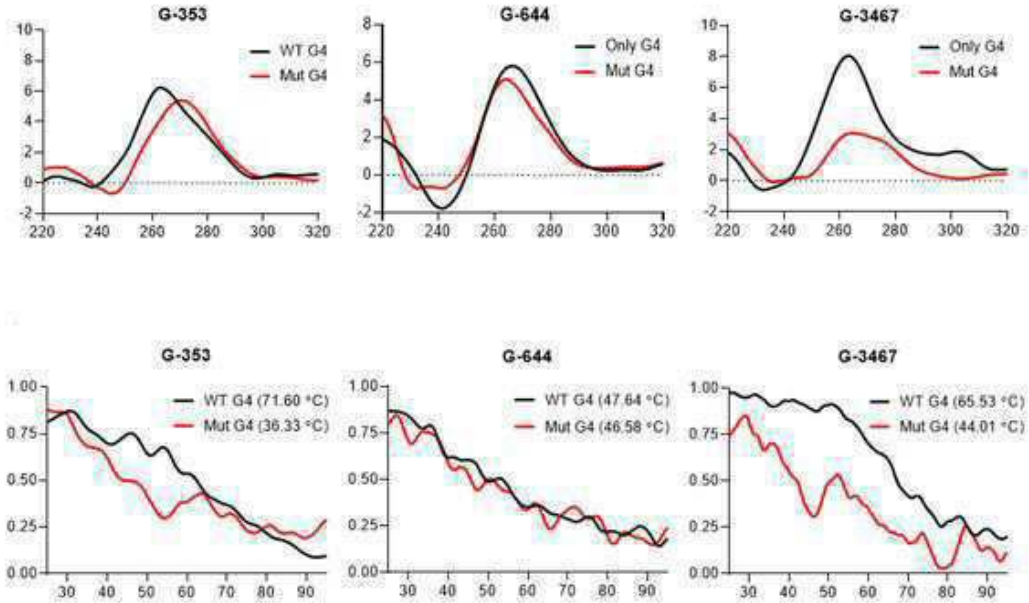
도면3a


G4-353
G4-644
G4-1463
G4-1574
G4-2714
G4-3467
G4-4162
G4-4261
G4-8687
G4-10261
G4-13385
G4-14947
G4-15208
G4-15448
G4-18256
G4-22316
G4-24215
G4-24268
Normalized Ellipticity (mdeg)
Wavelength (nm)

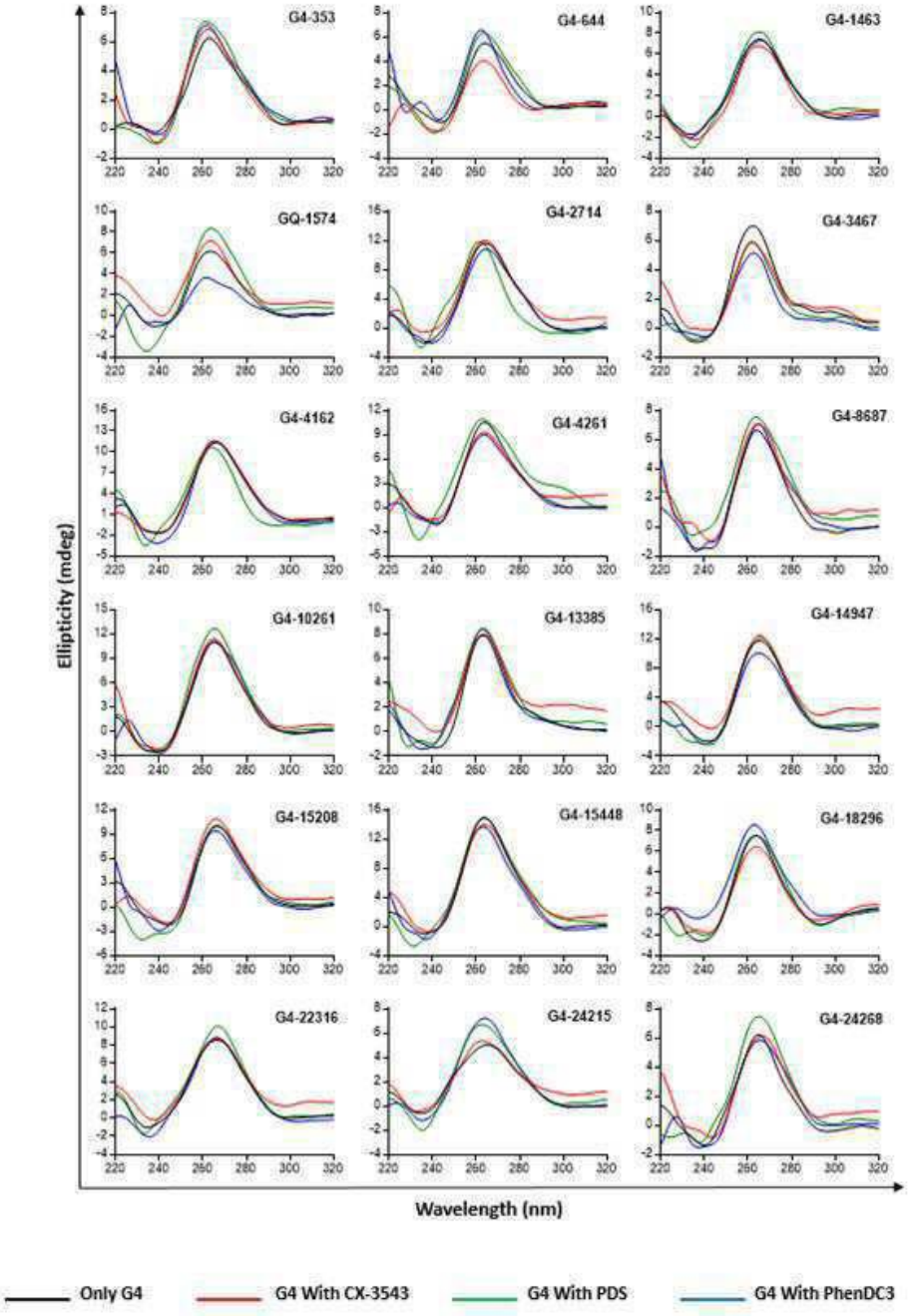
도면3b


G4-25197
G4-25951
G4-26746
G4-28781
G4-28903
G4-29123
G4-29234
Normalized Ellipticity (mdeg)
Wavelength (nm)

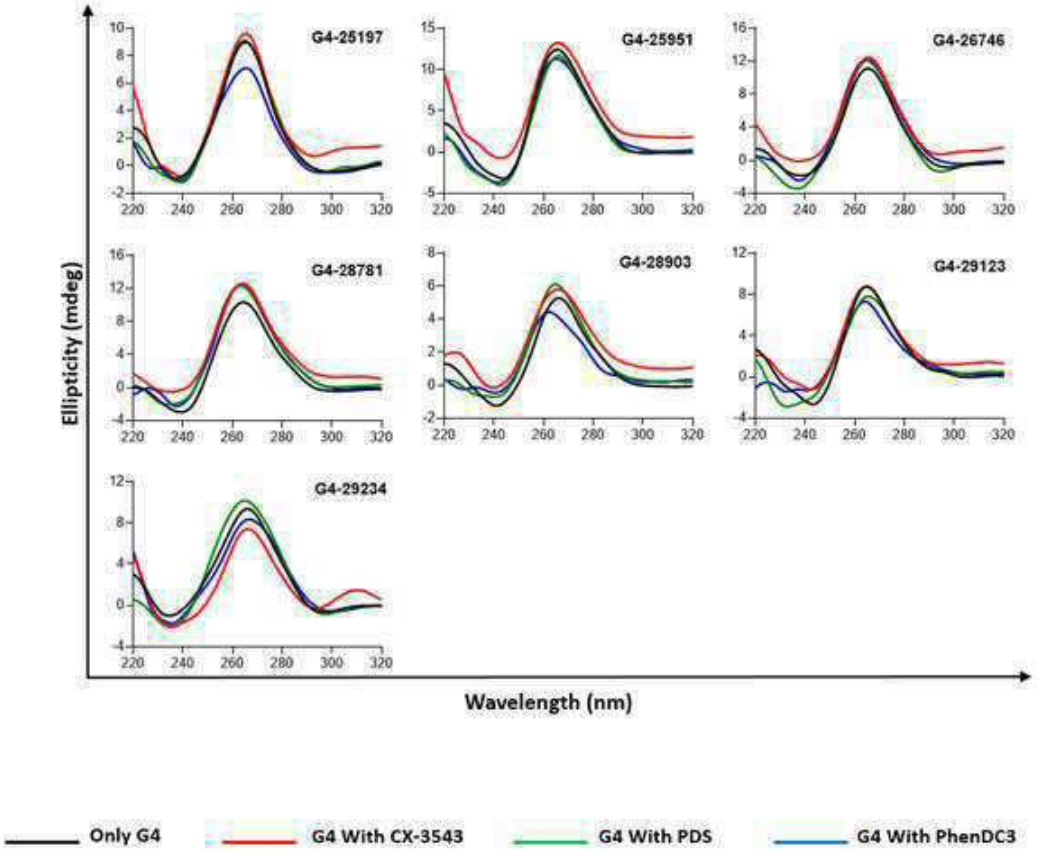
도면4


G-353
WT G4
Mut G4
G-644
Only G4
Mut G4
G-3467
Only G4
Mut G4
G-353
WT G4 (71.60 °C)
Mut G4 (36.33 °C)
G-644
WT G4 (47.64 °C)
Mut G4 (46.58 °C)
G-3467
WT G4 (65.53 °C)
Mut G4 (44.01 °C)

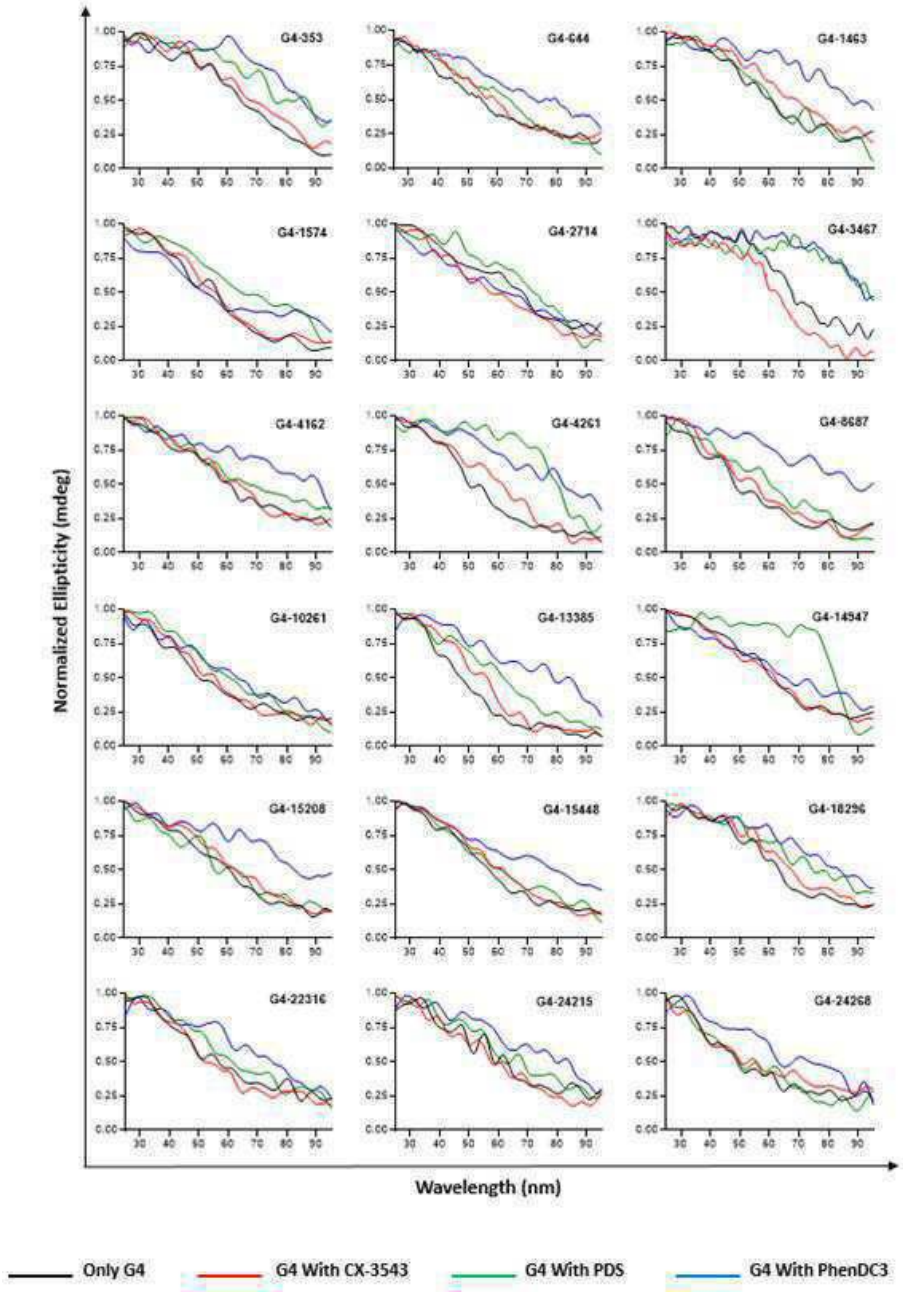
도면5a


G4-353
G4-644
G4-1463
GQ-1574
G4-2714
G4-3467
G4-4162
G4-4261
G4-8687
G4-10261
G4-13385
G4-14947
G4-15208
G4-15448
G4-18296
G4-22316
G4-24215
G4-24268
Ellipticity (mdeg)
Wavelength (nm)
Only G4
G4 With CX-3543
G4 With PDS
G4 With PhenDC3

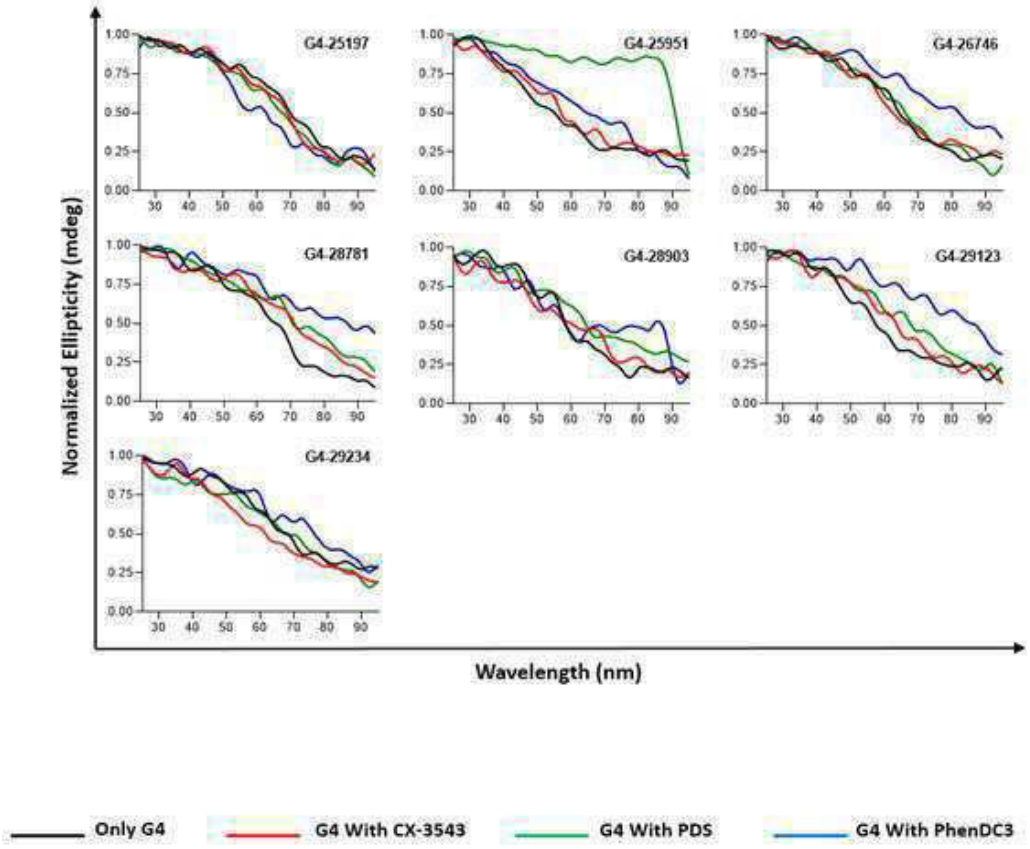
도면5b


G4-25197
G4-25951
G4-26746
G4-28781
G4-28903
G4-29123
G4-29234
Ellipticity (mdeg)
Wavelength (nm)
Only G4
G4 With CX-3543
G4 With PDS
G4 With PhenDC3

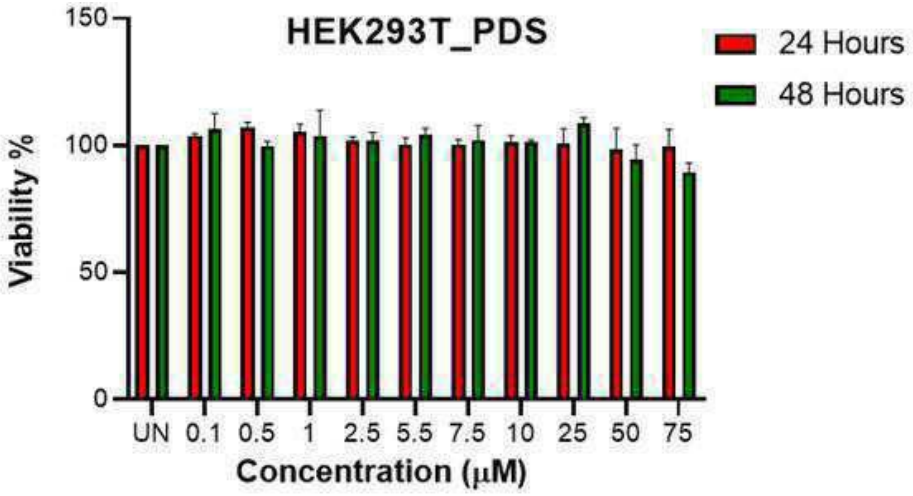
도면6a


G4-353
G4-644
G4-1463
G4-1574
G4-2714
G4-3467
G4-4162
G4-4261
G4-8687
G4-10261
G4-13385
G4-14547
G4-15208
G4-15448
G4-18296
G4-22316
G4-24215
G4-24268
Normalized Ellipticity (mdeg)
Wavelength (nm)
Only G4
G4 With CX-3543
G4 With PDS
G4 With PhenDC3

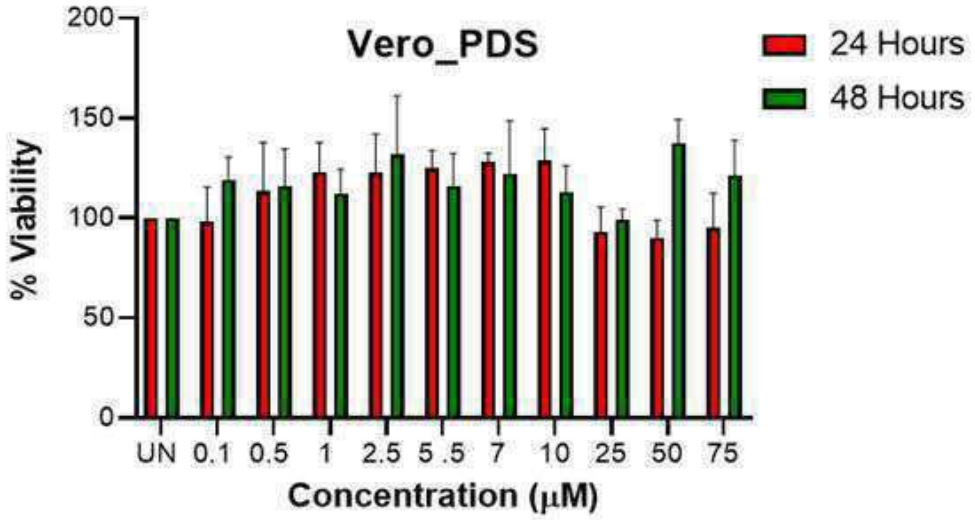
도면6b


G4-25197
G4-25951
G4-26746
G4-28781
G4-28903
G4-29123
G4-29234
Normalized Ellipticity (mdeg)
Wavelength (nm)
Only G4
G4 With CX-3543
G4 With PDS
G4 With PhenDC3

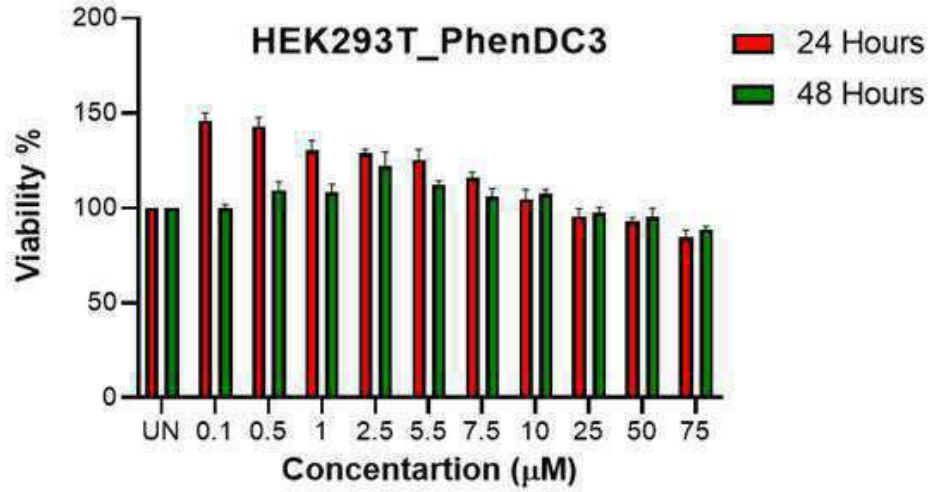
도면7a


HEK293T_PDS
24 Hours
48 Hours
Viability %
150
100
50
0
UN 0.1 0.5 1 2.5 5.5 7.5 10 25 50 75
Concentration (μM)

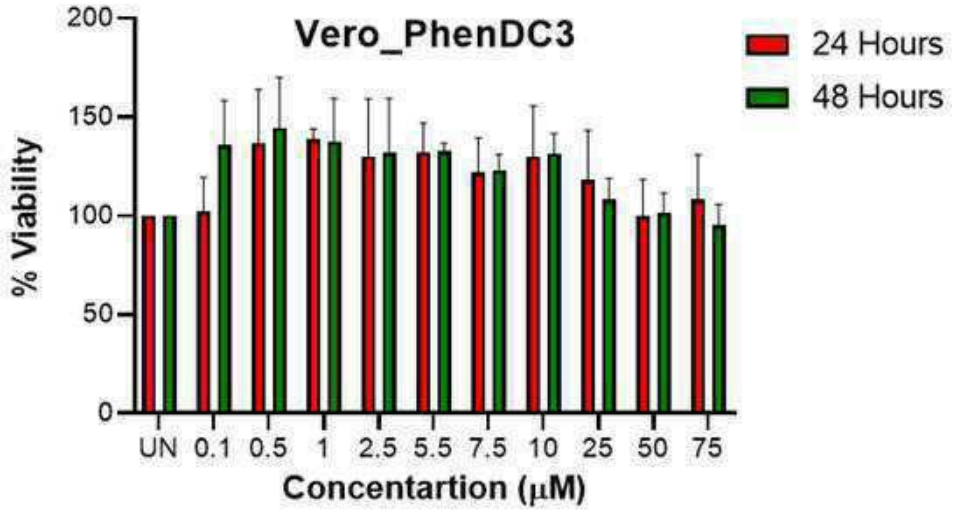
도면7b


Vero_PDS
24 Hours
48 Hours
% Viability
200
150
100
50
0
UN 0.1 0.5 1 2.5 5 .5 7 10 25 50 75
Concentration (μM)

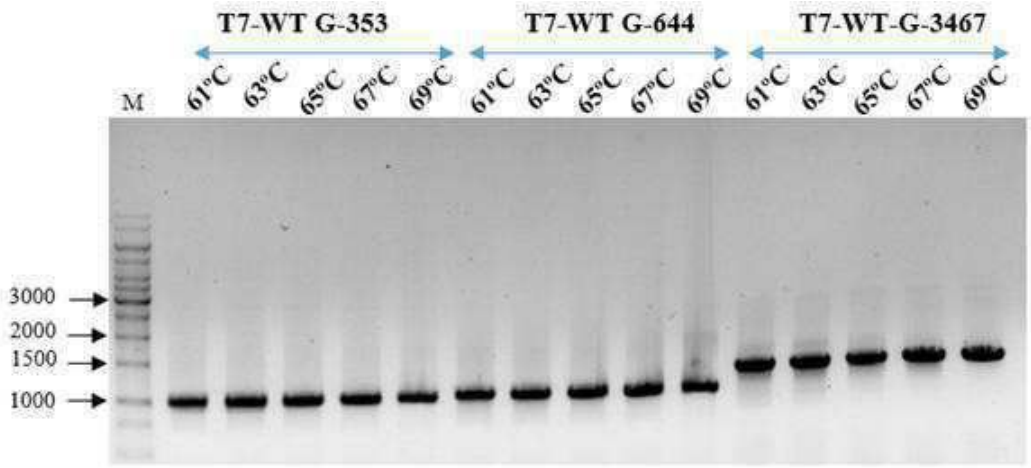
도면7c

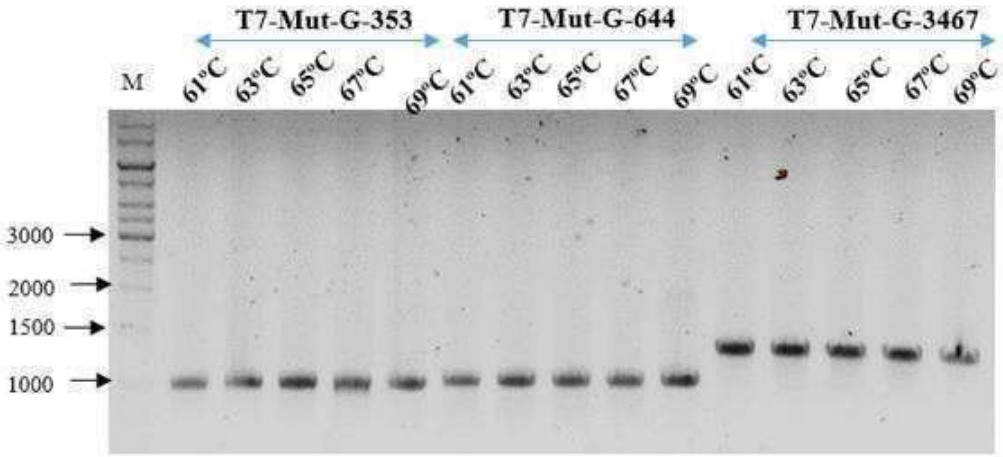

HEK293T_PhenDC3
24 Hours
48 Hours
Viability %
200
150
100
50
0
UN 0.1 0.5 1 2.5 5.5 7.5 10 25 50 75
Concentartion (μM)

도면7d

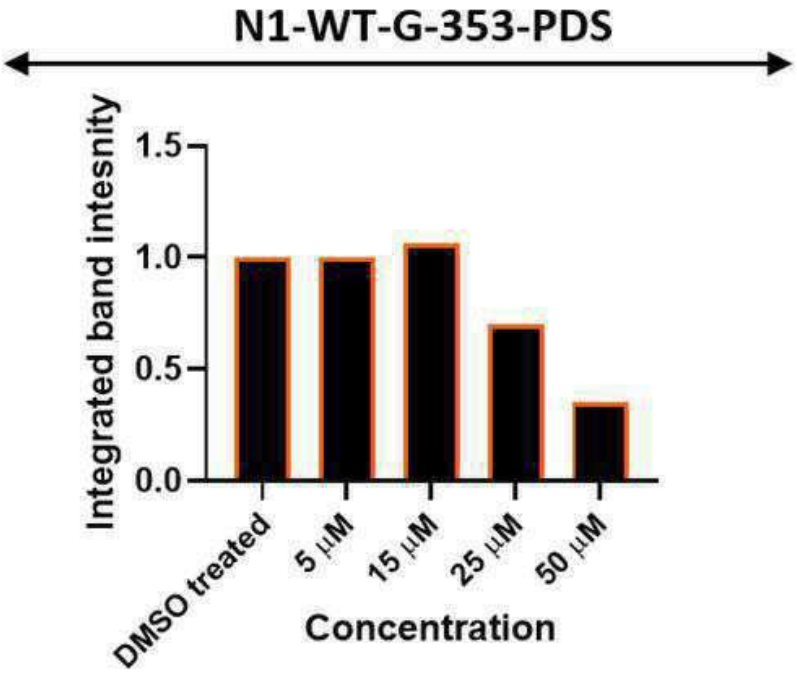

Vero_PhenDC3
24 Hours
48 Hours
% Viability
200
150
100
50
0
UN 0.1 0.5 1 2.5 5.5 7.5 10 25 50 75
Concentartion (μM)

도면8

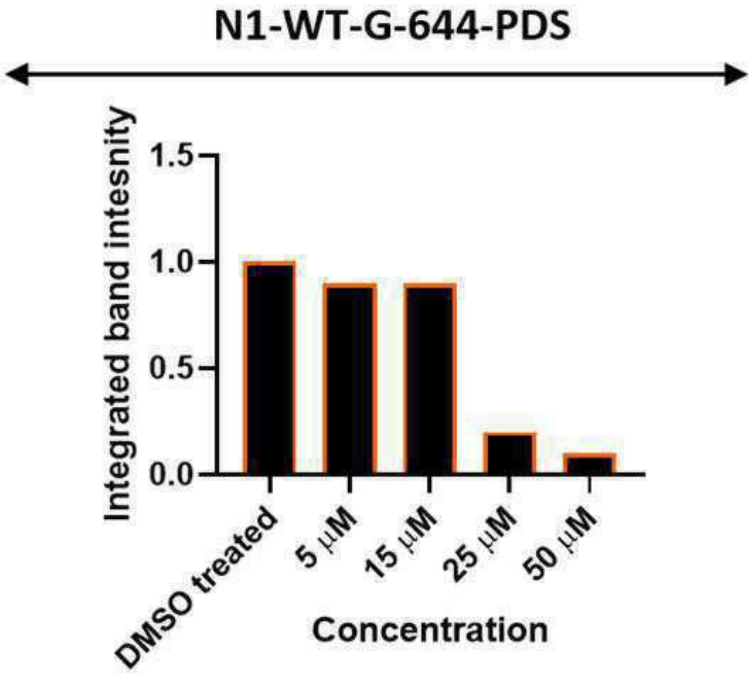

T7-WT G-353
T7-WT G-644
T7-WT-G-3467
M
61°C 63°C 65°C 67°C 69°C
3000
2000
1500
1000


T7-Mut-G-353
T7-Mut-G-644
T7-Mut-G-3467
M
61°C 63°C 65°C 67°C 69°C
3000
2000
1500
1000

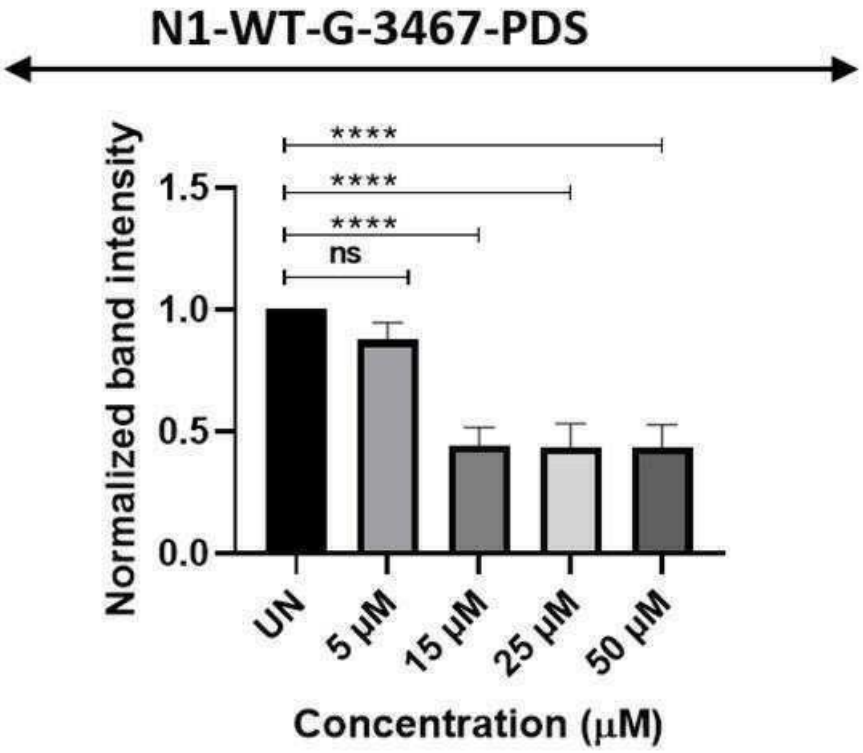
도면9a


N1-WT-G-353-PDS
Integrated band intesnity
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO treated
5 μM
15 μM
25 μM
50 μM
Concentration

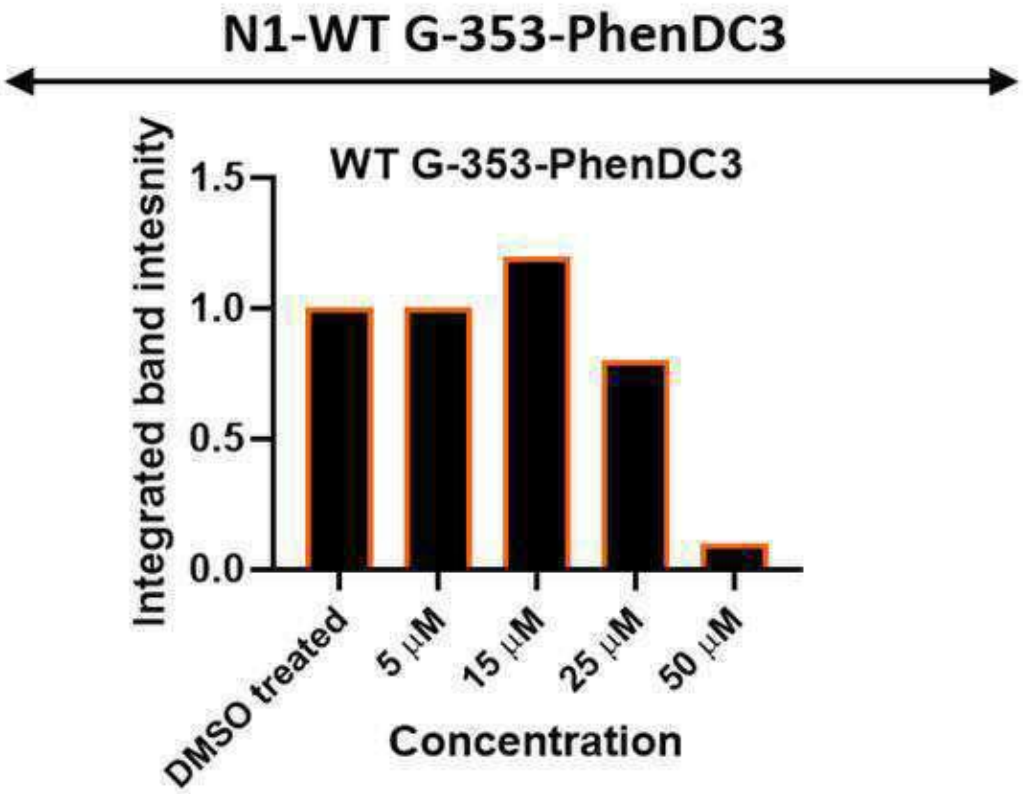
도면9b


N1-WT-G-644-PDS
Integrated band intesnity
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO treated
5 μM
15 μM
25 μM
50 μM
Concentration

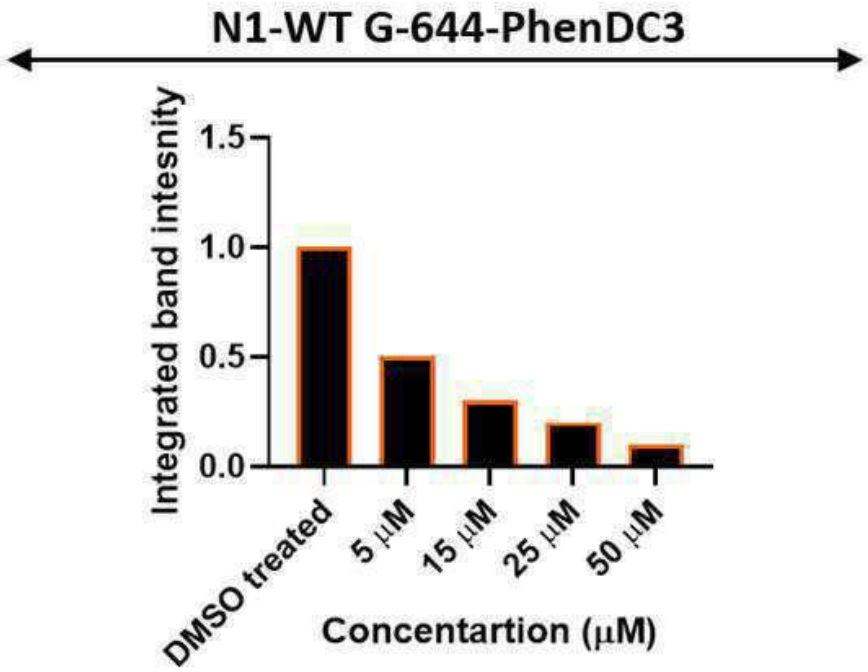
도면9c


N1-WT-G-3467-PDS
Normalized band intensity
1.5
1.0
0.5
0.0
****
****
****
ns
UN
5 μM
15 μM
25 μM
50 μM
Concentration (μM)

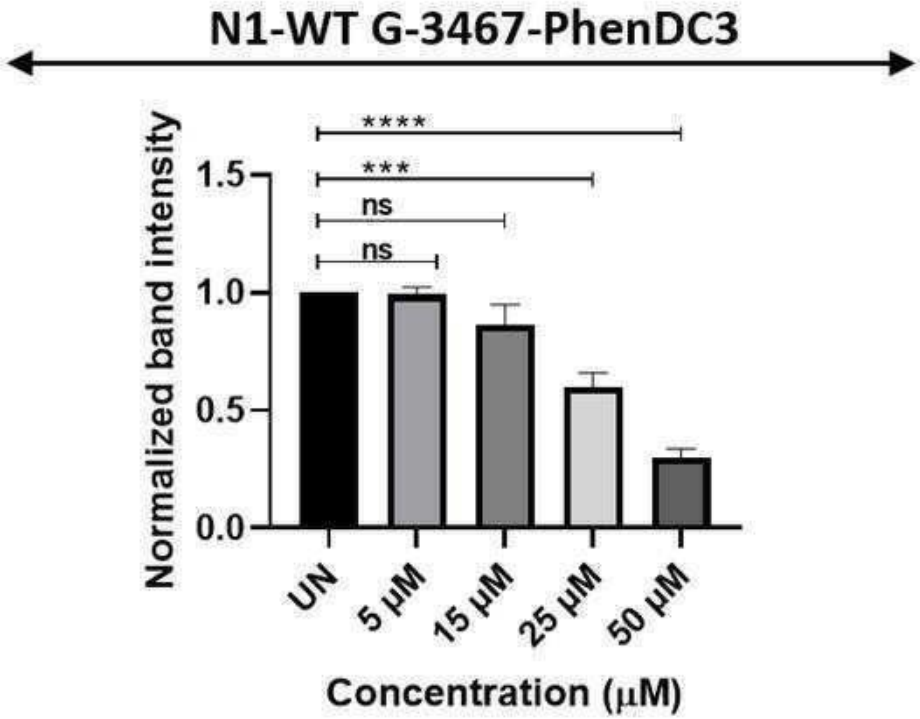
도면10a


N1-WT G-353-PhenDC3
WT G-353-PhenDC3
Integrated band intesnity
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO treated
5 μM
15 μM
25 μM
50 μM
Concentration

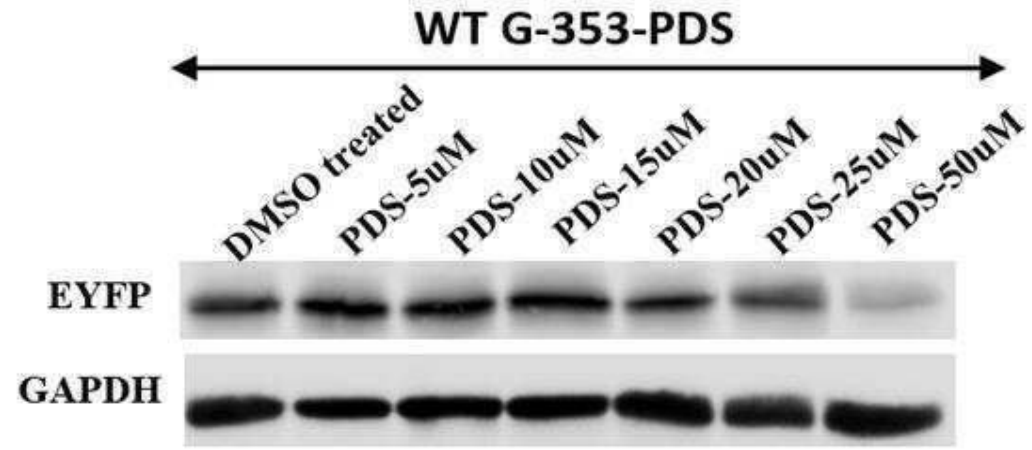
도면10b


N1-WT G-644-PhenDC3
Integrated band intesnity
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO treated
5 μM
15 μM
25 μM
50 μM
Concentartion (μM)

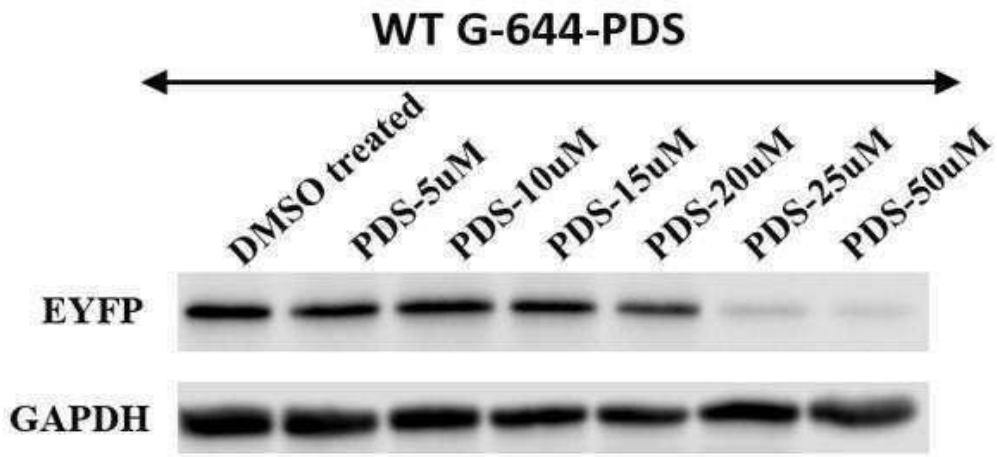
도면10c


N1-WT G-3467-PhenDC3
Normalized band intensity
****
***
ns
ns
1.5
1.0
0.5
0.0
UN
5 μM
15 μM
25 μM
50 μM
Concentration (μM)

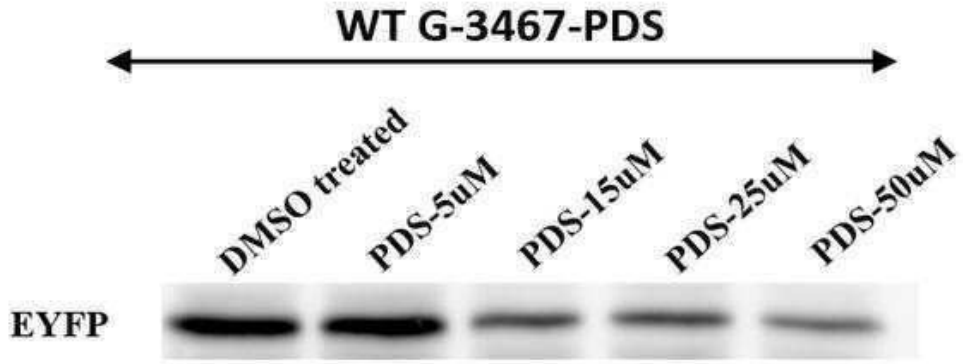
도면11a



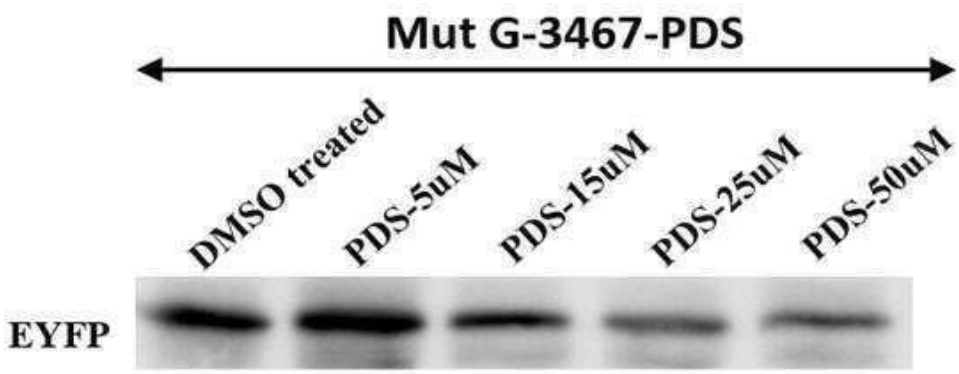
도면11b



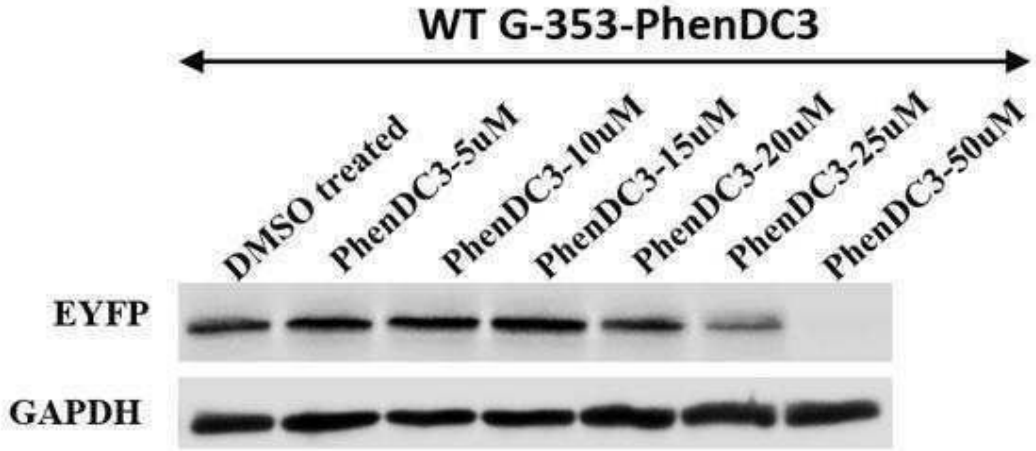
도면11c



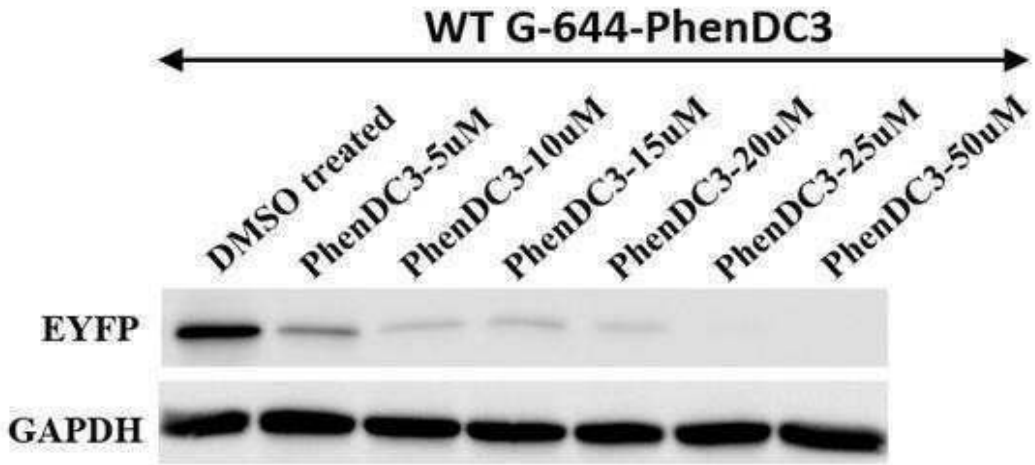
도면11d



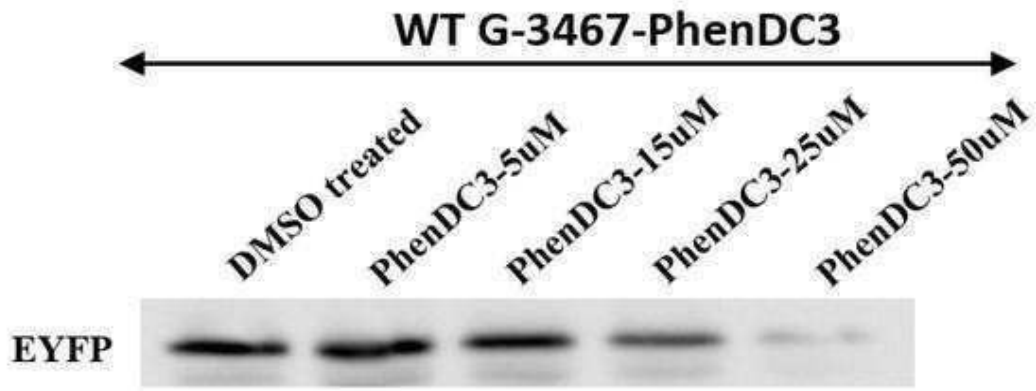
도면12a



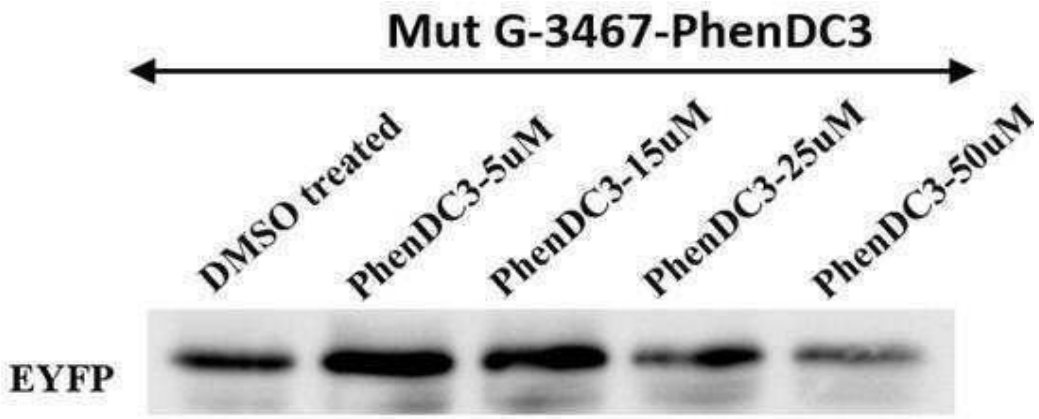
도면12b



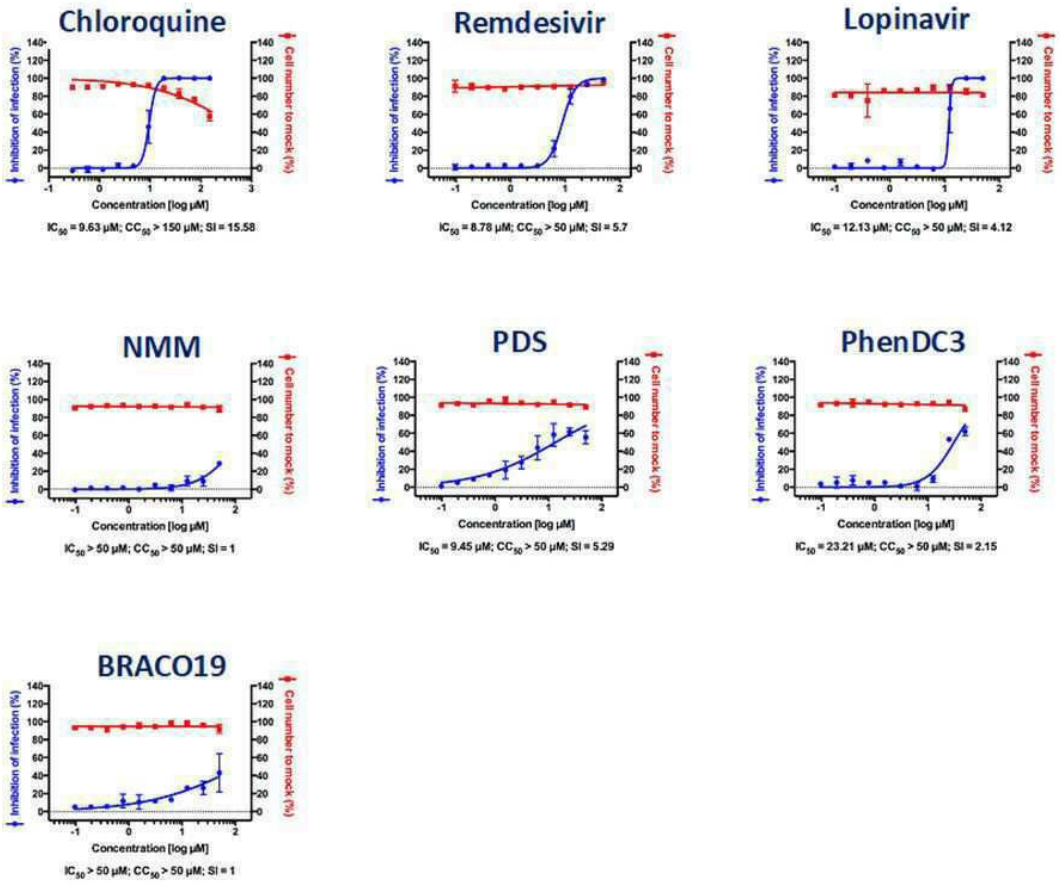
도면12c


WT G-3467-PhenDC3
DMSO treated
PhenDC3-5uM
PhenDC3-15uM
PhenDC3-25uM
PhenDC3-50uM
EYFP

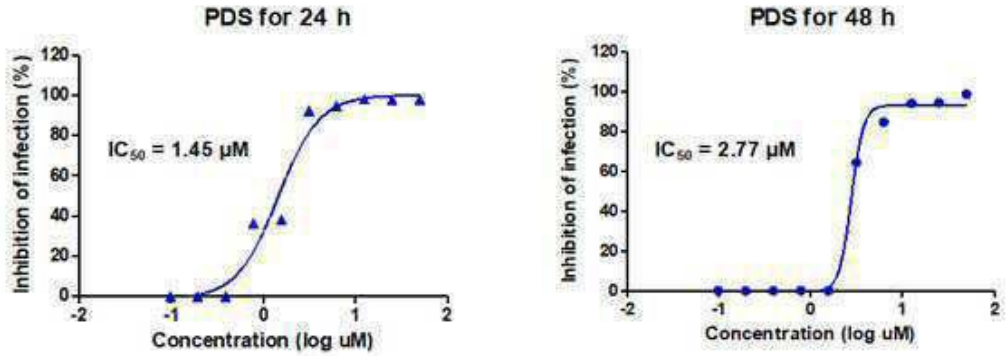
도면12d


Mut G-3467-PhenDC3
DMSO treated
PhenDC3-5uM
PhenDC3-15uM
PhenDC3-25uM
PhenDC3-50uM
EYFP

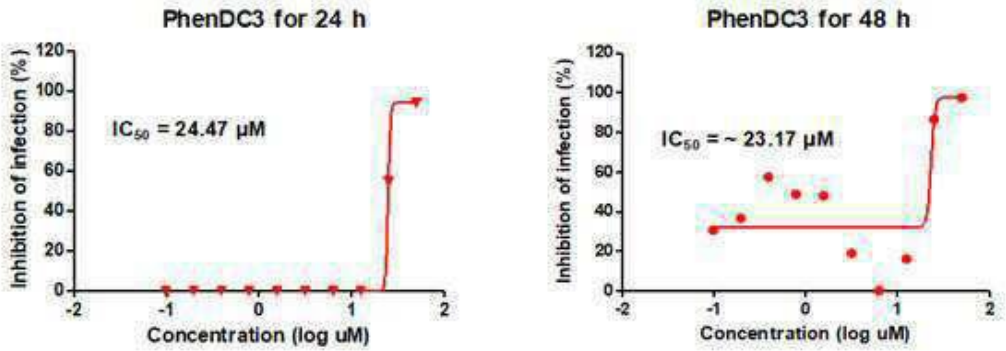
도면13


Chloroquine
Inhibition of infection (%)
Cell number to mock (%)
Concentration [log μM]
IC50 = 9.63 μM; CC50 > 150 μM; SI = 15.58
Remdesivir
Inhibition of infection (%)
Cell number to mock (%)
Concentration [log μM]
IC50 = 8.78 μM; CC50 > 50 μM; SI = 5.7
Lopinavir
Inhibition of infection (%)
Cell number to mock (%)
Concentration [log μM]
IC50 = 12.13 μM; CC50 > 50 μM; SI = 4.12
NMM
Inhibition of infection (%)
Cell number to mock (%)
Concentration [log μM]
IC50 > 50 μM; CC50 > 50 μM; SI = 1
PDS
Inhibition of infection (%)
Cell number to mock (%)
Concentration [log μM]
IC50 = 9.45 μM; CC50 > 50 μM; SI = 5.29
PhenDC3
Inhibition of infection (%)
Cell number to mock (%)
Concentration [log μM]
IC50 = 23.21 μM; CC50 > 50 μM; SI = 2.15
BRACO19
Inhibition of infection (%)
Cell number to mock (%)
Concentration [log μM]
IC50 > 50 μM; CC50 > 50 μM; SI = 1

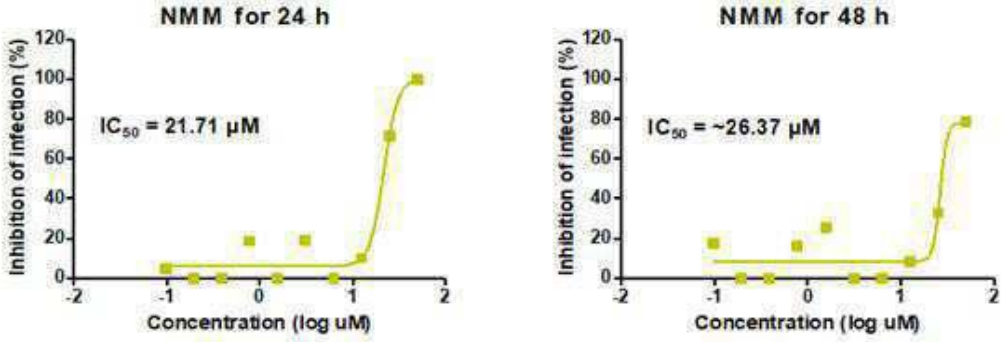
도면14a


PDS for 24 h
Inhibition of infection (%)
IC50 = 1.45 μM
Concentration (log uM)
PDS for 48 h
Inhibition of infection (%)
IC50 = 2.77 μM
Concentration (log uM)

도면14b

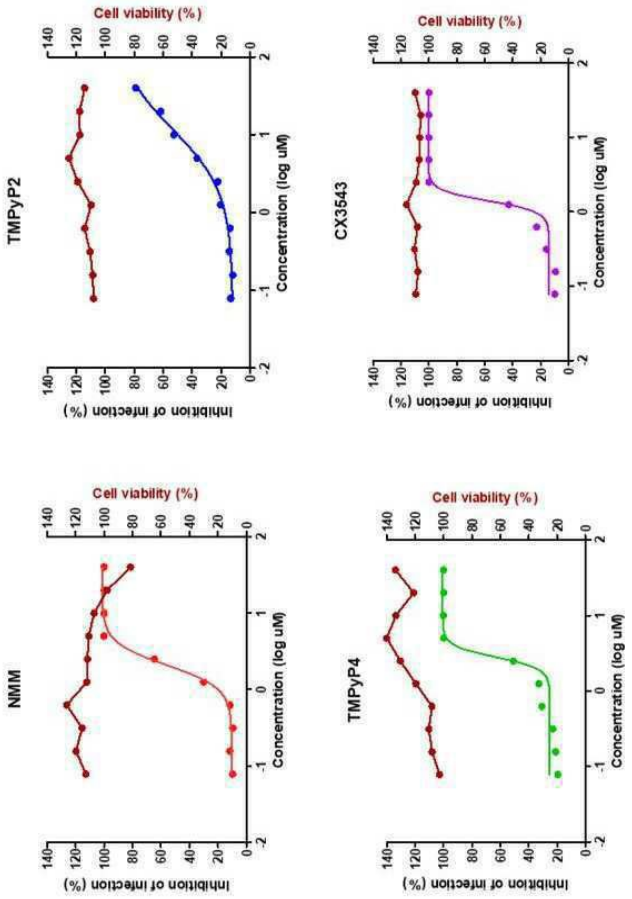

PhenDC3 for 24 h
Inhibition of infection (%)
IC50 = 24.47 μM
Concentration (log uM)
PhenDC3 for 48 h
Inhibition of infection (%)
IC50 = ~ 23.17 μM
Concentration (log uM)

도면15


NMM for 24 h
Inhibition of infection (%)
IC50 = 21.71 μM
Concentration (log uM)
NMM for 48 h
Inhibition of infection (%)
IC50 = ~26.37 μM
Concentration (log uM)

도면16

G4 Ligand	IC_{50} (μM)
NMM	2.10
TMPyP2	11.7
TMPyP4	2.80
CX3543	1.40



서 열 목 록

<110> Research and Business Foundation SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY
Korea University Research and Business Foundation

<120> Phamaceutical composition for preventing or treating Coronavirus infectious disease comprising Coronavirus G-quadruplex ligands as an active ingredient

<130> MP20-182P1D1

<150> KR 10-2020-0120799

<151> 2020-09-18

<160> 44

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

G-353

<400> 1

ggcuuuggag acuccgugga ggagg 25

<210> 2

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-644

<400> 2

gguaauaaag gagcuggugg 20

<210> 3

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-1463

<400> 3

gguggucgca cuauugccuu uggagg 26

<210> 4

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-1574

<400> 4

gguguuguug gagaagguuc cgaagg 26

<210> 5

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-2714

<400> 5

ggcggugcac caacaaaggu uacuuuugg 29

<210> 6

<211> 17

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-3467

<400> 6

ggaggaggug uugcagg 17

<210> 7

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-4162

<400> 7

gguuauaccu acuaaaaagg cuggugg 27

<210> 8

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-4261

<400> 8

gggguuuaaau gguuacacug uagaggagg 29

<210> 9

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-8687

<400> 9

ggauacaagg cuauugaugg ugg 23

<210> 10

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-10267

<400> 10

ggcugguaau guucaacuca ggguuauugg 30

<210> 11

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-13385

<400> 11

gguaugugga aagguuaugg 20

<210> 12

<211> 28

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-14947

<400> 12

gguuuuccau uuaauaaaug ggguaagg 28

<210> 13

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-15208

<400> 13

ggaacaagca aauucuaugg ugguugg 27

<210> 14

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-15448

<400> 14

ggcgguucac uauauguuaa accaggugg 29

<210> 15

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-18296

<400> 15

ggauuggcuu cgaugucgag ggg 23

<210> 16

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-22316

<400> 16

ggugauucuu cuucagguug gacagcugg 29

<210> 17

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-24215

<400> 17

gguuggaccu uuggugcagg 20

<210> 18

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-24268

<400> 18

ggcuuauagg uuuaauggua uugg 24

<210> 19

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-25197

<400> 19

ggccauggua cauuuggcua gg 22

<210> 20

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-25951

<400> 20

ggugguuaua cugaaaaaug ggaaucugg 29

<210> 21

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-26746

<400> 21

ggaucaccgg uggaauugcu aucgcaaugg 30

<210> 22

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-28781

<400> 22

ggcuucuacg cagaagggag cagaggcgg 29

<210> 23

<211> 15

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-28903

<400> 23

ggcuggcaau ggcgg 15

<210> 24

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-29123

<400> 24

ggaaauuuug gggaccagg 19

<210> 25

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-29234

<400> 25

ggcugguaau guucaacuca ggguuauugg 30

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT G4-353 (Fwd)

<400> 26

tatagctcga gatggagagc cttgtcc 27

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT G4-353 (Rev)

<400> 27

tatacggatc cacatgacca tgaggtgc 28

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT G4-644 (Fwd)

<400> 28

tatacctcga gatggttgag ctggtagc 28

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT G4-644 (Rev)

<400> 29

tatacggatc cccgttaagc tcacgc 26

<210> 30

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT G4-3467 (Fwd)

<400> 30

gataactcga gatggaactt acaccagttg ttcagac 37

<210> 31

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT G4-3467 (Rev)

<400> 31

aatataggat ccggaatctc agcgatcttt tgttc 35

<210> 32

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mut G4-353 (Fwd)

<400> 32

cgcgacgtgc tcgtacgtga ctttgaagac tccgtagaag aagtc 45

<210> 33

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mut G4-353 (Rev)

<400> 33

gacttcttct acggagtctt caaagtcacg tacgagcacg tcgcg 45

<210> 34

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mut G4-644 (Fwd)

<400> 34

cggtaataaa agagctagta gccatagtta cggcgccg 38

<210> 35

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mut G4-644 (Rev)

<400> 35

cggcgccgta actatggcta ctagctcttt tattaccg 38

<210> 36

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mut G4-3467 (Fwd)

<400> 36

catggaagaa gtgttgcaag agccttaaat aaggctac 38

<210> 37

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mut G4-3467 (Rev)

<400> 37

gtagccttat ttaaggctct tgcaacactt cttccatg 38

<210> 38

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T7-G4-353 (Fwd)

<400>

38

agtaatacga ctcactatag ggatggagag ccttgtcc 38

<210> 39

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T7-G4-644 (Fwd)

<400> 39

agtaatacga ctcactatag ggatggttga gctggtagca g 41

<210> 40

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T7-G4-3467 (Fwd)

<400> 40

agtaatacga ctcactatag ggatggaact tacaccagtt gttc 44

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T7-EYFP (Rev)

<400> 41

ttacttgtac agctcgtcca tg 22

<210> 42

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mut-G-353

<400> 42

gacuuugaag acuccguaga agaag 25

<210> 43

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mut-G-644

<400> 43

gguaauaaaa gagcuaguag 20

<210> 44

<211> 17

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mut-G-3467

<400> 44

ggaagaagug uugcaag 17