



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0021009  
(43) 공개일자 2023년02월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/55 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)  
A61P 31/14 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 31/55 (2013.01)  
A61P 11/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7045014
- (22) 출원일자(국제) 2021년05월28일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년12월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2021/064338
- (87) 국제공개번호 WO 2021/239943  
국제공개일자 2021년12월02일
- (30) 우선권주장  
20177451.0 2020년05월29일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인  
세비나 게엠베하  
오스트리아, 1030 비엔나, 칼-파르카스-가세 22
- (72) 발명자  
나지 에스테르  
오스트리아, 1070 비엔나, 웨스트반슈트라쎄 32-34/아이/12  
나지 가보르  
헝가리, 9400 소프론, 에르트부르게르 들류 8  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 20 항

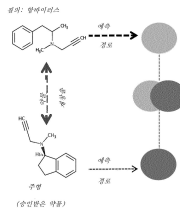
(54) 발명의 명칭 항바이러스 치료로서의 아젤라스틴

(57) 요약

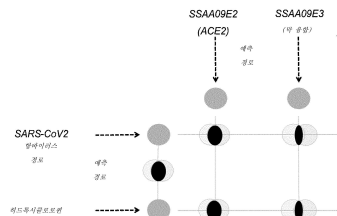
항바이러스 치료를 필요로 하는 대상체의 예방적 또는 치료학적 치료에 사용하기 위한 제약 제제에서 항바이러스 물질로서 사용하기 위한 항바이러스 유효량의 아젤라스틴(Azelastine) 화합물.

대표도 - 도1

(A)



(B)



(52) CPC특허분류

*A61P 31/14* (2018.01)

*A61P 31/16* (2018.01)

(72) 발명자

**스지자토 발레리아**

오스트리아, 1160 빈, 오타크링거 슈트라쎬 173/5

**콘라트 로버트**

오스트리아, 1040 비엔나, 파보리텐슈트라쎬 4-6

(30) 우선권주장

20184767.0 2020년07월08일

유럽특허청(EPO)(EP)

20195740.4 2020년09월11일

유럽특허청(EPO)(EP)

21171333.4 2021년04월29일

유럽특허청(EPO)(EP)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

항바이러스 치료(antiviral treatment)를 필요로 하는 대상체(subject)의 예방적 또는 치료학적 치료(therapeutic treatment)에 사용하기 위한 제약 제제에서 항바이러스 물질로서 사용하기 위한 항바이러스 유효량의 아젤라스틴(Azelastine) 화합물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

a) 코로나비리다에(*Coronaviridae*) ( $\beta$ -코로나바이러스, 예컨대, SARS-CoV-2, MERS-CoV, SARS-CoV-1, HCoV-OC43, HCoV-HKU1; 또는  $\alpha$ -코로나바이러스, 예컨대, HCoV-NL63, HCoV-229E 또는 PEDV; 상기 중 임의의 것의 자연 발생 변종(naturally-occurring variant) 또는 돌연변이체 포함);

b) 아데노비리다에(*Adenoviridae*) (예컨대, 아데노바이러스 또는 인간 아데노바이러스, 예컨대, HAdVB, HAdVC, 또는 HAdVD);

c) 파라믹소비리다에(*Paramyxoviridae*) (예컨대, RSV 또는 인간 RSV, 예컨대, hRSV 서브타입 A 또는 B); 또는

d) 오르토믹소비리다에(*Orthomyxoviridae*) (예컨대, 인플루엔자 바이러스 또는 인간 인플루엔자 바이러스, 바람직하게, 인플루엔자 바이러스 A (IVA), 예컨대, H1N1, H3N3, 또는 H5N1, 또는 인플루엔자 바이러스 B (IVB), 또는 인플루엔자 바이러스 C (IVC), 또는 인플루엔자 바이러스 D (IVD))로부터 선택되는 바이러스 중 하나 이상의 것에 의해 유발되거나, 또는 이에 의한 감염과 연관이 있는 질환 병태(disease condition)가 치료되는, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 상이한 코로나비리다에 바이러스가 자연 발생 SARS-CoV-2 변종 또는 돌연변이체, 예컨대, SARS-CoV-2 S-단백질의 하나 이상의 돌연변이, 바람직하게, 서열 번호: 4에서 K417N, L452R, N501Y, D614G, P681H, P681R, E484K, E484Q, 또는 69/70 결실(deletion)을 포함하는 것이고, 바람직하게, 여기서, SARS-CoV-2 변종 또는 돌연변이체는 B.1.1.7 (UK 변종), B.1.351 (남아프리카), P.1 (브라질), B.1.617 (인도), B.1.618 (벵골(Bengal)) 돌연변이체로 구성된 군으로부터 선택되는, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제약 제제가 아젤라스틴 화합물 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 의약품 또는 약물 제품인, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 병태가 감기, 코 감염, 부비동염(sinusitis), 인후 및 후두(throat and larynx), 세기관지염(bronchiolitis), 설사(diarrhea), 피부 발진(rash on skin), 또는 폐렴(pneumonia), 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS)인, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항바이러스 유효량이 바이러스에 의한 감수성 세포(susceptible cell)의 감염을 예방함으로써, 질환 병태를 치료하는 데 효과적인, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

#### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항바이러스 유효량이 0.1 - 500  $\mu\text{g}$ /용량인, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제약 제제가 국부 투여를 위해, 바람직하게, 상기도 및 하기도, 비강, 폐, 구강내, 안구, 또는 진피용으로 적용하기 위해, 또는 전신 투여를 위해, 바람직하게, 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 경피, 또는 경구 투여에 의한 전신 투여를 위해 제제화되는, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제약 제제가 대상체에게 스프레이, 산제, 젤, 연고, 크림, 폼 (foam), 또는 액상 액제, 로션, 가글액 (gargle solution), 에어로졸화된 산제 (aerosolized powder), 에어로졸화된 액상 제제, 과립제, 캡슐, 점적제 (drop), 정제, 시럽, 로젠지 (lozenge), 점안제 (eye drop), 또는 주입 또는 주사용 제제로서 투여되는, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 아젤라스틴 화합물이 콧구멍 (nostril) 당 1-1000  $\mu\text{g}$ 의 항바이러스 유효량으로 대상체의 코 내로 적용되는, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 아젤라스틴 화합물이 단일 항바이러스 물질로서 투여되거나, 또는 치료가 바람직하게, 항바이러스 물질, 항염증성 물질 및 항생제 물질로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 활성 물질을 이용하는 추가 치료와 조합되는, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스로 감염되었거나, 또는 감염될 위험이 있고, 대상체, 바람직하게는 인간, 개, 고양이, 말, 낙타, 소 또는 돼지가 치료되는, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

**청구항 13**

바이러스 감염 및/또는 바이러스 확산을 예방하기 위해 생물학적 표면을 처리하기 위한 의약품에서 항바이러스 물질로서 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 생물학적 표면이 하나 이상의 상이한 바이러스로 감염된 점막 표면, 또는 감염될 위험이 있는 점막 표면인, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 하나 이상의 상이한 바이러스가 바람직하게,  $\beta$ -코로나바이러스, 예컨대, SARS-CoV-2, MERS-CoV, SARS-CoV-1, HCoV-OC43, 또는 HCoV-HKU1, 또는  $\alpha$ -코로나바이러스, 예컨대, HCoV-NL63, HCoV-229E 또는 PEDV (상기 중 임의의 것의 자연 발생 변종 또는 돌연변이체 포함)로 구성된 군으로부터 선택되는 코로나 비리다에 바이러스인, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 하나 이상의 상이한 코로나비리다에 바이러스가 자연 발생 SARS-CoV-2 변종 또는 돌연변이체, 예컨대, SARS-CoV-2 S-단백질의 하나 이상의 돌연변이, 바람직하게, 서열 번호: 4에서 K417N, L452R, N501Y, D614G, P681H, P681R, E484K, E484Q, 또는 69/70 결실을 포함하는 것이고, 바람직하게, 여기서, SARS-CoV-2 변종 또는 돌연변이체는 B.1.1.7 (UK 변종), B.1.351 (남아프리카), P.1 (브라질), B.1.617 (인도), B.1.618 (벵골) 돌연변이체로 구성된 군으로부터 선택되는, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

**청구항 17**

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 의약품이 국소 용도를 위해, 바람직하게, 상기도 및 하기도, 비강, 폐, 구강내, 안구, 또는 진피 적용을 위해 제제화되는, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

**청구항 18**

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 의약품이 액제, 분산제, 건조 산제, 또는 에어로졸화된 액제 또는 산제로서 사용되는, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

**청구항 19**

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 아젤라스틴 화합물이 항바이러스 유효량으로 적용되고, 바람직하게, 여기서 상기 양이 1 ng -1000 ng/cm<sup>2</sup>인, 사용하기 위한 아젤라스틴 화합물.

**청구항 20**

바이러스 소독제(viral disinfectant)로서의, 아젤라스틴 화합물의 용도.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명의 분야

[0002] 본 발명은 바이러스 감염을 치료하기 위한 항히스타민 약물 화합물의 신규한 용도, 특히, 코로나비리다에 (Coronaviridae) 감염 (예컨대, SARS 바이러스 또는 MERS 바이러스), 아데노바이러스 감염, 인간 호흡기 세포융합 바이러스 감염 및 인플루엔자 감염을 치료하기 위한 방법 및 화합물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 본 발명의 배경

[0004] 코로나바이러스는 직경이 약 120나노미터인 단일 가닥 RNA 바이러스이다. 이는 돌연변이 및 재조합이 일어나기 쉬운 바, 매우 다양하다. 약 40가지의 다양한 변종이 있으며, 주로 인간 및 비인간 포유동물 및 조류를 감염시킨다. 이는 박쥐 및 야생 조류에 서식하며, 다른 동물과 인간에게 퍼질 수 있다.

[0005] 계통 구조에 따라 4개의 주요 속 (알파, 베타, 감마 및 델타 코로나바이러스)이 있다. 알파 및 베타 코로나바이러스는 포유동물에만 감염되며, 일반적으로 인간에서는 호흡기 증상을, 다른 동물에서는 위장염을 유발한다. 2019년 12월까지의 단 6가지의 상이한 코로나바이러스만이 인간을 감염시키는 것으로 알려졌다. 이들 중 4개 (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 및 HKU1)는 일반적으로 면역 능력이 있는 사람들에게 경미한 감기 유형 증상을 유발했으며, 남은 2개는 지난 20년 동안 유행병을 일으켰다. 2002-2003년에 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 (SARS-CoV)는 10%의 사망률을 초래한 SARS 유행병을 일으켰다. 유사하게, 중증 호흡기 증후군 코로나바이러스 (MERS-CoV)는 2012년에 37%의 사망률로 유행병을 일으켰다.

[0006] 2019년 말 내지 2020년 초에 SARS-CoV와 밀접한 관련이 있는 신종 코로나바이러스인 SARS-코로나바이러스 2 (SARS-CoV-2)는 대규모로 빠르게 확산되는, 폐렴을 비롯한 호흡기 질환의 발병 원인인 것으로 밝혀졌다. 신종 코로나바이러스가 인식되었기 때문에, 이들이 유발하는 질환을 코로나바이러스 질환 2019 (CoVID-19)로 명명하였다.

[0007] SARS-관련 코로나바이러스는 가변 수용체 결합 도메인 (RBD)을 포함하는 스파이크 단백질로 덮여 있다. 이 RBD는 심장, 폐, 신장 및 위장관에서 발견되는 안지오텐신 전환 효소-2 (ACE-2) 수용체에 결합하여 표적 세포로의 바이러스 진입을 촉진시킨다.

[0008] 우한에서 퍼진 최초의 바이러스 균주는 "야생형" 바이러스로 간주되며, 곧 변종, 즉, 더 높은 감염력을 바탕으로 자연 선택을 통해 진화한 돌연변이체를 생성하였다. 2020년 3월 초, 유럽에서 스파이크 단백질에 D614G 돌연변이가 있는 변종 (B.1 변종)이 확인되었고, 이는 곧 전 세계적으로 최초의 우한 변종을 대체하였다. 이어서, SARS-CoV-2 변종 B.1.1.7 (20I/501Y.V1, VOC 202012/01로도 공지) 및 B.1.351 (20H/501Y.V2로도 공지)이 각각 영국 및 남아프리카공화국에서 확인되었고, 이후 많은 국가로 퍼졌다. 이들 변종은 스파이크 단백질을 코딩하는 유전자에 다양한 돌연변이를 갖고 있다. 이들 중 하나는 아미노산 아스파라긴 (N)이 티로신 (Y)으로 대체된 위치 501의 수용체 결합 도메인 (인간 ACE2에 결합하는 RBD)에 있다(돌연변이 N501Y). B.1.1.7 변종은 또한 69/70 결실(deletion)을 포함하여 수 개의 다른 돌연변이를 가지고 있으며, S1/S2 푸린 절단 부위 근처의 스파이크 단백질 및 P681H의 구조적 변화로 이어질 가능성이 있다. 이러한 돌연변이의 조합은 2019년 중국 우한에서

출현한 원래 버전과 비교하여 더 높은 수용체 결합, 더 효율적인 확산 및 더 높은 질환 유발 가능성으로 이어진다. B.1.351 변종은 N501Y 외에도 E484K 및 K417N 돌연변이를 갖지만, 69/70 결실은 보이지 않는다. 몇 가지 증거에 따르면 이 변종은 면역 압박, 즉, 자연 감염으로 인한 인간 면역 반응으로부터의 회피, 또는 수동 면역 요법 또는 다른 백신을 사용한 능동 면역화로 인해 출현했음을 시사한다. E484K 돌연변이는 백신 효과 감소가 원인인 것으로 보인다. 이 돌연변이 (16개의 다른 돌연변이 N501Y 및 K417T와 함께)도 P.1로 지정된 브라질 변종에서 검출되었다. 변종 P.1.은 브라질에서 광범위한 감염을 일으켰고, 나중에 전 세계적으로 검출되었다. 이 돌연변이체는 젊은 사람들에게 더 중증 질환을 일으키고, 사망률을 높이며, 이전 변종과 일부 백신에 의해 유도된 면역 반응을 회피하는 것으로 의심된다.

[0009] 돌연변이체 B.1.617은 인도에서 처음 검출되고, 확산되었다. 이는 13개 돌연변이를 갖고, 그 중 3개: E484Q, L452R 및 P681R은 면역 회피와 관련하여 우려된다. 계통 B.1.618은 서 벵골(Bengal)에서 우세한 돌연변이 중 하나가 되었으며, 2개의 아미노산 결실 (H146del 및 Y145del) 뿐만 아니라, 스파이크 단백질의 E484K 및 D614G 돌연변이를 보유한다. 감염성이 더 높고, 자연 면역 또는 백신 유도 면역을 회피하는 위협이 될 것으로 추측된다.

[0010] 광범위한 백신접종이 현재 알려진 돌연변이와 새로운 돌연변이의 조합이 다른 추가 변종의 출현을 유도할 가능성이 높다.

[0011] 동시 이루어지는 바이러스의 집중 확산과 함께 가속화된 전세계 백신 접종이 회피 돌연변이체의 출현에 대한 엄청난 진화 압력을 제기한다. 거의 전적으로 모든 백신은 스파이크 단백질에 대한 면역 반응 유발에 의존한다. 추가로, 현재 관점에 따르면, 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인에 대한 중화 면역 반응은 장어에 대한 주요 기여자로 간주된다. 이러한 두 가지 사실을 바탕으로 자연 출현 바이러스 변종들 중에서 선택적인 이점 (수용체에 대한 더 높은 결합 및/또는 중화 면역 반응의 회피)을 제공하는 돌연변이된 스파이크 단백질을 발현하는 것이 선택될 것이다. 후속 변종은 전반적인 독성/전염성이 더 높고/거나, 면역 회피 가능성이 더 높은 몇 가지 연속적인 돌연변이를 축적할 수 있다. 상기에서 언급한 것 외에도 이에 대한 최적의 방어를 위한 2세대 백신의 잠재적 필요성과 함께 추가로 신종 바이러스 변종이 출현할 것으로 구상된다.

[0012] 따라서, 현재 우세한 UK (B.1.1.7) 변종 및 SA (B.1.351) 변종 뿐만 아니라, 크게 감소된 백신 유도 방어와 연관된 다른 신종 변종에 대해 활성을 나타내는 항바이러스 화합물이 예방과 치료, 둘 모두를 위해 높은 관련성을 보인다.

[0013] 아데노바이러스는 이중 가닥 DNA 게놈을 가진 큰 외피비보유 바이러스이다. 아데노비리다에(Adenoviridae) 과는 바이러스의 광범위한 숙주 특이성을 가진 6개의 속을 포함한다. 7개의 인간 아데노바이러스 과는 모두 (A-G) 모두 마스타데노바이러스 속에 속한다. 현재 인간 바이러스는 다양한 점막 감염을 유발하는 원인이 되는 88가지의 상이한 (혈청) 유형으로 분류된다. B 과 (HAdV-B) 및 C 과 (HAdV-C) 내의 유형은 상기도 감염의 원인이 되고, HAdV-F (주로 유형 40 및 41) 및 HAdV-G (주로 유형 52) 유형은 위장염을 유발한다. 결막염은 HAdV-B 및 HAdV-D와 연관이 있다. 이러한 점막 감염은 일반적으로 자가 제한적이지만, 면역이 손상된 숙주에서 더 심각할 수 있다. 아데노바이러스 혈청형 14는 면역 능력이 있는 숙주에서도 치명적일 수 있는 중증 호흡기 감염의 발병을 일으키는 신종 병원체이다.

[0014] 아데노바이러스는 240개의 핵소 단백질과 12개의 펜톤 단백질로 구성된 고전적인 20면체 캡시드를 나타낸다. 펜톤 염기는 숙주 세포 수용체인 CD46 (B 과) 및 콕사키/아데노바이러스 수용체 (CAR, 다른 모든 과에 대한 것)에 결합하는 돌출 섬유와 회합되어 있다. 이 초기 결합은 바이러스 입자의 세포내이입을 자극하는 αV 인테그린과 펜톤 염기 바이러스 구조의 상호작용으로 이어진다. 세포내에서는 캡시드는 탈안정화되고, 엔도솜이 분해되며, 바이러스 DNA가 핵공을 통해 핵으로 진입한다. 히스톤 단백질과 회합한 후, 숙주 전사 기구는 바이러스 게놈을 숙주 게놈으로 통합하지 않고, 바이러스 유전자 발현에 사용된다. 바이러스 단백질은 초기 단백질 (주로 조절 단백질)와 후기 단백질 (구조 단백질)로 발현되며, 게놈 복제에 의해 분리된다. 마지막으로, 바이러스 게놈은 단백질 쉘에 패키징되고, 바이러스 유도 용해 절차에 따라 숙주 세포에서 방출된다.

[0015] 아데노바이러스는 소독제 및 세제 (비캡슐화)에 대해 비교적 내성을 띠며, 표면 상에서 및 물에서 오래 생존한다. 아데노바이러스 감염을 치료할 수 있는 것으로 입증된 항바이러스 약물은 없는 바, 이에 치료는 주로 증상에 대한 것이다. 현재 일반 대중이 이용할 수 있는 아데노바이러스 백신은 없지만, 미군에서는 4형과 7형 백신을 사용하였다. 최근, 조작된 아데노바이러스는 유전자 요법에서 및 이중성 백신 항원 전달 (에볼라 및 코비드)을 위한 바이러스 벡터로서 성공적으로 사용되었다.

[0016] 인간 호흡기 세포융합 바이러스 (hRSV)는 (-) 센스, 단일 가닥 RNA 게놈을 가진 외피비보유 바이러스이다. 게놈은

선형이며, 11개의 단백질을 코딩하는 10개의 유전자를 가지고 있다. RSV는 각각 16개 및 22개 클레이드 (또는 균주)를 갖는 2개의 항원 서브타입 A 및 B로 나뉜다.

[0017] RSV는 전염성이 매우 높으며, 지역 사회 및 병원 전파, 둘 모두에서 발병을 일으킬 수 있다. 매년 약 3천만 건의 급성 호흡기 질환과 60,000건 이상의 소아 사망이 전 세계적으로 RSV로 인해 발생한다. 코, 입 또는 눈의 점막 표면에 닿는 오염된 에어로졸 비말을 통해 전염된다. 상부 기도의 섬모 세포의 감염은 하부 기도로 퍼진다. 이는 세기관지염을 통한 경미한 상기도 감염에서 바이러스성 폐렴에 이르기까지 다양한 증증도의 가장 흔한 아동기 감염 중 하나이며, 가장 심한 경우, 기계적 환기가 필요할 수 있다. 면역이 손상된 개체 (조산아 포함)는 더 심각한 질환 결과에 대한 위험이 더 높다. 리바비린은 아동의 RSV 감염에 대해 허가를 받았지만, 치료 옵션은 일반적으로 지지 요법으로 제한된다. (상당한 개발 노력에도 불구하고) 백신은 사용할 수 없지만, 모노클로날 항체 (팔리비주맵)를 사용한 수동 면역이 예방을 위한 선택으로 사용 가능해졌다.

[0018] 일반적으로 "독감"이라고 하는 인플루엔자는 인플루엔자 바이러스에 의해 발생하는 감염성 질환이다. 각 계절 (북반구의 겨울철)에 인구의 5-15%가 인플루엔자에 걸리며, 이는 대략 3-5백만 건의 중증 사례를 포함한다. 아동, 노인, 및 만성 건강상 병태를 앓는 질환자 등 고위험군에서 매년 50만 명 이상이 사망한다. 1-4일의 인큐베이션 기간 후, 갑작스럽게 발열, 오한, 두통, 근육통 또는 쭉심, 식욕 부진, 피로, 혼돈 등의 증상이 나타난다. 폐렴은 1차 바이러스 감염, 또는 예컨대, 뉴모코쿠스(*pneumococcus*) 또는 S. 아우레우스(*S. aureus*)와 같은 2차 박테리아 감염으로 인해 발생할 수 있다. 인플루엔자의 전파는 에어로졸 비말에 의해 매개된다. 1차 감염 부위는 상기도이며, 이어서, 하기도로의 진행 및 침습성 감염이 뒤따른다.

[0019] 인플루엔자 바이러스에는 A, B, C, D의 4가지 유형 (종)이 존재한다. 계절성 유행병 (즉, 독감 시즌)은 인간 인플루엔자 A (IAV) 및 B (IBV) 바이러스에 의해 발생하며, C 및 D는 인간의 증상 감염과는 거의 연관이 없다. 인플루엔자 A 바이러스는 바이러스 표면 상의 두 단백질, 헤마글루티닌 (H) 및 뉴라미니다제 (N)에 따라 서브타입으로 나뉜다. 잠재적으로 198개의 상이한 인플루엔자 A 서브타입 조합이 있지만, 현재 H1N1 및 H3N2 유형이 전 세계적으로 돌고 있다. B형 인플루엔자 바이러스는 서브타입으로 나뉘지 않고, 대신 B/Yamagata 및 B/Victoria의 두 계통으로 추가 분류된다. 이를 바탕으로, 계절성 독감 백신은 일반적으로 A형 (H1N1 및 H3N2) 2종과 B형 1 또는 2종의 조합을 함유한다. 인플루엔자 바이러스는 분절된 (-) 센스, 단일 가닥 RNA 게놈을 가지고 있다. IAV 및 IBV, 둘 모두, 동일한 세포의 공동 감염시 다른 인플루엔자 바이러스의 게놈과 조합될 수 있는 8개의 세그먼트를 함유한다. 이 과정 (재편성으로 명명)을 통해 바이러스 항원 조성이 상당히 변경된 자손이 생성된다. 상기 재편성체 바이러스 변종은 인간 집단에게 새로운 것이며, 유행병 (예컨대, 1918년 스페인 독감, H1N1)을 일으킬 수 있다. 재편성은 또한 상이한 숙주에 특이적인 바이러스 사이에서도 발생할 수 있다. 예를 들어, 2009년의 "돼지 독감" 유행병은 돼지, 조류 및 인간 특이적 바이러스 서열 (H1N1)의 조합을 보유하는 삼중 재편성체 바이러스에 의해 유발되었다. 유사하게, 야생 물새에서 흔한 조류 인플루엔자 균주는 때때로 인간을 감염시킨다 ("조류 또는 조류 독감(*avian or bird flu*)," H5N1). 상기 조류 바이러스와 인간 인플루엔자 바이러스의 재편성시, 인간에서 인간으로의 전파를 가능하게 하는 변종이 생성될 수 있는 바, 전 세계적 유행병을 일으킬 잠재성이 있다.

[0020] 위험도가 더 낮은 저위험군의 개체의 요법은 주로 증상 치료 (발열) 및 격리에 중점을 둔다. 의심되거나, 또는 확인된 인플루엔자 바이러스 감염과 연관된 중증 또는 진행성 임상 질환을 앓고 있는 환자는 항바이러스 약물 (예컨대, 오셀타미비르 또는 다른 뉴라미니다제 억제제) 및 지지 요법 (예컨대, 항염증성 약물)으로 치료된다. 고위험군 (노인, 임산부, 면역손상자, 연관 만성 질환)은 예방 차원에서 매년 계절 독감 백신을 맞아야 한다.

[0021] 프탈라진 유도체인 아젤라스틴(Azelastine)은 알레르기성 비염 및 혈관운동성 비염 치료용 비내용 스프레이로서 및 알레르기성 결막염 치료용 점안액으로 사용할 수 있는 항히스타민제이다. 이는 거울상이성질체 사이에 약리학적 활성에 현저한 차이는 없지만, 라세미 혼합물이며, 1996년에 처음으로 FDA 승인을 받았다.

[0022] 문헌 [Gysi et al. ("Network Medicine Framework for Identifying Drug Repurposing Opportunities for COVID-19", arXiv:2004.07229 [q-bio.MN] dated 15.04.2020)]에는 특정 약물 후보물질들 중 아젤라스틴의 경우, 항히스타민제가 질환의 원인이 되는 바이러스에 직접적인 영향을 미칠지 여부에 대한 어떤 징후도 없이, COVID-19 환자에 대한 특정 약물 후보물질의 가능한 효능에 기초하여 상기 약물 후보물질에 도달하기 위한 COVID-19에 대한 네트워크 기반 틀 세트가 개시되어 있다.

[0023] 문헌 [Hasanain Abdulhameed Odhar et al. (Bioinformatics 2020, 16(3):236-244)]에는 2019년 신종 코로나바이러스의 주요 프로테아제를 사용한 FDA 승인을 받은 약물의 분자 도킹 및 역학 시뮬레이션이 기술되어 있다. 약물은 2019-nCoV의 주요 프로테아제 결정에 대한 이의 최소 결합 활성에 따라 순위화되었고, 여기서, 아젤라스

틴 순위는 코니밧탄(Conivaptan)보다 덜 바람직한 낮은 순위였다.

- [0024] 문헌 [Xia Xiao et al. (bioRxiv July 6, 2020, DOI:10.1101/2020.07.06.188953)]에는 OC43에 대한 일련의 화합물의 항바이러스 활성과, 그들 중 아젤라스틴이 항히스타민제로서 기술되어 있다.
- [0025] 문헌 [Fu et al. (Cell Prolif. 2014, 47:326-335)]에는 B형 간염 바이러스 (HBV) 요법에서 나트륨 타우로콜레이트 공동 수송 폴리펩티드 (NTCP)를 표적화하는 아젤라스틴 히드로클로라이드가 개시되어 있다. NTCP는 HBV가 간세포로 진입하는 데 중요한 역할을 하는 담즙산의 수송을 매개하는, 인간 간세포에서 고도로 발현되는 막관통 단백질이다.
- [0026] 문헌 [M. W. Simon (Pediatric Asthma, Allergy & Immunology, 2003, Vol.16:275-282)]에는 아젤라스틴이 인간 리노바이러스, 콕사키 A형 바이러스, 아데노바이러스 5형, 인간 파라인플루엔자 바이러스 2형 및 3형, 및 호흡기 세포융합 바이러스 점막 부착 뿐만 아니라, 면역 이펙터 세포 동원에 중요한 역할을 하는 세포내 유착 분자-1(ICAM-1) 수용체의 발현을 하향조절하는 강력하고, 선택적인 2세대 히스타민 H<sub>1</sub> 수용체 길항제로서 기술되어 있다.

**발명의 내용**

- [0027] 본 발명의 요약
- [0028] 본 발명의 목적은 특히 바이러스에 노출되었거나, 또는 바이러스에 감염되었거나, 또는 감염될 위험이 있는 대상체(subject)에서 바이러스 감염 및/또는 바이러스 확산을 예방하는 데 사용될 수 있는 새로운 항바이러스 치료(antiviral treatment), 의약품 및 제약품을 제공하는 것이다. 본 목적은 본원에 추가로 기술된 바와 같이 본 청구범위의 주제에 의해 해결된다.
- [0029] 본 발명은 항바이러스 치료를 필요로 하는 대상체의 예방적 또는 치료학적 치료(therapeutic treatment)에 사용하기 위한 제약 제제에서 항바이러스 물질로서 사용하기 위한 항바이러스 유효량의 아젤라스틴 화합물을 제공한다.
- [0030] 구체적으로, 아젤라스틴 화합물은 아젤라스틴, 또는 이의 제약상 허용되는 염, 예컨대, 아젤라스틴 히드로클로라이드이다.
- [0031] 구체적인 측면에 따라, 제약 제제는 의약품 또는 약물 제품이다. 구체적으로, 제약 제제는 아젤라스틴 화합물 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다.
- [0032] 구체적으로, 대상체는 호흡기 바이러스, 예컨대, 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 아데노바이러스, 코로나바이러스, 또는 상기도 바이러스, 예컨대, 리노바이러스를 표적화하는 항바이러스 치료를 필요로 하는 대상체이다.
- [0033] 본원에서 호흡기 바이러스는 구체적으로 호흡기 질환을 유발하는 바이러스인 것으로 이해된다. 본원에 추가로 기술된 표적 바이러스 중 일부는 호흡기 질환을 유발할 뿐만 아니라, 다른 신체 부위도 이환시킬 수 있지만, 상기 바이러스는 본원에서 여전히 "호흡기 바이러스"로 이해된다. 구체적으로, 항바이러스 치료는 하나 이상의 인간 바이러스, 특히, 예컨대, 코로나비리다에 과, 아데노비리다에 과, 파라믹소비리다에(*Paramyxoviridae*) 과 또는 오르토믹소비리다에(*Orthomyxoviridae*) 과의 바이러스로부터 선택되는 인간 호흡기 바이러스를 표적화한다.
- [0034] 구체적으로, 하기 중 하나 이상의 것에 의해 유발되거나, 또는 이에 의한 감염과 연관이 있는 질환 병태(disease condition)가 치료된다:
- [0035] a) 코로나비리다에 바이러스, 바람직하게, β-코로나바이러스, 예컨대, SARS-CoV-2, MERS-CoV, SARS-CoV-1, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, 및 α-코로나바이러스, 예컨대, HCoV-NL63, HCoV-229E 또는 PEDV (상기 중 임의의 것의 자연 발생 변종(naturally-occurring variant) 또는 돌연변이체 포함)로 구성된 군으로부터 선택되는 것, 또는
- [0036] b) 아데노비리다에, 바람직하게, 인간 아데노바이러스, 예컨대, HAdVB, HAdVC, 또는 HAdVD;
- [0037] c) 인간 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV), 예컨대, RSV 서브타입 A 또는 B; 또는
- [0038] d) 인플루엔자 바이러스, 예컨대, 인간 인플루엔자 바이러스, 바람직하게, 인플루엔자 바이러스 A (IVA), 예컨대, H1N1, H3N3, 또는 H5N1, 또는 인플루엔자 바이러스 B (IVB), 또는 인플루엔자 바이러스 C (IVC), 또는 인플루엔자 바이러스 D (IVD).

- [0039] 구체적으로, 하나 이상의 코로나비리다에 바이러스, 특히, 하나 이상의 상이한 코로나비리다에 바이러스에 의해 유발되거나, 또는 이에 의한 감염과 연관이 있는 질환 병태가 치료된다.
- [0040] 구체적인 측면에 따라, 상기 코로나비리다에 바이러스는 바람직하게,  $\beta$ -코로나바이러스, 예컨대, SARS-CoV-2, MERS-CoV, SARS-CoV-1, HCoV-OC43, 또는 HCoV-HKU1, 또는  $\alpha$ -코로나바이러스, 예컨대, 인간 코로나바이러스 NL63 (HCoV-NL63, 뉴헤이븐 코로나바이러스), HCoV-229E 또는 돼지 유행성 설사 바이러스 (PEDV) (상기 중 임의의 것의 자연 발생 변종 또는 돌연변이체 포함)로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0041] 구체적으로, 본원에서 언급되는 상기 하나 이상의 상이한 코로나비리다에 바이러스는 자연 발생 SARS-CoV-2 변종 또는 돌연변이체, 특히, 스파이크 단백질 (SARS-CoV-2 S-단백질)의 하나 이상의 돌연변이, 예컨대, 하기 돌연변이: K417N, L452R, N501Y, D614G, P681H, P681R, E484K, E484Q, 또는 69/70 결실 중 임의의 하나 이상의 것을 포함하는 것이다.
- [0042] 구체적으로, 스파이크 단백질은 서열 번호: 4로 확인되는 아미노산 서열 (도 5에 제공된 서열, NCBI 수탁 번호 Q1157161.1, SARS-CoV-2, S-단백질)을 포함하거나, 또는 이로 구성된다.
- [0043] 바람직하게, 상기 하나 이상의 상이한 코로나비리다에 바이러스는 UK (B1.1.7) 변종, 남아프리카 (B.1.351) 변종, 브라질 (P.1) 변종, 인도 (B.1.617) 변종 및 벵골 (B.1.618) 변종으로 구성된 군으로부터 선택되는 자연 발생 SARS-CoV-2 변종 또는 돌연변이체이다.
- [0044] 본원에 기술된 제제, 방법 및 용도는 구체적으로 항바이러스 유효량의 아젤라스틴 화합물을 포함하는 것이다. 상기 항바이러스 유효량은 한 특이적 바이러스 또는 1 초과의 상이한 바이러스, 바이러스 돌연변이체 또는 바이러스 변종, 예컨대, 본원에 추가로 기술되는 것을 표적화할 수 있다.
- [0045] 항바이러스 효과의 표적 바이러스는 특히 본원에 기술된 치료, 특히, 상기 표적 바이러스에 의해 유발되거나, 또는 다르게는 연관되는 질환 병태 또는 질환의 예방 또는 요법을 위한 치료를 위한 적응증과 (직접 또는 간접적으로) 관련된 바이러스로 이해된다.
- [0046] 구체적으로, 본원에 기술된 제제, 방법 및 용도의 표적, 및 특히, 본원에 기술된 항바이러스 효과의 표적은 임의의 하나 이상의 상이한 바이러스 중, 바이러스 돌연변이체 또는 바이러스 변종, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 상이한 바이러스 중, 돌연변이체 또는 변종일 수 있다.
- [0047] 구체적으로, 표적은 임의의 2개 이상의 바이러스, 예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 상이한 바이러스 중, 바이러스 돌연변이체 또는 바이러스 변종일 수 있고, 여기서, 상기 바이러스 중 적어도 2, 3, 또는 4개는 상이한 바이러스 과, 예컨대,
- [0048] a) 코로나비리다에 과 ( $\beta$ -코로나바이러스, 예컨대, SARS-CoV-2, MERS-CoV, SARS-CoV-1, HCoV-OC43, HCoV-HKU1; 또는  $\alpha$ -코로나바이러스, 예컨대, HCoV-NL63, HCoV-229E 또는 PEDV; 상기 중 임의의 것의 자연 발생 변종 또는 돌연변이체 포함);
- [0049] b) 아데노비리다에 과 (예컨대, 아데노바이러스 또는 인간 아데노바이러스, 예컨대, HAdVB, HAdVC, 또는 HAdVD);
- [0050] c) 파라믹소비리다에 과 (예컨대, RSV 또는 인간 RSV, 예컨대, hRSV 서브타입 A 또는 B); 또는
- [0051] d) 오르토믹소비리다에 과 (예컨대, 인플루엔자 바이러스 또는 인간 인플루엔자 바이러스, 바람직하게, 인플루엔자 바이러스 A (IVA), 예컨대, H1N1, H3N3, 또는 H5N1, 또는 인플루엔자 바이러스 B (IVB), 또는 인플루엔자 바이러스 C (IVC), 또는 인플루엔자 바이러스 D (IVD))로부터 선택되는 것이다.
- [0052] 구체적으로, 상기 a) 내지 d)에 열거된 상기 바이러스는 본원에서 예시적인 "호흡기 바이러스"로서 언급된다.
- [0053] 구체적인 예에 따라, 표적은 a)로부터 선택되는 적어도 하나의 바이러스 및 b), c), 또는 d)로부터 선택되는 적어도 하나의 바이러스일 수 있다. 구체적으로, 표적은 적어도 하나의  $\beta$ -코로나바이러스, 예컨대, SARS 바이러스, 특히, SARS-CoV-2, 및 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스일 수 있다.
- [0054] 구체적으로, 표적은 적어도 하나의  $\beta$ -코로나바이러스, 예컨대, SARS 바이러스, 특히, SARS-CoV-2, 및 적어도 하나의 아데노바이러스 HAdVB, HAdVC, 또는 HAdVD일 수 있다.
- [0055] 구체적으로, 표적은 적어도 하나의  $\beta$ -코로나바이러스, 예컨대, SARS 바이러스, 특히, SARS-CoV-2, 및 적어도 하나의 hRSV 서브타입 A 또는 B일 수 있다.

- [0056] 구체적인 예에 따라, 표적은 d)로부터 선택되는 적어도 하나의 바이러스, 및 a), b), 또는 c)로부터 선택되는 적어도 하나의 바이러스일 수 있다.
- [0057] 구체적으로, 표적은 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스 또는 인간 인플루엔자 바이러스, 및 적어도 하나의 아데노바이러스 HAdVB, HAdVC, 또는 HAdVD일 수 있다.
- [0058] 구체적으로, 표적은 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스 또는 인간 인플루엔자 바이러스, 및 적어도 하나의 hRSV 서브타입 A 또는 B일 수 있다.
- [0059] 구체적인 예에 따라, 표적은 b)로부터 선택되는 적어도 하나의 바이러스, 및 a), c), 또는 d)로부터 선택되는 적어도 하나의 바이러스일 수 있다.
- [0060] 구체적으로, 표적은 적어도 하나의 아데노바이러스 HAdVB, HAdVC, 또는 HAdVD, 및 적어도 하나의 hRSV 서브타입 A 또는 B일 수 있다.
- [0061] 구체적인 예에 따라, 표적은 a)로부터 선택되는 적어도 하나의 바이러스, 및 b)로부터 선택되는 적어도 하나의 바이러스, 및 임의로 c), 또는 d)로부터 선택되는 적어도 하나의 바이러스일 수 있다. 구체적으로, 표적은 적어도 하나의  $\beta$ -코로나바이러스, 예컨대, SARS 바이러스, 특히, SARS-CoV-2, 및 적어도 하나의 인플루엔자 바이러스, 및 임의로 적어도 하나의 한 아데노바이러스 HAdVB, HAdVC, 또는 HAdVD, 및/또는 적어도 하나의 hRSV 서브타입 A 또는 B일 수 있다.
- [0062] 본 발명은 추가로 바람직하게,  $\beta$ -코로나바이러스, 예컨대, SARS-CoV-2, MERS-CoV, SARS-CoV-1, HCoV-OC43, 또는 HCoV-HKU1, 또는  $\alpha$ -코로나바이러스, 예컨대, HCoV-NL63, HCoV-229E 또는 PEDV (상기 중 임의의 것의 자연 발생 변종 또는 돌연변이체, 예를 들어, 본원에서 언급된 자연 발생 SARS-CoV-2 변종 또는 돌연변이체 중 임의의 하나 이상의 것, 바람직하게, UK (B.1.1.7) 변종, SA (B.1.351) 변종, 브라질 (P.1) 변종, 인도 (B.1.617) 변종 및 벵골 (B.1.618) 변종으로 구성된 군으로부터 선택되는 것 포함)로 구성된 군으로부터 선택되는 코로나비리다에 바이러스인 하나 이상의 상이한 바이러스에 의해 유발되거나, 또는 이에 의한 감염과 연관된 질환 병태의 예방적 또는 치료학적 치료에 사용하기 위한 제약 제제에서 항바이러스 물질로서 사용하기 위한 항바이러스 유효량의 (본원에서 추가로 기술되는 바와 같은) 아젤라스틴 화합물을 제공한다.
- [0063] 구체적으로, 본원에 기술된 표적 바이러스, 또는 호흡기 바이러스와 연관이 있거나, 또는 이에 의해 유발되는 질환 병태로서, 특히, 여기서, 표적 바이러스가 코로나비리다에 과, 아데노비리다에 과, 파라믹소비리다에 과, 또는 오르토믹소비리다에 과의 바이러스인 질환 병태는 감기, 코 감염, 부비동염(sinusitis), 인후 및 후두 (throat and larynx), 세기관지염(bronchiolitis), 설사(diarrhea), 피부 발진(rash on skin), 또는 폐렴 (pneumonia), 급성 호흡 곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome: ARDS)이다. 구체적으로, 질환 병태는 하기 중 임의의 하나 이상의 것과 연관된 증상일 수 있다. 구체적으로, 치료하고자 하는 증상은 기침, 인후통, 콧물, 재채기, 두통 및 발열 중 임의의 것일 수 있다.
- [0064] 구체적인 측면에 따라, 항바이러스 유효량은 바이러스에 의한 감수성 세포(susceptible cell)의 감염을 예방함으로써, 질환 병태를 치료하는 데 효과적이다. 구체적으로, 감수성 세포는 생물학적 표면 또는 대상체 내에, 또는 이에 존재한다.
- [0065] 구체적인 측면에 따라, 항바이러스 유효량은 0.1 - 500  $\mu\text{g}$ /용량, 바람직하게, 100, 90, 80, 70, 50, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1 또는 1  $\mu\text{g}$ /용량 중 어느 하나의 값 미만인 양이다. 구체적으로, 용량 수는 1일 최대 1 내지 10이다.
- [0066] 구체적인 측면에 따라, 항바이러스 유효량은 용량당 15  $\mu\text{g}$  - 150  $\mu\text{g}$ , 바람직하게, 100  $\mu\text{g}$  미만, 또는 50  $\mu\text{g}$ 이다.
- [0067] 구체적으로, 항바이러스 유효량은 훨씬 더 적은 양, 15  $\mu\text{g}$  - 150  $\mu\text{g}$  범위의 양의 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 또는 0.1% 중 어느 하나보다 적은 양일 수 있다. 상기 더 적은 양은 특히 코로나바이러스 (또는 코로나비리다에 과의 바이러스), 및/또는 코로나바이러스 이외의 다른 바이러스 (또는 코로나비리다에 과의 바이러스 이외의 다른 바이러스), 예컨대, 아데노비리다에 과, 파라믹소비리다에 과, 또는 오르토믹소비리다에 과의 바이러스인 경우에 효과적인 것으로 입증되었다.
- [0068] 예를 들어, 본원에 기술된 표적 바이러스 중 임의의 것을 표적화하는 항바이러스 효과는 0.1%, 즉, 2.39 mM 및 5x 감소된 (0.02%, 즉, 478  $\mu\text{M}$ ) 용량의 시판용 아젤라스틴 비강용 스프레이 제제 사용시 고도로 효과적이고,

이로써, 인간에서 바이러스 로드를 감소시키는 것으로 입증되었다.

- [0069] 예를 들어, 항인플루엔자 바이러스 효과는 시판용 아젤라스틴 제제 (0.1%, 2.39 mM)의 5x 희석 (0.02%, 즉, 478  $\mu$ M) 및 10x 희석 (0.01%, 즉, 239  $\mu$ M)시 고도로 효과적인 것으로 입증되었다.
- [0070] 예를 들어, 항RSV 효과는 시험관내에서 0.4-6.4  $\mu$ M에서 고도로 효과적인 것으로 입증되었다.
- [0071] 구체적인 측면에 따라, 상기 제약 제제는 국부 투여를 위해, 예컨대, 국소 또는 국소 점막 투여를 위해, 바람직하게, 상기도 및 하기도, 비강, 폐, 구강내, 안구, 또는 진피용으로 적용하기 위해, 또는 전신 투여를 위해, 바람직하게, 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 경피, 또는 경구 투여에 의한 전신 투여를 위해 제제화된다. 전형적으로, 비경구 투여를 위한, 정맥내 또는 경구 투여가 선호된다.
- [0072] 구체적인 측면에 따라, 상기 제약 제제는 스프레이, 예컨대, 코 스프레이, 산제, 예컨대, 인스턴트 산제 또는 흡입용 산제로서, 또는 예를 들어, 예컨대, 아젤라스틴 화합물이 함침된 표면 또는 직물을 포함하는 흡입용 의료 장치에 의해, 젤, 연고, 크림, 폼(foam), 또는 액상 액제, 로션, 가글액(gargle solution), 에어로졸화된 산제(aerosolized powder), 에어로졸화된 액상 제제, 과립제, 캡슐, 점적제(drop), 정제, 시럽, 로젠지(lozenge), 점안제(eye drop), 또는 주입 또는 주사용 제제에 의해 대상체에게 투여된다.
- [0073] 구체적으로, 예컨대, 수의학용 및 인간용과 같은 항바이러스 제제 및 투여 형태를 제공한다. 구체적으로, 제제는 예컨대, 산제 또는 과립제로서; 수성 또는 비수성 액체 중 액제 또는 현탁제로서; 또는 수중유 액상 에멀전 또는 유중수 액상 에멀전으로서 미리 결정된 양의 아젤라스틴 화합물을 활성 성분으로서 포함한다.
- [0074] 구체적인 측면에 따라, 아젤라스틴 화합물은 약 0.01-2  $\mu$ g/mL, 또는 최대, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 또는 0.1  $\mu$ g/mL 중 어느 하나인, 혈액 또는 혈장 중 피크 농도 (또는 최대 농도)를 제공하는 항바이러스 유효량으로 사용된다.
- [0075] 구체적인 측면에 따라, 아젤라스틴 화합물은 제제 중 1  $\mu$ M-10 mM, 바람직하게, 최대 1 mM, 100  $\mu$ M, 90  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 70  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 또는 50  $\mu$ M 중 어느 하나인 농도로 사용된다. 구체적인 실시양태에 따라, 농도는 3-50  $\mu$ M이다.
- [0076] 구체적으로, 액상 액제 또는 분산제는 예컨대, 점비제 또는 비강용 스프레이에 의해 비강 투여를 위해 사용되고, 바람직하게, 여기서, 항바이러스 유효량은 콧구멍(nostril)당 1-1000  $\mu$ g, 바람직하게, 콧구멍당 1-500  $\mu$ g, 또는 콧구멍당 최대 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110  $\mu$ g 중 어느 하나, 더욱 바람직하게, 최대 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 또는 1  $\mu$ g이다.
- [0077] 구체적으로, 용량은 용량당 약 2-2000  $\mu$ g, 바람직하게, 용량당 2-1000  $\mu$ g, 또는 용량당 최대 400, 380, 360, 340, 320, 300, 280, 260, 240, 220  $\mu$ g 중 어느 하나, 더욱 바람직하게, 최대 200, 180, 160, 140, 120, 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5, 4, 3, 또는 2  $\mu$ g인 용량은 비강 투여에 의해 투여될 수 있다.
- [0078] 제제는 바람직하게, 비강용 스프레이, 비강용 점적제, 에어로졸, 예컨대, 에어로졸화된 액제 또는 산제로서, 예컨대, 인후 스프레이로서, 또는 폐내 투여를 위해, 또는 점안제로서 적용된다.
- [0079] 예시적인 제제는 활성 성분으로서 아젤라스틴 화합물을 예를 들어, 0.001 내지 2% (w/w), 예컨대, 약 0.001% (w/w), 0.002% (w/w), 0.003% (w/w), 0.004% (w/w), 0.005% (w/w), 0.006% (w/w), 0.007% (w/w), 0.008% (w/w), 0.009% (w/w), 0.01% (w/w), 0.02% (w/w), 0.05% (w/w), 0.1% (w/w), 0.15% (w/w), 0.2% (w/w), 0.3% (w/w), 0.4% (w/w), 0.5% (w/w), 0.6% (w/w), 0.7% (w/w), 0.8% (w/w), 0.9% (w/w), 1.1% (w/w), 1.2% (w/w), 1.3% (w/w), 1.4% (w/w), 1.5% (w/w), 1.6% (w/w), 1.7% (w/w), 1.8% (w/w), 1.9% (w/w), 또는 2.0% (w/w)인 양으로 함유할 수 있다.
- [0080] 구체적으로, 용량당 100 - 1000  $\mu$ l인 부피, 예컨대, 최대 500  $\mu$ l의 스프레이 부피로 분무가능한 제제 중에 적용될 수 있다. 구체적인 예에 따라, 비강용 스프레이는 스프레이당 약 100-150  $\mu$ l 부피를 전달할 수 있다. 전형적으로, 1일 1 또는 2회에 걸쳐 콧구멍당 2개의 스프레이가 적용된다.
- [0081] 스프레이 사용시, 바람직하게는 퍼프당 특정 스프레이 부피 또는 용량을 투여하기 위해 정량식 스프레이가 사용된다.
- [0082] 폐내 투여용으로 적합한 제제는 폐포낭에 도달하도록 콧구멍을 통한 흡입에 의해, 또는 구강을 통한 흡입에 의해 투여될 수 있는 0.1 내지 500  $\mu$ m 범위의 입자 크기를 가질 수 있다. 적합한 제제는 아젤라스틴 화합물 수용액 또는 오일성 용액을 포함한다. 에어로졸 또는 건조 산제 투여용으로 적합한 제제는 통상의 방법에 따라 제조

될 수 있고, 다른 치료제, 예컨대, 폐 염증 또는 폐 질환의 치료 또는 예방에서 사용되는 화합물과 함께 전달될 수 있다.

- [0083] 구체적으로, 액상 액체 또는 분산제는 예컨대, 주입 또는 주사에 의한 비경구 투여를 위해 사용되고, 바람직하게, 여기서, 항바이러스 유효량은 약 1-500 mg의 용량을 제공한다.
- [0084] 구체적으로, 약 1-500 mg의 단일 로딩 용량이 비경구적으로 투여된 후, 약 10 - 200 mg, 또는 약 100 mg, 또는 약 200 mg의 유지 용량이 예컨대, 1-10일 동안 매일 투여에 의해, 또는 특정 임상 반응이 달성될 때까지 투여될 수 있다.
- [0085] 구체적으로, 경구 투여를 위해 정제, 젤 또는 로젠지가 사용되고, 바람직하게, 여기서, 항바이러스 유효량은 용량당 1  $\mu\text{g}$ - 12 mg, 바람직하게, 용량당 최대 5, 4, 3, 2, 또는 1 mg 중 어느 한; 또는 용량당 최대 100  $\mu\text{g}$ 이다.
- [0086] 구체적으로, 1일 1회 내지 3회 투여될 수 있는, 아젤라스틴 화합물을 포함하는 정제가 사용될 수 있다.
- [0087] 구강내 국소 투여용으로 적합한 제제는 가향 베이스, 예컨대, 수크로스, 아카시아 또는 트라가칸트 중 활성 성분을 포함하는 로젠지, 불활성 베이스, 예컨대, 젤라틴 및 글리세린, 수크로스, 또는 아카시아를 포함하는 페스틸, 또는 적합한 액체 담체 중 아젤라스틴 화합물을 포함하는 구강세정제를 포함한다.
- [0088] 국소 적용되는 젤 또는 연고로 제제화될 때, 활성 성분은 파라핀계 또는 수혼화성 연고 베이스와 함께 사용될 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 수중유 크림 베이스 중에서 제제화될 수 있다.
- [0089] 안구로의 국소 투여에 적합한 제제는 점안제, 젤, 또는 크림을 포함할 수 있고, 여기서, 아젤라스틴 화합물은 적합한 담체, 특히, 수성 용매 또는 오일/물 에멀전 중에 용해 또는 현탁된다.
- [0090] 구체적인 예에 따라, 구강내 국소 투여용의 상기 제제, 또는 국소 적용되는 제제, 예컨대, 젤 또는 연고는 예를 들어, 0.001% (w/w), 0.002% (w/w), 0.003% (w/w), 0.004% (w/w), 0.005% (w/w), 0.006% (w/w), 0.007% (w/w), 0.008% (w/w), 0.009% (w/w), 0.01% (w/w), 0.02% (w/w), 0.05% (w/w), 0.1% (w/w), 0.15% (w/w), 0.2% (w/w), 0.3% (w/w), 0.4% (w/w), 0.5% (w/w), 0.6% (w/w), 0.7% (w/w), 0.8% (w/w), 0.9% (w/w), 1.0% (w/w), 2% (w/w), 3% (w/w), 4% (w/w), 5% (w/w), 6% (w/w), 7% (w/w), 8% (w/w), 9% (w/w), 10% (w/w), 11% (w/w), 12% (w/w), 13% (w/w), 14% (w/w), 15% (w/w), 16% (w/w), 17% (w/w), 18% (w/w), 9, 또는 20% (w/w) 의 농도로 아젤라스틴 화합물을 포함할 수 있다.
- [0091] 구체적인 측면에 따라, 아젤라스틴 화합물을 이용하는 치료는 또 다른 투여 형태로 (동일하거나, 또는 상이한 화합물일 수 있는) 아젤라스틴 화합물을 투여하는 추가 치료와 조합될 수 있다. 예를 들어, 아젤라스틴 히드로클로라이드를 포함하는 비내 또는 인후 스프레이를 이용하는 치료는 (아젤라스틴 히드로클로라이드일 수 있거나, 또는 아젤라스틴 히드로클로라이드와 상이할 수 있는) 아젤라스틴 화합물을 포함하는 정제와 조합될 수 있다.
- [0092] 구체적인 측면에 따라, 아젤라스틴 화합물은 단일 항바이러스 물질로서 투여되거나, 또는 치료는 하나 이상의 상이한 제제 및/또는 하나 이상의 상이한 투여 경로에 의해 예컨대, 하나 이상의 항바이러스 물질 또는 작용제, 및/또는 하나 이상의 항염증제 및/또는 항생제 물질 또는 작용제의 투여를 포함하는 예컨대, 추가의 항바이러스 제, 항염증제 및/또는 항생제 치료와 같은 추가 치료와 조합된다.
- [0093] 구체적으로, 아젤라스틴 화합물은 대상체에게로의 동시, 공동 투여 또는 순차적 투여를 위해 단위 투여 형태로 하나 이상의 추가의 활성 치료제와 조합될 수 있다. 조합 요법은 예컨대, 동시, 병렬, 또는 순차적 요법으로서 투여될 수 있다. 순차적으로 투여될 때, 조합은 둘 이상의 투여로 투여될 수 있다.
- [0094] 구체적인 측면에 따라, 상기 바이러스로 감염되었거나, 또는 이로 감염될 위험이 있는 대상체, 바람직하게, 인간, 또는 비인간 포유동물, 예컨대, 개, 고양이, 말, 낙타, 소 또는 돼지가 치료된다.
- [0095] 구체적으로, 대상체는 바이러스에 노출되거나, 또는 노출된 적이 있거나, 또는 다르게는 바이러스로 감염될 위험이 있는 대상체이다.
- [0096] 구체적으로, 대상체는 면역계가 약화되고, 바이러스 질환 발생 위험이 더 높거나, 또는 바이러스 질환의 중증도가 증가된 대상체이다.
- [0097] 구체적으로, 대상체는 바이러스로 감염된 것으로 결정되거나, 또는 진단받은 대상체이다.

- [0098] 구체적인 실시양태에서, 병원체와의 접촉시, 코로나비리다에 바이러스 유발 질환, 예컨대, SARS 바이러스 유발 질환, 예컨대, COVID19, 또는 COVID19 연관 폐렴을 앓는 이환된 대상체 또는 환자인 대상체가 치료된다.
- [0099] 추가의 구체적인 실시양태에서, 인플루엔자 바이러스 유발 질환, 예컨대, 인플루엔자를 앓는 이환된 대상체 또는 환자인 대상체가 치료된다.
- [0100] 본 발명은 추가로 바이러스 감염 및/또는 바이러스 확산을 예방하기 위해 생물학적 표면을 처리하기 위한 의약품에서 항바이러스 물질로서 본원에 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물을 제공한다.
- [0101] 구체적인 측면에 따라, 상기 의약품은 국소용으로, 바람직하게, 상기도 및 하기도, 비강, 폐, 구강내, 안구, 또는 진피용으로 적용하기 위한 것으로 제제화된다.
- [0102] 국소 적용은 전형적으로 피부, 상처 및/또는 점막 세포 또는 조직 (예컨대, 폐포, 협측, 설측, 저작 기관 또는 비강 점막 등)의 표면을 지칭한다.
- [0103] 구체적인 측면에 따라, 상기 의약품은 국소 투여, 특히, 점막 투여를 위해 사용되는 제제, 예컨대, 스프레이, 액제, 분산제, 건조 산제, 또는 에어로졸화된 액제 또는 산제로 사용된다.
- [0104] 구체적인 측면에 따라, 아젤라스틴 화합물은 항바이러스 유효량으로 생물학적 표면에 적용되고, 바람직하게, 여기서, 상기 양은 1 ng -1000 ng/cm<sup>2</sup>, 바람직하게, 10 - 800 ng/cm<sup>2</sup>, 또는 최대 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50 ng/cm<sup>2</sup> 중 어느 하나이다.
- [0105] 본원에 기술된 바와 같은 국소 치료를 위해 적합하게 사용되는 의약품 중 임의의 것이 생물학적 표면을 처리하는 데 사용될 수 있다.
- [0106] 구체적인 측면에 따라, 생물학적 표면은 상기 바이러스로 감염되거나, 또는 이로 위협될 위험이 있는 점막 표면을 포함하거나, 또는 이로 구성된다.
- [0107] 본 발명은 추가로 특히, 생물학적 표면, 또는 비생물학적 표면, 예컨대, 위생 장치 안면 마스크 등을 처리하는 데 적합한 바이러스 소독제(viral disinfectant)로서의 본원에 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물의 용도를 제공한다. 구체적으로, 소독제를 사용하여 생물 또는 비생물 표면을 처리할 수 있다.
- [0108] 구체적으로, 바이러스 소독제는 항바이러스 제제, 예컨대, 의약품이다.
- [0109] 구체적인 측면에 따라, 본 발명은 인간 또는 비인간 포유동물에서 코로나비리다에 바이러스 감염, 특히, SARS 바이러스 감염을 예방 또는 치료하는 데 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물을 제공한다.
- [0110] 구체적인 측면에 따라, 본 발명은 인간 또는 비인간 포유동물에서 코로나비리다에 바이러스 감염, 특히, SARS 바이러스 감염을 예방 또는 치료하는 데 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물을 제공한다.
- [0111] 구체적인 측면에 따라, 본 발명은 인간에서 아데비리다에 바이러스 감염, 특히, HAdVB, HAdVC, 또는 HAdVD 바이러스 감염을 예방 또는 치료하는 데 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물을 제공한다.
- [0112] 구체적인 측면에 따라, 본 발명은 인간에서 파라믹소비리다에 바이러스 감염, 특히, 인간 RSV 바이러스 감염을 예방 또는 치료하는 데 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물을 제공한다.
- [0113] 구체적인 측면에 따라, 본 발명은 인간 또는 비인간 포유동물에서 오르토믹소비리다에 바이러스 감염, 특히, 인플루엔자 바이러스 감염을 예방 또는 치료하는 데 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물을 제공한다.
- [0114] 구체적인 측면에 따라, 본원에 추가로 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물의 하나 이상의 개별 투여 단위, 및 인간 또는 비인간 포유동물에서 코로나비리다에 바이러스 감염 또는 코로나비리다에 바이러스 유발 질환을 치료하는 데 이를 사용하기 위한 사용 설명서를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0115] 또 다른 구체적인 측면에 따라, 본원에 추가로 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물의 하나 이상의 개별 투여 단위, 및 인간에서 아데노비리다에 바이러스 감염, 특히, HAdVB, HAdVC, 또는 HAdVD 바이러스 감염을 치료하는 데 이를 사용하기 위한 사용 설명서를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0116] 또 다른 구체적인 측면에 따라, 본원에 추가로 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물의 하나 이상의 개별 투여

단위, 및 인간에서 파라믹소비리다에 바이러스 감염, 특히, 인간 RSV 바이러스 감염을 치료하는 데 이를 사용하기 위한 사용 설명서를 포함하는 키트를 제공한다.

- [0117] 또 다른 구체적인 측면에 따라, 본원에 추가로 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물의 하나 이상의 개별 투여 단위, 및 인간 또는 비인간 포유동물에서 오르토믹소비리다에 바이러스 감염, 특히, 인플루엔자 바이러스 감염을 치료하는 데 이를 사용하기 위한 사용 설명서를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0118] 구체적인 측면에 따라, 본 발명은 본원에 추가로 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 항바이러스 제약 제제를 제공한다.
- [0119] 구체적으로, 의학적 용도의, 특히, 예컨대, COVID19와 같이 코로나비리다에 바이러스에 의해 유발된 질환 병태의 예방적 또는 치료학적 치료에서 사용하기 위한 제약 제제를 제공한다.
- [0120] 구체적으로, 의학적 용도의, 특히, 코로나비리다에 바이러스 및/또는 아데노비리다에 바이러스 및/또는 파라믹소비리다에 바이러스 및/또는 오르토믹소비리다에 바이러스에 의해 유발된 질환 병태의 예방적 또는 치료학적 치료에서 사용하기 위한 제약 제제를 제공한다.
- [0121] 구체적인 측면에 따라, 본 발명은 추가로 항바이러스 유효량의 아젤라스틴 화합물, 및 본원에 추가로 기술된 바와 같은 각각의 의약품 또는 제약 제제를 투여하는 단계를 포함하는, 하나 이상의 상이한 바이러스, 코로나비리다에 바이러스 및/또는 아데노비리다에 바이러스 및/또는 파라믹소비리다에 바이러스 및/또는 오르토믹소비리다에 바이러스 중 하나 이상의 것으로 감염되었거나, 또는 이로 감염될 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0122] 추가의 구체적인 측면에 따라, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물의 항바이러스 제제 (예컨대, 의약품, 제약 제제 또는 소독제), 및 제약상 허용되는 담체와 함께 항바이러스 유효량의 아젤라스틴 화합물을 제제화하여 항바이러스 제제, 특히, 의약품 또는 제약 제제를 제조하는 단계를 포함하는, 상기 항바이러스 제제를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0123] 본원에 기술된 바와 같은 항바이러스 제제 중 임의의 것 (예컨대, 의약품, 제약 제제 또는 소독제)의 생물학적 표면으로의 국소 투여는 바람직하게, 예컨대, 10분 내지 24시간, 및/또는 최대 24, 18, 12, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1시간의 시간으로 특정 접촉시, 접촉으로 상기 표면 상의 바이러스는 적어도 0.5배 (절반만큼) 감소, 또는 1-로그, 2-로그, 3-로그, 4-로그, 5-로그 감소되도록 이루어진다.

**도면의 간단한 설명**

[0124] **도 1**은 매칭되는 경로 프로파일을 갖는 약물 동족체 확인 (a) 및 SARS-CoV-2 관련 경로 확인 (b)을 위한 섀넌 엔트로피(Shannon entropy) 접근법을 도시한 것을 보여주는 것이다. 잘 정의된 기전 및 작용 기전을 이용하여 히드록시클로로퀸, 및 SARS 억제제: SSAA09E2, 소분자 ACE2 억제제 및 SSAA09E3, 바이러스 숙주 막 융합의 일반 억제제에 대한 경로 프로파일을 계산하였다.

**도 2**는 위상차 현미경 사진을 기반으로 Vero E6 세포에 유발된 SARS-CoV-2의 세포변성 효과의 예방을 보여주는 것이다. **a**: 비감염된 (대조군) 배양물; **b**: SARS-CoV-2로 감염된 세포; **c-f**: 제어 완충제 (0.5% DMSO 함유)의 존재하의 SARS-CoV-2로 감염된 세포; **d-g**: 농도가 증가하는 아젤라스틴-HCl: 3.125, 6.25, 12.5 및 25  $\mu$ M의 존재하의 SARS-CoV-2로 감염된 세포. 세포를 30 min 동안 MOI 0.1로 SARS-CoV-2 바이러스로 감염시킨 후, 배양 배지를 제거하고, 바이러스가 없는 신선한 배양 배지 (단, 아젤라스틴 함유)로 교체하고, 감염 48시간 후에 현미경 사진을 촬영하였다.

**도 3**은 재구성된 인간 비강 조직 (뮤클리에어(MucilAir))에 대한 SARS-CoV-2의 세포변성 효과의 감소를 보여주는 것이다. 인간 비강 조직을 SARS-CoV-2로 감염시킨 후, 이어서, 3일 동안 매 24시간마다 20 min 동안 5배 희석된 0.1% 아젤라스틴-HCl 함유 비강용 스프레이 용액으로 처리하였다. 본 도면은 감염 후 48 및 72시간 후의 인간 비강 조직의 저해상도 현미경 이미지를 보여주는 것이다. (무손상 조직 기능의 징후로서) 뮤신 생산은 조직 상의 다크 스팟이 존재하는 것으로 입증된다.

**도 4** (생체외의 아젤라스틴에 의한 SARS-CoV-2 B.1.351 및 B.1.1.7 감염 억제)는 SARS-CoV-2 B.1.351 (a) 또는 B.1.1.7 (b)로의 Vero-TMPRSS2/ACE2 세포 감염을 억제하는 아젤라스틴의 효과를 보여주는 것이다. 세포를 30 min 동안 MOI 0.01로 SARS-CoV-2 바이러스로 감염시키고, 아젤라스틴을 감염 직전 (예방 세팅) 또는 감염 후 30 분째 (치료 세팅)에 감염된 세포에 첨가하였다. 감염 후 48 h째에 바이러스 카피수를 정량적 PCR에 의해 측정하

였다. 감염 억제는 바이러스 단독 웰 (아젤라스틴 처리를 하지 않음) 대비의 상대적인 바이러스 카피수로 표시되어 있다. 그래프는 9개 (a) 또는 6개 (b) 개별 값으로부터 계산된 평균 및 표준 편차를 보여준다. 감염의 50%를 억제하는 아젤라스틴 농도 (EC50)는 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 8.4.3을 사용하여 비선형 회귀 (로그(효능제) 대 정규화된 반응 - 가변 기울기)로 계산하였다.

**도 5:** 서열 번호: 4 (NCBI 수탁 번호 Q1157161.1, SARS-CoV-2, S-단백질).

**도 6:** MOI 0.01로 SARS-CoV-2에 의해 감염된 Calu-3 인간 세포에서 측정된 2개의 상이한 농도의 아젤라스틴의 항바이러스 효과 뿐만 아니라, 바이러스 감염이 없는 동일한 세포에서 측정된 동일한 농도의 화합물의 세포독성. 그래프는 한 대표적인 실험에서 삼중으로 반복한 것의 평균 결과를 보여준다.

**도 7:** 명시된 최종 농도 범위의 아젤라스틴-HCl 및 상응하는 희석된 비히클인 DMSO로 48h 동안 처리된 비감염된 Hep-2 세포의 생존능. 평균 및 SEM은 3회의 독립 실험으로부터 계산하였다. 통계상 유의적인 차이에 대한 임계값은  $P < 0.05$ 였다. \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

**도 8:** 명시된 최종 농도 범위의 아젤라스틴-HCl이 HEp-2 세포의 RSV 감염에 미치는 항바이러스 효과. 아젤라스틴-HCl을 바이러스 감염 이전 (a), 그와 동시에 (b), 또는 그 이후에 (c) 적용하고, 텍스트에 기술된 바와 같이 RSV 감염된 세포를 시각화하여 복제를 평가하였다. 아젤라스틴-HCl 스톱의 용매인 DMSO를 상응하게 희석하여 대조군으로 사용하였다. 실험은 중복하여 2회 반복하였다. 막대는 평균을 나타내며, 여기서, 평균의 표준 오차는 오차 막대로 표시된다.

**도 9** 인플루엔자 바이러스 H1N1 감염 후 24h째 재구성된 비강 조직의 정단부 세척으로부터 수득한 바이러스 카피수에 대한 2개의 상이한 농도의 아젤라스틴-HCl 뿐만 아니라, 오셀타미비르가 미치는 영향. 통계상 유의적인 차이는 별표로 표시되어 있다. 그래프는 한 대표적인 실험에서 삼중으로 반복한 것의 평균 결과를 보여준다. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

**도 10:** 인플루엔자 바이러스 H1N1에 의해 감염된 재구성된 비강 조직에 의해 분비된 IL-8 (패널 a) 및 RANTES (패널 b)의 수준에 대한 2개의 상이한 농도의 아젤라스틴-HCl 뿐만 아니라, 오셀타미비르가 미치는 효과. 통계상 유의적인 차이는 별표로 표시되어 있다. 그래프는 한 대표적인 실험에서 삼중으로 반복한 결과의 평균 값을 보여준다. \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0125]

본 발명의 상세한 설명

[0126]

본원에서 사용되는 바, "포함하다(comprise)," "함유하다," "가지다" 및 "포함하다(include)"라는 용어는 동의어로 사용될 수 있으며, 추가 부재 또는 부품 또는 요소를 허용하는 개방형 정의로 이해되어야 한다. "구성된"은 구성된이라는 정의의 특징에 추가 요소가 없는 가장 가까운 정의로 간주된다. 따라서, "포함하는"이 더 광범위하며 "구성된"이라는 정의를 포함한다.

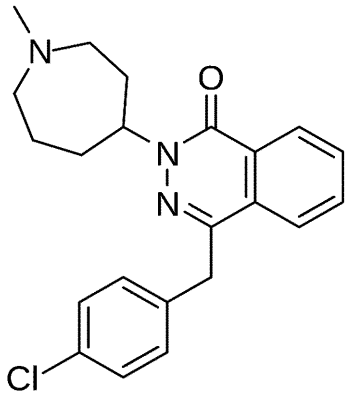
[0127]

본원에서 사용되는 바, 용어 "약"은 동일한 값 또는 주어진 값의 +/-10% 또는 +/-5%만큼 상이한 값을 의미한다.

[0128]

본원에서 사용되는 바, 용어 "아젤라스틴 화합물"은 아젤라스틴 또는 이의 염을 지칭할 것이다.

[0129] 아젤라스틴의 분자식은 하기 화학 구조식 (I)을 갖는  $C_{22}H_{24}ClN_3O$ 이다:



[0130]

[0131] IUPAC 명칭: 4-[(4-클로로페닐)메틸]-2-(1-메틸아제판-4-일)프탈라진-1-온.

[0132] CAS 번호: 58581-89-8.

[0133] 아젤라스틴 염은 바람직하게, 제약상 허용되는 염, 예컨대, 예를 들어, 히드로클로라이드이다.

[0134] 아젤라스틴 히드로클로라이드는 아젤라스틴의 히드로클로라이드 염 형태이고, 비내 투여용의 정량식-스프레이 액체로서 제제화된 항히스타민 약물 화합물로서 사용된다. 아젤라스틴 히드로클로라이드를 포함하는 상업적 제품은 pH  $6.8 \pm 0.3$ 의 수용액 중 0.1% 또는 0.15% 아젤라스틴 히드로클로라이드 USP를 함유하는 비강용 스프레이로서 제공된다.

[0135] 아젤라스틴 히드로클로라이드는 백색 또는 거의 백색의 결정질 분말로서 존재한다. 수난용성이고, 에탄올 및 디클로로메탄에서는 가용성이다.

[0136] 분자식:  $C_{22}H_{25}ClN_3O$ .

[0137] IUPAC 명칭: 4-[(4-클로로페닐)메틸]-2-(1-메틸아제판-4-일)프탈라진-1-온; 히드로클로라이드.

[0138] CAS 번호: 58581-89-8; 37932-96-0; 79307-93-0.

[0139] 아젤라스틴 염의 선택은 주로 화학 물질의 산성 또는 염기성 정도 (pH), 이온화된 형태의 안전성, 약물의 의도된 용도, 약물 제공 방법 (예를 들어, 경구에 의해, 주사, 또는 피부 상에) 및 투여 형태의 유형 (예컨대, 정제, 캡슐 또는 액제)에 의해 결정된다.

[0140] "약리학적으로 허용되는"으로도 또한 지칭되는 "제약상 허용되는"이라는 용어는 동물, 특히, 인간의 치료에 적합한 것을 의미한다. 약리학적으로 허용되는 염이라는 용어는 약리학적으로 허용되는 산 부가 염 및 약리학적으로 허용되는 염기 부가 염, 둘 모두를 포함한다.

[0141] 본원에서 사용되는 바, 용어 "약리학적으로 허용되는 산 부가 염"은 본 개시내용의 임의의 염기성 화합물 또는 이의 중간체 중 임의의 것의 임의의 비독성 유기 또는 무기 염을 의미한다. 산 부가 염을 형성할 수 있는 본 개시내용의 염기성 화합물은 예를 들어, 염기성 질소 원자를 함유하는 화합물을 포함한다. 적합한 염을 형성하는 예시적인 무기산으로는 염산, 브롬화수소산, 황산 및 인산 뿐만 아니라, 오르토인산일수소나트륨 및 황산수소칼륨과 같은 금속염을 포함한다. 적합한 염을 형성하는 예시적인 유기산으로는 모노-, 디- 및 트리카르복실산, 예컨대, 글리콜산, 락트산, 피루브산, 말론산, 숙신산, 글루타르산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 말레산, 벤조산, 페닐아세트산, 신남산 및 살리실산 뿐만 아니라, 술폰산, 예컨대, p-톨루엔 술폰산 및 메탄술폰산을 포함한다. 일산, 이산 또는 삼산 염이 형성될 수 있으며, 이러한 염은 수화, 용매화 또는 실질적으로 무수 형태로 존재할 수 있다. 일반적으로, 본 개시내용의 화합물의 산 부가 염은 물 및 다양한 친수성 유기 용매 중 더 큰 가용성을 띠며, 일반적으로 이의 유리 염기 형태와 비교하여 더 높은 용점을 나타낸다. 적절한 염의 선택은 당업자에게 공지될 것이다. 다른 비-약리학적으로 허용되는 산 부가 염, 예컨대, 옥살레이트는 예를 들어, 본 개시내용의 화합물의 단리, 실험실 사용 또는 약리학적으로 허용되는 산 부가 염으로의 후속 전환에 사용될 수 있다.

[0142] 본원에서 사용되는 바, 용어 "약리학적으로 허용되는 염기 염"은 동물, 특히, 인간 치료에 적합하거나, 또는 그

와 상용성인, 본 발명의 임의의 산성 화합물 또는 이의 중간체 중 임의의 것의 임의의 비독성 유기 또는 무기 염기성 부가 염을 의미한다. 염기성 부가 염을 형성할 수 있는 본 발명의 산성 화합물은 예를 들어, 카르복실산, 술폰산, 술폰산, 술폰아미드, N-비치환 테트라졸, 인산 에스테르 또는 황산 에스테르를 함유하는 화합물을 포함한다. 적합한 염을 형성하는 예시적인 무기 염기는 수산화리튬, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화칼슘, 수산화마그네슘 또는 수산화바륨을 포함한다. 적합한 염을 형성하는 예시적인 유기 염기는 지방족, 지환족 또는 방향족 유기 아민, 예컨대, 메틸아민, 트리메틸아민 및 피롤린 또는 암모니아를 포함한다. 적절한 염의 선택은 당업자에게 공지될 것이다. 다른 비-약리학적으로 허용되는 염기성 부가 염은 예를 들어, 본 개시내용의 화합물의 단리, 실험실 사용 또는 약리학적으로 허용되는 염기성 부가 염으로의 후속 전환에 사용될 수 있다. 원하는 화합물 염의 형성은 표준 기술을 사용하여 달성된다. 예를 들어, 중성 화합물은 적합한 용매에서 염기로 처리되고, 형성된 염은 여과, 추출 또는 임의의 다른 적합한 방법에 의해 단리된다.

- [0143] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항바이러스"는 바이러스 생물학적 성질에 영향을 미치고, 바이러스 부착, 진입, 복제, 배출, 잠복기 또는 이의 조합을 약화시키거나, 억제하여 바이러스 로드 또는 감염성을 감소시키는 임의의 물질, 약물 또는 제제를 지칭할 것이다. 본 청구범위 및/또는 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "약화시키는," "억제하는," "감소시키는" 또는 "예방" 또는 상기 용어의 임의의 어미 변화 형태는 예컨대, 바이러스 감염 위험 감소 (노출 전) 또는 노출 후 바이러스 생존, 로드 또는 성장 감소와 같은 원하는 결과를 달성하기 위한 임의의 측정가능한 감소 또는 완전한 억제를 포함한다.
- [0144] 본원에 기술된 예시적인 항바이러스 제제는 생체내, 생체의 또는 시험관내 사용을 위한 의약품, 제약 제제 또는 소독제이다.
- [0145] 본원에서 사용되는 바, 용어 "생물학적 표면"은 예컨대, 생물학적 조직 표면, 예컨대, 표면 또는 상피 또는 진피 조직 (예컨대, 피부), 점막 조직 또는 막 조직을 비롯한, 예컨대, 포유동물 (인간 또는 비인간 동물) 세포와 같은 생존가능한 세포를 포함하는 표면을 지칭할 것이다.
- [0146] 항바이러스 효과와 관련하여 본 발명에서 사용되는 바, 용어 "유효량"은 항바이러스 효과가 입증된 양 (특히, 미리결정된 양)을 의미한다. 상기 양은 전형적으로 표면에 적용되거나, 또는 대상체에게 투여되었을 때, 항바이러스 또는 임상 결과를 비롯한 원하는 결과에 유익한 효과를 내기에 충분한 양 또는 활성이며, 따라서, 유효량 또는 이의 동의어는 그가 적용되는 문맥에 따라 달라진다.
- [0147] 제약 제제 또는 약물의 유효량은 질환, 질환 병태 또는 장애를 치료, 예방 또는 억제하기에 충분한 화합물의 양을 의미하는 것으로 의도된다. 이러한 유효 용량은 구체적으로 본원에 기술된 질환 또는 장애와 관련된 병태를 치유, 예방 또는 호전시키기에 충분한 화합물의 양을 지칭한다.
- [0148] 질환과 관련하여, 본원에 기술된 바와 같은 아젤라스틴 화합물의 유효량 (특히, 예방 또는 치료 유효량)은 구체적으로 이의 항바이러스 효과로부터 이익을 얻는 질환 또는 병태를 치료, 조정, 약화, 역전 또는 영향을 주기 위해 사용된다. 상기 유효량에 상응하는 화합물의 양은 예컨대, 주어진 약물 또는 화합물, 제제, 투여 경로, 질환 또는 장애의 유형, 치료받는 대상체 또는 숙주의 아이덴티티, 의학적 상황 및 다른 관련 요인의 평가와 같은 다양한 인자에 따라 달라질 수 있지만, 그럼에도 불구하고 당업자에 의해 통상적으로 결정될 수 있다.
- [0149] 유효량의 본원에 기술된 아젤라스틴 화합물을 사용한 대상체의 치료 또는 예방 요법은 단일 적용 또는 투여로 구성될 수 있거나, 또는 대안적으로, 각각 일련의 적용 및 투여를 포함할 수 있다. 예를 들어, 아젤라스틴 화합물은 적어도 한 달에 한 번, 또는 적어도 일주일에 한 번, 또는 적어도 하루에 한 번 사용될 수 있다. 그러나, 급성기인 특정 경우에, 예를 들어, 바이러스에 대한 노출이 의심되거나, 확인된 경우, 또는 바이러스 감염이 결정된 후, 아젤라스틴 화합물은 더욱 빈번하게, 예컨대, 하루에 1-10회 사용될 수 있다.
- [0150] 구체적으로, 본원에 기술된 제제를 사용한 치료 및 코로나비리다에 바이러스 유발 질환의 표준 요법 및/또는 다른 표적 바이러스 중 임의의 것에 의해 유발된 질환의 표준 요법을 포함하는 조합 요법을 제공한다.
- [0151] 용량은 예컨대, 대상체의 바이러스 확산 위험에 따라 병원체 연관 반응을 예방하기 위해, 다른 활성제, 예컨대, 항바이러스제, 항염증성 약물 또는 항생제와 조합하여 적용될 수 있다.
- [0152] 치료는 항바이러스제, 항염증제 또는 항생제 치료와 조합될 수 있으며, 바람직하게, 여기서, 제약 제제는 상기 항바이러스제, 항염증제 또는 항생제 치료 이전, 그 동안 (예컨대, 공동 투여에 의해 또는 병렬로), 또는 그 이후에 투여된다.
- [0153] 구체적으로, 본원에 기술된 아젤라스틴 화합물은 아젤라스틴 화합물, 예컨대, 동일하거나, 또는 상이한 화합물

일 수 있는 추가의 항바이러스제와 조합될 수 있다. 구체적인 실시양태는 ACE2 억제제, 바이러스 단백질 M2 이온 채널 억제제, 뉴라미니다제 억제제, RNA 복제 및 번역 억제제 및 폴리머라제 억제제로부터 선택되는 추가의 항바이러스제를 지칭한다. 항바이러스제는 아만타딘 또는 리만타딘일 수 있다. 구체적으로 항바이러스제는 오셀타미비르, 자나미비르, 페라미비르, 리바비린, 로피나비르 또는 리토나비르일 수 있다. 구체적인 추가의 항바이러스제의 예로는 예컨대, 카라기난과 같은 생물학적 표면 처리에 적합하게 사용되는 것, 또는 예컨대, 히드록시클로로퀸, 또는 렘데시비르와 같은 SARS-Cov2 감염 치료를 위해 현재 연구 중인 것이 있다.

[0154] 구체적으로, 아젤라스틴 화합물은 항염증제, 예컨대, 표준 스테로이드성 항염증성 약물, 글루코코르티코이드 및 비스테로이드성 항염증성 약물 (NSAID)과 조합된다. 적합한 NSAID는 이부프로펜, 나프록센, 페노프로펜, 케토프로펜, 플루로비프로펜, 옥사프로진, 인도메타신, 슐린다, 에토돌락, 케토틴락, 디클로페낙, 나부메톤, 피록시캄, 멜록시캄, 테녹시캄, 드록시캄, 로녹시캄, 이속시캄, 메페남산, 메클로페남산, 플루페남산, 툴페남산 및 셀레콕시브를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 적합한 스테로이드성 항염증제는 코르티코스테로이드, 예컨대, 합성 글루코코르티코이드를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 구체적인 예로는 플루티카손, COX-2 억제제, 이부프로펜, 히드록시클로로퀸, 헤파린, LMW 헤파린, 히루딘 또는 면역억제제, 예컨대, 아자티오프린, 사이클로스포린 A 또는 사이클로포스파미드가 있다.

[0155] 구체적으로, 아젤라스틴 화합물은 항생제, 예컨대, 베타 락탐 항생제, 아미노글리코시드 항생제, 안사마이신, 카르바세펜, 카르바페넴, 세팔로스포린, 글리코펩티드, 린코사미드, 리포펩티드, 마크롤라이드, 모노박탐, 니트로푸란, 옥사졸리디논, 폴리펩티드, 숄폰아미드, 클로파지민, 답손, 카프레오마이신, 사이클로세린, 에탐부톨, 에티오나미드, 이소니아지드, 피라진아미드, 리팜피신, 리파부틴, 리파웬틴, 스트렙토마이신, 아르스페나민, 클로람페니콜, 포스포마이신, 무피로신, 플라텐시마이신, 퀴누프리스틴/달포프리스틴, 티아페니콜, 티게사이클린, 티니다졸, 트리메토프림, 테익소박틴, 말라시딘, 할리신, 클린다마이신, 반코마이신, 메트로니다졸, 푸시딘산, 티오펩티드, 피닥소미신, 퀴놀론, 테트라사이클린, 오마다사이클린, 리파마이신, 키브렐로마이신, 옥사졸리디논, 케툴리드, 티아졸리드, 아믹시실, 테이코플라닌, 라모플라닌, 오리타반신, 란티바이오틱스, 카푸라마이신, 수로토마이신, 투리신, 엔도리신, 아비도신 CD, 카다졸리드, 라미졸, 데펜신, 리디닐라졸, 중쇄 지방산, 파지, 베르베린, 락토페린과 조합된다.

[0156] 구체적으로, 본원에 기술된 아젤라스틴 화합물을 이용한 치료는 코르티코스테로이드, 항염증성 신호 전달 조정제, 2-아드레노수용체 효능제 기관지확장제, 항콜린제, 점액 용해제, 고장성 염수 및 코로나비리다에 바이러스 감염 및/또는 본원에 기술된 다른 표적 바이러스 중 임의의 것에 의한 감염을 치료하기 위한 다른 약물; 또는 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 다른 치료제를 투여하는 치료와 조합될 수 있다. 구체적인 제약 조성물은 특히 하나 이상의 항염증제, 및/또는 진통제, PPAR- $\gamma$  효능제 및 면역 반응 조정제를 포함할 수 있다.

[0157] 치료 기간의 길이는 예컨대, 급성 또는 만성 질환인 질환의 중증도, 환자의 연령, 아젤라스틴 화합물의 농도와 같은 다양한 인자에 따라 달라진다. 또한, 치료 또는 예방에 사용되는 유효 투여량은 특정 치료 또는 예방 요법 과정에 걸쳐 증가 또는 감소될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 투여량의 변화는 당업계에 공지된 표준 진단 검정법에 의해 발생하고, 명백해질 수 있다.

[0158] 구체적인 측면에 따라, 본원에 기술된 의약품 또는 제약 조성물은 유효량의 본원에서 정의된 바와 같은 아젤라스틴 화합물을 함유한다. 본원에 기술된 제제는 단일 또는 다회 투여용으로 제공될 수 있다.

[0159] 단위 용량 또는 다회 용량 용기는 예를 들어, 밀봉된 앰플 및 바이알 또는 다용도 스프레이로 사용될 수 있으며, 액체 또는 건조 상을 포함하며, 예컨대, 사용 직전에 멸균 액체 담체, 예를 들어, 주사용수의 첨가만을 필요로 하는, 냉동 건조된 (동결 건조된) 상태로 보관될 수 있다. 바람직한 단위 투여 제제는 아젤라스틴 화합물을 1일 용량 또는 단위 1일 서브용량, 또는 다회 용량으로 함유하는 것이다.

[0160] 본원에서 사용되는 바, 용어 "단일 용량"은 하기 방식으로 이해된다. 단일 용량 또는 1회용량은 단일 경우/절차/투여를 위해 인간 또는 동물 환자와 같은 단일 대상체에서 사용하기 위한 투여를 위한 양이다. 단일 용량을 포함하는 패키지는 전형적으로 제조사에 의해 라벨링된다. 단일 용량이라는 양은 구체적으로 유효량을 제공하기 위한, 아동 또는 성인과 같은 개체를 위한 1일 용량인 것으로 이해된다.

[0161] 본원에 기술된 의약품 또는 제약 조성물은 구체적으로 인간 또는 수의학용 의약품 또는 제약 조성물로서 제공된다. 의약품은 질환을 치료하거나, 통증을 완화시키거나, 또는 애초에 상기 질환 또는 통증을 예방하기 위해 사용되는 물질로 이해된다. 본 정의는 의약품이 인간에게 투여되든, 또는 동물에게 투여되든, 이에 관계없이 적용

된다. 물질은 신체 내에서 또는 신체에서 모두 작용할 수 있다.

- [0162] 본원에 기술된 의약품 또는 제약 조성물은 바람직하게 하나 이상의 제약상 허용되는 보조제를 함유하고, 활성 제약 화합물이 높은 생체이용률로 투여될 수 있게 하는 제약 형태이다. 적합한 보조제는 예를 들어, 사이클로덱스트린을 기반으로 할 수 있다. 적합한 제제는 예를 들어, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 시아노아크릴레이트, 아크릴아미드, 폴리락테이트, 폴리글리콜레이트, 폴리안하이드레이트, 폴리오르토에스테르, 젤라틴, 알부민, 폴리스티렌, 폴리비닐, 폴리아크롤레인, 폴리글루타르알데히드 및 유도체, 공중합체 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 중합체로 형성된 합성 중합체성 나노입자를 포함할 수 있다.
- [0163] 본원에 기술된 구체적인 의약품 또는 제약 조성물은 아젤라스틴 화합물 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다. "제약상 허용되는 담체"는 대상체에게 비독성인, 활성 성분 이외의 의약 또는 의학적 용도를 위한 제제 내의 성분을 지칭한다. 제약상 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정제 또는 보존제, 및 특히 염수, 포스페이트 완충처리된 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0164] 본원에서 사용되는 바, 아젤라스틴 화합물은 통상의 관행에 따라 선택되는 통상적인 담체 및 부형제와 함께 제제화될 수 있다.
- [0165] 제약상 허용되는 담체는 일반적으로 본원에 기술된 항바이러스 소분자 화합물 또는 관련 조성물 또는 조합 제제와 생리학적으로 상용성인 임의의 모든 적합한 용매, 분산 매질, 코팅제, 항바이러스제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다.
- [0166] 구체적인 측면에 따라, 아젤라스틴 화합물은 원하는 투여 경로에 적절한 하나 이상의 담체와 조합될 수 있다. 아젤라스틴 화합물은 예컨대, 락토스, 수크로스, 전분, 알칸산의 셀룰로스 에스테르, 스테아르산, 활석, 스테아르산마그네슘, 산화마그네슘, 인산 및 황산의 나트륨 및 칼슘 염, 아카시아, 젤라틴, 알긴산나트륨, 폴리비닐피롤리딘, 폴리비닐 알콜 중 임의의 것과 혼합될 수 있고, 임의로 통상적인 투여를 위해 추가로 정제화되거나 캡슐화될 수 있다. 대안적으로, 아젤라스틴 화합물은 염수, 물, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 카르복시메틸 셀룰로스 콜로이드 용액, 에탄올, 옥수수유, 땅콩유, 면실유, 참깨유, 트라가칸트 검 및/또는 다양한 완충제 중에 분산되거나, 또는 용해될 수 있다. 다른 담체, 애주번트 및 투여 모드는 제약 분야에 널리 공지되어 있다. 담체는 방출 조절 물질 또는 시간 지연 물질, 예컨대, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트를 단독으로 또는 왁스, 또는 당업계에 널리 공지된 다른 물질과 함께 포함할 수 있다.
- [0167] 본원에 기술된 바와 같은 화합물은 아젤라스틴 화합물의 방출이 더 적은 빈도로 투약될 수 있도록 허용하거나, 또는 주어진 활성 성분의 약동학적 또는 독성 프로파일을 개선시키도록 제어되고, 방출 조절형 제약 ("방출 조절형 제제")으로 제공될 수 있다.
- [0168] 제약 조성물은 또한 통상적인 방법에 의해, 전형적으로 pH 또는 시간-의존성 코팅제로 코팅될 수 있으며, 이로써, 대상 제제는 원하는 국소 적용 부근에서, 또는 다양한 시간에 위장관에서 방출되어 원하는 작용을 연장할 수 있다. 상기 투여 형태는 전형적으로 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 폴리비닐아세테이트 프탈레이트, 히드록시프로필 메틸 셀룰로스 프탈레이트, 에틸 셀룰로스, 왁스 및 셀락 중 하나 이상의 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0169] 추가의 제약상 허용되는 담체는 당업계에 공지되어 있고, 예컨대, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22<sup>nd</sup> revised edition (Allen Jr, LV, ed., Pharmaceutical Press, 2012)]에 기술되어 있다. 액체 제제는 액제, 에멀전 또는 현탁제일 수 있고, 부형제, 예컨대, 현탁화제, 가용화제, 계면활성제, 보존제 및 킬레이트제를 포함할 수 있다.
- [0170] 바람직한 제제는 즉시 사용할 수 있고, 보관 안정성이 있는 형태이며, 저장 수명이 적어도 1 또는 2년이다.
- [0171] 본원에서 사용되는 바, 용어 "제제"는 특정 방식으로 즉시 사용할 수 있는 제제를 지칭한다. 구체적으로, 본원에 기술된 조성물은 아젤라스틴 화합물, 및 제약상 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함한다.
- [0172] 구체적인 측면에 따라, 비강, 폐내, 경구, 국소, 점막 또는 비경구 투여를 위한 제약상 허용되는 비히클을 포함하는 제제를 제공한다. 투여는 또한 피내 또는 경피일 수 있다. 또한, 본 개시내용은 동결건조되고, 재구성되어 제약상 허용되는 투여용 제제를 형성할 수 있는 상기 화합물을 포함한다.
- [0173] 본원에 기술된 구체적인 의약품 또는 제약 조성물은 비내 투여를 위한 또는 예컨대, 점막 또는 피부를 비롯한 생물학적 표면 상에의 또 다른 국소 경로에 의한 것으로 제제화된다. 상기 투여 수단을 용이하게 하는 데 적합

한 제약 담체는 당업계에 널리 공지되어 있다.

- [0174] 구체적으로, pH 6.8 ± 0.3의 수용액 중 0.001% (w/w) 또는 0.15% (w/w) 아젤라스틴 화합물을 함유하고, 임의로, 시트르산 일수화물, 인산수소이나트륨 12수화물, 에테데이트이나트륨, 히프로멜로스, 정제수, 염화나트륨, 및 보존제, 예컨대, 염화벤즈알코늄 중 어느 하나 이상의 것을 추가로 함유하는 비강용 스프레이가 사용될 수 있다.
- [0175] 비경구 투여 이외의 다른 임의의 경로에 의해 아젤라스틴 화합물을 투여하기 위해, 이의 불활성화를 방지하기 위한 물질로 활성제를 코팅하거나, 또는 활성제와 함께 투여하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들어, 적절한 담체, 예를 들어, 리포솜 또는 희석제가 사용될 수 있다. 제약상 허용되는 희석제는 염수 및 완충제 수용액을 포함한다.
- [0176] 아젤라스틴 화합물은 예를 들어, 불활성 희석제 또는 동화성 또는 식용 담체와 함께 경구 투여될 수 있다. 예를 들어, 제제는 경질 또는 연질 셀룰라틴 캡슐에 동봉되거나, 또는 정제로 압축될 수 있다. 경구 치료 투여를 위해, 아젤라스틴 화합물은 부형제와 함께 혼입될 수 있고, 섭취가능한 정제, 협측용 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 현탁제, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 물론 조성물 및 제제 중 화합물의 백분율은 다양할 수 있다. 상기 치료상 유용한 조성물에서 아젤라스틴 화합물의 양은 적합한 투여량이 수득될 수 있도록 하는 양이다.
- [0177] 정제는 부형제, 유동화제, 충전제, 결합제, 붕해제, 활택제, 향미제 등을 함유할 것이다. 과립제는 이소말토스를 사용하여 제조될 수 있다. 추가로, 점막 부위에서, 예컨대, 점막 부위 (예컨대, 코, 입, 눈, 식도, 인후, 폐)에서, 예컨대, 전신 작용 없이 국소적으로 작용하도록 제제화된 제제를 제공하는 것이 바람직하다. 수성 제제는 멸균 형태로 제조되고, 경구 투여 이외의 다른 방식으로 전달하고자 하는 경우, 일반적으로 등장성일 것이다.
- [0178] 대상체를 치료하기 위한 제제 또는 각각의 제제의 투여 또는 적용 또는 점막 사용과 관련하여 용어 "점막"은 전신 또는 국부 투여를 비롯한, 점막 경로를 통한 투여를 지칭하며, 여기서, 활성 성분은 점막 표면과의 접촉에 의해 흡수된다. 이는 비강, 폐, 경구(oral) 또는 경구(peroral) 투여 및 제제, 예컨대, 액체, 시럽, 로젠지, 점안제, 정제, 스프레이, 산제, 인스턴트 산제, 과립제, 캡슐, 크림, 젤, 점적제, 현탁제 또는 에멀전을 포함한다.
- [0179] 경구 제제는 액상 액체, 에멀전, 현탁제 등을 포함할 수 있다. 상기 조성물의 제조에 적합한 제약상 허용되는 비히클은 당업계에 널리 공지되어 있다. 시럽, 엘릭시르, 에멀전 및 현탁제를 위한 담체의 전형적인 성분으로는 에탄올, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 액체 수크로스, 소르비톨 및 물을 포함한다. 현탁제의 경우, 전형적인 현탁화제로는 메틸 셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 트라가칸트 및 알긴산나트륨을 포함하고; 전형적인 습윤화제로는 레시틴 및 폴리소르베이트 80을 포함하고; 전형적인 보존제로는 메틸 파라벤 및 벤조산나트륨을 포함한다. 경구용 액상 조성물은 또한 예컨대, 상기 개시된 감미료, 향미제 및 착색제와 같은 하나 이상의 성분을 함유할 수 있다.
- [0180] 아젤라스틴 화합물 또는 각각의 제제의 전신 전달을 달성하는 데 유용한 다른 조성물은 설하, 협측 및 비강 투여 형태를 포함한다. 상기 조성물은 전형적으로 가용성 충전제 물질, 예컨대, 수크로스, 소르비톨 및 만니톨; 및 결합제, 예컨대, 아카시아, 미정질 셀룰로스, 카르복시메틸 셀룰로스 및 히드록시프로필 메틸 셀룰로스, 또는 유동화제, 활택제, 감미료, 착색제, 향산화제 및 향미제 중 하나 이상의 것을 포함한다.
- [0181] 아젤라스틴 화합물 또는 각각의 제제는 또한 예컨대, 대상체의 표피 또는 상피 조직 상에 이를 함유하는 조성물을 직접 놓거나 도포함으로써, 또는 "패치"를 통해 경피적으로 대상체에게 국소적으로 투여될 수 있다. 상기 조성물은 예를 들어, 로션, 크림, 액체, 젤 및 고체를 포함한다. 상기 국소 조성물은 유효량, 일반적으로, 적어도 약 0.001 wt%, 또는 심지어 약 0.1 wt% 내지 5 wt%, 또는 1 wt% 내지 약 5 wt%의 아젤라스틴 화합물을 포함할 수 있다. 국소 투여에 적합한 담체는 전형적으로 연속적인 필름으로서 피부에 제 위치에 남아있고, 땀 또는 물에 의한 침지에 의한 제거에 대해 내성을 띤다. 일반적으로, 담체는 본질적으로 유기 담체이며, 그 안에 치료제를 분산시키거나 용해시킬 수 있다. 담체는 제약상 허용되는 연화제, 유화제, 증점제, 용매 등을 포함할 수 있다.
- [0182] 주사용으로 적합한 제약 조성물은 멸균 수용액 (특히 화합물 또는 제약상 허용되는 염이 수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 특히, 조성물은 구체적으로 멸균성이고, 쉽게 주사할 수 있는 정도로 유동적이며; 제조 및 보관 조건하에서 안정적이고, 미생물, 예컨대, 박테리아 및 진균의 오염 작용으로부터 보존된다.

- [0183] 적합한 제약상 허용되는 비히클은 제한 없이, 경구, 비경구, 비강, 점막, 경피, 혈관내 (IV), 동맥내 (IA), 근육내 (IM), 및 피하 (SC) 투여 경로에 적합한 임의의 비면역성 제약 애주먼트, 예컨대, 포스페이트 완충제 염수 (PBS)를 포함한다.
- [0184] 본원에서 사용되는 바, 용어 "대상체"는 온혈 포유동물, 특히, 인간 또는 예컨대, 개, 고양이, 토끼, 말, 소 및 돼지를 비롯한 비인간 동물을 지칭할 것이다. 특히, 본원에 기술된 치료 및 의학적 용도는 코로나비리다에 바이러스 감염 및/또는 본원에 기술된 다른 표적 바이러스 중 임의의 것에 의한 감염과 연관된 질환 병태의 예방 또는 요법을 필요로 하는 대상체에게 적용된다. 구체적으로, 치료는 코로나비리다에 바이러스 및/또는 아데노비리다에 바이러스 및/또는 파라믹소비리다에 바이러스 및/또는 오르토믹소비리다에 바이러스가 병태의 병원체인 질환 병태의 병인을 방해함으로써 이루어질 수 있다. 대상체는 상기 질환 병태의 위험이 있거나, 질환을 앓고 있는 환자일 수 있다. 구체적으로, 대상체는 다른 사람보다 질환의 위험 또는 질환의 중증도를 증가시킬 가능성이 더 높은 약화된 면역계 또는 기존의 호흡기 또는 심장 질환을 앓을 수 있다.
- [0185] 특정 질환 병태"의 위험이 있는"이라는 용어는 예컨대, 특정 소인, 바이러스 또는 바이러스 감염 대상체에의 노출에 의해 상기 질환 병태가 잠재적으로 발생하는 대상체, 또는 특히 다른 원인 질환 병태 또는 바이러스 감염의 결과로 뒤따르는 병태 또는 합병증과 연관된 다양한 병기의 상기 질환 병태를 이미 앓고 있는 대상체를 지칭한다. 위험 결정은 아직 질환 진단을 받지 않은 대상체에서 특히 중요하다. 따라서, 이러한 위험 결정은 예방적 요법을 가능하게 하는 조기 진단을 포함한다. 구체적으로, 아젤라스틴 화합물은 고위험 대상체, 예컨대, 질환이 발생할 가능성이 높은 대상체에서 사용된다.
- [0186] 용어 "환자"는 예방적 또는 치료학적 치료를 받는 인간 및 다른 포유동물 대상체를 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "환자"는 항상 건강한 대상체를 포함한다. 따라서, "치료"라는 용어는 예방적 및 치료학적 치료, 둘 모두를 포함하는 것을 의미한다.
- [0187] 구체적으로, 용어 "예방"은 병인 발병의 예방을 포함하도록 의도된 예방 조치, 또는 병인의 위험을 감소시키기 위한 예방 조치를 지칭한다.
- [0188] 대상체 치료와 관련하여 본원에서 사용되는 바, 용어 "요법"은 개별적으로 또는 함께 "질환 병태"로서 이해되는 질환, 병리학적 상태 또는 장애를 치유, 호전, 안정화, 발병률 감소 또는 예방하려는 의도하에 진행되는 대상체의 의학적 관리를 지칭한다. 본 용어는 구체적으로 질환 병태의 개선을 위한 능동적 치료, 구체적으로 질환 병태의 예방을 위한 예방을 포함하고, 또한 연관된 질환 병태의 원인을 제거하기 위한 인과적 치료를 포함한다. 추가로, 본 용어는 질환 병태의 치유보다는 증상 완화를 위해 고안된 고식적 치료, 및 연관된 질환 병태의 발생을 최소화하거나, 부분적으로 또는 완전히 억제시키기 위해 질환 병태를 추가로 치유하는 것, 및 연관된 질환 병태의 개선을 위해 또 다른 특정 요법을 보충하는 데 사용된 지지 치료를 포함한다.
- [0189] 상기 설명은 하기 실시예를 참조하여 더욱 완전히 이해될 것이다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 하나 이상의 실시양태를 실시하는 방법을 단지 대표할 뿐이며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0190] 실시예
- [0191] 실시예 1: 항바이러스 약물 확인
- [0192] 소분자 (약물)에 대한 수학적 표현의 개발은 현대 제약 연구에 막대한 가치를 지닌 연구 분야이며, 따라서, 수많은 분자 디스크립터가 개발되어 화학 구조의 2D 및/또는 3D 피처를 활용하고 있다. 상기 디스크립터는 정량적 구조-활성 관계를 평가하는 데 매우 유용하다. 구체적으로, 원자 중심 피처 쌍은 고처리량의 구조-활성 관계 분석, 화합물 선택, 가상 화학 스크리닝 및 약리학적 프로파일링에 비용면에서 효율적인 접근법을 제공하기 때문에 약물 발견 프로그램과 매우 큰 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 일반적으로 사용되는 화학 디스크립터 중 하나는 새넨 엔트로피 디스크립터(Shannon Entropy Descriptor)인 SHED로 지칭된다 (1). 이 접근법에서, 원자 중심 피처 쌍의 위상 분포는 정보 이론 (새넨 엔트로피)을 기반으로 정량화된다. 특별한 이점은 SHED 접근법을 사용하여 화학적으로는 상이하지만, 위상학적으로는 관련된 화학 스캐폴드를 확인할 수 있다는 점이다.
- [0193] 새로운 항바이러스 약물을 확인하기 위해, 생화학적 경로 기반 개입 전략법에 기초하여 약물 확인 전략법을 사용하였다. 소분자 (약물)의 고유한 화학적 피처에 대한 새넨 엔트로피 기반 설명을 사용하여 미리 정의된 기계론적 프로파일 (작용 모드)과 매칭되는 임상적으로 승인받은 약물을 후보 항바이러스 약물로 확인하였다. 상기 접근법의 근거는 새넨 엔트로피 벡터가 유사한 리간드가 유사한 단백질 표적에 결합한다는 것이다.
- [0194] 여기서, 승인받은 약물 및 이의 실험적으로 검증된 단백질 표적의 저장소인 DRUGBANK 데이터베이스 (2)를 사용

하였다. 유클리드 거리 (0.25를 컷오프 값으로 취함)를 계산하여 약물 유사성을 평가하였다.

[0195] 분석의 출발점으로 특정 질의 항바이러스 화합물 분석과 함께 최근 생물정보학 분석 (3)으로부터 SARS-CoV-2 감염에 대한 이용가능한 기계론적 정보를 추출하였다. SARS-CoV2 활성이 공지된 질의 항바이러스 화합물 (히드록시클로로퀸 (RS)-2-[[4-[(7-클로르-4-키놀리닐)아미노]펜틸](에틸)아미노]에탄올; SSAA09E2 {N-[[4-(4-메틸피페라진-1-일)페닐]메틸]-1,2-옥사졸-5-카르복스아미드}; 및 SSAA09E3 [N-(9,10-디옥소-9,10-디히드로안트라센-2-일)벤즈아미드])의 경로 프로파일은 새년 엔트로피 접근법을 사용하여 예측하였고, 흥미롭게도 상당한 상호 중첩을 보였다.

[0196] 두 번째로, SARS 억제제에 대한 경로 프로파일은 잘 정의된 기전 및 작용 기전을 이용하여 예측하였다: SSAA09E2, 소분자 ACE2 억제제 및 SSAA09E3, 바이러스 숙주 막 융합의 일반적인 억제제 (4). 두 억제제 모두 히드록시클로로퀸과 상당 수의 경로를 공유하는 것으로 밝혀졌다. 요약하면, 분석 결과, 유사한 경로가 히드록시클로로퀸에 의해 표적화되고, 기전이 잘 정의된 억제제에 의해 해결되는 SARS-CoV-2 감염에 관여하는 것으로 나타났다. 따라서, 이러한 경로는 항바이러스 활성과 고도의 관련성을 갖고, 이전에 매칭되는 경로 프로파일과 함께 항바이러스 활성을 갖는 것으로 알려지지 않은 임상적으로 승인받은 약물을 찾음으로써 항바이러스 활성에 대해 신규한 약물 재창출을 위한 기초 역할을 할 수 있다고 결론지었다.

[0197] 개별 경로 프로파일을 매칭시키기 위해 임상적으로 승인받은 약물을 탐색하였다. 상이한 질의 화합물 (히드록시클로로퀸, SSAA09E2 및 SSAA09E3)에 대해 수득된 예측 경로 프로파일을 사용하여 승인받은 (및 상업적으로 이용가능한) 약물의 SELLECKCHEM 데이터베이스를 스크리닝하였다. 후보 선택의 이론적 근거는 상이한 (예측된) 데이터셋에서 승인받은 약물의 동시 출현을 기반으로 한다. 히드록시클로로퀸 및 SSAA09E2 (ACE2 억제제)는 서로 간에 및 SARS-CoV-2 경로 프로파일로 수득된 약물과 상당한 중첩을 보였다. 화학 조성에 기초하여 약물을 제거한 후, 생체의 SARS-CoV-2 감염 모델에서 추가 시험을 위한 후보 항바이러스제로 승인받은 두 약물을 선택하였다: 아젤라스틴 및 마라비록(Maraviroc).

[0198] 참고문헌:

- (1) Gregori-Puigjane, E. and Mestres, J. SHED: Shannon Entropy Descriptors from Topological Feature Distributions. *J.Chem.Inf.Model.* 46, 1615-1622 (2006)
- (2) Wishart, DS., Knox, C., Guo, AC., Cheng, D., Shrivastava, S., Tzur, D., Gautam, B. and Hassanali, M. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug action and drug targets. *Nucleic Acids Res.* D901-D906, (2008)
- (3) Zhou, Y, Hou, Y., Shen, J, Huang, Y., Martin, W. and Cheng, F. Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. *Cell Discovery* 6,14-32, (2020)
- (4) Adedeji, AO., Severson, W., Jonsson, C., Singh, K., Weiss SR. and Sarafanos, SG. Novel Inhibitors of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry That Act by Three Distinct Mechanisms. *J Virol.* 87, 8017-8028, (2013)

[0199] 실시예 2: SARS-CoV-2에 의한 Vero E6 세포의 바이러스 감염 예방

[0201] 아젤라스틴-HCl이 SARS-CoV-2 감염에 미치는 효과를 검출하기 위해, ACE2 발현 Vero E6 (원숭이 신장) 세포를 아젤라스틴-HCl의 부재 또는 존재하에서 SARS-CoV-2로 감염시키고, 세포의 현미경 검사에 의해 세포변성 효과를 평가하였다.

[0202] 실험 절차:

[0203] Vero E6 세포(ATCC CRL-1586)를 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 2일 후, 세포 배양물은 전면생장에 도달하였고, 균질한 단층을 형성하였다. 세포에 신선한 세포 배양 배지 (DMEM+ FBS?)를 공급하였다. 아젤라스틴-HCl (아젤라스틴-HCl (셀렉켄(Seleckchem) 카탈로그 번호 S2552, 10 mM 스톡 용액) 및 항-HIV 항바이러스제인 마라비록 (셀렉켄 카탈로그 번호 S2003, DMSO에 용해된 10mM 스톡 용액)을 세포 배양 배지에 50, 25, 12.5, 6.25 및 3.125  $\mu$ M 최종 농도 (희석액은 배양 배지에서 제조하였다)로 첨가하였다. 바이러스 감염을 위해, SARS-CoV-2 바이러스 (hCoV-19/Hungary/SRC\_isolate\_2/2020, 수탁 ID: EPI\_ISL\_483637)를 배양 배지 교체 후 즉시 (기본적으로 동시에) MOI 0.1 (다중 감염도: 10개의 세포에 대해 1개의 바이러스 입자)로 상청액에 첨가하였다. Vero

E6 세포에서의 증식에 의해 바이러스 스톱을 제조하고, 감염 역가를 측정하였다. 바이러스와 함께 30 min 인큐베이션시킨 후, 배양 배지를 제거하고, 상기 농도의 아젤라스틴-HCl 또는 마라비록을 함유하는 신선한 배양 배지로 교체하였다 (공동 투여: 예방 시뮬레이션). 실험을 또한 바이러스와 함께 30 min 인큐베이션 후에만 약물을 제공하되, 그 기간 동안에는 제공하지 않는 방식으로 아젤라스틴을 이용하여 수행하였다 (감염 후 투여: 노출 후/치료 세팅). 감염 후 48시간째, 세포를 현미경 관찰로 평가한 후, 이어서, 정량적 PCR 분석을 위해 상청액을 수집하고, -80°C에서 보관하였다. 제조사의 지침에 따라 모나크 토탈 RNA 미니프렙 키트(Monarch Total RNA Miniprep Kit) (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England BioLabs), 카탈로그 번호: T2010S)를 이용하여 배양 상청액 샘플로부터 바이러스 RNA를 추출하였다. 간략하면, 300  $\mu$ l 용해 완충제를 100  $\mu$ l 배양 상청액과 혼합하고, 전용 컬럼을 이용하여 gDNA 오염을 제거하고 (DNA 유지), RNA를 함유하는 통과액을 RNA 결합 컬럼에 적용하였다. 컬럼을 세척한 후, RNA를 H<sub>2</sub>O로 용출시키고, 샘플을 분석할 때까지 -80°C에서 보관하였다. 역전사 반응 후, DNA를 RdRp 유전자로부터의 F, R 및 P2 프라이머로 증폭시켰다.

- [0204] 사용된 프라이머 및 프로브는 SARS-CoV-2 RdRp 유전자에 대해 특이적이었다:
- [0205] 역방향 프라이머: CARATGTTAAASACACTATTAGCATA (서열 번호: 1),
- [0206] 정방향 프라이머: GTGARATGGTCATGTGTGGCGG (서열 번호: 2),
- [0207] 프로브: FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ (서열 번호: 3).
- [0208] 액적 PCR 키트를 사용하였다 (바이오래드(BioRad) ddPCR™, 바이오-래드 라보라토리즈 게엠베하(Bio-Rad Laboratories GmbH: 독일)). RT-PCR 반응 결과를 정량화하고, 바이러스 입자/ $\mu$ l로 계산하였다.
- [0209] **결과:**
- [0210] 세포의 전면생장한, 균질한 층 (비감염, 도 2a)이 파괴되고, "구멍"이 보이고, 이는 바이러스에 기인한 세포 사멸을 시사하는 것이다 (도 2b). 시험된 모든 농도의 아젤라스틴-HCl의 존재하에서, SARS-CoV-2 감염된 세포는 사멸로부터 유의적으로 방어되었고, 이는 직접적인 항바이러스 효과의 증거를 제공하는 것이다. 마라비록은 더 낮은 저농도에서 효과적이지 않았고, 심지어 더 높은 농도 (12.5 내지 50  $\mu$ M)도 높은 세포변성 점수를 보이며, 단지 미미한 방어 효과를 나타내었다 (표 1). 놀랍게도, 아젤라스틴은 적어도 히드록시클로로퀸만큼 효과적인, 유효한 항바이러스 물질인 것으로 입증되었다.
- [0211] 본 데이터는 아젤라스틴 화합물이 세포에 적용되자마자 즉시 SARS-CoV-2에 의한 감염을 중단시킬 수 있었다는 것을 시사한다. 바이러스는 증식하고, 체내로 확산되기 위해서는 세포에 진입하여야 하는 바, 아젤라스틴은 바이러스가 인체에 감염되는 곳인 호흡기 점막 표면에서 바로 COVID-19를 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

**표 1**

화합물	<b>50 <math>\mu</math>M</b>	<b>25 <math>\mu</math>M</b>	<b>12.5 <math>\mu</math>M</b>	<b>6.25 <math>\mu</math>M</b>	<b>3.125 <math>\mu</math>M</b>
아젤라스틴-HCl	nd	0 또는 1	0 또는 1	2	2
마라비록	3	3	3	4	4

nd: 데이터 없음

- [0212]
- [0213] **점수화:**
- [0214] 0: 세포변성 효과 (CPE) 없음, 세포가 비감염된 대조군에서의 것과 동일한 것으로 보임
- [0215] 1: 매우 작은 부위가 낮은 수준의 CPE를 나타냄
- [0216] 2: 세포 배양물의 작은 부위에서 CPE가 관찰됨
- [0217] 3: CPE가 좀 더 강하기는 하지만, 감염된 대조군에서의 것만큼 강력하지는 않음
- [0218] 4: CPE는 감염된 대조군에서의 것만큼 강력함.
- [0219] 정량적 PCR 분석 결과, 아젤라스틴은 공동 투여 (예방 시뮬레이션)에서 최대 >99% 및 감염 후 투여 세팅 (노출 후 또는 요법 시뮬레이션)에서 최대 >97%까지 바이러스 입자수를 감소시키는 데 매우 효과적인 것으로 나타났으

며 (표 2), 이는 아젤라스틴이 예방 및 치료 세팅, 둘 모두에서 사용될 수 있다는 것을 시사한다. 예상대로 공동 투여가 더 효과적이지만, 25 μm 아젤라스틴 농도에서 낮은 바이러스 수는 진행 중인 감염을 예방할 수 있을 뿐만 아니라, 중단시킬 수 있다는 것을 보여준다.

**표 2**

아젤라스틴 농도 (μM)	바이러스 입자/μl	
	공동 투여	감염 후 투여
0	99.15	99.15
3,125	98.4	138
6,25	15.45	68.4
12,5	12.25	52
25	0.2	6.865

수치는 2-3회의 기술적 반복하에 농도당 최대 5개의 복제 샘플의 중앙값을 나타낸다 (동일한 생물학적 샘플로부터 정량적 PCR을 반복).

[0220]

[0221]

실시예 3: SARS-CoV-2에 의한 재구성된 인간 비강 조직의 바이러스 감염에 대한 효능

[0222]

인간 세포에서 SARS-CoV2에 대한 아젤라스틴-HCl의 효능을 확인하기 위해, 재구성된 인간 비강 3D 조직 (뮤클리에어, 시험관내에서 재구성된 3D 인간 기도 상피(3D Human Airway Epithelia))을 SARS-CoV-2로 감염시키고, 아젤라스틴을 함유하는 시판 비강용 스프레이로 처리하였다. 조직의 현미경 검사에 의해 세포변성 효과를 평가하고, 액적 PCR에 의해 바이러스 입자수를 측정하였다.

[0223]

실험 절차:

[0224]

건강한 기증자로부터 생성된 뮤클리에어 인간 비강 조직 (에피텔릭스 살(Epithelix Sarl: 스위스 제네바), 카탈로그 번호: EP02MP)을 정단부 측에서 다중 감염도 (MOI) 0.01로 SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 바이러스, hCoV-19/Hungary/SRC\_isolate\_2/2020, 수탁 ID: EPI\_ISL\_483637)로 감염시켰다. 5% CO<sub>2</sub> 중에서 37°C에서 20 min 인큐베이션 후, 바이러스 함유 배지를 완전히 제거하였다. 이어서, (뮤클리에어 배양 배지 중) 5배 희석된 알레르 고딜(Allergodil) 비강용 스프레이 (0.1% 아젤라스틴-HCl, 밀란(Mylan)) 용액을 20 min 동안 (200 μl의 부피로) 정단부 측에 첨가하였다. 처리 후, 희석된 비강용 스프레이를 세포 표면에서 완전히 제거하여 액체-공기 계면을 제공하고, 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 희석된 알레르 고딜로 20 min 치료처리하는 것을 감염 후 24 및 48시간째 (hpi)에 반복하였다. 24, 48 및 72 hpi 후, 세포의 정단부 측을 뮤클리에어 배양 배지로 15 min 동안 세척하고, 감염 바이러스 입자의 정량화를 위해 용액을 수집하였다. 또한, 48 및 72 hpi에 도입 현미경하에서 세포를 검사하였다.

[0225]

제조사에 지침에 따라 모나크 토탈 RNA 미니프랩 키트 (프로메가(Promega), 카탈로그 번호: T2010S)를 이용하여 정단부 세척액 (100 μl)으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 실시예 2에 기술된 바와 같이, 바이러스 카피수 정량화를 위해 액적 디지털 PCR 기술을 적용하였다 (바이오-레드 라보라토리즈 인크.(Bio-Rad Laboratories Inc.), QX200 액적 디지털 PCR 시스템(QX200 Droplet Digital PCR System)).

[0226]

결과:

[0227]

48 및 72시간째 조직의 현미경 분석 결과, 현미경 이미지에서 검은색 스팟이 완전히 없어진 것으로 관찰된 바와 같이, 대조군 세포 (바이러스 또는 약물 비처리, 세포 상에서 검은색 물질이 다량 관찰됨) 대비 감염된 세포에서 뮤신 생산이 감소된 것으로 나타났다 (도 3). 중요하게, 현미경 이미지에서 검은색 물질의 존재에 의해 입증된 뮤신 생산은 5배 희석된 알레르 고딜 처리 존재하에서 명백하게 입증되며, 음성 대조군 (바이러스 또는 약물 비처리)에서 관찰되는 것과 유사하다. 대조군 세포와 아젤라스틴 처리 세포 (바이러스 감염 없음)에서 조직 형태의 차이는 검출되지 않았고, 섬모 운동은 모든 조직에서 검출되었다.

[0228]

액적 디지털 PCR 분석 결과, 효과적인 SARS-CoV-2 감염 및 바이러스 복제와, 조직 삼입체의 정단부 구획에서 감염 후 72시간째까지 1 μl당 수천 개의 카피에 도달한 것을 확인할 수 있었다. 5배 희석된 비강용 스프레이 (0.02% 아젤라스틴 HCl)를 20분 동안 매일 사용하였을 때, 감염 후 48 및 72시간째까지 바이러스 입자수가 크게 감소하였다 (> 99.9% 억제) (표 3).

표 3

	정단부 세척액 중 바이러스 입자/ $\mu\text{l}$ (비처리 대비 상대적인 비율(%))		
	24h pi	48h pi	72h pi
비처리	0.68	444.67	3521.33
5배 희석된 알레르코딜	0.05 (7.88%)	0.03 (0.01%)	0.05 (0.001%)

[0229]

[0230]

실시예 4: 우려되는 B.1.1.7 및 B.1.351인 SARS-CoV-2 변종에 대한 아젤라스틴의 시험관내 효력 입증

[0231]

SARS-CoV-2 변종 바이러스에 대한 아젤라스틴-HCl의 항바이러스 효과를 검출하기 위해, ACE2 및 TMPRSS2 발현 Vero (원숭이 신장) 세포주를 아젤라스틴-HCl의 존재 또는 부재하에서 우려되는 B.1.1.7 및 B.1.351 변종으로 감염시키고, 정량적 PCR에 의해 바이러스 증식에 대한 효과를 평가하였다.

[0232]

실험 절차:

[0233]

Vero-TMPRSS2/ACE2를 이용한 SARS-CoV-2 감염 검정

[0234]

인간 세린 프로테아제 TMPRSS2 및 ACE2 수용체를 안정적으로 과다발현하는 Vero 세포 (문헌 [Riepler et al., Comparison of Four SARS-CoV-2 Neutralization Assays. Vaccines (Basel), 2020;9(1):13])를 감염 전날  $10^4$ /웰로 96-웰 플레이트 상에 시딩하였다. DMSO 중에 10 mM 농도로 용해된 아젤라스틴 히드록로라이드 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), PHR1636-1G, 로트 번호 LRAC4832)를 2% FBS를 함유하는 돌베코스 변형 이글 배지 (Dulbeccos's Modified Eagle Medium) (머크(Merck: 독일 다름슈타트))로 희석하여 최종 농도 범위가 50  $\mu\text{M}$  내지 0.4  $\mu\text{M}$  (2배 연속 희석액)이 되도록 만들었다. 세포 감염 전, 세포 배양 상청액을 흡인하고, 예방 (공동 투여) 세팅에서는 50  $\mu\text{l}$ 의 아젤라스틴-HCl 희석액으로 대체하고, 감염 후 세팅에서는 50  $\mu\text{l}$ 의 배지로 대체하였다. 각 아젤라스틴 농도에 대해 삼중으로 측정을 수행하였다. 이어서, B.1.1.7 또는 B.1.351 유형에 속하는 SARS-CoV-2 분리주로 세포를 MOI 0.01로 37°C에서 30분 동안 감염시켰다. 두 실험 세팅에서 모두 상청액을 흡인하고, 신선한 배지 50  $\mu\text{l}$  및 전에 사용한 것과 동일한 농도의 아젤라스틴 50  $\mu\text{l}$ 로 대체하여 25  $\mu\text{M}$  내지 0.2  $\mu\text{M}$  범위의 아젤라스틴 농도를 얻었다. 감염 후 48시간째, 세포변성 효과를 평가하고, 상청액을 DLR 완충제 (0.5% IGEPAL, 10 mM 트리스(Tris)-HCl 완충제 중 25 mM NaCl, 15  $\mu\text{l}$  리보록 RNase 억제제(RiboLock RNase Inhibitor) (써모사이언티픽(ThermoScientific), 40 U/ $\mu\text{l}$ , E00381 (DLR 완충제 1 ml당))와 1:1 비로 혼합하여 바이러스 RNA를 단리시켰다. E 유전자 특이적 프라이머 (5' ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT 3' (서열 번호: 5) 및 5' ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A3' (서열 번호: 6)), FAM-표지된 프로브 (FAM-ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG-BHQ1 (서열 번호: 7)) 및 iTaq 범용 프로브 1-단계 키트(iTaq Universal Probes One-Step Kit) (바이오래드, 카탈로그 번호 1725141)를 사용하여 qPCR을 통해 SARS-CoV-2 게놈 카피를 정량화하였다. 사내 생산된 시험관내 전사된 RNA 표준 (SARS-CoV-2의 E 유전자)를 사용하여 qPCR 결과를 정량화하였다. 아젤라스틴 처리를 하지 않은 바이러스 단독 웰을 100%로 설정하고, 바이러스 단독 웰 대비 각 샘플에 대한 억제율(%)을 계산하였다.

[0235]

결과:

[0236]

정량적 PCR 분석 결과, 아젤라스틴은 예방 (공동 투여) 및 감염 후 (노출 후 또는 요법 시뮬레이션) 투여 세팅, 둘 모두에서 바이러스 입자수를 감소시키는 데 매우 효과적이었다 (표 4&5 및 도 4). 야생형 바이러스의 결과와 유사하게, 공동 투여가 다소 더 효과적이지만, 12.5  $\mu\text{M}$  아젤라스틴 농도에서 낮은 바이러스 수 (90% 초과로 억제)는 진행 중인 감염을 예방할 수 있을 뿐만 아니라, 중단시킬 수 있다는 것을 보여준다. 감염의 50%를 억제하는 데 필요한 유효 아젤라스틴 농도 (EC50)는 세팅 및 바이러스 돌연변이체에 따라 4 내지 6.5  $\mu\text{M}$ 이었고, 이는 야생형 바이러스에서 관찰된 EC50 범위 (~6  $\mu\text{M}$ ) 내에 있다. 이는 SARS-CoV-2에 대한 아젤라스틴의 효능이 신종 고위험 돌연변이와 무관하다는 것을 입증한다.

**표 4**

표 4: B.1.351

아젤라스틴 농도 ( $\mu\text{M}$ )	감염 억제 (아젤라스틴 비처리 세포 대비)	
	예방 세팅	치료 세팅
<b>3,125</b>	32.87%	22.01%
<b>6,25</b>	74.86%	54.97%
<b>12,5</b>	99.12%	97.62%

수치는 각각 농도당 3개의 복제 샘플 (총 9개)을 이용한 3회의 독립 실험의 평균값을 나타낸다.

[0237]

**표 5**

표 5. B1.1.7

아젤라스틴 농도 ( $\mu\text{M}$ )	감염 억제 (아젤라스틴 비처리 세포 대비)	
	예방 세팅	치료 세팅
<b>3,125</b>	23.76%	2.57%
<b>6,25</b>	72.79%	47.40%
<b>12,5</b>	98.81%	91.71%

수치는 각각 농도당 3개의 복제 샘플 (총 6개)을 이용한 2회의 독립 실험의 평균값을 나타낸다.

[0238]

[0239]

결론:

[0240]

본 데이터는 아젤라스틴 화합물이 세포에 적용되자마자 즉시 SARS-CoV-2 돌연변이체 B.1.351 및 B.1.1.7에 의한 감염을 중단시킬 수 있었다는 것을 시사한다. 바이러스는 증식하고, 체내로 확산되기 위해서는 세포에 진입하여야 하는 바, 아젤라스틴은 바이러스가 인체에 감염되는 곳인 호흡기 점막 표면에서 바로 COVID-19를 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

[0241]

실시예 5: SARS-CoV-2에 의한 Calu-3 세포의 바이러스 감염 예방

[0242]

인간 폐 선암종 세포주인 표면 프로테아제 TMPRSS2를 발현하는 세포에 대한 아젤라스틴-HCl의 항바이러스 효과를 확인하기 위해, Calu-3을 아젤라스틴-HCl의 존재 또는 부재하에서 SARS-CoV-2로 감염시키고, 48 h 후 바이러스 입자수를 측정하였다.

[0243]

실험 절차:

[0244]

Calu-3 (ATCC® HTB-55™)을 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 2일 후, 세포가 전면생장에 도달하였을 때, 배양물에 신선한 세포 배양 배지 (EMEM+10%FBS+ 1% P/S, 1% L-글루타민, 1% 비필수 아미노산)를 공급하였다. 아젤라스틴-HCl (셀렉캠 카탈로그 번호 S2552, DMSO 중에 용해된 10 mM 스톡 용액) 및 히드록시클로로퀸 술페이트 (TCI 카탈로그 번호 H1306, H2O 중에 용해되고, 멸균 여과된 10 mM 스톡)를 50 및 25  $\mu\text{M}$  최종 농도로 세포 배양 배지에 첨가하였다 (배양 배지 중에서 희석액을 제조하였다). 히드록시클로로퀸 술페이트는 Vero E6 세포 (TMPRSS2를 발현하지 않음)에 대해 강력한 항-SARS-CoV-2 효과를 나타내지만, Calu-3 세포를 비롯한, 표면 프로테아제 TMPRSS2를 발현하는 세포에서 시험하였을 때에는 이의 효력을 크게 상실하였다 (문헌 [Hoffmann et al. Nature 2020, 585:588-590] 참조).

[0245]

Vero E6 세포에서 증식시켜 바이러스 스톡을 제조하고, 감염 역가를 측정하였다. 바이러스 감염을 위해, SARS-

CoV-2 바이러스를 배양 배지 교체 후 즉시 (기본적으로 동시에) MOI 0.01 (다중 감염도: 100개의 세포에 대해 1개의 바이러스 입자)로 상청액에 첨가하였다. 바이러스와 함께 30 min 인큐베이션시킨 후, 배양 배지를 제거하고, 상기 농도의 아젤라스틴-HCl 또는 히드록시클로로퀸 술페이트를 함유하는 신선한 배양 배지로 교체하였다. 감염 후 48시간째, 정량적 PCR 분석을 위해 상청액을 수집하고, -80°C에서 보관하였다. 제조사의 지침에 따라 모나크 토탈 RNA 미니프랩 키트 (뉴 잉글랜드 바이오랩스, 카탈로그 번호: T2010S)를 이용하여 배양 상청액 샘플로부터 바이러스 RNA를 추출하였다. 간략하면, 300 µl 용해 완충제를 100 µl 배양 상청액과 혼합하고, 전용 컬럼을 이용하여 gDNA 오염을 제거하고 (DNA 유지), RNA를 함유하는 통과액을 RNA 결합 컬럼에 적용하였다. 컬럼을 세척한 후, RNA를 H<sub>2</sub>O로 용출시키고, 샘플을 분석할 때까지 -80°C에서 보관하였다. 역전사 반응 후, 1-스텝 RT-ddPCR 어드밴스드 키트 포 프로브즈(1-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes) (바이오래드 ddPCR™, 카탈로그 번호 1864021 및 1864022, <https://www.bio-rad.com/de-at/product/1-step-rt-ddpcr-advanced-kit-for-probes?ID=NTGCR115>)를 이용하여 DNA를 RdRp 유전자로부터의 F, R 및 P2 프라이머로 증폭시켰다.

2019 신종 코로나바이러스에 대한 프라이머 및 프로브, 실시간 RT-PCR		
검정법/용도	올리고뉴클레오타이드	시열 <sup>a</sup>
RdRP 유전자	RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG 시열 번호: 8
	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ 시열 번호: 9
	RdRp_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ 시열 번호: 10
	RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA 시열 번호: 11
E 유전자	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT 시열 번호: 12
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ 시열 번호: 13
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA 시열 번호: 14
N 유전자	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC 시열 번호: 15
	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ 시열 번호: 16
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG 시열 번호: 17

<sup>a</sup> W는 A/T이고; R은 G/A이고; M은 A/C이고; S는 G/C이다. FAM: 6-카복시플루오레세인; BBQ: 블랙베리 소광제.

<sup>b</sup> 최적화된 농도는 최종 반응 믹스에 기초하여 나노몰/리터 (nM)로 제공, 예컨대, 상기 표에 명시된 바와 같이, 전체 반응 부피 25 µl당 1.5 µl의 10 µM 프라이머 스톱 용액을 통해 600 nM의 최종 농도를 수득할 수 있다.

[0246]

[0247]

RT-PCR 반응 결과를 정량화하고, 바이러스 카피수/µl로서 계산하고, 감염된 모의 처리된 (완충제) 세포 (양성 대조군)에서 측정된 카피수와 비교하였다.

[0248]

동시에, 제조사의 지침에 따라 셀타이터-글로® 2.0 세포 생존능 검정법(CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay) (프로메가® 카탈로그 번호 G9241)을 이용하여 48h 동안 아젤라스틴-HCl 또는 히드록시클로로퀸 술페이트로 처리된 비감염된 Calu-3 세포에서 세포 생존을 측정하였다. 간략하면, 셀타이터-글로® 2.0 시약을 배지의 것과 동일한 부피로 세포에 첨가하고, 실온에서 10분 동안 인큐베이션시켰다. 발광 신호를 측정하고, 비처리 세포 (음성 대조군)로 측정된 신호와 비교하였다.

[0249]

결과:

[0250]

정량적 PCR 분석 결과, 아젤라스틴-HCl이 50 µM 농도에서 최대 >99%로, 및 25 µM 농도에서 90% 초과로 인간 폐 선암종 세포의 바이러스 입자수를 감소시키는 데 매우 효과적인 것으로 나타났으며 (도 6), 이를 통해 아젤라스틴이 표면 프로테아제 TMPRSS2를 발현하고, SARS-CoV-2 감염과 가장 관련성이 높은 인간 호흡기 상피 세포에 대해 이의 항-SARS-CoV-2 효과를 발휘한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0251]

실시예 6: 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV)에 의한 HEp-2 세포 감염 예방 및 치료

[0252]

아젤라스틴-HCl의 광범위한 항바이러스 효과를 확인하기 위해, HEp-2 세포 (ATCC CCL-23)를 아젤라스틴-HCl의 부재 또는 존재하에서 RSV로 감염시켰다. 아젤라스틴-HCl을 3가지 세팅에서 시험하였다: 예방적 (아젤라스틴-HCl 처리 후 감염), 공동 투여 (동시에 감염 및 아젤라스틴-HCl 처리된 세포) 및 치료 세팅 (감염 후 1h째 아젤라스틴-HCl로 처리된 감염된 세포). 스팟수 및 바이러스 게놈 카피수를 측정하고, 완충액으로 처리된 세포와 비교하였다.

[0253]

실험 절차:

[0254] DMSO 중에서 제조된 10 mM 스톡을 이용하여 아젤라스틴-HCl (시그마(Sigma) 카탈로그 번호 PHR1636-1G)을 0.4 내지 25  $\mu$ M 농도 범위에서 항-RSV 활성에 대하여 시험하였다.

[0255]  $1 \times 10^4$  개의 HEp-2 세포 (ATCC CCL-23)를 96-웰 플레이트에 시딩하고, 10% FCS 및 2 mM L-글루타민으로 보충된 50  $\mu$ l/웰의 DMEM 배지에서 3시간 동안 37°C하에 5% CO<sub>2</sub> 및 100% 습도에서 배양하였다. 3시간 후, 세포는 부착에 도달하였고, MOI 0.01로 RSV 롱(RSV Long) 균주 (ATCC VR-26, 세포 요법 및 면역학을 위한 프라우호퍼 연구소 (Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology: 독일 라이프치히)의 T. 그룬발트(T. Grunwald)에 의해 친절하게 기증받음)로 감염시켰다. 아젤라스틴-HCl을 감염 1 h 전, 감염과 동시에 또는 감염 후 1 h째에 세포에 첨가하였다. 아젤라스틴-HCl 스톡을 (DMEM/10% FCS/2 mM L-글루타민)로 연속 희석하여 의도된 최종 농도에 도달하도록 하였다. DMSO를 동일한 방식으로 희석하고, 비히클 대조군으로서 세포에 첨가하였다. 감염 및 처리된 세포를 총 부피 200  $\mu$ l로 48 h 동안 37°C하에 5% CO<sub>2</sub> 및 100% 습도에서 인큐베이션시켰다. RSV에 대한 폴리클로날 염소 항체 (항-RSV Gt X(IgG Frac), 머크) 및 HRP-접합된 토끼 폴리클로날 항염소 IgG (노부스바이오 (Novusbio))로 면역세포화학적으로 염색하여 RSV 감염 플라크를 측정하였다. 3-아미노-9-에틸카르바졸 (AEC, 시그마)을 RSV 감염 세포를 시각화하기 위한 면역조직화학에서 크로모젠으로 사용하였다. 스팟을 수동으로 계수하였다. 이전에 문헌 [Wilmschen et al. (Vaccines, 2019, 7:59)]에 기술된 바와 같이 프라이머s RSV-1 (5'TCA ACT TCT GTC ATC CAG CAA-3', 서열 번호: 18) 및 RSV-2 (5'CAT CAT AAT TAG GAG TAT CAA T-3', 서열 번호: 19)를 사용하여 RT-PCR에 의해 바이러스 게놈 카피수를 측정하였다. 아젤라스틴-HCl 처리 후 수득된 Ct 값을 단독으로 비히클로 처리된 세포와 비교하였다. 비히클 대비 처리된 샘플에서의 바이러스 게놈 카피수를 계산하기 위해, 본 발명자들은 하기 공식을 사용하였다: 1 Ct 증가는 50% 더 낮은 카피수와 같다.

[0256] HEp-2 세포에 대한 아젤라스틴-HCl의 세포독성은 바이탈 염료인 프로피디움 아이오다이드를 사용하는 유세포 분석법 기반 검정법으로 측정하였다.

[0257] 실험은 독립적으로 3-4회 수행하였다.

[0258] 결과:

[0259] 아젤라스틴-HCl은 12.8 및 25.6  $\mu$ M 농도에서 HEp-2 세포에 대해 세포독성을 보였다 (도 7). 그러므로, 아젤라스틴-HCl의 효과를 6.4  $\mu$ M 이하의 농도에서 평가하였다. 스팟 계수에 의해 측정된, 세포의 RSV 감염은 3개의 세팅에서 모두 비히클 (DMSO) 처리된 대조군과 비교하여 3.2 및 6.4  $\mu$ M 농도에서 ~50%로 감소되었고 (도 8), 이는 HEp-2 세포의 RSV 감염에 대한 아젤라스틴-HCl의 강력한 예방적 및 치료적 효과를 시사한다. 바이러스 게놈 카피수 측정을 통해 6.4  $\mu$ M 아젤라스틴-HCl 농도에서의 상기 효과를 확인할 수 있었다 (표 6).

**표 6**

표 6. RSV로 감염된 HEp-2 세포에서 6.4  $\mu$ M 아젤라스틴-HCl 처리가 바이러스 게놈 카피수에 미치는 효과

	공동 투여	예방	치료	DMSO (완충제 대조군)
<b>Ct (실험 #1)</b>	27.99	27.5	27.95	26.89
<b>Ct (실험 #2)</b>	27.21	27.17	27.27	26.3
DMSO 대비 바이러스 게놈 카피 (실험 #1)	46.65%	65.52%	47.96%	100%
DMSO 대비 바이러스 게놈 카피 (실험 #2)	53.22%	54.71%	51.05%	100%

Ct: PCR 반응에서 사이클 임계값

[0260]

- [0261] 실시예 7. 인플루엔자 A 바이러스 H1N1에 의한 뮤클리에어™ 감염 예방
- [0262] 공기-액체 계면에서 배양된 완전히 분화된 인간 비강 상피 세포 (뮤클리에어™ 풀(MucilAir™ Pool), 에피텔릭스 살 - 14명의 상이한 정상 비강 기증자의 풀로부터의 1차 세포)에서 아젤라스틴-HCl 코 스프레이 (폴리발 (Pollival), 우루사팜 아르즈나이미텔(UrsaPharm Arzneimittel))의 반복 투약이 인플루엔자 H1N1 감염에 미치는 효과를 시험하였다.
- [0263] 실험 절차:
- [0264] 문헌 [Boda et al., (Antiviral Research 156 (2018) 72-79)]에 기술된 바와 같이 인플루엔자 H1N1에 대한 아젤라스틴-HCl의 항바이러스 효과를 시험하였다. 간략하면, 뮤클리에어™ 풀의 정단부를 뮤클리에어™ 배양 배지 (10 min 동안 200  $\mu$ l)로 세척한 후, 코 스프레이 폴리발® (우루사팜 아르즈나이미텔 게엠베하(Ursapharm Arzneimittel GmbH))로부터 그 자체의 희석제로 희석된 0.02 또는 0.01% 농도의 10  $\mu$ l의 아젤라스틴-HCl을 10 분 동안 뮤클리에어™ 정단부 측에 적용하였다. 이후, 1 ml당 10<sup>6</sup>개의 계놈 카피수의 스톱으로부터의 100  $\mu$ l의 인플루엔자 H1N1 (ATCC VR-95)을 정단부 측에 적용하고, 3 h 동안 인큐베이션시켰다. 200  $\mu$ l의 뮤클리에어 배양 배지로 세포의 정단부 측을 3회 세척하여 (20 min 인큐베이션) 접종물을 세척하였다. 세 번째 세척 후, 동일한 농도의 아젤라스틴-HCl을 10  $\mu$ l 부피로 세포의 정단부 측에 첨가하고, 21 h 동안 인큐베이션시켰다. 24 h, 48 및 72 h 시점에, 뮤클리에어™ 세포 세척을 반복한 후, 상기와 같이 정단부 측에서 아젤라스틴을 대체하였다. 각 시점에 정단부 세척액으로부터 바이러스 카피수를 측정하였다. 기본 배양 배지 또한 제거하고, 매일 500  $\mu$ l의 신선한 배양 배지로 대체하였다. 기본 세척액으로부터 (96 h 세포 사멸을 평가하기 위해) LDH 방출을 측정하고, 48 h 및 96 h 시점에 시토카인 수준 (IL-8 및 RANTES)을 측정하였다. 모든 인큐베이션 단계는 34°C하에 5% CO<sub>2</sub> 및 100% 습도에서 수행하였다. 세척된 정단부로부터 바이러스 카피수를 측정하였고; 이를 위해, QIAamp® 바이러스 RNA 키트 (키아젠(Qiagen))로 RNA를 추출하고, qTOWER3 검출 시스템을 이용하여 RT-PCR (퀀티텍 프로브 RT-PCR(QuantyTect Probe RT-PCR), 키아젠)에 의해 바이러스 RNA를 정량화하였다. Ct 데이터를 표준 곡선으로 기록하고, 계놈 카피수/ml로 표시하였다.
- [0265] 음성 대조군으로서, 비감염된 세포를 포함하였다. 양성 대조군으로서, 인플루엔자 H1N1로 감염되며, 오직 완충제로만 처리된 세포를 사용하였다. 아젤라스틴-HCl의 항바이러스 효과를 기저측 구획 중의 감염된 세포에 첨가된 오셀타미비르 카르복실레이트 (카보신스(Carbosynth: 영국 콤프틴))로부터의 오셀타미비르, 10  $\mu$ M)의 효과와 비교하였다. 화합물을 삼중으로 시험하였다.
- [0266] 결과:
- [0267] 상기 두 농도 모두 아젤라스틴-HCl로 뮤클리에어™ 세포를 처리하였을 때, 완충제로 처리된 세포와 비교하여 감염 후 24 h째의 바이러스 계놈 카피는 통계상 유의적으로 감소되었다. 바이러스 카피 감소는 0.02% 아젤라스틴-HCl에서는 ~1.9 로그 (98.74% 감소)이고, 0.01% 아젤라스틴-HCl에서는 ~0.9 로그 (87.4% 감소)였다 (도 9).
- [0268] 추가로, 아젤라스틴-HCl은 뮤클리에어™의 H1N1 감염 동안 항염증성 효과를 보였고; 두 IL-8 (도 10/a) 및 RANTES (도 10/b) 수준 모두 감염 후 2일째 및 4일째 완충제 대조군과 비교하여 유의적으로 감소되었다.
- [0269] 0.02% 농도의 아젤라스틴-HCl은 비감염된 세포에서 약간의 세포독성 (6.5%)을 보였지만, 감염된 세포 또는 더 낮은 농도(0.01%)에서는 세포독성을 보이지 않았다.
- [0270] 실시예 8: 아데노바이러스에 의한 A549 세포의 감염 예방 및 치료
- [0271] 아젤라스틴-HCl의 광범위한 항바이러스 효과를 확인하기 위해, 인간 폐 암종 세포 (A549)를 아젤라스틴-HCl의 부재 또는 존재하에서 아데노바이러스로 감염시켰다. 아젤라스틴-HCl을 공동 투여 및 치료 세팅에서 시험하였다.
- [0272] 실험 절차:
- [0273] DMSO 중에서 제조된 10 mM 스톱을 이용하여 아젤라스틴-HCl (시그마 카탈로그 번호 PHR1636-1G)을 0.78 내지 50  $\mu$ M 농도 범위에서 항-아데노바이러스 활성에 대하여 시험하였다.
- [0274] 3x10<sup>4</sup>개의 A549 세포 (ATCC CCL-185™)를 100  $\mu$ l 완전 성장 배지 (DMEM, 고 글루코스, 글루타맥스(GlutaMAX)™

보충제, 10% FBS 포함, QUALIFIED, HI 500ML, 카탈로그 번호: 10500064, 로트 번호: 08Q6291K) 중 96-웰 플레이트에 시딩하고, 37°C하에 5% CO<sub>2</sub> 및 100% 습도에서 인큐베이션시켰다. 24 h 후, MOI 0.01 TCID<sub>50</sub>의 아데노바이러스 hAdv5 (ATCC VR-5)와 함께 25  $\mu$ l 신선한 배지를 세포에 첨가하여 감염을 개시하였다. 공동 투여 세팅에서, 완전 성장 배지 중에 희석된 25  $\mu$ l의 아젤라스틴-HCl을 감염과 동시에 세포에 첨가하였다. 치료 세팅에서는, 아젤라스틴-HCl을 감염 후 6 h째에 세포에 첨가하였다. 세포를 감염 후 48시간째 37°C하에 5% CO<sub>2</sub> 및 100% 습도에서 인큐베이션시켰다. 이후, 플레이트를 -80°C에서 냉동시키고, 냉동-해동 사이클을 3회 수행하여 바이러스를 방출시켰다. 제조사의 지침에 따라 아데노-X™ 래피드 타이터 키트(Adeno-X™ Rapid Titer kit) (웰당 3회 반복, 클론테크(Clontech), 다카라 바이오(Takara Bio), 카탈로그 번호 PT3651-2)에 의해 바이러스 역가를 측정하였다.

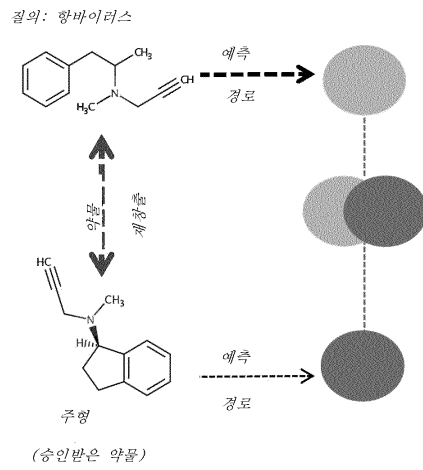
[0275]

상기 기술된 것과 동일한 프로토콜을 사용하되, 단, 세포를 아데노바이러스로 감염시키지 않은 상태에서 셀타이터 글로 검정법(CellTiter Glo Assay) (프로메가: 미국)를 이용하여 비감염된 A549 세포에 대한 아젤라스틴의 세포독성을 측정하였다.

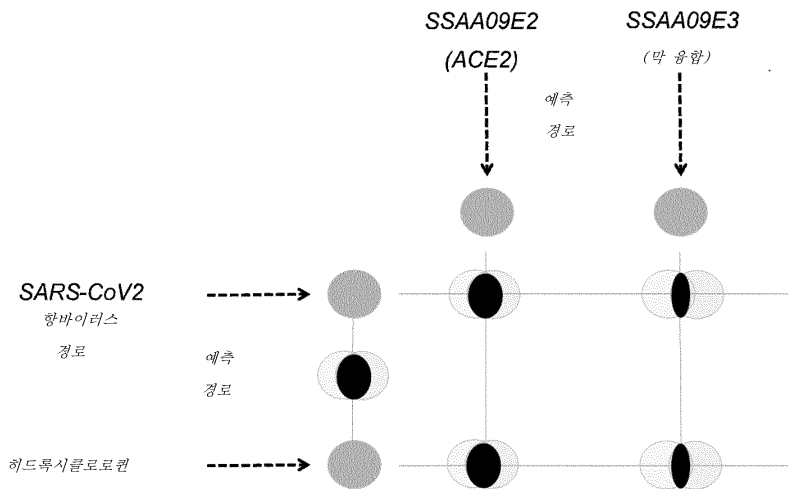
도면

도면1

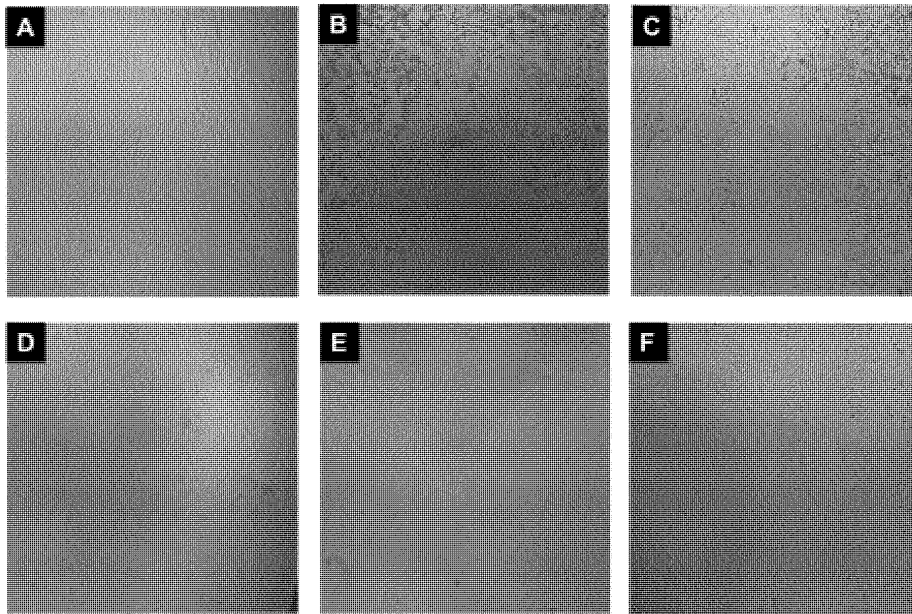
(A)



(B)

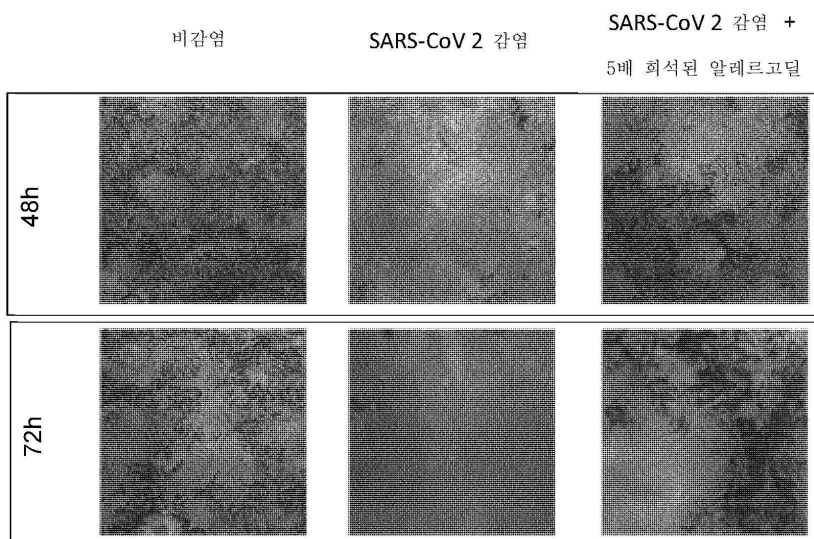


도면2

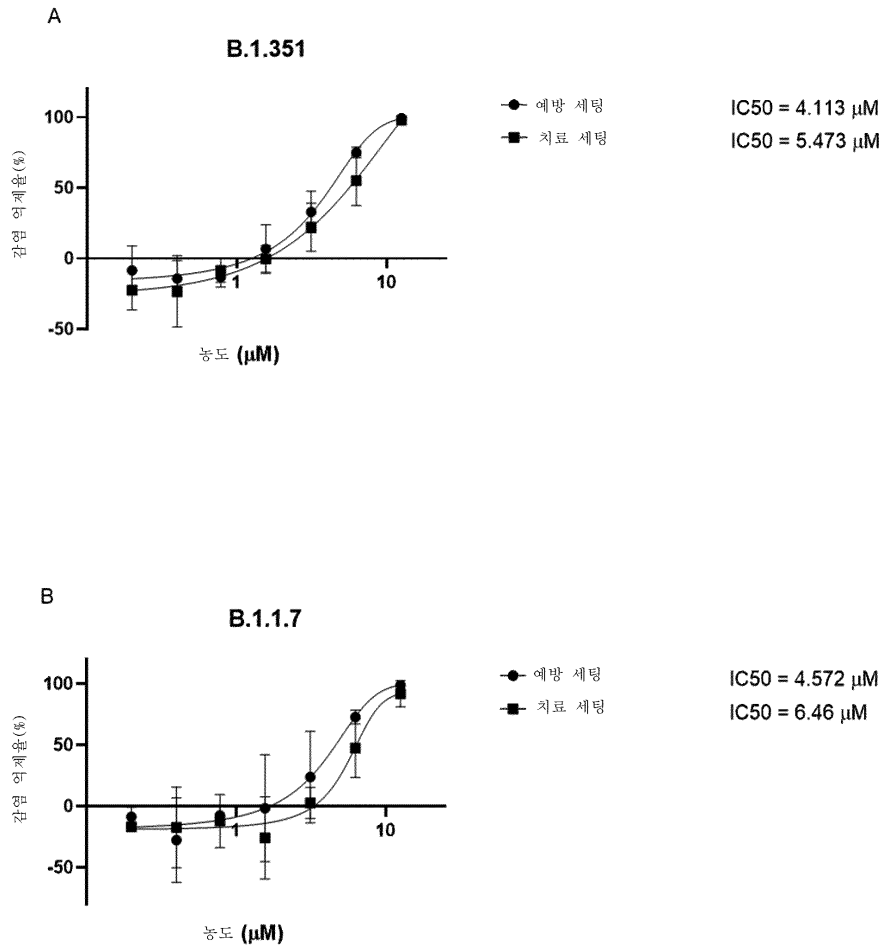


- A:** 비감염 (음성) 대조군
- B:** 감염된 바이러스 (양성) 대조군
- C:** 바이러스 + 3.125  $\mu\text{M}$  아젤라스틴-HCl
- D:** 바이러스 + 6.25  $\mu\text{M}$  아젤라스틴-HCl
- E:** 바이러스 + 12.5  $\mu\text{M}$  아젤라스틴-HCl
- F:** 바이러스 + 25  $\mu\text{M}$  아젤라스틴-HCl

도면3



도면4



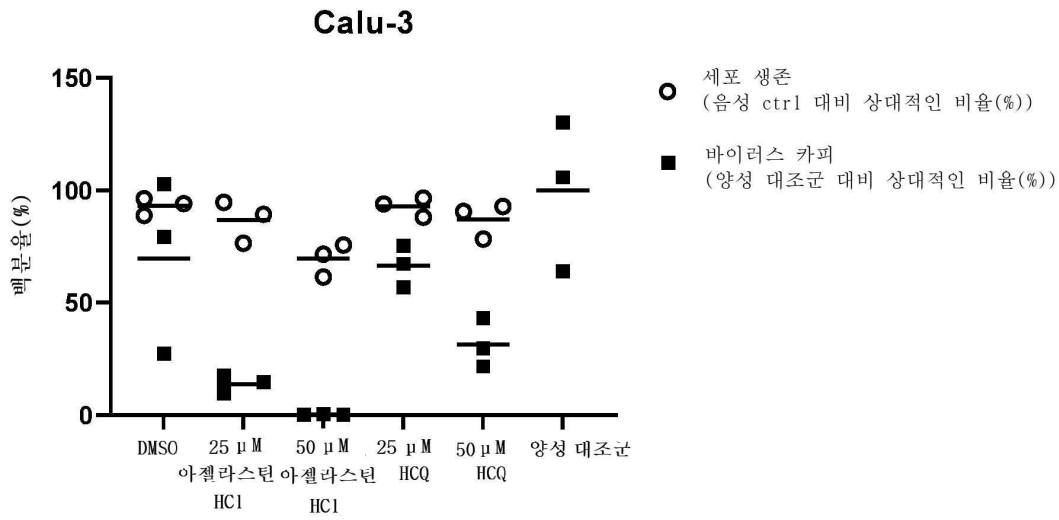
도면5

서열 번호 4: SARS-CoV-2, S-단백질

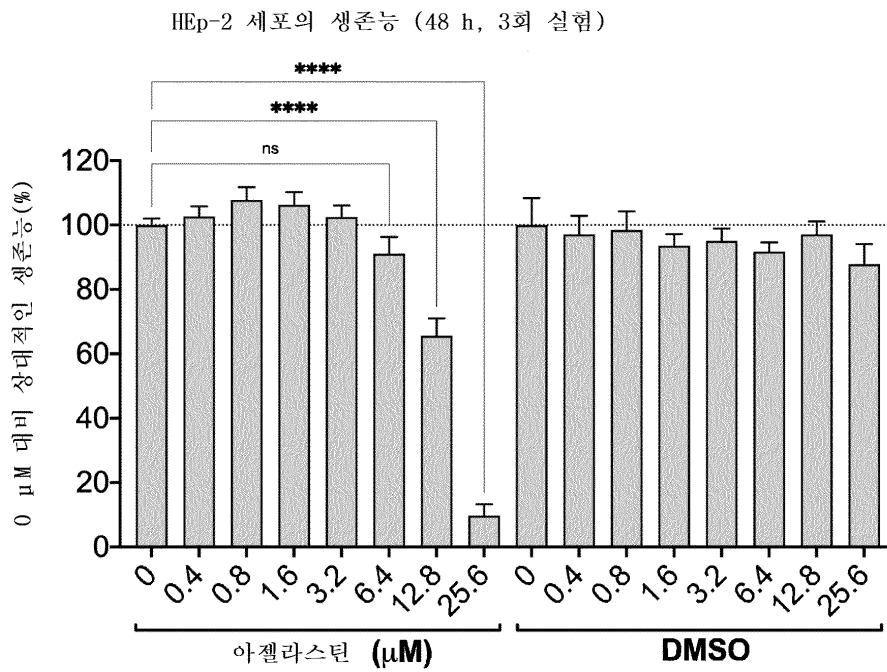
NCBI 수탁 번호 QII57161.1 (인간 SARS-CoV-2, S-단백질)

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPFPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHV  
 SGTNGTKRFNDPVLFPNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLLIIVNNATNVVVKVCFQFCNDPF  
 LGVYHKKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLRFEVFKNIDGYFKIYSKHTPI  
 NLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAAYVGYLQPRTPFLKYN  
 ENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPEGEVFNATRFASV  
 YAWNRRKRSNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIAD  
 YNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDKVGNNYLYRFLFRKSNLKPFFERDISEIYQAGSTPCNGVEGFNCYF  
 PLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNENFNGLTGTGVLTESNKKFL  
 PFQQFGRDIADTTDAVRDPQLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLQDVNCTEVPVAIHADQLT  
 PTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSEYCDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIAYTMSLG  
 AENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLYGSEFCTQLNRALTGI  
 AVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSPKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGD  
 LGDIAARDLCAQKFNGLTVLPPLLTDEMIQYTSALLAGTITSGWTFGAGAAALQIPFAMQMAYRFNGIG  
 VTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDLSSTASALGKLDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDI  
 LSRLDKVEAEVQIDRLITGRQLSQTYYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGGQSKRVDPCGKGYHLM  
 SFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAI CHDGHKAFHPREGVFSVNGTHWFVTRNFYEPQIITTDNT  
 FVSGNCDVVIIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVNNIQKEIDRLNEVA  
 KNLNESLIDLQELGKYEYQIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCCLKGCSCGSCCKFDEDD  
 SEPVLKGVKLLHYT

도면6



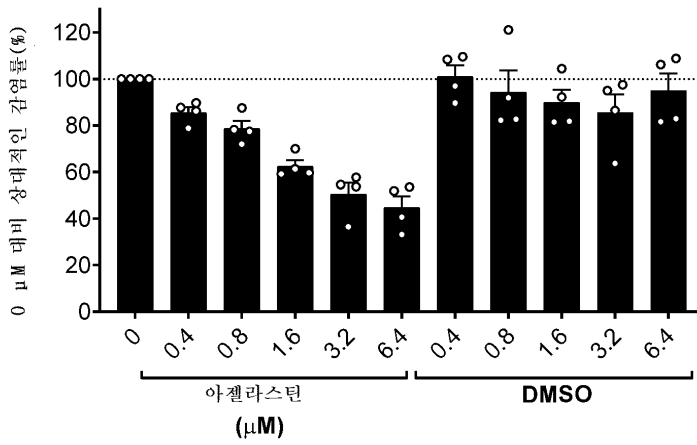
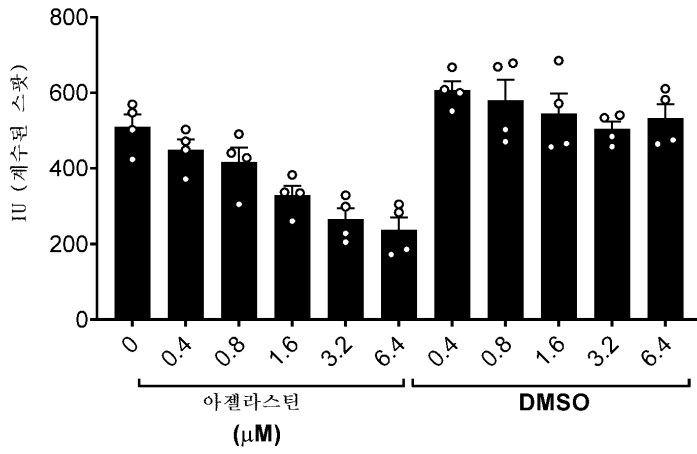
도면7



도면8a

A

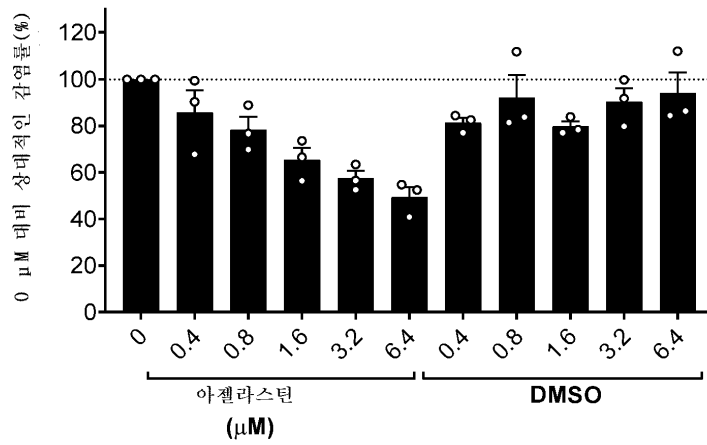
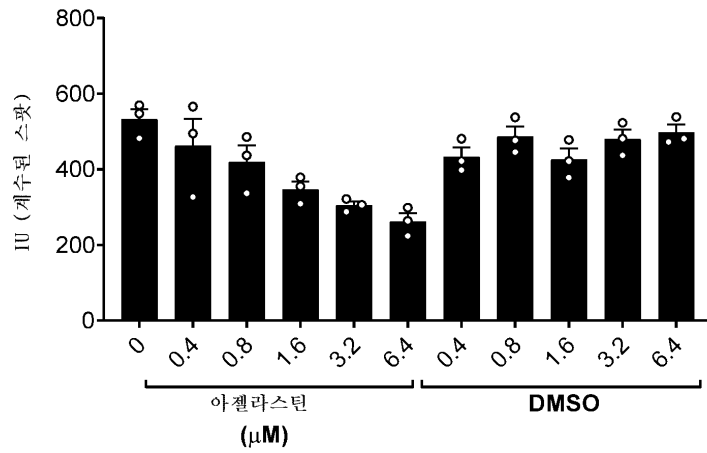
RSV 감염 (MOI 0.01) 전  
아젤라스틴과 함께 1시간 사전 인큐베이션



도면8b

B

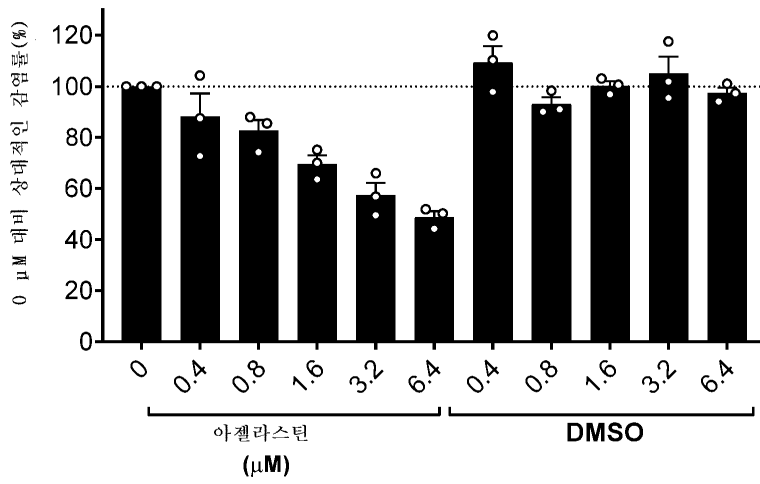
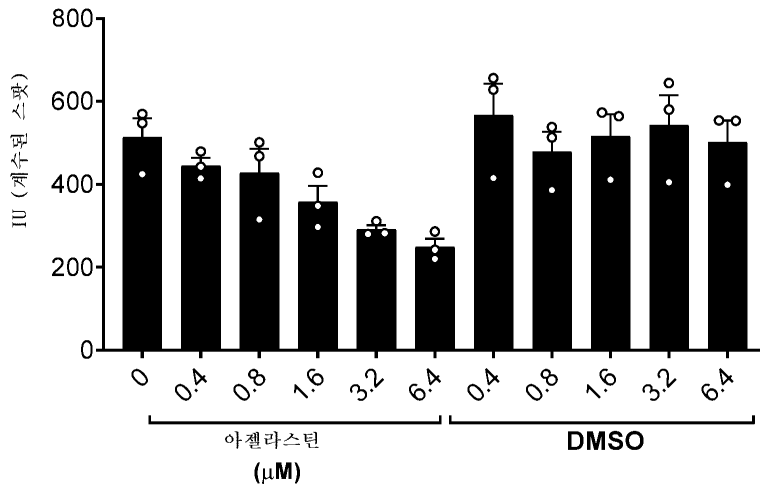
RSV 감염 (MOI 0.01) 시점에  
아젤라스틴



도면8c

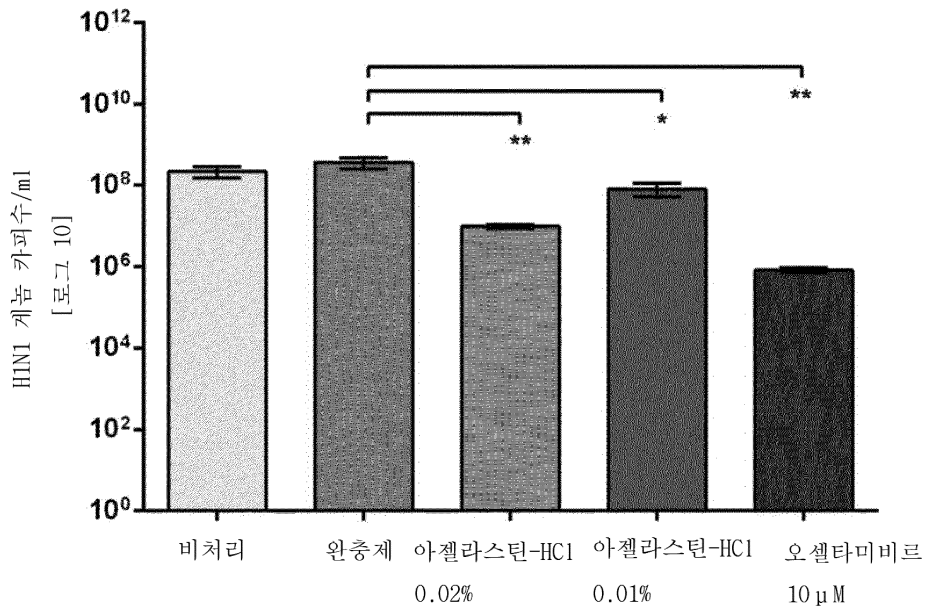
C

RSV 감염 (MOI 0.01) 후 1시간째  
아젤라스틴



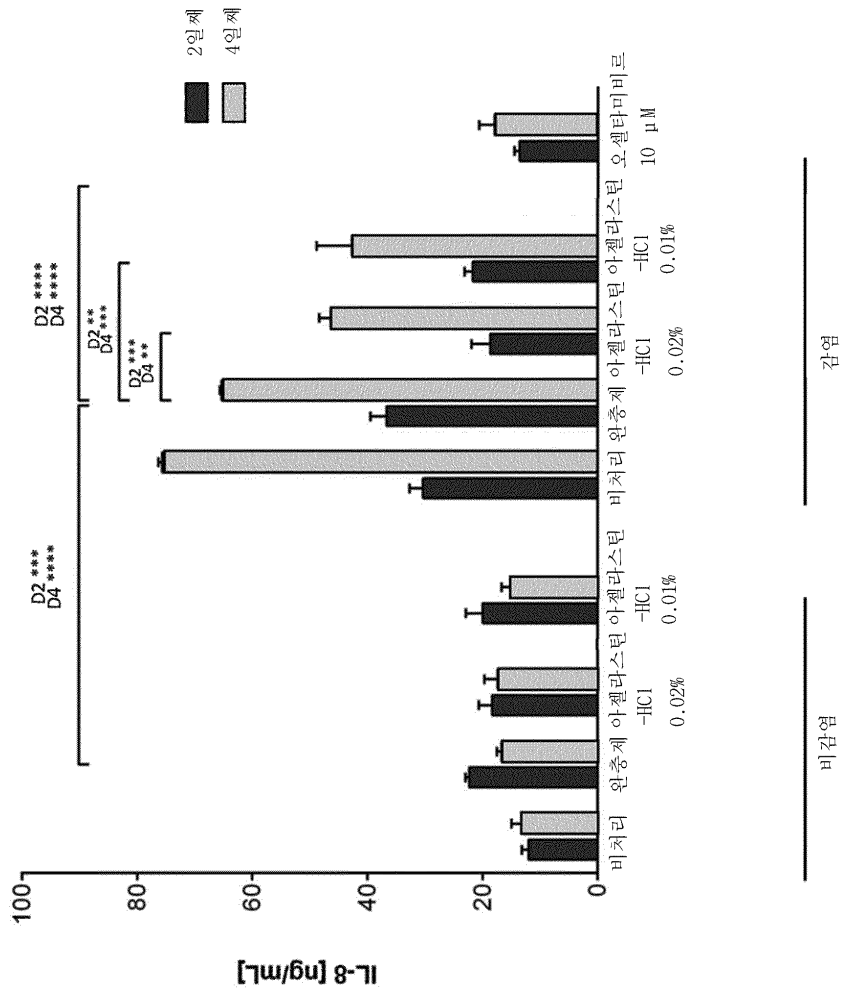
도면9

아젤라스틴-HCl이  
H1N1 정단부 복제에 미치는 효과 (감염 후 24 h째)

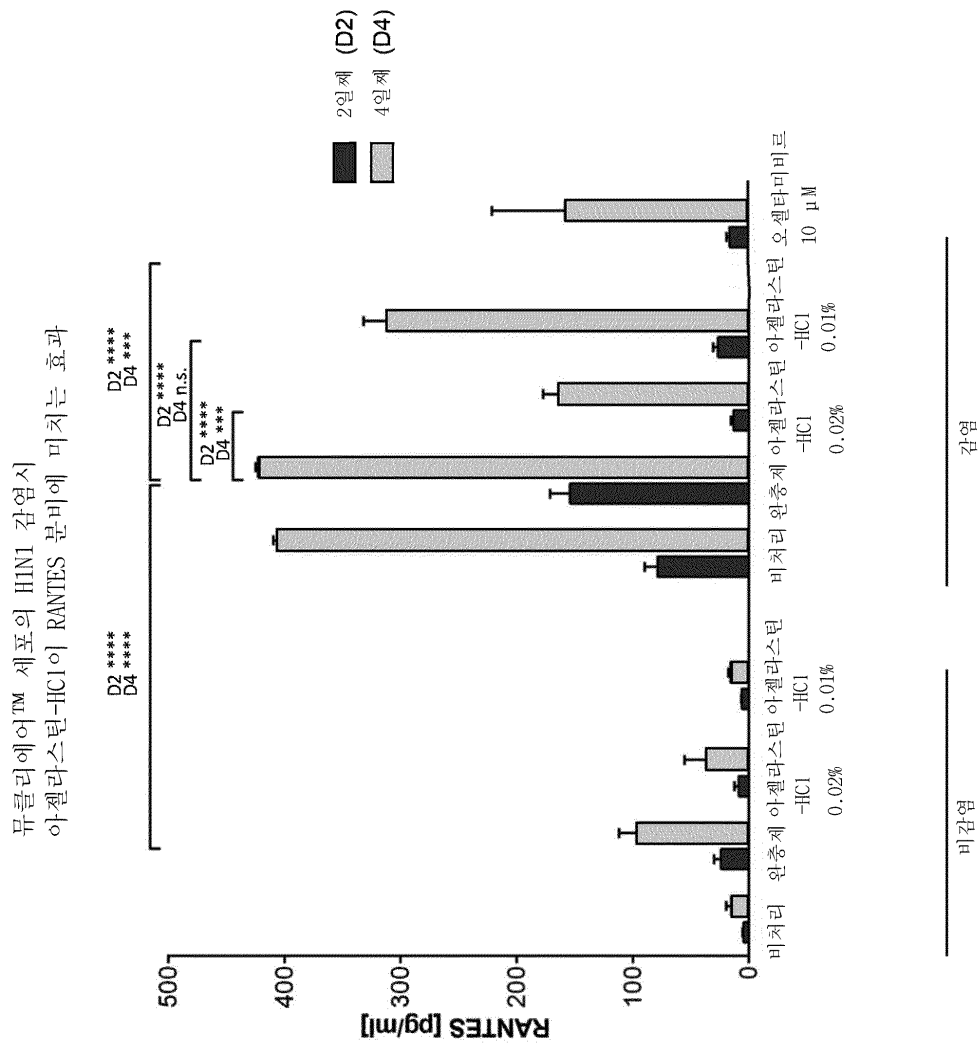


도면10a

뮤클리에어™ 세포의 H1N1 감염시  
아젤라스틴-HCl이 IL-8 분비에 미치는 효과



도면10b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> CEBINA GmbH

<120> ANTIVIRAL TREATMENT

<130> CB001P

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer  
 <220><221> R  
 <222> (3)..(3)  
 <223> is G/A  
 <220><221> S  
 <222> (12)..(12)  
 <223> is G/C  
 <400> 1  
 caratgttaa asacactatt agcata 26  
 <210> 2  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <220><221> R  
 <222> (5)..(5)  
 <223> is G/A  
 <400> 2  
 gtgaratggt catgtgtggc gg 22  
 <210> 3  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Probe  
 <400> 3  
 caggtggaac ctcatcagga gatgc 25  
 <210> 4  
 <211> 1273  
 <212> PRT  
 <213> SARS-CoV-2  
 <400> 4  
 Met Phe Val Phe Leu Val Leu Leu Pro Leu Val Ser Ser Gln Cys Val  
 1 5 10 15

Asn Leu Thr Thr Arg Thr Gln Leu Pro Pro Ala Tyr Thr Asn Ser Phe  
 20 25 30  
 Thr Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Lys Val Phe Arg Ser Ser Val Leu  
 35 40 45  
 His Ser Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn Val Thr Trp  
 50 55 60  
 Phe His Ala Ile His Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Lys Arg Phe Asp  
 65 70 75 80  
 Asn Pro Val Leu Pro Phe Asn Asp Gly Val Tyr Phe Ala Ser Thr Glu  
 85 90 95  
 Lys Ser Asn Ile Ile Arg Gly Trp Ile Phe Gly Thr Thr Leu Asp Ser  
 100 105 110  
 Lys Thr Gln Ser Leu Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Asn Val Val Ile  
 115 120 125  
 Lys Val Cys Glu Phe Gln Phe Cys Asn Asp Pro Phe Leu Gly Val Tyr  
 130 135 140  
 Tyr His Lys Asn Asn Lys Ser Trp Met Glu Ser Glu Phe Arg Val Tyr  
 145 150 155 160  
 Ser Ser Ala Asn Asn Cys Thr Phe Glu Tyr Val Ser Gln Pro Phe Leu  
 165 170 175  
 Met Asp Leu Glu Gly Lys Gln Gly Asn Phe Lys Asn Leu Arg Glu Phe  
 180 185 190  
 Val Phe Lys Asn Ile Asp Gly Tyr Phe Lys Ile Tyr Ser Lys His Thr  
 195 200 205  
 Pro Ile Asn Leu Val Arg Asp Leu Pro Gln Gly Phe Ser Ala Leu Glu  
 210 215 220  
 Pro Leu Val Asp Leu Pro Ile Gly Ile Asn Ile Thr Arg Phe Gln Thr  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Ala Leu His Arg Ser Tyr Leu Thr Pro Gly Asp Ser Ser Ser  
 245 250 255  
 Gly Trp Thr Ala Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Val Gly Tyr Leu Gln Pro



Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys  
 515 520 525  
 Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Asn Phe Asn  
 530 535 540  
 Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Glu Ser Asn Lys Lys Phe Leu  
 545 550 555 560  
 Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile Ala Asp Thr Thr Asp Ala Val  
 565 570 575  
 Arg Asp Pro Gln Thr Leu Glu Ile Leu Asp Ile Thr Pro Cys Ser Phe  
 580 585 590  
 Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Thr Ser Asn Gln Val  
 595 600 605  
 Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Glu Val Pro Val Ala Ile  
 610 615 620  
 His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Thr Trp Arg Val Tyr Ser Thr Gly Ser  
 625 630 635 640  
 Asn Val Phe Gln Thr Arg Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu His Val  
 645 650 655  
 Asn Asn Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile Cys Ala  
 660 665 670  
 Ser Tyr Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg Arg Ala Arg Ser Val Ala  
 675 680 685  
 Ser Gln Ser Ile Ile Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Glu Asn Ser  
 690 695 700  
 Val Ala Tyr Ser Asn Asn Ser Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Thr Ile  
 705 710 715 720  
 Ser Val Thr Thr Glu Ile Leu Pro Val Ser Met Thr Lys Thr Ser Val  
 725 730 735  
 Asp Cys Thr Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ser Asn Leu  
 740 745 750  
 Leu Leu Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Thr



Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn  
 1010 1015 1020  
 Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys  
 1025 1030 1035  
 Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro  
 1040 1045 1050  
 Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val  
 1055 1060 1065  
 Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His  
 1070 1075 1080  
 Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn  
 1085 1090 1095  
 Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln  
 1100 1105 1110  
 Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val  
 1115 1120 1125  
 Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro  
 1130 1135 1140  
 Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn  
 1145 1150 1155  
 His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn  
 1160 1165 1170  
 Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu  
 1175 1180 1185  
 Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu  
 1190 1195 1200  
 Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Ile Trp Leu  
 1205 1210 1215  
 Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Met  
 1220 1225 1230  
 Leu Cys Cys Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Cys Cys

1235                      1240                      1245  
 Ser Cys Gly Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro

1250                      1255                      1260  
 Val Leu Lys Gly Val Lys Leu His Tyr Thr  
 1265                      1270

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 5

acaggtacgt taatagttaa tagcgt 26

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 6

atattgcagc agtacgcaca c 21

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Probe

<400> 7

acactagcca tccttactgc gcttcg 26

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<220>

><221> R

<222> (5)..(5)

<223> is G/A  
 <400> 8  
 gtgaratggt catgtgtggc gg 22  
 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Probe  
 <400> 9  
 caggtggaac ctcatcagga gatgc 25  
 <210> 10  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Probe  
 <220><221> W  
 <222> (9)..(9)  
 <223> is A/T  
 <220><221> M  
 <222> (18)..(18)  
 <223> is A/C  
 <400> 10  
 ccaggtggwa crtcatcmgg tgatgc 26  
 <210> 11  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Primer  
 <220><221> R  
 <222> (3)..(3)  
 <223> is G/A  
 <220><221> S  
 <222> (12)..(12)  
 <223> is G/C

<400> 11	
caratgtaa asacactatt agcata	26
<210> 12	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 12	
acaggtacgt taatagtaa tagcgt	26
<210> 13	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Probe	
<400> 13	
acactagcca tccttactgc gcttcg	26
<210> 14	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 14	
atattgcagc agtacgcaca ca	22
<210> 15	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 15	
cacattggca cccgcaatc	19
<210> 16	
<211> 25	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Probe

<400> 16

acttcctcaa ggaacaacat tgcca 25

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 17

gaggaacgag aagaggcttg 20

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 18

agatcaactt ctgtcatcca gcaa 24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 19

gcacatcata attaggagta tcaa 24