



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월01일
(11) 등록번호 10-2690306
(24) 등록일자 2024년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1131 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0077680
(22) 출원일자 2023년06월16일
심사청구일자 2023년06월16일
(56) 선행기술조사문헌
W02021226485 A2*
EP4008785 A1
KR1020230030690 A
NATURE COMMUNICATIONS (2021) 12;5120, P.1-16
[DOI.ORG/10.1038/S41467-021-25361-5]
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
백대현
서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교(신림동)
장희령
서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교(신림동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 7 항

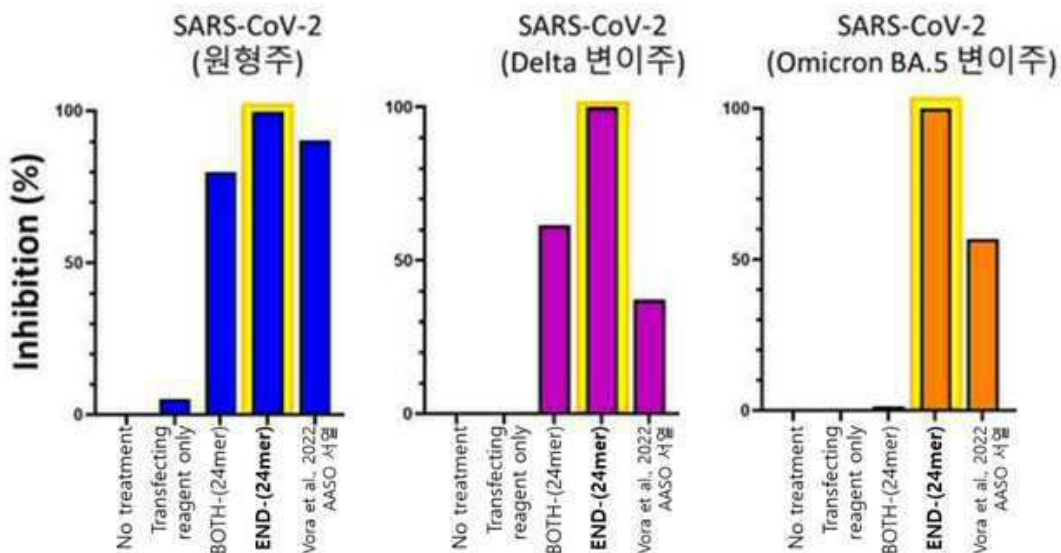
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 SARS-CoV-2 증식억제효과를 보이는 TIS-L 표적 안티센스 올리고뉴클레오타이드

(57) 요약

본 발명은 SARS-CoV-2 증식을 억제하는 TIS-L 표적 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 이의 항 바이러스 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 TIS-L 표적 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 구조가 간단하여 대량 생산이 용이하고, 원형주 및 다양한 변형주 바이러스에서 적은 용량으로도 90% 이상의 항바이러스 효능을 나타내는 바, COVID-19 치료제 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도3c



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2024.01)

A61P 31/14 (2018.01)

C12N 2310/11 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

(73) 특허권자

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

대한민국(질병관리청 국립보건연구원장)

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

(72) 발명자

양정선

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187,
국립보건연구원

이한샘

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187,
국립보건연구원

박만성

서울특별시 성북구 고려대로 73, 고려대학교 의과
대학(안암동5가)

박희도

서울특별시 성북구 고려대로 73, 고려대학교 의과
대학(안암동5가)

김윤기

대전광역시 유성구 대학로 291, 한국과학기술원(구
성동)

장지윤

대전광역시 유성구 대학로 291, 한국과학기술원(구
성동)

박주리

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 자연계
캠퍼스 산학관(안암동5가)

이주연

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187,
국립보건연구원

김경창

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187,
국립보건연구원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1776000230
 과제번호 2022-ER1605-00
 부처명 질병관리청
 과제관리(전문)기관명 국립보건연구원
 연구사업명 국가위기초래바이러스감염병극복기술개발사업(R&D)
 연구과제명 RNA를 이용한 코로나19 등 신변종 바이러스 치료물질 탐색 및 효능 분석
 기 여 율 45/100
 과제수행기관명 서울대학교 산학협력단
 연구기간 2022.06.02 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711170884
 과제번호 2022M3A9I2017241
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 바이오·의료기술개발
 연구과제명 코로나19 바이러스 변이주 발생 예측 모델 확립 및 통합 기전 분석 기반 예방 플랫폼

폼 기술 개발

기 여 율 35/100
 과제수행기관명 고려대학교
 연구기간 2022.04.01 ~ 2026.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711155211
 과제번호 2018M3A9H4056537
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 바이오·의료기술개발
 연구과제명 조류인플루엔자 바이러스 변이 지도 구축
 기 여 율 10/100
 과제수행기관명 고려대학교
 연구기간 2018.06.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1776000469
 과제번호 6634-325-210-11
 부처명 질병관리청
 과제관리(전문)기관명 국립보건연구원
 연구사업명 항바이러스제 약물평가 실험실 운영 사업
 연구과제명 항바이러스제 약물평가 실험실 운영 과제
 기 여 율 10/100
 과제수행기관명 국립보건연구원
 연구기간 2022.01.01 ~ 2024.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 7의 염기 서열로 표시되는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 SARS-CoV-2 증식 억제용인 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 TIS-L를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 서열번호 7의 염기 서열로 표시되는 올리고뉴클레오타이드는 SARS-CoV-2 원형주 및 변이주 증식 억제 효과를 발휘하는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 DNA 뉴클레오타이드, RNA 뉴클레오타이드, PNA 뉴클레오타이드, LNA 뉴클레오타이드, PMO 뉴클레오타이드, PS 뉴클레오타이드, 2'-O-Me 뉴클레오타이드, 2'-O-MOE 뉴클레오타이드 또는 이들의 임의의 조합으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 DNA 뉴클레오타이드 및 LNA 뉴클레오타이드의 조합으로 구성되는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 7의 1번째 내지 3번째 뉴클레오타이드 및 22번째 내지 24번째 뉴클레오타이드가 LNA이고, 4번째 내지 21번째 뉴클레오타이드가 DNA인 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오타이드.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 SARS-CoV-2 증식을 억제하는 TIS-L 표적 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 이의 항 바이러스 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 중증 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스 2(SARS-CoV-2)는 베타 코로나 바이러스로 다른 6개의 인간에 전염성이 있는 코로나 바이러스(229E, OC43, HKU1, SARS-CoV 및 MERS-CoV)와 같은 패밀리로 분류된다. 인간에게 병원성이 있는 것으로 알려진 인간 코로나 바이러스(HCoV)229E, OC43, NL63 및 HKU1은 비교적 경미한 호흡기 질환을 유발하는 반면, HCoV SARS-CoV, MERS-CoV 및 SARS-CoV-2는 2002년, 2012년 및 2019년에 치명적인 증상과 함께 심각한 발병을 유발하였다. 특히, SARS-CoV-2는 전례없는 규모의 전염병을 일으켰고, 유엔이 팬데믹을 선언하고 세계적으로 사회와 경제에 막대한 영향을 주었다.

[0004] 코로나-19 바이러스는 전사를 위한 주형으로 사용되는 30kb의 단일-가닥 포지티브 센스(positive sense) RNA 유전체가 들어있는 단백질 껍질(capsid)을 외막(envelope)이 둘러싸고 있고 표면에는 막 당단백질(membrane glycoprotein) 형태인 스파이크 단백질(spike protein)들이 돌기처럼 돌출된 구조를 가지며, 이 중 스파이크 단백질은 못처럼 튀어나온 숙주에 존재하는 수용체 표면에 결합하여 숙주세포의 안으로 침투하는 역할을 하여 숙주를 바이러스에 감염시키는 중요한 역할을 수행한다. 스파이크 단백질은 기능적으로 숙주세포의 수용체와 결합하는 S1 서브유닛(subunit)과 막에 융합하는 S2 서브유닛으로 나뉘며 S1 서브유닛에는 숙주세포의 ACE2(Angiotensin converting enzyme 2) 수용체에 결합하는 RBD(Receptor binding domain)가 존재한다. RNA 유전체는 5' 말단에 2/3은 ppla(polyprotein 1a) 및 pplab를 코딩하는 ORF 1a 및 1b로 구성되어 있고, 이는 16개의 비-구조적 단백질로 번역 후의 과정을 거친다. 나머지 유전체는 구조 및 부속적인 단백질을 코딩하는데, 그 구성은 코로나 바이러스에 따라 상이하다. 최근 연구에 따르면, SARS-CoV-2의 전체 유전체 구조는 ORF1a, 1b, 구조 단백질, 스파이크(S), 외피(E), 막(M), 뉴클레오캡시드(N), 3a, 6, 7a, 7b, 8 및 10를 포함한다. ORF1a 및 1b는 gRNA에서 직접 번역되지만 나머지 ORF는 sgRNA로부터 번역된다. sgRNA는 모두 5'말단이 캡핑되고 3'말단이 폴리아데닐화된 양성가닥 RNA의 중첩된 말단을 갖고 있다.

[0005] SARS-CoV-2 바이러스의 유전자의 5' 말단은 3' 말단에 TRS-L(transcription regulatory sequence-leader)을 포함하는 리더서열(leader sequence)이 있다. TRS는 각 ORF(TRS-body; TRS-B)의 상류에 위치하며, 6-nt 코어 서열은 모든 TRS에 동일하다. 각 ORF의 5' 말단은 ORF1a, 1b에 의하여 암호화되는 RNA 의존성 RNA 중합효소 복합체에 의한 불연속적 전사를 통하여 리더 서열과 융합된다. 바이러스 유전체 복제 및 전사는 바이러스 단백질에 의하여 수행되는 반면, 번역 과정은 숙주의 단백질에 의하여 수행된다. 따라서, 바이러스 및 인간 번역체의 역할을 관찰하는 것은 인간의 COVID-19 병원성의 분자 메커니즘을 이해하는데 매우 중요하고, 이를 이용하여 신약을 개발할 수 있다.

[0006] 본 발명자들은 SARS-CoV-2의 유전체 구조 및 유전자의 발현양상을 확인하여 번역 조절 인자 (Translation initiation site located in the leader sequence; TIS-L)를 동정한 바 있으며(대한민국 공개특허 제10-2023-0030690호, NATURE COMMUNICATIONS | (2021) 12:5120), TIS-L의 기능을 저해하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide; ASO)를 투여하면 SARS-CoV-2의 유전자 발현 전반을 교란하여, 바이러스의 증식 및 감염성을 크게 낮추어 효과적으로 COVID-19를 치료할 수 있음을 예측한 바 있다. 본 발명에서는 TIS-L의 기능을 저해하는 다양한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 후보군 중에서도 특히 현저한 효과를 보이는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 개발하고, 그 효과를 검증함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2023-0030690호

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) NATURE COMMUNICATIONS | (2021) 12:5120

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 다양한 변이주의 SARS-CoV-2 증식을 억제하는 TIS-L 표적 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 이의 항바이러스 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 5 또는 서열번호 7의 염기 서열로 표시되는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 SARS-CoV-2 증식 억제용인 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 TIS-L를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 7의 염기 서열로 표시되는 올리고뉴클레오타이드는 SARS-CoV-2 원형주 및 변이주 증식 억제 효과를 발휘하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 DNA 뉴클레오타이드, RNA 뉴클레오타이드, PNA 뉴클레오타이드, LNA 뉴클레오타이드, PMO 뉴클레오타이드, PS 뉴클레오타이드, 2'-O-Me 뉴클레오타이드, 2'-O-MOE 뉴클레오타이드 또는 이들의 임의의 조합으로 구성되는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 DNA 뉴클레오타이드 및 LNA 뉴클레오타이드의 조합으로 구성되는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 5 또는 서열번호 7의 1번째 내지 3번째 뉴클레오타이드 및 22번째 내지 24 번째 뉴클레오타이드가 LNA이고, 4번째 내지 21번째 뉴클레오타이드가 DNA인 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명은 또한, 상기 올리고뉴클레오타이드 또는 상기 올리고뉴클레오타이드의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, COVID-19 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 전달체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 전달체는 바이러스성 벡터, 비바이러스성 벡터, 리포솜, 양이온성 고분자, 미셀(micelle), 에멀전 및 지질 나노입자(solid lipid nanoparticles), 엑소솜(exosome)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 TIS-L 표적 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 구조가 간단하여 대량 생산이 용이하고, 원형주 및 다양한 변형주 바이러스에서 적은 용량으로도 90% 이상의 항바이러스 효능을 나타내며, COVID-19 치료제 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1a는 문헌을 통하여 검색된 TIS-L을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(Neuman 서열)와 SARS-CoV-2 억제 효과를 나타내는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(Vora 서열)의 표적 서열을 보여주는 모식도이다.

도 1b는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 처리에 따른 SARS-CoV-2 증식 억제 효과를 확인하기 위한 qRT-PCR 및

plaque assay 실험 방법을 보여주는 모식도이다.

도 1c는 Neuman 서열 및 Vora 서열의 SARS-CoV-2의 증식 억제 효과를 plaque assay로 확인한 결과이다.

도 2a는 TIS-L을 표적으로 하는 2종의 20mer 안티센스 올리고뉴클레오타이드(MIDDLE-(20mer) 서열 및 END-(20mer) 서열)의 표적 서열을 보여주는 모식도이다.

도 2b는 MIDDLE-(20mer) 서열 및 END-(20mer) 서열의 SARS-CoV-2의 증식 억제 효과를 plaque assay로 확인한 결과이다.

도 3a는 TIS-L을 표적으로 하는 3종의 24mer 안티센스 올리고뉴클레오타이드(BOTH-(24mer) 서열, MIDDLE-(24mer) 서열 및 END-(24mer))의 표적 서열을 보여주는 모식도이다.

도 3b는 BOTH-(24mer) 서열, MIDDLE-(24mer) 서열 및 END-(24mer) 서열의 SARS-CoV-2 원형주의 증식 억제 효과를 plaque assay로 확인한 결과이다.

도 3c는 BOTH-(24mer) 서열, MIDDLE-(24mer) 서열 및 END-(24mer) 서열의 SARS-CoV-2 원형주 및 변이주의 증식 억제 효과를 qRT-PCR로 확인한 결과이다.

도 4는 END-(24mer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 SARS-CoV-2 원형주 및 다양한 변이주에 대한 IC₅₀를 qRT-PCR로 확인한 결과이다.

도 5a는 WST-1 Assay 실험방법을 보여주는 모식도이다.

도 5b는 Vero 세포주를 이용하여 END-(24mer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 세포 독성을 WST-1 Assay로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0026] 본 발명에서는 2019년부터 판데믹 사태를 일으킨 코로나바이러스 감염증-19(COVID-19)의 원인 바이러스인 SARS-CoV-2의 증식 억제 효과를 발휘하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(antisense oligonucleotide; ASO)를 개발하고자 하였으며, 선행 연구에서 동정한 SARS-CoV-2 유전자의 발현 전반에 막대한 영향을 미칠 것으로 예상되는 번역 조절 인자 (Translation initiation site located in the leader sequence; TIS-L)를 표적하는 DNA 및/또는 LNA로 구성된 ASO를 설계한 결과, 특정 서열의 안티센스 올리고뉴클레오타이드에서 SARS-CoV-2 원형주 및 각종 변이주 바이러스에 대해 90% 이상의 증식 억제 효능을 가지는 것을 확인하였다.
- [0028] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 서열번호 5 또는 서열번호 7의 염기 서열로 표시되는 올리고뉴클레오타이드에 관한 것이다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 SARS-CoV-2 증식 억제용인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 TIS-L를 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 특히 상기 서열번호 7의 염기 서열로 표시되는 올리고뉴클레오타이드는 SARS-CoV-2 원형주 및 변이주 증식 억제 효과를 발휘하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 DNA 뉴클레오타이드, RNA 뉴클레오타이드, PNA 뉴클레오타이드, LNA 뉴클레오타이드, PMO 뉴클레오타이드, PS 뉴클레오타이드, 2'-O-Me 뉴클레오타이드, 2'-O-MOE 뉴클레오타이드 또는 이들의 임의의 조합으로 구성되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 일 양태로서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 DNA 뉴클레오타이드 및 LNA 뉴클레오타이드의 조합으로 구성되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0034] 예컨대, 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 5 또는 서열번호 7의 1번째 내지 3번째 뉴클레오타이드 및 22번째 내지 24 번째 뉴클레오타이드가 LNA이고, 4번째 내지 21번째 뉴클레오타이드가 DNA인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드는 길이가 길지 않고, DNA 및 LNA로 구성된 간단한 구조이기 때문에 대량 생

산이 용이한 장점이 있다.

- [0037] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드는 TIS-L을 표적으로 하는 것을 특징으로 한다.
- [0038] TIS-L은 SARS-CoV-2 리더 서열(leader sequence)에 위치하며 RNA 구조물인 stem loop(SL) 주위에 위치하기 때문에, 일반적인 상식으로는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 개발하는데 본 기술분야에서 적합한 표적 서열로 간주되지는 않는다.
- [0039] 이에 일반적으로는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 표적부위를 선별할 때 이차구조를 고려하여, 구조물이 없는 위치를 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 표적부위로 선별하고, 이를 위해서 m-fold 등의 RNA 2차구조 계산 소프트웨어가 사용되고 있다(Aartsma-Rus, Annemieke, et al. "Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms." *Molecular Therapy* 17.3 (2009): 548-553)
- [0040] 실제로 본 발명에서는 TIS-L을 표적으로 하는 선행문헌(Vora, Setu M., et al. "Targeting stem-loop 1 of the SARS-CoV-2 5' to suppress viral translation and Nsp1 evasion." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119.9 (2022): e2117198119)에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 SARS-CoV-2 증식 억제 효과를 TIS-L을 표적으로 하지 않는 다른 종류의 선행문헌(Neuman, Benjamin W., et al. "Inhibition, escape, and attenuated growth of severe acute respiratory syndrome coronavirus treated with antisense morpholino oligomers." *Journal of virology* 79.15 (2005): 9665-9676)에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 SARS-CoV-2 증식 억제 효과와 비교해 본 결과, TIS-L을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 SARS-CoV-2 증식 억제 효과가 상대적으로 저조하게 나타났음을 확인하였다.
- [0041] 또한, 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 통상적으로 사용되는 길이인 20mer의 TIS-L을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 설계하여 SARS-CoV-2 증식 억제 효과를 확인해 본 결과에서도, 20mer의 TIS-L을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 SARS-CoV-2의 증식을 효과적으로 억제하지 못하는 것으로 나타났다.
- [0042] 반면, 본 발명인 24mer의 길이를 가지며 그 3' 말단이 TIS-L에 상보적으로 결합하도록 설계한 안티센스 올리고뉴클레오타이드(END-(24mer))는 SARS-CoV-2의 증식을 매우 효과적으로 억제할 수 있었을 뿐만 아니라, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 SARS-CoV-2 원형주 뿐만 아니라 다양한 변이주에서도 증식 억제 효과가 현저히 우수하였다.
- [0044] 본 발명에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드" 또는 "안티센스 화합물"은 다른 RNA 또는 DNA (표적 RNA, DNA)에 결합하는 RNA, DNA, LNA, PNA 또는 이들이 혼합된 분자를 의미한다. 가령, RNA 올리고뉴클레오타이드이면, 이는 RNA-RNA 상호작용에 의해 다른 RNA 표적에 결합하고 표적 RNA의 활성을 변경시킨다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 특정 폴리뉴클레오타이드의 발현 및/또는 기능을 상향 조절 또는 하향 조절할 수 있다. 이러한 정의에는 치료적 관점, 진단적 관점, 또는 다른 관점에서 유용한 임의의 외래 RNA 또는 DNA 분자가 포함되는 것으로 의도된다. 이런 분자에는 예로써, 안티센스 RNA 또는 DNA 분자, 간섭 RNA (RNAi), 마이크로 RNA, 미끼 RNA 분자, siRNA, 효소 RNA, 치료 편집 RNA 및 안티센스 올리고머 화합물, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 외부 가이드 서열 (external guide sequence, EGS) 올리고뉴클레오타이드, 프라이머, 프로브, 그리고 표적 핵산의 최소한 일부분에 혼성화되는 다른 올리고머 화합물이 포함된다. 따라서 이들 화합물은 단일-가닥, 이중-가닥, 부분적으로 단일-가닥, 또는 원형 올리고머 화합물의 형태로 도입될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 맥락에서, 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 리보핵산 (RNA) 또는 데옥시리보핵산 (DNA)의 올리고머 또는 폴리머, 또는 이의 모방체를 지칭한다. 용어 "올리고뉴클레오타이드"에는 또한, 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 이들의 치환된 및 알파-아노머 (alpha-anomeric) 형태, 펩티드 핵산 (PNA), 잠금된 핵산 (LNA), 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트 등을 비롯한 자연 및/또는 변형된 단량체 또는 연쇄의 선형 또는 원형 올리고머가 포함된다. 올리고뉴클레오타이드는 단량체-단량체 상호작용의 규칙적인 패턴, 예를 들면, Watson-Crick 유형의 염기 대합 (base pairing), Hoogsteen 또는 역 Hoogsteen 유형의 염기 대합 등에 의해, 표적 폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0046] 올리고뉴클레오타이드는 "키메라"일 수 있다, 다시 말하면, 서로 다른 영역으로 구성될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, "키메라" 화합물은 2개 이상의 화학적 영역, 예를 들면, DNA 영역(들), RNA 영역(들), PNA 영역(들), LNA 영역(들) 등을 보유하는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0047] 올리고뉴클레오타이드는 단량체가 고유 DNA에서처럼 연속적으로 연결되거나, 또는 스페이서를 통해 연결될 때, 연결될 수 있는 영역으로 구성될 수 있다. 이들 스페이서는 이들 영역 간에 공유 "가교"를 구성하고 바람직한 경우에, 대략 100개의 탄소 원자를 초과하지 않는 길이를 갖도록 의도된다. 이들 스페이서는 예로써, 양 또는 음

전하를 보유하고, 특정한 핵산 결합 특성 (삽입물, 그루브 접합제 (groove binder), 독소, 형광단 등)을 갖고, 친유성이고, 예로써 알파-나선 (alpha-helix)을 유도하는 알라닌 보유 펩티드와 같은 특수한 이차 구조를 유도하는 상이한 기능기 (functionality)를 보유할 수 있다.

[0048] 본 명세서에서, 용어 "표적 핵산"은 DNA, 이런 DNA로부터 전사된 RNA (premRNA 및 mRNA 포함), 그리고 비-코딩 서열, 센스 또는 안티센스 폴리뉴클레오타이드를 코딩하는, 이런 RNA로부터 유래된 cDNA를 포괄한다. 올리고머 화합물의 표적 핵산과의 특이적인 혼성화는 상기 핵산의 정상적인 기능을 간섭한다. 표적 핵산에 특이적으로 혼성화되는 화합물에 의한 상기 표적 핵산의 기능의 이러한 조정은 일반적으로, "안티센스"로 지칭된다. 간섭되는 DNA의 기능에는 예로써, 복제 및 전사가 포함된다.

[0050] RNA 간섭 "RNAi"는 "표적" 핵산 서열에 서열-특이적 상동성 (homology)을 갖는 이중 가닥 RNA (dsRNA) 분자에 의해 매개된다. 본 발명의 일정한 구체예에서, 매개자 (mediator)는 5-25개 뉴클레오타이드 "작은 간섭" RNA 이중 나선 (siRNA)이다. 이들 siRNA는 Dicer로 알려져 있는 RNase 효소에 의한 dsRNA의 가공으로부터 유래된다. siRNA 이중나선 산물은 RISC (RNA Induced Silencing Complex)로 명명된 다중-단백질 siRNA 복합체 내로 동원된다. 특정 이론에 한정됨 없이, RISC는 이후, 표적 핵산 (적절하게는 mRNA)로 안내되는 것으로 생각되고, 여기서 siRNA 이중나선은 서열-특이적 방식으로 상호작용하여 촉매 방식으로 절단을 매개한다. 본 발명에 따라서 이용될 수 있는 작은 간섭 RNA는 당분야에 널리 공지되고 당업자에게 익숙한 절차에 따라서 합성되고 이용될 수 있다. 본 발명의 방법에 이용되는 작은 간섭 RNA는 적절하게는, 대략 1개 내지 대략 50개의 뉴클레오타이드(nt)를 포함한다. 무제한적 구체예의 실례에서, siRNA는 대략 5개 내지 대략 40nt, 대략 5개 내지 대략 30개 nt, 대략 10개 내지 대략 30개 nt, 대략 15개 내지 대략 25개 nt, 또는 대략 20-25개 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0051] 용어 "뉴클레오타이드"에는 자연 발생 뉴클레오타이드 및 비-자연 발생 뉴클레오타이드가 포함된다. 이전에 "비-자연 발생" 인 것으로 간주되었던 다양한 뉴클레오타이드가 차후에, 자연에서 발견되고 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 따라서 "뉴클레오타이드"에는 공지된 퓨린과 피리미딘 헤테로환-보유 분자뿐만 아니라 이들의 헤테로환상 유사체 및 호변체 (tautomer) 역시 포함된다. 다른 유형의 뉴클레오타이드의 예시적인 실례는 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 우라실, 퓨린, 잔틴, 디아미노퓨린, 8-옥소-N6-메틸아데닌, 7-테아자잔틴, 7-테아자구아닌, N4, N4-에타노시토신, N6, N6-에타노-2,6-디아미노퓨린, 5-메틸시토신, 5-(C3-C6)-알킬닐시토신, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 슈도이소시토신, 2-히드록시-5-메틸-4-트리아졸로피리딘, 이소시토신, 이소구아닌, 이노신, 그리고 Benner et al., U.S. Pat No. 5,432,272에서 설명된 "비-자연 발생" 뉴클레오타이드를 보유하는 분자이다.

[0052] 용어 "뉴클레오타이드"에는 이들 실시예 모두, 그리고 이들의 유사체 및 호변체가 포함될 수 있다. 특히 흥미로운 뉴클레오타이드는 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 그리고 우라실을 보유하는 것들인데, 이 들은 인간에서 치료적 및 진단적 적용에 관하여 자연 발생 뉴클레오타이드로서 간주된다. 뉴클레오타이드는 예로써, Kornberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992)에서 설명된 바와 같은 자연 2'-데옥시 및 2'-히드록실 당, 그리고 이들의 유사체를 포함한다.

[0053] 뉴클레오타이드와 관련하여 "유사체"에는 변형된 염기 모이어티 및/또는 변형된 당 모이어티를 보유하는 합성 뉴클레오타이드가 포함된다 (예로써, Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429-4443, Toulme J.J., (2001) Nature Biotechnology 19:17-18; Manoharan M., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1489:117-139; Freier S. M., (1997) Nucleic Acid Research, 25:4429-4443, Uhlman, E., (2000) Drug Discovery & Development, 3: 203-213, Herdewin P., (2000) Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10:297-310); 2'-O, 3'-C-linked [3.2.0] bicycloarabinonucleosides에 의해 전반적으로 기술됨). 이런 유사체에는 결합 특성, 예를 들면, 이중나선 또는 삼중나선 안정성, 특이성 등을 증강시키도록 설계된 합성 뉴클레오타이드가 포함된다.

[0054] 본 명세서에서, "상보성"은 1개 또는 2개의 올리고머 가닥에서 2개의 뉴클레오타이드 간에 정확한 대합의 능력을 지칭한다. 가령, 안티센스 화합물의 일정한 위치에서 핵염기 (nucleobase)가 표적 핵산의 일정한 위치에서 핵염기와 수소 결합을 형성할 수 있고, 상기 표적 핵산이 DNA, RNA, 또는 올리고뉴클레오타이드 분자이면, 상기 올리고뉴클레오타이드 및 표적 핵산 사이에 수소 결합의 위치는 상보성 위치인 것으로 간주된다. 올리고머 화합물 및 추가의 DNA, RNA, 또는 올리고뉴클레오타이드 분자는 각 분자 내에서 충분한 숫자의 상보성 위치가 서로에 수소 결합될 수 있는 뉴클레오타이드에 의해 점유될 때, 서로에 상보성이다. 따라서 "특이적으로 혼성화가능" 및 "상보성"은 올리고머 화합물 및 표적 핵산 사이에 안정되고 특정한 결합이 발생할 만큼 충분한 숫자의 뉴클레오타이드에 걸쳐 충분한 정도의 정확한 대합 또는 상보성을 지시하는데 이용되는 용어이다.

[0055] 당해분야에서, 올리고머 화합물의 서열은 특이적으로 혼성화되기 위하여, 표적 핵산의 서열에 100% 상보성일 필

요가 없다. 또한, 올리고뉴클레오타이드는 개재성 또는 인접 분절 (segment)이 혼성화 현상에 관련되지 않도록 하나 이상의 분절에 걸쳐 혼성화될 수 있다 (가령, 루프 (loop) 구조, 미스매치 (mismatch) 또는 헤어핀 (hairpin) 구조). 본 발명의 올리고머 화합물은 그들이 표적화되는 표적 핵산 서열 내에 표적 영역에 최소한 대략 70%, 또는 최소한 대략 75%, 또는 최소한 대략 80%, 또는 최소한 대략 85%, 또는 최소한 대략 90% 또는 최소한 대략 95%, 또는 최소한 대략 99% 서열 상보성을 포함한다. 가령, 안티센스 화합물의 20개 뉴클레오타이드 중에서 18개가 표적 영역에 상보성이고, 따라서 특이적으로 혼성화되는 안티센스 화합물은 90% 상보성을 나타낼 것이다. 이러한 실례에서, 나머지 비-상보성 뉴클레오타이드는 상보성 뉴클레오타이드와 함께 군집되거나, 또는 상보성 뉴클레오타이드가 군데군데 산재될 수 있고, 그리고 서로에 또는 상보성 뉴클레오타이드에 인접할 필요가 없다. 따라서 표적 핵산과 완전 상보성의 두 영역이 측면에서 접하는 4개의 비-상보성 뉴클레오타이드를 보유하는 18개 뉴클레오타이드 길이를 갖는 안티센스 화합물은 표적 핵산과 77.8% 전체 상보성을 가질 것이고, 따라서 본 발명의 범위 내에 속할 것이다. 안티센스 화합물의 표적 핵산의 영역과의 상보성 비율은 당분야에 공지된 BLAST(basic local alignment search tools) 프로그램 및 PowerBLAST 프로그램을 이용하여 일과적으로 결정될 수 있다. 상동성, 서열 동일성 또는 상보성 비율은 예로써, 디폴트 설정을 이용한 Gap 프로그램 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)에 의해 결정될 수 있고, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., (1981) 2, 482-489의 알고리즘을 이용한다.

[0056] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 임의의 화학적 또는 천연 변형이 될 수 있다. 화학적 및 천연 변형은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 변형에는 예를 들어 표적 가닥과의 결합을 증가시키도록 (즉, 그들의 용융 온도를 증가시키도록), 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드-표적 복합체의 확인을 보조하도록, 세포 침투를 증가시키도록, 뉴클레아제, 및 올리고뉴클레오타이드의 구조 또는 활성을 분해하거나 방해하는 다른 효소에 대해 안정화시키도록, 표적에 서열 특이적으로 결합할 때 중단 방식(중결 사건)을 제공하도록, 올리고뉴클레오타이드의 약동학 성질을 개선시키도록 설계된 변형이 포함된다. 변형에는 예를 들어 (a) 말단 변형, 예를 들어 5' 말단 변형 (인산화, 탈인산화, 접합, 역위 연결 등), 3' 말단 변형 (접합, DNA 뉴클레오타이드, 역위 연결 등), (b) 염기 변형, 예를 들어 변형된 염기, 안정화 염기, 탈안정화 염기, 또는 파트너의 확장된 레퍼토리와 염기 쌍을 형성하는 염기, 또는 접합된 염기로의 교체, (c) 당 변형 (예를 들어, 2' 위치 또는 4' 위치에서) 또는 당 교체, 뿐만 아니라 (d) 뉴클레오시드간 연결 변형, 예컨대 포스포디에스테르 연결의 변형 또는 교체가 포함되나 이로 제한되지 않는다. 이러한 변형이 번역을 방해하는 (즉, 예를 들어 시험관내 번역 검정에서, 변형이 없는 것에 비해 번역에서 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 또는 그보다 많은 감소를 초래하는) 정도까지는 본원에 기재된 방법 및 조성물에 대해 변형이 최적이지 아닐 수 있다. 변형된 뉴클레오시드간 연결의 비제한적인 예에는 정상적인 3'-5' 연결을 갖는 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 예컨대 3'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트, 포스포네이트, 포스포르아미데이트, 예컨대 3'-아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르 및 보라노포스포네이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 및 뉴클레오시드 단위의 인접한 쌍이 3'-5'에서 5'-3'로 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결된 반전된 극성을 갖는 것들이 포함된다. 다양한 염, 혼합된 염 및 유리산 형태 또한 포함된다. 일부 실시양태에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드는 단일-가닥의 변형된 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 단일-가닥의 변형된 올리고뉴클레오타이드는 10-30, 10-35, 10-40, 10-45, 10-50, 10-60, 10-70, 10-80, 10-90, 10-100개 또는 100개 초과 연결된 뉴클레오시드로 이루어지고, 갭 세그먼트를 갖는다. 일부 실시양태에서, 갭 세그먼트는 변형된 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 단일-가닥의 변형된 올리고뉴클레오타이드의 중심 또는 중심 근처에 위치하는 데옥시뉴클레오시드로 이루어진 하나 이상의 연결된 핵산을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 갭 세그먼트는 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-20, 2-30, 2-40, 2-50, 10-20, 10-30, 10-40 또는 10-50개의 연결된 데옥시뉴클레오시드로 이루어진다. 5' 윙 세그먼트는 변형된 올리고뉴클레오타이드의 5'-말단에서부터 갭 세그먼트의 5'-말단에 있는 첫번째 핵산 이전의 핵산까지 연결된 핵산 (예를 들어, 뉴클레오시드)에 상응한다. 3' 윙 세그먼트는 갭 세그먼트의 3' 말단에 있는 마지막 핵산 이후부터 변형된 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 있는 마지막 핵산까지 연결된 핵산 (예를 들어, 뉴클레오시드)에 상응한다. 갭 세그먼트는 5' 윙 세그먼트와 3' 윙 세그먼트 사이에 위치한다. 일부 실시양태에서, 5' 윙 세그먼트의 적어도 1개의 뉴클레오시드 및/또는 3' 윙 세그먼트의 적어도 1개의 뉴클레오시드는 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 갭 세그먼트 내부의 뉴클레오시드간 연결 및 갭 세그먼트를 3' 윙 세그먼트 및/또는 5' 윙 세그먼트에 연결하는 연결은 모두 포스포로티오에이트 연결 (*)이다. 일부 실시양태에서, 5' 및 3' 윙 세그먼트 둘다의 나머지 뉴클레오시드를 연결하는 뉴클레오시드간 연결은 포스포디에스테르 연결이다. 일부 실시양태에서,

변형된 올리고뉴클레오타이드에 있는 뉴클레오타이드는 2' 0-메틸 기로 변형된다. 변형된 올리고뉴클레오타이드에 있는 뉴클레오타이드는 또한 본원에 기재된 임의의 다른 변형으로 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 올리고뉴클레오타이드의 핵염기 서열은 10-30, 10-35, 10-40, 10-45, 10-50, 10-60, 10-70, 10-80, 10-90, 10-100개 또는 100개 초과와 연결된 뉴클레오타이드로 이루어지고 이의 제약상 허용되는 염을 갖는다. 그 안에 인 원자를 함유하지 않는 변형된 뉴클레오타이드간 연결은 단쇄 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오타이드간 연결, 혼합된 헤테로원자, 및 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오타이드간 연결, 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로시클릭 뉴클레오타이드간 연결에 의해 형성된 뉴클레오타이드간 연결을 갖는다. 이들에는 모르폴리노 연결을 갖는 것 (뉴클레오타이드의 당 부분으로부터 부분적으로 형성됨); 실록산 백본; 술폰, 술폰사이드 및 술폰 백본; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 알켄 함유 백본; 술폰 및 에이트 백본; 메틸렌 이미노 및 메틸렌히드라지노 백본; 술폰네이트 및 술폰아미드 백본; 아마이드 백본; 및 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 성분 부분을 갖는 다른 것이 포함된다. 치환된 당 모이어티에는 2' 위치에서 다음 중 하나가 포함되나 이로 제한되지 않는다: H (데옥시리보스); OH (리보스); F; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S- 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알킬닐; 또는 O-알킬- O-알킬 (여기서, 알킬, 알케닐 및 알킬닐은 치환된 또는 비치환된 C1 내지 C10 알킬 또는 C2 내지 C10 알케닐 및 알킬닐일 수 있음). 화학적으로 또는 천연적으로 변형된 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어 당의 2' 위치에서 변형된 적어도 1개의 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 2'-O-알킬, 2'-O-알킬-O-알킬 또는 2'-플루오로-변형된 뉴클레오타이드 또는 말단 캡을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, RNA 변형에는 피리미딘의 리보스 상에서 2'-플루오로, 2'-아미노 및 2' 0-메틸 변형, 무염기성 잔기, 또는 RNA의 3' 말단에서의 역위 염기가 포함된다. 본 발명에 따라 유용한 올리고뉴클레오타이드는 단일 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 2개의 변형된 뉴클레오타이드, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20개 이상, 올리고뉴클레오타이드의 전체 길이까지 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드 또는 핵염기는 천연 퓨린 염기 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 및 피리미딘 염기 티민 (T), 시토신 (C) 및 우라실 (U)을 포함한다. 변형된 뉴클레오타이드는 다른 합성 및 천연 핵염기, 예컨대 이노신, 크산틴, 히포크산틴, 누클라린, 이소구아니신, 투베르시딘, 2-(할로)아데닌, 2-(알킬)아데닌, 2-(프로필)아데닌, 2 (아미노)아데닌, 2-(아미노알킬)아데닌, 2 (아미노프로필)아데닌, 2 (메틸티오) N6 (이소펜테닐)아데닌, 6 (알킬)아데닌, 6 (메틸)아데닌, 7 (데아자)아데닌, 8 (알케닐)아데닌, 8-(알킬)아데닌, 8 (알킬닐)아데닌, 8 (아미노)아데닌, 8-(할로)아데닌, 8-(히드록실)아데닌, 8 (티오알킬) 아데닌, 8-(티올)아데닌, N6-(이소펜테닐)아데닌, N6 (메틸)아데닌, N6, N6 (디메틸)아데닌, 2-(알킬)구아닌, 2 (프로필)구아닌, 6-(알킬)구아닌, 6 (메틸)구아닌, 7 (알킬)구아닌, 7 (메틸)구아닌, 7 (데아자)구아닌, 8 (알킬)구아닌, 8-(알케닐)구아닌, 8 (알킬닐)구아닌, 8- (아미노)구아닌, 8 (할로)구아닌, 8-(히드록실)구아닌, 8 (티오알킬)구아닌, 8-(티올)구아닌, N (메틸)구아닌, 2-(티오)시토신, 3 (데아자) 5 (아자)시토신, 3-(알킬)시토신, 3 (메틸)시토신, 5-(알킬)시토신, 5-(알킬닐)시토신, 5 (할로)시토신, 5 (메틸)시토신, 5 (프로피닐)시토신, 5 (프로피닐)시토신, 5 (트리플루오로메틸)시토신, 6-(아조)시토신, N4 (아세틸)시토신, 3 (3 아미노-3 카르복시프로필)우라실, 2-(티오)우라실, 5 (메틸) 2 (티오)우라실, 5 (메틸아미노메틸)-2 (티오)우라실, 4-(티오)우라실, 5 (메틸) 4 (티오)우라실, 5 (메틸아미노메틸)-4 (티오)우라실, 5 (메틸) 2,4 (디티오)우라실, 5 (메틸아미노메틸)-2,4 (디티오)우라실, 5 (2-아미노프로필)우라실, 5-(알킬)우라실, 5-(알킬닐)우라실, 5-(알릴아미노)우라실, 5 (아미노알킬)우라실, 5 (아미노알킬)우라실, 5 (구아니딘알킬)우라실, 5 (1,3-디아졸-1-알킬)우라실, 5-(시아노알킬)우라실, 5-(디아알킬아미노알킬)우라실, 5 (디메틸아미노알킬)우라실, 5-(할로)우라실, 5-(메톡시)우라실, 우라실-5 옥시아세탄산, 5(메톡시카르보닐메틸)-2-(티오)우라실, 5 (메톡시카르보닐-메틸)우라실, 5(프로피닐)우라실, 5 (프로피닐)우라실, 5 (트리플루오로메틸)우라실, 6 (아조)우라실, 디히드로우라실, N3 (메틸)우라실, 5-우라실 (즉, 슈도우라실), 2 (티오)슈도우라실, 4 (티오)슈도우라실, 2,4-(디티오)슈도우라실, 5-(알킬)슈도우라실, 5-(메틸)슈도우라실, 5-(알킬)-2-(티오)슈도우라실, 5-(메틸)-2-(티오)슈도우라실, 5-(알킬)-4 (티오)슈도우라실, 5-(메틸)-4 (티오)슈도우라실, 5-(알킬)-2,4 (디티오)슈도우라실, 5-(메틸)-2,4 (디티오)슈도우라실, 1 치환된 슈도우라실, 1 치환된 2 (티오)-슈도우라실, 1 치환된 4 (티오)슈도우라실, 1 치환된 2,4-(디티오)슈도우라실, 1 (아미노카르보닐에틸레닐)-슈도우라실, 1 (아미노카르보닐에틸레닐)-2(티오)-슈도우라실, 1 (아미노카르보닐에틸레닐)-4 (티오)슈도우라실, 1 아미노카르보닐에틸레닐-2,4-(디티오)슈도우라실, 1 (아미노알킬아미노 카르보닐에틸레닐)-슈도우라실, 1 (아미노알킬아미노-카르보닐에틸레닐)-2(티오)-슈도우라실, 1(아미노알킬아미노 카르보닐에틸레닐)-4(티오)슈도우라실, 1 (아미노알킬아미노카르보닐에틸레닐)-2,4-(디티오)슈도우라실, 1,3-(디아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일, 1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-페녹사진-1-일, 1,3-(디아자)-2-(옥소)-펜티아진-1-일, 1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-펜티아진-1-일, 7-치환된 1,3-(디아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일, 7-치환된 1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-페녹사진-1-일, 7-치환된 1,3-(디아자)-2-(옥소)-펜티아진-1-일, 7-치환된 1-(아자)-2-(티오)-3-

(아자)-펜티아진-1-일, 7-(아미노알킬히드록시)-1,3-(디아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일, 7-(아미노알킬히드록시)-1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-페녹사진-1-일, 7-(아미노알킬히드록시)-1,3-(디아자)-2-(옥소)-펜티아진-1-일, 7-(아미노알킬히드록시)-1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-펜티아진-1-일, 7-(구아니디늄알킬히드록시)-1,3-(디아자)-2-(옥소)-페녹사진-1-일, 7-(구아니디늄알킬히드록시)-1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-페녹사진-1-일, 7-(구아니디늄알킬-히드록시)-1,3-(디아자)-2-(옥소)-펜티아진-1-일, 7-(구아니디늄알킬히드록시)-1-(아자)-2-(티오)-3-(아자)-펜티아진-1-일, 1,3,5-(트리아자)-2,6-(디옥사)-나프탈렌, 이노신, 크산틴, 히포크산틴, 누볼라린, 투베르시딘, 이소구아니신, 이노시닐, 2-아자-이노시닐, 7-테아자-이노시닐, 니트로이미다졸릴, 니트로피라졸릴, 니트로벤즈이미다졸릴, 니트로인다졸릴, 아미노인돌릴, 피롤로피리미디닐, 3-(메틸)이소카르보스티릴릴, 5-(메틸)이소카르보스티릴릴, 3-(메틸)-7-(프로피닐)이소카르보스티릴릴, 7-(아자)인돌릴, 6-(메틸)-7-(아자)인돌릴, 이미다조피리디닐, 9-(메틸)-이미다조피리디닐, 피롤로피리지닐, 이소카르보스티릴릴, 7-(프로피닐)이소카르보스티릴릴, 프로피닐-7-(아자)인돌릴, 2,4,5-(트리메틸)페닐, 4-(메틸)인돌릴, 4,6-(디메틸)인돌릴, 페닐, 나프탈레닐, 안트라세닐, 페난트라세닐, 피레닐, 스틸베닐, 테트라세닐, 펜타세닐, 디플루오로톨릴, 4-(플루오로)-6-(메틸)벤즈이미다졸, 4-(메틸)벤즈이미다졸, 6-(아조)티민, 2-피리디논, 5 니트로인돌, 3 니트로피롤, 6-(아자)피리미딘, 2 (아미노)퓨린, 2,6-(디아미노) 퓨린, 5 치환된

[0057] 피리미딘, N2-치환된 퓨린, N6-치환된 퓨린, O6-치환된 퓨린, 치환된 1,2,4-트리아졸, 피롤로-피리미딘-2-온-3-일, 6-페닐-피롤로-피리미딘-2-온-3-일, 파라-치환된-6-페닐-피롤로-피리미딘-2-온-3-일, 오르토-치환된-6-페닐-피롤로-피리미딘-2-온-3-일, 비스-오르토-치환된-6-페닐-피롤로-피리미딘-2-온-3-일, 파라-(아미노알킬히드록시)-6-페닐-피롤로-피리미딘-2-온-3-일, 오르토-(아미노알킬히드록시)-6-페닐-피롤로-피리미딘-2-온-3-일, 비스-오르토-(아미노알킬히드록시)-6-페닐-피롤로-피리미딘-2-온-3-일, 피리도피리미딘-3-일, 2-옥소-7-아미노-피리도피리미딘-3-일, 2-옥소-피리도피리미딘-3-일, 또는 이들의 임의의 0-알킬화 또는 N-알킬화 유도체를 포함한다. 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 키메라 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 본 발명의 키메라 안티센스 화합물은 상기 기재된 2가지 이상의 올리고뉴클레오타이드, 변형된 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드 모방체의 복합 구조로 형성될 수 있다. 이러한 화합물은 관련 기술분야에서 하이브리드 또는 혼합된 백본 또는 키메라 또는 갭머(gapmer)로도 지칭되었다. 특히, 갭머는 적어도 3개의 구별되는 부분을 갖는 올리고뉴클레오타이드이며, 여기서 부분 중 2개는 유사하고, 즉, 하나 이상의 백본 변형을 포함하고, 구별되는 (즉, 백본 변형에 포함되지 않는) 영역을 둘러싼다. 올리고뉴클레오타이드는 하나 또는 양쪽 말단에, 즉, 3' 및/또는 5' 말단에 분자 종을 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 분자 종은 천연 발생 또는 비-천연 발생 뉴클레오타이드가 아닌 임의의 화합물을 지칭한다. 분자 종에는 스페이서, 지질, 스테롤, 지질 모이어티, 예컨대 콜레스테롤 모이어티, 콜산, 티오에테르, 예를 들어 헥실-S-트리틸티올, 티오콜레스테롤, 지방족 쇠, 예를 들어 도데칸디올 또는 운데실 잔기, 인지질, 예를 들어 디-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-0-헥사데실-rac-글리세로-3-H-포스포네이트, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 쇠, 또는 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카르 보닐-옥시콜레스테롤 모이어티, 스테아릴, C16 알킬 쇠, 담즙산, 콜산, 타우로콜산, 데옥시콜레이트, 올레일 리 토콜산, 올레오일 콜렌산, 당지질, 인지질, 스펅고지질, 이소프레노이드, 예컨대 스테로이드, 비타민, 예컨대 비타민 E, 포화 지방산, 불포화 지방산, 지방산 에스테르, 예컨대 트리글리세리드, 피렌, 포르피린, 텍사피린, 아다만탄, 아크리딘, 비오틴, 코우마린, 플루오레세인, 로다민, 텍사스-레드, 디곡시게닌, 디메톡시트리틸, t-부틸디메틸실릴, t-부틸디페닐실릴, 시아닌 염료 (예를 들어, Cy3 또는 Cy576), 획스트 33258 염료, 프소랄렌, 또는 이부프로펜이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0058] 분자 종은 올리고뉴클레오타이드의 다양한 위치에서 부착될 수 있다.

[0059] 상기 기재된 바와 같이, 분자 종은 올리고 뉴클레오타이드의 2'-말단, 3'-말단 또는 5'-말단에 연결될 수 있으며, 여기서 이는 3'- 또는 5'- 엑소뉴클레아제에 대한 올리고머의 안정성을 개선시키기 위한 목적으로도 작용한다.

[0060] 대안적으로, 이는 내부 뉴클레오타이드 또는 분자 상의 뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 분자 종은 뉴클레오타이드의 2'-위치에 부착될 수 있다. 분자 종 은 뉴클레오타이드의 헤테로시클릭 염기에도 연결될 수 있다. 분자 종은 링커 모이어티에 의해 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 임의적으로, 링커 모이어티는 비-뉴클 레오타이드성 링커 모이어티이다. 비-뉴클레오타이드성 링커는 예를 들어 무염기성 잔기 (디스페이서), 올리고에틸 렌글리콜, 예컨대 트리에틸렌글리콜 또는 헥사에틸렌글리콜, 또는 알칸-디올, 예컨대 부탄디올이다. 스페이서 단위는 바람직하게는 포스포디에스테르, 포스포로디티오에이트 또는 포스포로티오에이트 결합에 의해 연결된다. 링커 단위는 분자에 하나만 있을 수 있거나 또는 예를 들어 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 메틸포스포 네이트

또는 아마이드 연결을 통해 여러번 도입될 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 (뉴클레오타이드를 분자 종에 연결하는 링커와는 별개로) 비-뉴클레오타이드성 링 커, 특히 무염기성 링커 (디스페이서), 트리에틸렌 글리콜 단위 또는 헥사에틸렌 글리콜 단위를 또한 함유할 수 있다. 추가로 바람직한 링커는 알킬아미노 링커, 예컨대 C3, C6, C12 아미노링커, 및 또한 알킬티올 링커, 예컨대 C3 또는 C6 티올 링커이다.

[0062] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 올리고뉴클레오타이드 또는 상기 올리고뉴클레오타이드의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는, COVID-19 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0063] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 상기 올리고뉴클레오타이드 또는 상기 올리고뉴클레오타이드의 약학적으로 허용되는 염의 세포 내 전달 효율을 높이기 위해 전달체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0064] 세포 내로 상기 올리고뉴클레오타이드 또는 상기 올리고뉴클레오타이드의 약학적으로 허용되는 염을 전달하기 위한 전달체에는 바이러스성 벡터, 비바이러스성 벡터, 리포솜, 양이온성 고분자, 미셀(micelle), 에멀전, 지질 나노입자(solid lipid nanoparticles), 엑소솜(exosome) 등이 있다. 상기 바이러스성 벡터(viral vector)는 전달 효율이 높고 지속 시간이 긴 이점이 있다. 상기 바이러스성 벡터에는 레트로바이러스 벡터(retroviral vector), 아데노바이러스 벡터(adenoviral vector), 백시니아바이러스 벡터, 아데노 부속 바이러스 벡터(adenovirus-associated viral vector), 암세포 용해성 바이러스 벡터 등이 포함된다. 비바이러스성 벡터(nonviral vector)는 플라즈미드를 포함할 수 있다. 그 외에도 리포솜, 양이온성 고분자, 미셀(micelle), 에멀전, 지질 나노입자(solid lipid nanoparticles) 등의 다양한 제형이 사용될 수 있다. 핵산 전달을 위한 양이온성 고분자에는 키토산, 아텔로콜라겐(atelocollagen), 양이온성 폴리펩타이드(cationic polypeptide) 등과 같은 천연고분자와 poly(L-lysine), 선형 또는 분지형 PEI(polyethylene imine), 사이클로덱스트린계열 다가양이온(cyclodextrin-based polycation), 덴드리머(dendrimer) 등과 같은 합성고분자가 포함된다.

[0065] 상기 지질 나노입자는 상기 올리고뉴클레오타이드 또는 상기 올리고뉴클레오타이드의 약학적으로 허용되는 염과 함께 핵산-지질 입자를 형성한다. 핵산-지질 입자는 보통 양이온성 지질, 비-양이온성 지질, 스테롤, 및 입자의 응집을 방지하는 지질(예컨대, PEG-지질 콘주게이트)을 포함한다. 핵산-지질 입자는 이들이 i.v. 주사 후 연장된 순환 수명을 나타내고 원위 부위(예컨대 투여 부위와 물리적으로 떨어진 부위)에 축적되므로, 전신 적용에 있어 극히 유용하다. 또한, 핵산이 본 발명의 핵산-지질 입자 중에 존재하는 경우 이들은 수용액 중에서 핵산 분해효소의 분해에 내성을 띤다. 핵산-지질 입자 및 이들의 제조 방법은 예컨대 미국 특허 제5,976,567호; 제5,981,501호; 제6,534,484호; 제6,586,410호; 제6,815,432호; 및 WO 96/40964에 개시되어 있다.

[0066] 핵산-지질 입자는 또한 하나 이상의 추가 지질 및/또는 기타 성분, 예컨대 콜레스테롤을 포함할 수 있다. 기타 지질은 다양한 목적, 예컨대 지질 산화를 방지하거나 또는 리포솜 표면 상에 리간드를 부착하기 위해 리포솜 조성물 중에 포함될 수 있다. 양친매성, 중성, 양이온성, 및 음이온성 지질을 포함하여 임의의 수의 지질이 존재할 수 있다. 이러한 지질은 단독으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0067] 핵산-지질 입자 중에 존재할 수 있는 추가 성분에는 이중층 안정화 성분, 예컨대 폴리아미드 올리고머(예컨대 미국 특허 제6,320,017호 참고), 펩타이드, 단백질, 세제, 지질-유도체, 예컨대 포스파티딜에탄올아민에 콘주게이트된 PEG 및 세라마이드에 콘주게이트된 PEG(미국 특허 제5,885,613호 참고)가 포함된다. 핵산-지질 입자는 하나 이상의 제 2 아미노 지질 또는 양이온성 지질, 중성 지질, 스테롤, 및 형성 동안 하전 유도 응집을 방지하는 입자의 구조적 안정화에서 기여할 수 있는, 형성 동안 지질 입자의 응집을 감소시키기 위해 선택되는 지질을 포함할 수 있다.

[0068] 상기 핵산-지질 입자는 압출 방법 또는 인-라인 혼합 방법을 통하여 만들 수 있다. 압출 방법(또는 배척(batch) 공정이라고도 함)은 비어있는 리포솜(가령, 핵산이 없는)을 먼저 만들고, 빈 리포솜에 핵산을 추가하는 방법으로 미국 특허 제5,008,050호; 제4,927,637호; 제4,737,323호; BiochimBiophysActa. 1979 Oct 19; 557(1):9-23; BiochimBiophysActa. 1980 Oct 2; 601(3):559-7; Biochim Biophys Acta. 1986 Jun 13; 858(1):161-8; 및 Biochim. Biophys. Acta 1985 812, 55-65에 설명되어 있으며, 이들의 전문을 참조할 수 있다.

[0069] 인라인(in-line) 혼합 방법은 지질 및 핵산을 나란하게 혼합 챔버에 추가하는 방법이다. 혼합 챔버는 단순한 T-커넥터이거나 당업계에 공지되어 있는 임의의 기타 혼합 챔버일 수 있다. 이러한 방법들은 미국 특허 제6,534,018호 및 미국 특허 제6,855,277호; US 공개특허 제2007-0042031호 및 Pharmaceuticals Research, Vol. 22, No. 3, Mar. 2005, pp. 362-372에 공개되어 있으며, 이들의 전문을 참조할 수 있다.

[0070] 일 구현예에 따르면, 핵산-지질 입자들은 지방성물질(리피도이드) ND98(MW 1487), 콜레스테롤 및 PEG-ceramide C16를 이용하여 합성될 수 있다. 지질-siRNA 나노입자들은 일반적으로 혼합시 자발적으로 형성된다. 원하는 입

자 크기 분포에 따라, 생성된 나노입자 혼합물은 예를 들면, Lipex Extruder (Northern Lipid, Inc)와 같은 열통(thermobarrel) 압출기를 이용하여 폴리카르보네이트 막(가령, 100 nm 컷-오프)을 통하여 압출될 수 있다. 일부 경우에, 압출 단계가 생략될 수 있다. 에탄올 제거 및 동시 완충액 교환은 투석 또는 접선 흐름 여과 방식(tangential flow filtration)에 의해 이루어질 수 있다. 완충액은 약 pH 7, 가령, 약 pH 6.9, 약 pH 7.1, 약 pH 7.2, 약 pH 7.3, 또는 약 pH 7.4에서 인산염 완충된 염(PBS)으로 교체될 수 있다.

- [0071] 상기 올리고뉴클레오타이드 또는 상기 올리고뉴클레오타이드의 약학적으로 허용되는 염이 전달체와의 복합체 형태로 인 비보 또는 인 비트로 상에서 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 제형은 당업계에 공지되어 있는 임의의 방법으로 제조할 수 있다.
- [0073] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 코로나-19 바이러스 감염증의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0074] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 코로나-19 바이러스 감염증 및 이로 인한 합병증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0075] 본 발명은 상기 올리고뉴클레오타이드 또는 상기 올리고뉴클레오타이드의 약학적으로 허용되는 염을 치료학적으로 유효한 양으로 포함하는 약학 조성물을 제공할 수 있는데, 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 코로나-19 바이러스 감염증을 예방 또는 치료하는데 유효한 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack PublishingCo.에 기술되어 있다.
- [0076] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 코로나-19 바이러스 감염증의 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 약학 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack PublishingCompany, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0078] 일 구현예에서, 상기 약학 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으며, 경구형 또는 주사 제형이 더욱 바람직하다.
- [0079] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 개체 또는 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제

로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 본 발명의 약학 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0080] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 상기 코로나-19 바이러스 감염증이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 박쥐, 낙타, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, "검체"란 이로부터 분리한 비말, 가래, 전혈, 혈장, 혈청, 뇨 또는 타액일 수 있다.

[0081] 본원에서 기술한 약학 조성물은 약리학 분야에 알려져 있거나 이후 내용에서 전개되는 임의의 방법에 의해 제조될 수도 있다. 일반적으로, 이러한 정제용 방법은 활성 성분을 부형제 및/또는 하나 이상의 다른 보조 성분과 연관시키는 단계를 포함하고, 이어서 필요하거나 원하는 경우 생성물을 원하는 단일- 또는 다중-용량 단위로 성형 및/또는 포장하는 단계를 포함한다.

[0082] 본 발명의 약학 조성물은 단일 단위 용량 및/또는 복수의 단일 단위 용량으로서 제조, 포장, 및/또는 포장하지 않은 채로 판매될 수도 있다. 본원에서 사용하는 바와 같이, "단위 용량"은 사전 설정된 양의 활성 성분을 포함하는 약학 조성물의 개별적인 양이다. 활성 성분의 양은 대상체에게 투여되는 활성 성분의 투여량 및/또는 그러한 투여량의 편리한 분획 예컨대 예를 들어 투여량의 1/2 또는 1/3과 일반적으로 동일하다.

[0083] 발명의 약학 조성물 내 활성 성분, 제약상 허용되는 부형제, 및/또는 임의의 추가 성분의 상대량은 치료 대상체의 동일성, 크기, 및/또는 장애에 따라 그리고 조성물이 투여되는 경로에 따라 변할 것이다. 예로서, 조성물은 0.1% 내지 100% (w/w) 활성 성분을 포함할 수도 있다.

[0084] 본원에서 사용하는 바와 같이, 제약상 허용되는 부형제는 특정한 투여 형태 목적에 적합한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 희석제, 또는 다른 액체 비히클, 분산액 또는 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장화제, 증점제 또는 유화제, 보존제, 고체 결합제, 윤활제 등을 포함한다. 레밍턴(Remington)의 문헌[The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)]은 약학 조성물 조제에 사용된 다양한 부형제 및 이의 제조를 위한 공지된 기술을 개시한다. 임의의 통상적인 담체 배지가 예컨대 임의의 원하지 않는 생물학적 효과를 제공하거나 다르게는 약학 조성물의 임의의 다른 성분과 유해한 방식으로 상호작용함으로써 물질 또는 그 유도체와 공존할 수 없는 것을 제외하고, 그 용도는 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 고려한다. 제약상 허용되는 부형제는 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 순수하다.

[0085] 일부 실시예에서, 부형제는 인간 및 수의학적 용도에서 승인되어 있다. 일부 실시예에서, 부형제는 미국식품의약품국에 의해 승인되어 있다. 일부 실시예에서, 부형제는 제약 등급이다. 일부 실시예에서, 부형제는 미국 약전(USP), 유럽 약전(EP), 영국 약전, 및/또는 국제 약전(EP)의 표준을 충족한다.

[0086] 약학 조성물의 제조에 사용된 제약상 허용되는 부형제는 불활성 희석제, 분산제 및/또는 과립화제, 표면 활성제 및/또는 유화제, 봉해제, 결합제, 보존제, 완충제, 윤활제, 및/또는 오일을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0087] 이러한 부형제는 임의로 본 발명의 제제에 포함될 수도 있다. 부형제 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스, 착색제, 코팅제, 감미제, 향미제, 및 퍼프제는 조제사의 판단에 따라 조성물에 존재할 수 있다.

[0088] 예시적인 희석제는 탄산칼슘, 탄산나트륨, 인산칼슘, 인산이칼슘, 황산칼슘, 칼슘 히드로젠 포스페이트, 인산나트륨 락토스, 수크로스, 셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 카올린, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 염화나트륨, 건조 전분, 옥수수 전분, 분말형 당, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0089] 예시적인 과립화제 및/또는 분산제는 감자 전분, 옥수수 전분, 타피오카 전분, 소듐 스타치 글리콜레이트, 점토, 알긴산, 구아 검, 시트러스 펄프, 한천, 벤토나이트, 셀룰로스 및 목재 생성물, 천연 스폰지, 양이온-교

환 수지, 탄산칼슘, 규산염, 탄산나트륨, 가교-결합형 폴리(비닐-피롤리돈) (크로스포비돈), 소듐 카르복시메틸 전분 (소듐 스타치 글리콜레이트), 카르복시메틸 셀룰로스, 가교-결합형 소듐 카르복시메틸 셀룰로스 (크로스카르멜로스), 메틸셀룰로스, 예비젤라틴화 전분 (전분 1500), 미세결정질 전분, 수불용성 전분, 칼슘 카르복시메틸 셀룰로스, 규산알루미늄마그네슘 (비검), 소듐 라우릴 술페이트, 4급 암모늄 화합물, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0090] 예시적인 표면 활성제 및/또는 유화제는 천연 유화제 (예를 들어 아카시아, 한천, 알긴산, 알긴산나트륨, 트라가칸트, 혼드릭스(chondrux), 콜레스테롤, 크산탄, 펙틴, 젤라틴, 난황, 카세인, 양모 지방, 콜레스테롤, 왁스, 및 레시틴), 콜로이드성 점토 (예를 들어 벤토나이트 [규산알루미늄] 및 비검 [규산알루미늄마그네슘]), 장쇄 아미노산 유도체, 고분자량 알콜 (예를 들어 스테아릴 알콜, 세틸 알콜, 올레일 알콜, 트리아세틴 모노스테아레이트, 에틸렌 글리콜 디스테아레이트, 글리세릴 모노스테아레이트, 및 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 폴리비닐 알콜), 카르보머 (예를 들어 카르복시 폴리메틸렌, 폴리아크릴산, 아크릴산 중합체, 및 카르복시비닐 중합체), 카라기난, 셀룰로스 유도체 (예를 들어 카르복시메틸셀룰로스 소듐, 분말화 셀룰로스, 히드록시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스), 소르비탄 지방산 에스테르 (예를 들어 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트 [트윈 20], 폴리옥시에틸렌 소르비탄 [트윈 60], 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트 [트윈 80], 소르비탄 모노팔미테이트 [스팬 40], 소르비탄 모노스테아레이트 [스팬 60], 소르비탄 트리스테아레이트 [스팬 65], 글리세릴 모노올레이트, 소르비탄 모노올레이트 [스팬 80]), 폴리옥시에틸렌 에스테르 (예를 들어 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트 [미르즈 45], 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자 오일, 폴리에톡실화 피마자 오일, 폴리옥시메틸렌 스테아레이트, 및 솔루톨), 수크로스 지방산 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 지방산 에스테르 (예를 들어 크레모포르), 폴리옥시에틸렌 에테르, (예를 들어 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르 [브리즈 30]), 폴리(비닐-피롤리돈), 디에틸렌 글리콜 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트, 올레산나트륨, 칼륨 올레이트, 에틸 올레이트, 올레산, 에틸 라우레이, 소듐 라우릴 술페이트, 플루로닉 F 68, 폴록사머 188, 세트리모늄 브로마이드, 세틸피리디늄 클로라이드, 벤즈알코늄클로라이드, 도큐세이트 소듐, 및/또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0091] 예시적인 결합제는 전분 (예를 들어 옥수수 전분 및 전분 페이스트); 젤라틴; 당 (예를 들어 수크로스, 글루코스, 텍스트로스, 텍스트린, 당밀, 락토스, 락티톨, 만니톨); 천연 및 합성 검 (예를 들어 아카시아, 알긴산나트륨, 아이리쉬 모스의 추출물, 판위 검, 새티 검, 이사폴 후스크스의 점액, 카르복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 히드록시메틸셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트, 폴리(비닐-피롤리돈), 규산알루미늄마그네슘 (비검), 및 라치 아라보갈락탄); 알기네이트; 폴리에틸렌 옥시드; 폴리에틸렌 글리콜; 무기 칼슘 염; 규산; 폴리메타크릴레이트; 왁스; 물; 알콜; 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0092] 예시적인 보존제는 항산화제, 킬레이트화제, 항미생물 보존제, 항진균 보존제, 알콜 보존제, 산성 보존제, 및 다른 보존제를 포함할 수도 있다. 예시적인 항산화제는 알파 토크페롤, 아스코르브산, 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 모노티오글리세롤, 메타중아황산칼륨, 프로피온산, 프로필 갈레이트, 아스코르브산나트륨, 중아황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 및 아황산나트륨을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 킬레이트화제는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 시트르산 1수화물, 이나트륨 에데테이트, 이칼륨 에데테이트, 에데트산, 푸마르산, 말산, 인산, 소듐 에데테이트, 타르타르산, 및 트리소듐 에데테이트를 포함한다. 예시적인 항미생물 보존제는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 벤질 알콜, 브로노폴, 세트리미드, 세틸피리디늄 클로라이드, 클로르헥시딘, 클로로부탄올, 클로로크레졸, 클로로크실레놀, 크레졸, 에틸 알콜, 글리세린, 헥세티딘, 이미드우레아, 페놀, 페녹시에탄올, 페닐에틸 알콜, 페닐질산수은 (phenylmercuric nitrate), 프로필렌 글리콜, 및 티메로살을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 항진균 보존제는 부틸 파라벤, 메틸 파라벤, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 벤조산, 히드록시벤조산, 칼륨 벤조에이트, 소르브산칼륨, 벤조산나트륨, 프로피온산나트륨, 및 소르브산을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 알콜 보존제는 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 페놀, 페놀계 화합물, 비스페놀, 클로로부탄올, 히드록시벤조에이트, 및 페닐에틸 알콜을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 산성 보존제는 비타민 A, 비타민 C, 비타민 E, 베타-카로틴, 시트르산, 아세트산, 데히드로아세트산, 아스코르브산, 소르브산, 및 피트산을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 다른 보존제는 토크페롤, 토크페롤 아세테이트, 데테록시메 메실레이트, 세트리미드, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔드 (BHT), 에틸렌디아민, 소듐 라우릴 술페이트 (SLS), 소듐 라우릴 에테르 술페이트 (SLES), 중아황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 칼륨 술파이트, 메타중아황산칼륨, 글리칸트 플러스, 페노립, 메틸파라벤, 저몰 115, 게르마벤 II, 네올론, 카톤, 및 에옥실을 포함하지만 이에 제

한되지 않는다. 특정 실시예에서, 보존제는 항-산화제이다. 다른 실시예에서, 보존제는 킬레이트화제이다.

[0093] 예시적인 완충제는 시트레이트 완충 용액, 아세테이트 완충 용액, 포스페이트 완충제 용액, 염화암모늄, 탄산칼슘, 염화칼슘, 칼슘 시트레이트, 칼슘 글루비오네이트, 칼슘 글루셉테이트, 칼슘 글루코네이트, D-글루콘산, 글리세로인산칼슘, 락트산칼슘, 프로판산, 칼슘 레볼리네이트, 펜탄산, 이염기성 인산칼슘, 인산, 삼염기성 인산칼슘, 수산화칼슘 포스페이트, 아세트산칼슘, 염화칼슘, 글루콘산칼슘, 칼륨 혼합물, 이염기성 인산칼슘, 일염기성 인산칼슘, 인산칼슘 혼합물, 아세트산나트륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨, 시트르산나트륨, 락트산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 일염기성 인산나트륨, 인산나트륨 혼합물, 트로메타민, 수산화마그네슘, 수산화알루미늄, 알긴산, 피로젠-자유수, 등장성 염수, 링거(Ringer's) 용액, 에틸 알콜, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0094] 예시적인 윤활제는 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 스테아르산, 실리카, 활석, 맥아, 글리세릴 베하네이트, 수소화 식물성 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 벤조산나트륨, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 류신, 마그네슘 라우릴 술페이트, 소듐 라우릴 술페이트, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0095] 예시적인 오일은 아몬드, 살구 커널, 아보카도, 바바수야자, 베르가모트, 흑색 커런트 종자, 보리지, 케이드, 카모마일, 카놀라, 카라웨이, 카르나우바, 카스토르, 시나몬, 코코아 버터, 코코넛, 대구 간, 커피, 옥수수, 목화 종자, 예뮈, 유칼립투스, 달맞이꽃, 생선, 아마 씨, 게라니올, 호박, 포도 종자, 개암, 히습, 이소프로필 미리스테이트, 호호바, 쿠쿠이 너트, 라반딘, 라벤더, 레몬, 리트세아 쿠베바, 마카데미아 너트, 아욱, 망고 종자, 메도우폼 종자, 밍크, 너트, 올리브, 오렌지색의 오렌지색 라피, 팜, 팜핵, 복숭아 커널, 땅콩, 양귀비 종자, 호박 종자, 평지씨, 쌀겨, 로즈마리, 홍화, 샌달우드, 사스쿠아나, 세이보리, 산자나무, 참깨, 시어 버터, 실리콘, 대두, 해바라기, 티트리, 엉겅퀴, 쓰바키, 베티버, 호두, 및 밀 배아 오일을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 오일은 부틸 스테아레이트, 카프릴산 트리글리세리드, 카프르산 트리글리세리드, 시클로메티콘, 디에틸 세바케이트, 디메티콘 360, 이소프로필 미리스테이트, 미네랄 오일, 옥틸도데칸올, 올레일 알콜, 실리콘 오일, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0096] 경구 및 비경구 투여를 위한 액체 투여 형태는 제약상 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 활성 성분 외에, 액체 투여 형태는 본 기술분야에 공동으로 사용된 불활성 희석제 예컨대, 예를 들어, 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제 예컨대 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일 (특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 쌀, 올리브, 아주까리, 및 참깨 오일), 글리세롤, 테트라히드로프루피루알, 소르비탄의 폴리에틸렌 글리콜 및 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 포함할 수도 있다. 불활성 희석제 외에, 경구 조성물은 아주반트 예컨대 습윤제, 유화제 및 현탁화제, 감미제, 향미제, 및 퍼폼제를 포함할 수 있다. 비경구 투여를 위한 특정 실시예에서, 본 발명의 키메라 화합물은 가용화제 예컨대 크레모포르, 알콜, 오일, 변성 오일, 글리콜, 폴리소르베이트, 시클로텍스트린, 중합체, 및 이들의 조합과 혼합된다.

[0097] 주사가능한 제제, 예를 들어, 멸균 주사가능한 수성 또는 유성 현탁액은 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 공지된 기술 분야에 따라 조제될 수도 있다. 멸균 주사가능한 제제는 비독성 비경구 허용되는 희석제 또는 용매, 예를 들어, 1,3-부탄디올 내 용액에서의 멸균 주사가능한 용액, 현탁액 또는 에멀전일 수도 있다. 허용되는 비히클 및 용매 중에서 채택될 수도 있는 것은 물, 링거(Ringer's) 용액, U.S.P. 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 또한, 멸균, 고정 오일은 통상적으로 용매 또는 현탁 매질로서 채택되고 있다. 이를 위하여 합성 모노- 또는 디글리세리드를 포함하는 임의의 무자극 고정 오일이 채택될 수 있다. 또한, 지방산 예컨대 올레산이 주사제의 제조에 사용되고 있다.

[0098] 주사가능한 제제는 예를 들어 박테리아-보유 필터를 통한 여과에 의해, 또는 사용 전에 멸균수 또는 다른 멸균 주사가능한 배지에 용해 또는 분산될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태인 멸균제를 포함시킴으로써 멸균될 수 있다.

[0099] 약물의 효과를 연장하기 위하여, 흔히 피하 또는 근육내 주사로부터 약물의 흡수를 느리게 할 수 있다. 이는 낮은 수용해도를 갖는 결정질 또는 무정형 물질의 액체 현탁액을 사용함으로써 이루어진다. 그러면 약물의 흡수율은 결국 결정 크기 및 결정질 형태에 좌우될 수 있는 용해율에 좌우된다. 대안으로, 비경구 투여 약물의 지연된 흡수는 오일 비히클에서 약물을 용해 또는 현탁화함으로써 이루어진다.

[0100] 본 발명의 국소 투여를 위한 제제는 액체 및/또는 세미 액체 제제 예컨대 도찰제, 로션, 수중유 및/또는 유중수

에멀전 예컨대 크림, 연고/또는 페이스트, 및/또는 용액 및/또는 현탁액을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 활성 성분의 농축이 용매 내 활성 성분의 용해도 한계만큼 높을 수도 있지만, 국소-투여가능한 제제는 예를 들어 약 1% 내지 약 10% (w/w) 활성 성분을 포함할 수도 있다. 국소 투여를 위한 제제는 본원에서 기술한 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함할 수도 있다.

[0101] 본 발명의 약학 조성물은 구강을 통한 폐 투여를 위한 제제로서 제조, 포장, 및/또는 판매될 수도 있다. 이러한 제제는 활성 성분을 포함하고 약 0.5 내지 약 7 나노미터 또는 약 1 내지 약 6 나노미터 범위 내 직경을 갖는 건조 입자를 포함할 수도 있다. 이러한 조성물은 분말을 분산시키도록 추진제의 스트림이 향할 수도 있는 건조 분말 저장소를 포함하는 장치를 사용하는 투여를 위하여 그리고 자체 추진 용매/분말 분배 용기 예컨대 밀봉된 용기 내 낮은-비등 추진제에 용해 및/또는 현탁화된 활성 성분을 포함하는 장치를 사용하는 투여를 위하여 편리하게는 건조 분말의 형태이다. 이러한 분말은 중량 기준으로 입자의 적어도 98%가 0.5 나노미터 초과와 직경을 갖고 수 기준으로 입자의 적어도 95%가 7 나노미터 미만의 직경을 갖는 입자들을 포함한다. 대안으로, 중량 기준으로 입자의 적어도 95%가 1 나노미터 초과와 직경을 갖고 수 기준으로 입자의 적어도 90%가 6 나노미터 미만의 직경을 갖는다. 건조 분말 조성물은 고체 미세 분말 희석제 예컨대 당을 포함할 수도 있고 편리하게는 단위 투여 형태로 제공된다.

[0102] 낮은 비등 추진제는 일반적으로 대기압에서 65°F 미만의 비점을 갖는 액체 추진제를 포함한다. 일반적으로 추진제는 조성물의 50 내지 99.9%(w/w)를 구성할 수도 있고, 활성 성분은 조성물의 0.1 내지 20%(w/w)를 구성할 수도 있다. 추진제는 추가 성분 예컨대 액체 비-이온성 및/또는 고체 음이온성 계면활성제 및/또는 고체 희석제 (활성 성분을 포함하는 입자와 동일한 등급의 입자 크기를 가질 수도 있음)를 추가로 포함할 수도 있다.

[0103] 폐 전달을 위해 조제된 본 발명의 약학 조성물은 용액 및/또는 현탁액의 액적 형태로 활성 성분을 제공할 수도 있다. 이러한 제제는 수성 및/또는 묽은 알콜성 용액 및/또는 현탁액, 임의로 활성 성분을 포함하는 멸균으로서 제조, 포장, 및/또는 판매될 수도 있고, 편리하게는 임의의 연무화 및/또는 분무화 장치를 사용하여 투여될 수도 있다. 이러한 제제는 향미제 예컨대 사카린 소듐, 휘발성 오일, 완충제, 표면 활성제, 및/또는 보존제 예컨대 메틸히드록시벤조에이트를 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함할 수도 있다. 이러한 투여 경로에 의해 제공된 액적은 약 0.1 내지 약 200 나노미터 범위 내의 평균 직경을 가질 수도 있다.

[0104] 폐 전달에 유용한 본원에서 기술한 제제는 본 발명의 약학 조성물의 비강내 전달에 유용하다. 비강내 투여를 위한 또 다른 제제는 활성 성분을 포함하고 약 0.2 내지 500 마이크로미터의 평균 입자를 갖는 조대 분말이다. 이러한 제제는 스너프가 취해지는 방식으로, 즉 콧구멍에 가깝게 있는 분말 용기로부터 비도를 통한 고속 흡입에 의해 투여된다.

[0105] 비강 투여를 위한 제제는 예를 들어 활성 성분의 약 0.1%(w/w) 내지 100%(w/w)를 포함할 수도 있고, 본원에서 기술한 하나 이상의 추가 성분을 포함할 수도 있다. 본 발명의 약학 조성물은 구강 투여를 위한 제제로 제조, 포장, 및/또는 판매될 수도 있다. 이러한 제제는 예를 들어 통상적인 방법으로 제조된 정제 및/또는 로렌지의 형태일 수도 있고, 예를 들어 0.1 내지 20%(w/w) 활성 성분, 경구 용해가능하고/거나 분해가능한 조성물을 포함하는 밸런스 및 임의로 본원에서 기술한 하나 이상의 추가 성분을 포함할 수도 있다. 대안으로, 구강 투여를 위한 제제는 분말 및/또는 에어로졸화 및/또는 분무화 용액 및/또는 활성 성분을 포함하는 현탁액을 포함할 수도 있다. 분산될 때, 이러한 분말형, 에어로졸형, 및/또는 분무형 제제는 약 0.1 내지 약 200 나노미터 범위 내의 액적 크기 및/또는 평균 입자를 가질 수도 있고, 본원에서 기술한 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함할 수도 있다.

[0107] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0109] 실시예에서 +A, +T, +G, +C는 LNA를 나타내고, A, T, C, G는 DNA를 나타낸다.

[0111] **실시예 1. TIS-L을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 문헌 검색 및 효과 검증**

[0113] TIS-L을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 SARS-CoV-2의 증식을 효과적으로 억제할 것으로 예측되는바, 이를 검증하기 위하여, TIS-L을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 문헌 검색하였다. 그 결과, Neuman(Journal of virology 79.15 (2005): 9665-9676)의 문헌에서 코로나바이러스를 억제하고자 TIS-L을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제작하였음을 확인하고, 해당 안티센스 올리고뉴클레오타이드가

SARS-CoV-2의 증식을 효과적으로 억제하는지 확인하였다. SARS-CoV-2 억제 효과를 확인한 Vora(Proceedings of the National Academy of Sciences 119.9 (2022): e2117198119)의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0115] Neuman 서열(서열번호 1): +T+A+AAGTTCGTTTAGAGAA+C+A+G [제조처: IDT]

[0116] Vora 서열(서열번호 2): +C+C+TGGAAGGTATAAACCTTT+A+A+T [제조처: BIONEER]

[0118] 본 발명의 항바이러스 효능을 평가하기 위하여 고려대학교 의과대학의 고병원성 바이러스 병원체 관련 실험을 수행할 수 있는 생물안전 3등급 시설(Biosafety Level 3, BSL3)을 사용하였다.

[0119] 본 발명자들은 Vero 세포주를 기반으로 코로나19 바이러스에 대한 플라크 형성 시험법(plaque assay)과 qRT-PCR 기반 항바이러스 치료제 유효성 평가법을 확립하였고 이를 기반으로 항바이러스 효능평가 실험을 수행하였다. 구체적으로 도 1b에서와 같이 Vero 세포주에 안티센스 올리고뉴클레오타이드(750nM)와 transfecting reagent인 Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher)을 제조사 지침에 따라 처리하고 6-8시간 뒤 SARS-CoV-2 바이러스 감염시킨 후, 24시간 경과하여 qRT-PCR 및 plaque assay를 수행하여 바이러스 증식을 관찰하였다. qRT-PCR을 수행하기 위해 supernatant를 수득하여 Maxwell RSV Viral Total Nucleic Acid Purification kit (Promega)를 이용해 RNA를 추출하였고, 그 후 아래의 프라이머들을 이용해 qRT-PCR을 수행하였다.

[0120] Forward: (5'-GTGARATGGTCATGTGTGGCGG)

[0121] Reverse: (5'-CARATGTTAAASACACTATTAGCATA)

[0122] Probe: (5'-FAMCAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC - BHQ1)

[0123] Plaque assay는 6-well plate에 Monolayer로 깔린 Vero 세포를 희석된 supernatant로 감염 후 2% agarose가 추가된 DMEM-F12 (Sigma-Aldrich) 배지로 덮은 후 72시간 뒤에 crystal violet (Georgia Chemicals Inc.)으로 염색하였다. qRT-PCR 및 Plaque assay 실험방법은 Bae & Lee(Biomolecules & Therapeutics 2021; 29(3): 268-272)에서 서술된 바와 같이 진행하였다.

[0124] 사용된 Vero 세포주 (KCLB Cat#10081)는 Korean Cell Line Bank에서 구입하였고, SARS-CoV-2 (BetaCoV/Korea/KCDC03/2020, NCCP no. 43326)바이러스는 질병관리청 국가병원체자원은행(National Culture Collection for Pathogens, NCCP)을 통하여 확보하였다. 분양한 바이러스는 Vero 세포주에서 증식하였다.

[0125] 그 결과, 도 1c서와 같이, Vora가 개시하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 SARS-CoV-2의 증식 효과를 발휘하는 반면, Neuman이 개시하는 TIS-L을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 SARS-CoV-2 증식 억제 효과가 상대적으로 미미한 것으로 확인되었다.

[0127] 실시예 2. TIS-L을 표적으로 하는 20mer 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 제작 및 효과 검증

[0129] 비록 Neuman의 문헌에서 개시하는 TIS-L을 표적으로 하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 SARS-CoV-2 억제 효과가 약하게 나타났으나, 본 발명에서는 TIS-L을 표적으로 하는 2개의 20mer 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 추가로 제작하고(도 2a) 실시예 1과 같은 방법으로 SARS-CoV-2 증식 억제 실험을 진행하여 항바이러스 치료제로서의 유효성을 평가하였다.

[0131] MIDDLE-(20mer) 서열(서열번호 3): +T+T+AGAGAACAGATCTAC+A+A+G [제조처: IDT]

[0132] END-(20mer) 서열(서열번호 4): +C+A+GATCTACAAGAGATC+G+A+A [제조처: IDT]

[0134] 그 결과, 도 2b에서와 같이 TIS-L에 상보적으로 결합하는 위치를 5' 말단에 위치시킨 END-(20mer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 TIS-L에 상보적으로 결합하는 위치를 중간에 위치시킨 MIDDLE-(20mer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드 모두에서 SARS-CoV-2의 증식을 효과적으로 억제시키지 못하는 것으로 확인되었다.

[0136] 실시예 3. TIS-L을 표적으로 하는 24mer 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 제작 및 효과 검증

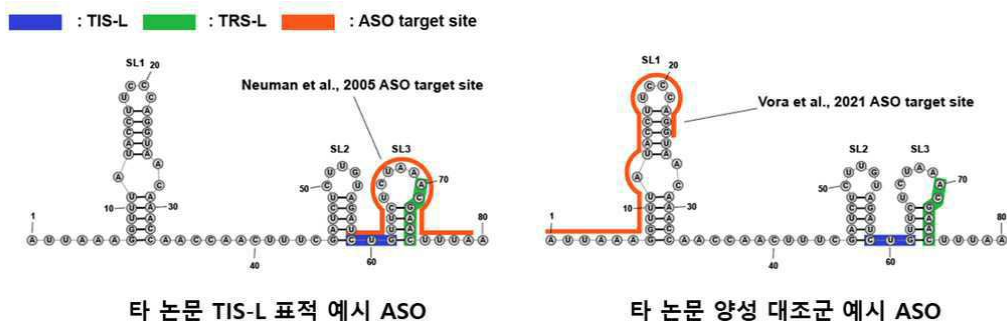
[0138] 비록 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 통상적인 길이인 20mer의 END-(20mer)와 MIDDLE-(20mer)가 SARS-CoV-2 증식을 효과적으로 억제시키지 못하는 것으로 확인되었으나, 본 발명자들은 TIS-L이 SARS-CoV-2 증식을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 표적일 수 있다는 가정 하에 TIS-L을 다양한 위치에서 표적으로 하는 3개의 24mer 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 추가로 제작하였다 (도 3a).

[0140] BOTH-(24mer) 서열(서열번호 5): +G+T+TCGTTTAGAGAACAGATCT+A+C+A [제조처: BIONEER]

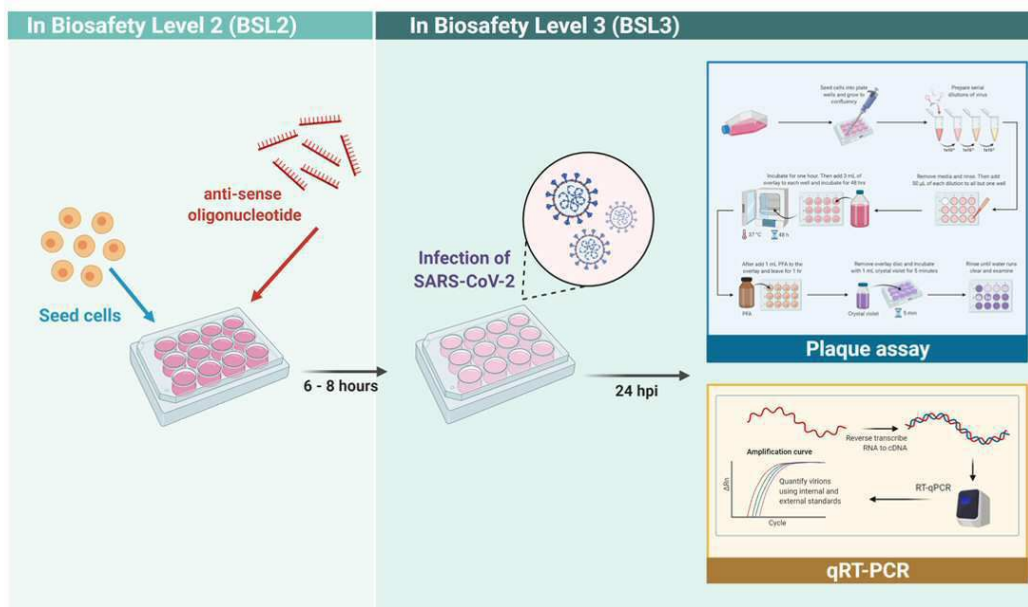
- [0141] MIDDLE-(24mer) 서열(서열번호 6): +T+T+AGAGAACAGATCTACAAGA+G+A+T [제조처: BIONEER]
- [0142] END-(24mer) 서열(서열번호 7): +C+A+GATCTACAAGAGATCGAAA+G+T+T [제조처: BIONEER]
- [0144] 그 결과, 도 3b에서와 같이 TIS-L에 상보적으로 결합하는 위치를 중간에 위치시킨 MIDDLE-(24mer) 서열은 전혀 SARS-CoV-2 증식을 억제시키지 못한 반면, TIS-L과 TRS-L을 모두 표적으로 하는 BOTH-(24mer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 TIS-L에 상보적으로 결합하는 위치를 5' 말단에 위치시킨 END-(24mer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 SARS-CoV-2 증식을 억제시키는 것으로 나타났다. 이중에서도 END-(24mer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 경우 SARS-CoV-2 증식 억제 효과가 특히 우수한 것으로 확인되었다.
- [0146] 한편, BOTH-(24mer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 END-(24mer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 SARS-CoV-2 원형주 바이러스 및 변이주 바이러스 (Delta 변이주, Omicron BA.5 변이주)에 대한 항바이러스 효능을 추가적으로 평가하였다. 본 실험에 사용된 SARS-CoV-2 원형주(NCCP no. 43326), 델타 변이주(B.1.617.2; NCCP no. 43390), 오미크론 변이주(BA.5; NCCP no. 43426)바이러스는 질병관리청 국가병원체자원은행(National Culture Collection for Pathogens, NCCP)을 통하여 확보하였다.
- [0148] 그 결과, 도 3c에서와 같이 END-(24mer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드에서만 SARS-CoV-2 원형주 바이러스 및 변이주 바이러스 모두에서 항바이러스 효능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 이는 기존에 양성대조군으로 삼은 Vora(Proceedings of the National Academy of Sciences 119.9 (2022): e2117198119)의 안티센스 올리고뉴클레오타이드보다 원형주 바이러스 및 변이주 바이러스 모두에서 훨씬 더 월등히 뛰어난 항바이러스 효능을 보여주는 것으로 확인되었다.
- [0150] **실시예 4. END-(24mer)의 IC₅₀ 확인**
- [0152] END-(24mer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 고농도 (1500nM)에서 저농도 (0.98nM)까지 세포에 처리 후 오미크론 변이주들 (BA.1, BA.5, XBB.1)와 원형주에 감염시키고 바이러스의 증식 억제 효능을 qRT-PCR를 통해 검증하였다. 실험방법은 도1b에 기재된 바와 동일하다. 본 실험에 사용된 S type 혹은 SARS-CoV-2 원형주(NCCP no. 43326), 오미크론 변이주(BA.1; NCCP no. 43408), 오미크론 변이주(BA.5; NCCP no. 43426), XBB.1 변이주(XBB.1; NCCP no. 43428)바이러스는 질병관리청 국가병원체자원은행(National Culture Collection for Pathogens, NCCP)을 통하여 확보하였다. IC₅₀값은 Bae & Lee(Biomolecules & Therapeutics 2021; 29(3): 268-272)에서 서술된 바와 같이 도출하였다.
- [0153] 그 결과, 도 4에서와 같이 END-(24mer)는 원형주 및 모든 변이주에서 매우 낮은 50% 억제농도 (50% inhibitory concentration, IC₅₀)를 가지는 것으로 확인되었다(85.52-356.4nM).
- [0155] **실시예 5. END-(24mer)의 세포 독성 실험**
- [0157] END-(24mer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 Vero 세포에 고농도 (1500nM)에서 저농도 (0.98nM)까지 농도별로 처리하고 WST-1 assay를 수행하여 세포의 생존율을 분석하였다. WST-1 assay는 WST-1 reagent (ROCHE)를 사용하여 제조사의 지침(도 5a)에 따라 진행하였다.
- [0158] 그 결과, 도 5b에서와 같이 END-(24mer) 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 고농도인 1500nM에서도 Vero 세포에 독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다.
- [0160] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

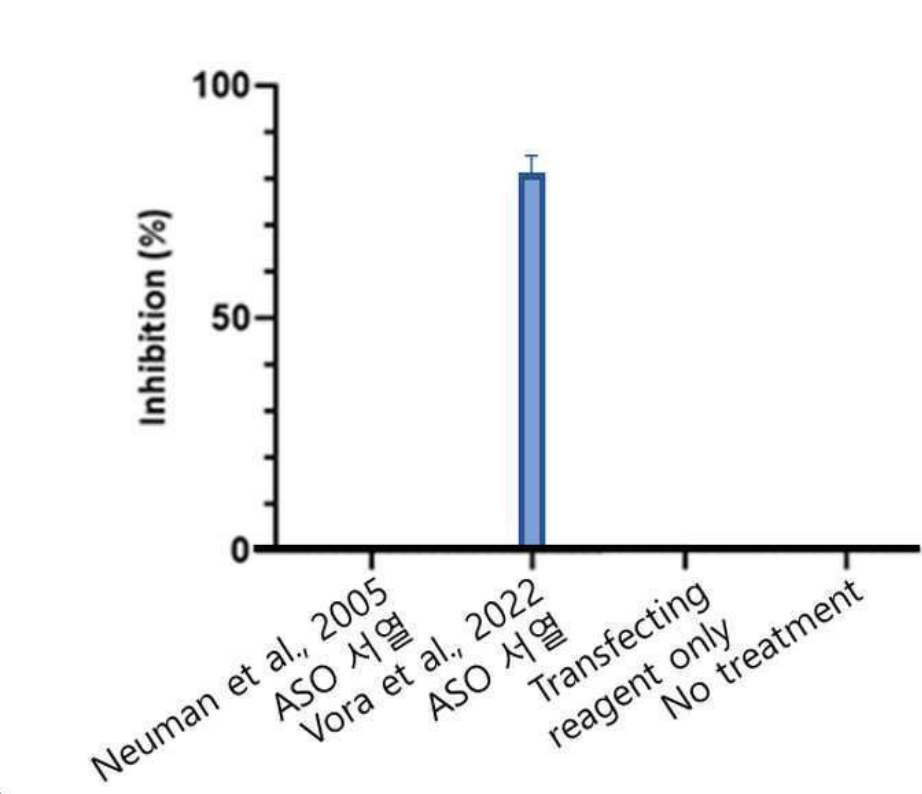
도면1a



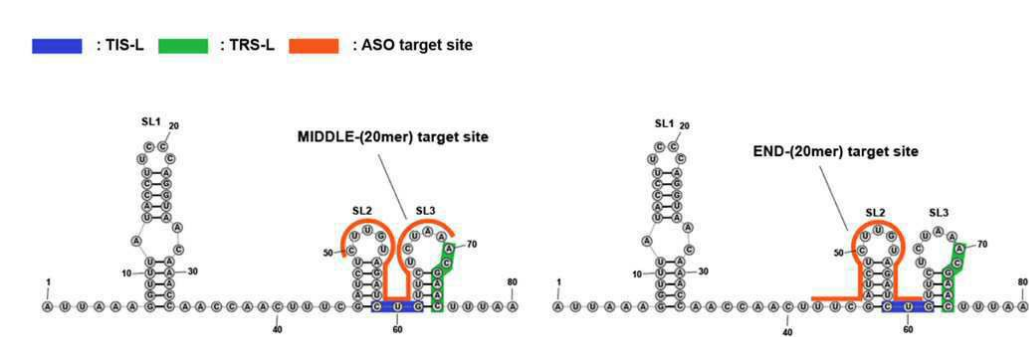
도면1b



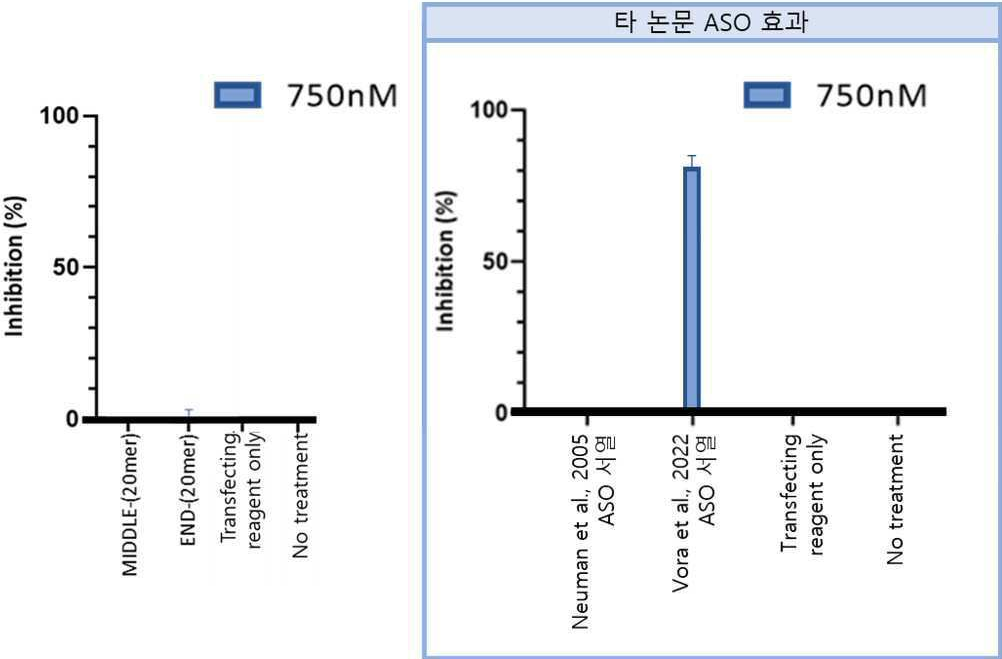
도면1c



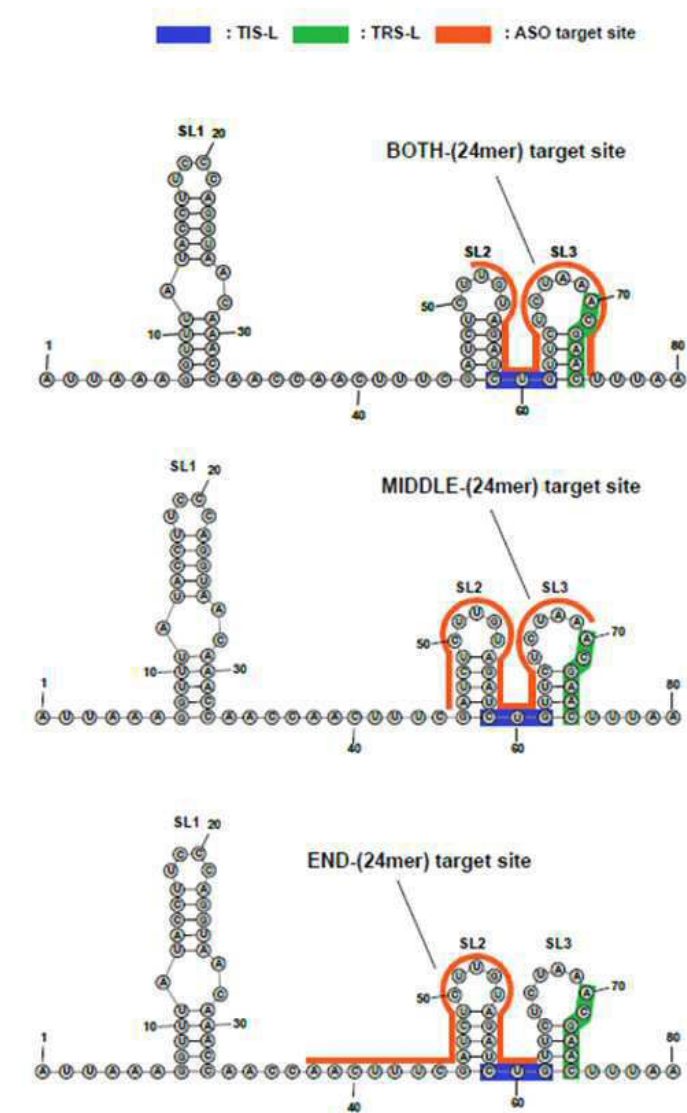
도면2a



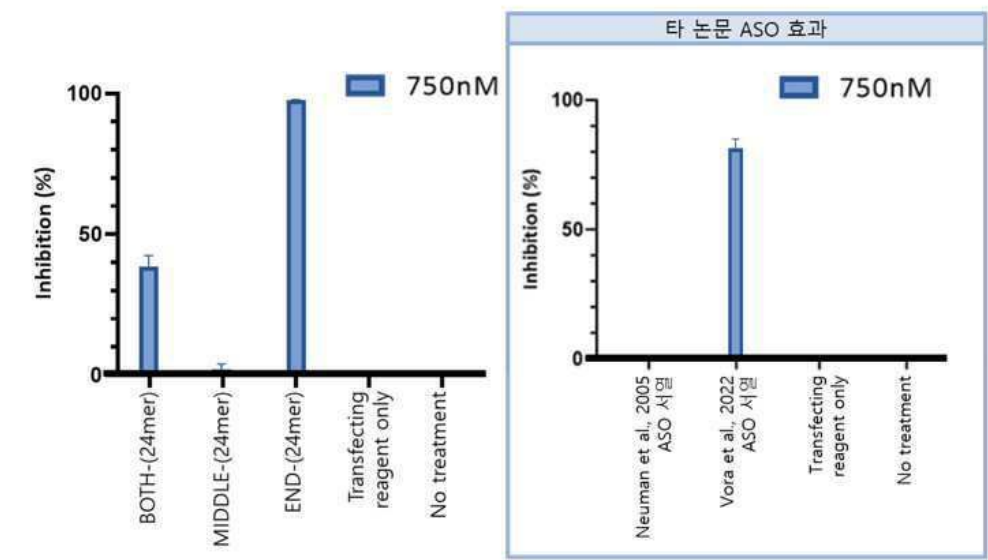
도면2b



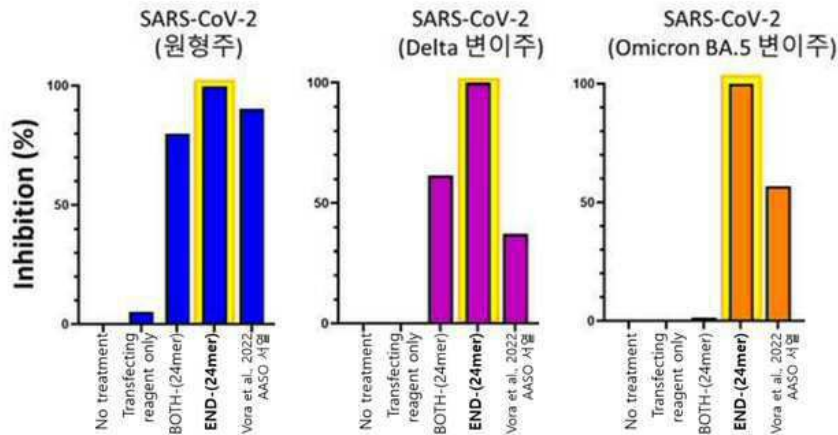
도면3a



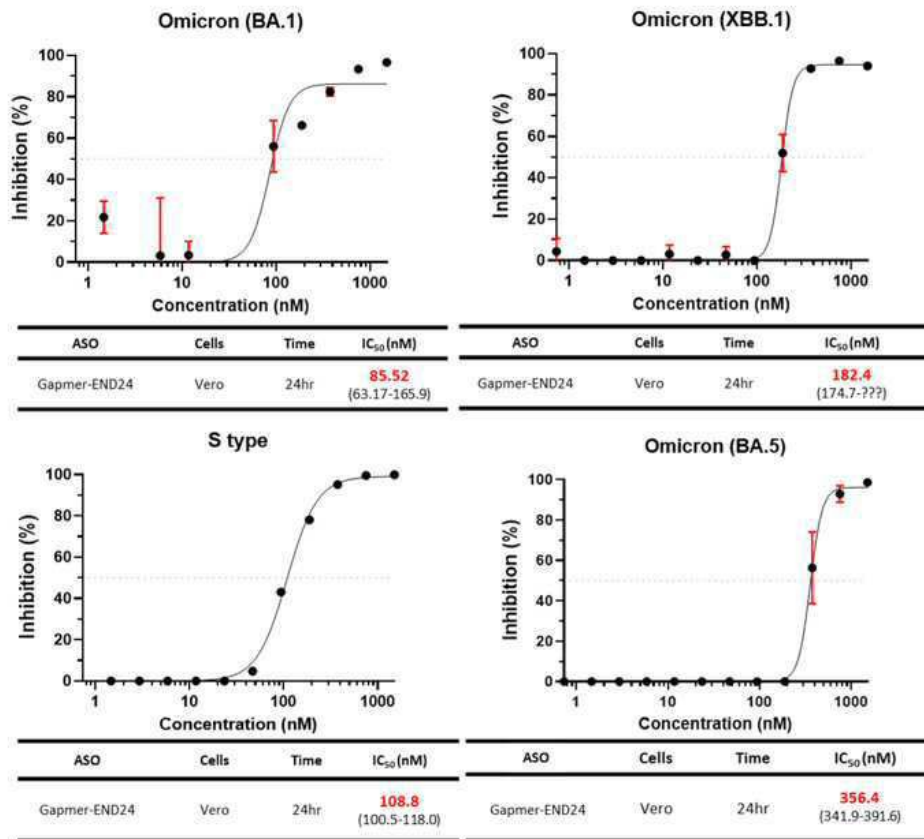
도면3b



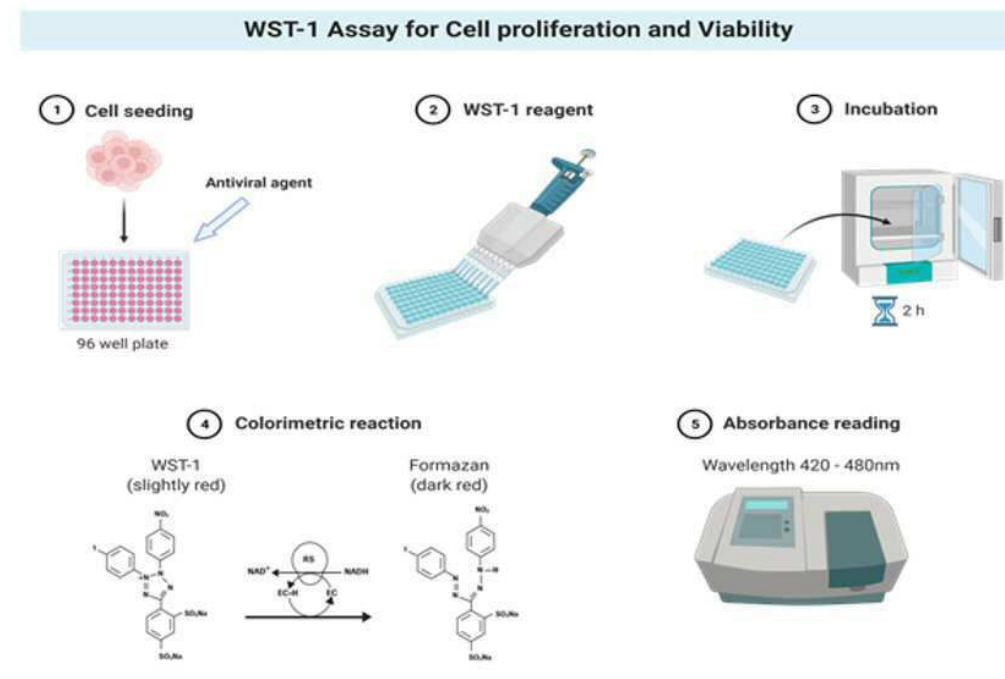
도면3c



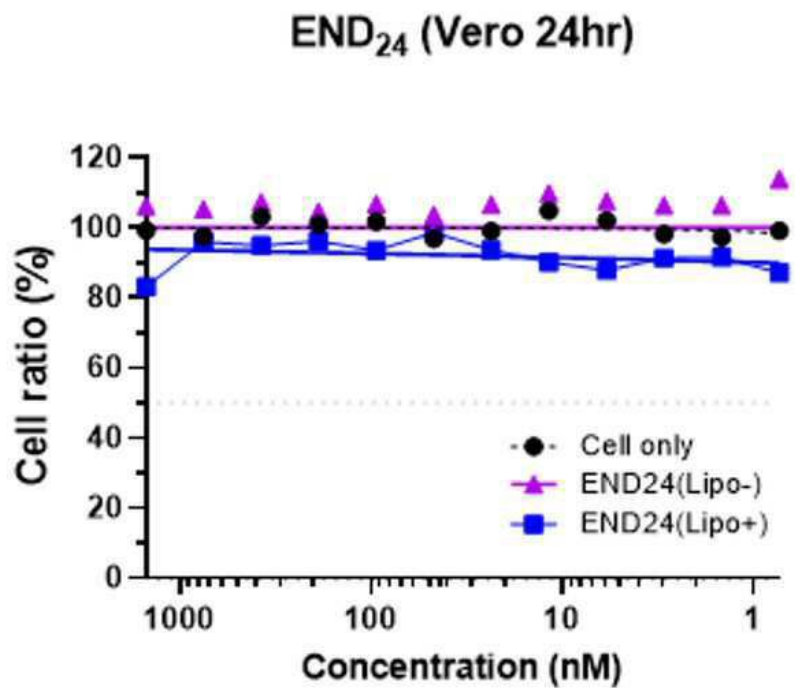
도면4



도면5a



도면5b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.