

명세서

발명의 명칭: 유행성 RNA 바이러스 감염질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 피로나리딘(pyronaridine) 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 및/또는 알테미시닌(artemisinin) 또는 그의 유도체를 유행성 RNA 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 치료학적 유효량의 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 및/또는 알테미시닌 또는 그의 유도체를, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는, 유행성 RNA 바이러스 감염 질환, 특히 코로나바이러스감염증-19(COVID-19)의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] RNA를 게놈으로 갖는 RNA 바이러스는 DNA 바이러스와 비교하여 돌연변이율이 높고, 숙주와 환경의 변화에 적응하는 변이체가 쉽게 발생한다. 이러한 특성으로 RNA 바이러스는 항바이러스제나 예방 백신을 통한 제어가 어렵다. 또한 RNA 바이러스는 바이러스 게놈에 RNA를 주형으로 RNA를 합성하는 RNA 의존적 RNA 중합효소 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)를 코드하고 있으며, DNA를 주형으로 RNA를 합성하는 숙주세포의 RNA 중합효소는 RNA 바이러스 복제에 작용할 수 없다. RNA 바이러스는 게놈의 극성 및 mRNA와 동일가닥인지 여부에 따라 양성가닥, 음성가닥, dsRNA 바이러스로 나뉜다.
- [3] 최근 전 세계적으로 유행하여 글로벌 공중보건 위기를 유발하고 있는 급성 바이러스성 감염병 질환은 발원국가의 이동과 교역을 통해 다른 국가로 빠르게 전파되고 있으며 그 치료제 개발에 대한 국제적 요구가 크다. 특히, 지난 2009년 신종 인플루엔자, 2014년 서아프리카와 2019년 콩고민주공화국의 에볼라(Ebola) 바이러스, 2016년 지카 (Zika)바이러스는 모두 RNA 바이러스에 의해 유발되는 질환이다.
- [4] 코로나 바이러스는 이 중 지카 바이러스와 같이 양성가닥 RNA 바이러스에 속하는 바이러스로, 25-32 kb 크기의 포지티브 단일 가닥을 가지는 RNA 게놈을 가지며, 조류, 포유류 등의 동물과 사람의 세포를 모두 감염시킬 수 있는 인수공통(zoonotic) 바이러스이다. 그 외피에 특징적 돌기형 스파이크(spike) 단백질이 돌출되어 있는 구조를 가지고 있다. 코로나 바이러스는 다양한 구성원을 가지는 바이러스 계열로, 2003년 중증급성호흡기증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS), 2012년 사우디 아라비아에서 신규 출현한 중등호흡기증후군(Middle East Respiratory Syndrome, MERS), 최근 세계보건기구(WHO)에 의해 국제적 공중보건 비상사태 (PHEIC)이 선포된

코로나바이러스감염증-19(CoVID-19, 2019-nCoV infection)을 유발하는 SARS-CoV 바이러스, MERS-CoV 바이러스, SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 바이러스들을 포함한다.

- [5] SARS-CoV 코로나 바이러스는 중증급성호흡기증후군을 유발하며, 2002년 중국에서 발생해 전 세계적으로 확산되어 8,096명의 환자에서 약 10%의 사망률을 기록하였다. 주로 고온과 근육통을 동반하며 2-7일 지나면 가래가 없는 마른기침이 나타나 10-20%의 환자에서 호흡부전이 발생한다. 적정 치료법에 대한 확립이 되어 있지 않아 비정형 폐렴에 대한 항균제를 투여하고 오셀타미비르(oseltamivir) 또는 리바비린(ribavirin)과 같은 항바이러스제를 투여하거나 스테로이드를 병용할 수 있다.
- [6] MERS-CoV 코로나 바이러스는 낙타 등의 동물 숙주에서 사람에게 전파된 바이러스로 추정되며, 중증급성호흡기증후군과 신부전을 유발하여 중증을 포함한 26개국에서 2천여 명의 감염사례를 일으켰으며 사망률은 35.6%에 달한다(WHO, 2016). 잠복기는 5일 정도로, 발열과 기침, 호흡곤란, 폐렴 등이 동반되며, 가족간 혹은 의료기관에서의 제한적 전파로 유행되었고, 당뇨 등 기저질환을 가진 사람에서 중증으로 흔하게 진행되었다.
- [7] SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 코로나 바이러스는 2019년 중국 우한에서 발생한 코로나바이러스감염증-19 (COVID-19)를 유발하는 원인 바이러스이다. 1-14일의 잠복기를 거쳐 기침, 발열, 권태감, 호흡곤란 및 폐렴, 급성 호흡곤란 증후군 등 경증에서 중증까지 다양한 호흡기 감염증이 나타나며 드물게 객담, 인후통, 설사 등이 나타난다. 선택적 항바이러스제가 없어 대증요법, 혹은 기존 질환에 사용하던 항바이러스제를 병용하여 치료하고 있다.
- [8] 특히, 가장 최근에 발발한 COVID-19의 경우 현재 치료법과 백신이 없는 상태에서 매우 빠른 전파속도를 보이고 있으며(Li et al, 2020), 아직 적절한 세포나 동물 시험모델도 확립되지 않은 상태이다. 현재 중국 및 한국 등지에서 임상적으로 사용되어 보고되었거나 전문가 권고안에서 제안되는 약제로는 클로로퀸(Chloroquine)과 렘데시비르(Remdesivir) (Wang et al, 2020), 로피나비르(Lopinavir), 파비피라비르(Favipiravir), 리바비린(Ribavirin), 인터페론 등이 있으며, 80여개가 넘는 임상시험이 진행 중이다(Maxmen et al, 2020). 특히, SARS-CoV-2 바이러스는 코로나바이러스과에 속하여, 동일 계열의 MERS 바이러스나, SARS-CoV-2 바이러스와 염기성 서열이 약 79.5% 일치하는 SARS-CoV에서 항바이러스 효과를 보였다고 기존에 알려진 물질들이 주목받고 있으며 (Zhou et al, 2020), 이 중에는 니클로사미드(Niclosamide) 같은 약물이 있다 (Xu et al, 2020).
- [9] 코로나 바이러스는 사스 환례나 코로나감염증-19 환례로 볼 때 환자에게 밀접하게 노출되는 경우, 에어로졸화된 호흡기 비말이 여러 사람에게 감염될 수 있는 밀집 환경에서 상당히 높은 전파력을 가지고 있어 감염성 위험이 매우 높다. 또한, 이들 코로나 바이러스로 인한 급성 바이러스 질환은 발원국가의

이동과 교역을 통해 다른 국가로 빠르게 전파되어 글로벌 공중보건 위기를 유발하고 있다.

- [10] 그럼에도 불구하고, 현재까지 이러한 유행성 호흡기 바이러스 병원체를 효율적으로 억제, 치료하거나 예방하는 적절한 해결책의 개발이 미흡한 바, 세계 인류의 건강과 복지에 상기 질환에 대응하기 위한 약물의 개발이 시급하다.
- [11] 또한, 호흡기 감염의 임상증세가 일부 유사하고, 동일한 RNA 바이러스 계열에 속하더라도, 유전적, 구조적 수준에 따른 차이가 존재하며 이러한 차이가 항바이러스 약제에 대한 민감도와 효능에 영향을 미친다고 보고되고 있다. 또한, 이러한 분자유전학적 차이가 전파 경로, 바이러스가 결합하는 숙주(host)의 수용체, 전파 속도와 잠복기, 감염부위에 따른 임상증상의 차이, 치료 효능의 차이를 유발하는 바, 적정 약제의 개발과 적용이 매우 중요하다.
- [12] 또한, 그 호흡기 감염병의 빠른 전파 속도와 높은 사망률, 전 세계적인 보건 경제학적 위해를 볼 때 그 개발에 짧게는 1년에서 수 년이 걸리는 신약과 신규 백신의 개발에 더불어, 기존에 임상시험과 실사용례에 의해 안전성이 보장된 약물의 신약 재창출 (drug repositioning)을 통해 RNA 바이러스 감염관련 질환, 특히 코로나 바이러스 호흡기 질환을 예방, 개선하거나 치료할 수 있는 가능성을 살펴보는 것은 매우 유효하고 비용대비 효율적인 전략이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 본 발명의 목적은 피로나리딘(pyronaridine) 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 및/또는 알테미시닌(artemisinin) 또는 그의 유도체를 유행성 RNA 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료에서 사용하는 용도를 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 다른 목적은 치료학적 유효량의 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 및/또는 알테미시닌 또는 그의 유도체를, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는, 유행성 RNA 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 다른 목적은 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 및/또는 알테미시닌 또는 그의 유도체를 사용하여 유행성 RNA 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [16] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 치료학적 유효량의 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 및/또는 알테미시닌 또는 그의 유도체를, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는, 유행성 RNA 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 및/또는 알테미시닌 또는 그의 유도체의, 유행성 RNA 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하기 위한 용도를 제공한다.

[18] 또한, 본 발명은 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 및/또는 알테미시닌 또는 그의 유도체를 치료적 유효량으로 치료 대상에게 투여하는 것을 포함하여, 유행성 RNA 바이러스 감염 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[19]

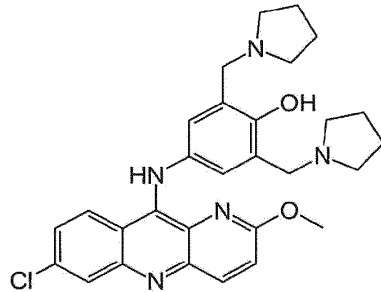
[20] 이하에서 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[21]

[22] 본 발명의 일 측면에 따르면, 치료학적 유효량의 하기 화학식 1의 피로나리딘(pyronaridine) 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는, 유행성 RNA 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이 제공된다:

[23] [화학식 1]

[24]

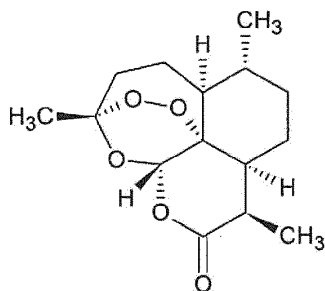


[25]

[26] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 치료학적 유효량의 하기 화학식 2의 알테미시닌(artemisinin) 또는 그의 유도체를, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는, RNA 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이 제공된다:

[27] [화학식 2]

[28]



[29]

[30] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 치료학적 유효량의 상기 화학식 1의 피로나리딘(pyronaridine) 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 및 상기 화학식 2의 알테미시닌(artemisinin) 또는 그의 유도체를, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는, RNA 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이

제공된다.

[31]

[32] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 피로나리딘의 약제학적으로 허용되는 염은 예를 들면 인산, 황산, 염산, 아세트산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 톨루엔설폰산, 말레인산 또는 푸마르산과의 산부가염을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 다른 구체예에서 상기 피로나리딘의 약제학적으로 허용되는 염은 피로나리딘 인산염이다.

[33]

[34] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 알테미시닌의 유도체는, 예를 들면 디하이드로알테미시닌(dihydroartemisinin), 알테수네이트(artesunate), 알테메터(artemether) 및 알테에터(arteether)를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 알테미시닌의 유도체는 알테수네이트이다.

[35]

[36] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 치료학적 유효량의 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 및 알테미시닌 또는 그의 유도체를, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 약제학적 조성물에 있어서, 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염과 알테미시닌 또는 그의 유도체의 중량비는 10:1 내지 1:10이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염과 알테미시닌 또는 그의 유도체의 중량비는 1:1 내지 6:1이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염과 알테미시닌 또는 그의 유도체의 중량비는 1:1 내지 4:1이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염과 알테미시닌 또는 그의 유도체의 중량비는 3:1이다.

[37]

[38] 본원에서 "약제학적으로 허용되는"이란 용어는 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성을 말한다. 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화 될 수 있다. 투여 경로로는 이에 한정되지는 않으나 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다. 비경구적 투여 경로로는 예를 들면, 경피, 비강, 복강, 근육, 피하, 정맥 주사 등의 여러 경로가 포함된다.

[39]

본 발명의 약제학적 조성물을 경구 투여하는 경우 본 발명의 약제학적 조성물은 적합한 경구 투여용 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼, 주사제, 좌제 등의 형태로 제형화 될 수 있다. 적합한 담체의 예로는 유당, 포도당, 백당, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와

옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 및 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 저치환도히드록시메틸셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 크로스포비돈, 전분글리콜산나트륨, 크로스카멜로오스나트륨, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 상기 약제학적 조성물은 활택제, 항응집제, 가소제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [40] 또한, 비경구적으로 투여하는 경우 본 발명의 약제학적 조성물은 적합한 비경구용 담체와 함께 주사제, 좌제, 경피 투여제 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화 될 수 있다. 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리에틸렌글리콜(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌글리콜 및 액체 폴리에틸렌글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌글리콜 및 5% 포도당과 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 염화나트륨과 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [41] 이들 제형은 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania)에 기술되어 있다.
- [42] 흡입 투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팍 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 캡슐 및 카트리지는 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화 할 수 있다.
- [43] 그 밖의 약제학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).
- [44]
- [45] 본 발명의 다른 구체예에서, 피로나리딘(pyronaridine) 또는 그의 약제학적으로

허용가능한 염을, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 제형화 하였다.

- [46] 상기에서 본 발명에서 사용할 수 있는 “약제학적으로 허용되는 담체”는 약제학 분야에서 통상적으로 사용되는 것이면 어느 것이나 사용될 수 있으며, 대표적인 예로는 유당, 텍스트린, 전분, 호화전분, 미결정셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 폴리에틸렌글리콜, 이산화규소, 하이드로탈사이트, 알루미늄 마그네슘 실리케이트, 수산화 알루미늄, 알루미늄 실리케이트, 마그네슘 알루미늄 메타실리케이트, 벤토나이트 및 이들의 혼합물 등을 들 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 담체 이외에, 생체 내 투여 시 수용성 매질과 접촉하여 신속히 붕해, 용출될 수 있도록 붕해제, 용출이나 흡수를 증가시키는 가용화제 혹은 계면활성제, 유동성이나 활택력을 증가시키는 유동화제 혹은 활택제를 추가로 포함할 수 있다. 붕해제로는 크로스포비돈, 전분글리콜산나트륨, 크로스카멜로즈나트륨, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 들 수 있다. 유동화제 혹은 활택제로는 콜로이드알실리콘디옥사이드, 실리콘디옥사이드, 탈크, 스테아린산마그네슘, 스테아린산칼슘, 스테아린산아연, 스테아린푸마르산나트륨, 스테아릴산, 이산화규소 등을 들 수 있다. 하지만 예시된 예에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 40 내지 80 중량%, 미결정셀룰로오스 1 내지 30 중량%, 이산화규소 0.1 내지 5 중량%, 히드록시프로필셀룰로오스 1 내지 10 중량%, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스 1 내지 10 중량%, 전분글리콜산나트륨 2 내지 20 중량% 및 스테아린산마그네슘 1 내지 10 중량%을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[47]

- [48] 본 발명의 다른 구체예에서, 알테미시닌 또는 그의 유도체를, 약제학적으로 허용되는 첨가제를 포함하여 제형화 하였다. 본 발명의 약제학적 조성물은 담체 이외에, 생체 내 투여 시 수용성 매질과 접촉하여 신속히 붕해, 용출될 수 있도록 붕해제, 용출이나 흡수를 증가시키는 가용화제 혹은 계면활성제, 유동성이나 활택력을 증가시키는 유동화제 혹은 활택제를 추가로 포함할 수 있다. 담체로는 미결정셀룰로오스, 유당수화물, 만니톨, 전분, 호화전분, 저치환도 히드록시셀룰로오스, 히스록시셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 등을 들 수 있고, 붕해제로는 크로스포비돈, 전분글리콜산나트륨, 크로스카멜로즈나트륨, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 들 수 있다. 유동화제 혹은 활택제로는 콜로이드알실리콘디옥사이드, 실리콘디옥사이드, 탈크, 스테아린산마그네슘,

스테아린산칼슘, 스테아린산아연, 스테아린푸마르산나트륨, 스테아릴산, 이산화규소 등을 들 수 있다. 계면활성제의 대표적인 예들은 라우릴황산나트륨(sodium lauryl sulfate) 및 그의 유도체, 폴록사머(poloxamer) 및 그의 유도체, 포화폴리글리코형 글리세라이드(saturated polyglycorized glyceride, 일명 gelucire), 라브라솔(labrasol), 각종의 폴리소르베이트(polysorbate, 예를 들면 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(이하, 트윈 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트(이하, 트윈 40), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(이하, 트윈 60), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트(이하, 트윈 80), 소르비탄 에스테르(sorbitan esters, 예를 들면 소르비탄 모노라우레이트(이하, 스펠 20), 소르비탄 모노팔미테이트(이하, 스펠 40), 소르비탄 모노스테아레이트(이하, 스펠 60), 소르비탄 모노올레이트(이하, 스펠 80), 소르비탄 트리라우레이트(이하, 스펠 25), 소르비탄 트리올레이트(이하, 스펠 85), 소르비탄 트리스테아레이트(이하, 스펠 65), 크레모포어(cremophor), PEG-60 수소화 피마자유(PEG-60 hydrogenated castor oil), PEG-40 수소화 피마자유(PEG-40 hydrogenated castor oil), 소듐 라우릴 글루타메이트(sodium lauryl glutamate), 디소듐 코코암포디아세테이트(disodium cocoamphodiacetate) 등을 들 수 있다. 하지만 예시된 예에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 알테미시닌 또는 그의 유도체 10 내지 50 중량%, 미결정셀룰로오스 30 내지 70 중량%, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스 2 내지 20 중량%, 전분글리콜산나트륨 2 내지 20 중량%, 실리콘디옥사이드 0.1 내지 5 중량%, 라우릴황산나트륨 0.5 내지 15 중량% 및 스테아린산마그네슘 0.1 내지 5 중량%를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[49]

[50] 본 발명의 다른 구체예에서 피로나리딘(pyronaridine) 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 및 알테미시닌(artemisinin) 또는 그의 유도체를, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하여 제형화 하였다. 본 발명의 약제학적 조성물은 담체 이외에, 생체 내 투여 시 수용성 매질과 접촉하여 신속히 분해, 용출될 수 있도록 계면활성제 혹은 분해제, 유동성이나 활택력을 증가시키는 유동화제 혹은 활택제를 추가로 포함할 수 있다. 담체로는 유당, 텍스트린, 전분, 호화전분, 미결정셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 폴리에틸렌글리콜, 이산화규소, 하이드로탈사이트, 알루미늄 마그네슘 실리케이트, 수산화 알루미늄, 알루미늄 실리케이트, 마그네슘 알루미늄 메타실리케이트, 벤토나이트, 부틸히드록시톨루엔 및 이들의 혼합물 등을 들 수 있다. 계면활성제의 대표적인 예들은 라우릴황산나트륨(sodium lauryl sulfate) 및 그의 유도체, 폴록사머(poloxamer) 및 그의 유도체, 포화폴리글리코형

글리세라이드(saturated polyglycorized glyceride, 일명 gelucire), 라브라솔(labrasol), 각종의 폴리소르베이트(polysorbate, 예를 들면 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(이하, 트윈 20), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트(이하, 트윈 40), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노스테아레이트(이하, 트윈 60), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트(이하, 트윈 80), 소르비탄 에스테르(sorbitan esters, 예를 들면 소르비탄 모노라우레이트(이하, 스펠 20), 소르비탄 모노팔미테이트(이하, 스펠 40), 소르비탄 모노스테아레이트(이하, 스펠 60), 소르비탄 모노올레이트(이하, 스펠 80), 소르비탄 트리라우레이트(이하, 스펠 25), 소르비탄 트리올레이트(이하, 스펠 85), 소르비탄 트리스테아레이트(이하, 스펠 65), 크레모포어(cremophor), PEG-60 수소화 피마자유(PEG-60 hydrogenated castor oil), PEG-40 수소화 피마자유(PEG-40 hydrogenated castor oil), 소듐 라우릴 글루타메이트(sodium lauryl glutamate), 디소듐 코코암포디아세테이트(disodium cocoamphodiacetate) 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 봉쇄제로는 크로스포비돈, 전분글리콜산나트륨, 크로스카멜로오스나트륨, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 들 수 있다. 유동화제 혹은 활택제로는 콜로이달실리콘디옥사이드, 실리콘디옥사이드, 탈크, 스테아린산마그네슘, 스테아린산칼슘, 스테아린산아연, 스테아린푸마르산나트륨, 스테아릴산, 이산화규소 등을 들 수 있다. 하지만 예시된 예에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 15 내지 60 중량%, 알테미시닌 또는 그의 유도체 5 내지 20 중량%, 미결정셀룰로오스 5 내지 30 중량%, 크로스포디돈 10 내지 40 중량%, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스 2 내지 15 중량%, 라우릴황산나트륨 1 내지 10 중량%, 폴리에틸렌글리콜 5 내지 30 중량%, 히드록시프로필셀룰로오스 0.1 내지 5 중량%, 부틸히드록시톨루엔 0.001 내지 1 중량%, 실리콘디옥사이드 0.1 내지 5 중량% 및 스테아린산마그네슘 0.5 내지 10 중량%를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[51]

[52] 본 발명의 약제학적 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 건조 시럽제, 코팅 제제, 주사제, 좌제, 주사제, 경피 투여제 및 흡입투여제 등으로 제형화될 수 있다.

[53]

[54] 본 발명의 다른 구체예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 유행성 RNA 바이러스성 감염질환을 예방하고 치료하기 위해 항바이러스 효능을 갖는 하나 또는 그 이상의 부가적 약물과 조합하여 투여될 수 있다.

[55]

본 발명의 다른 구체예에서, 상기 다른 항바이러스제는 예를 들면, 바이러스 복제 억제제, 헬리카아제 억제제, 바이러스 프로테아제 억제제 및 바이러스 세포 진입 억제제를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 다른

구체예에서, 상기 다른 항바이러스제는 예를 들면, 리바비린(ribavirin), 인터페론(interferon), 니클로사미드(niclosamide) 또는 이들의 조합일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[56]

[57] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 유행성 RNA 바이러스 질환은 예를 들면, 지카 바이러스 감염증, 에볼라 바이러스 감염증, 신종 인플루엔자 바이러스 감염증, 코로나 바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 코로나 바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환은 예를 들면, 중증급성호흡기증후군(severe acute respiratory syndrome, SARS), 중동호흡기증후군(Middle East respiratory syndrome, MERS) 또는 코로나바이러스감염증-19(coronavirus disease 2019, COVID-19)를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 다른 구체예에서 상기 코로나 바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환은 코로나바이러스감염증-19(coronavirus disease 2019, COVID-19)이다.

[58]

[59] 본 발명에 있어 상기한 용어 “예방”이란 본 발명의 조성물 투여로 유행성 RNA 바이러스 감염질환의 발생, 확산 및 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, 상기 용어 “치료”란 본 발명의 조성물 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[60]

또한, 상기에서 “치료학적 유효량”이란 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 유행성 RNA 바이러스성 감염 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 말한다. 환자의 경우 치료용량은 일반적으로 상태의 심각성 및 상기 화합물내에서의 단독, 조합 또는 다른 약물과 조합하여 투여되는가에 따라 50 mg 내지 2,000 mg/day, 더욱 바람직하게는 100 mg 내지 1,000 mg/day이다. 1일 1회 또는 분할하여 경구 또는 비경구적 경로를 통해 투여될 수 있다. 그러나 상기 치료학적 유효량은 질환 및 이의 중증정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등과 같은 여러 인자에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[61]

비록 본 발명은 사람에서의 유행성 RNA 바이러스성 감염질환, 바람직하게는 사람에서의 코로나 바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환, 더욱 바람직하게는 사람에서의 코로나바이러스감염증-19을 일으키는 바이러스의 예방과 치료하는 것에 관해 기술하지만, 본 발명은 RNA 바이러스, 구체적으로는 호흡기질환을 유발하는 코로나바이러스과(Coronaviridae), 더욱 구체적으로는 코로나바이러스감염증-19를 유발하는 동물 및 인간 균주 치료에 유용할 수 있다.

[62]

본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다. 또한, 상기의 설명은 청구된 발명을 어떠한 방식으로든 한정하지 않으며, 나아가 논의된 특징의 조합은 본 발명의 해결

방법에 절대적으로 필요한 것은 아니다.

발명의 효과

- [63] 본 발명은 치료학적 유효량의 피로나리딘 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 및/또는 알테미시닌 또는 그의 유도체를 유효성분으로 포함하는 유행성 RNA 바이러스 감염 질환의 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 유행성 RNA 바이러스 감염 질환, 예를 들면 코로나감염증-19 등 코로나 바이러스에 의해 유발되는 호흡기 질환을 효과적으로 억제하여 예방 및 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [64] 도 1은 본 발명의 유효성분의 하나인 피로나리딘 인산염(pyronaridine tetraphosphate) 전처리에 의한 SARS-CoV-2 바이러스 감염 억제 효과와 세포독성을 감염 후 24시간에 측정하고, 그 결과를 농도-반응곡선으로 나타낸 것이다.
- [65] 도 2는 피로나리딘 인산염(pyronaridine tetraphosphate)의 동시 처리에 의한 SARS-CoV-2 바이러스 감염 억제효과와 세포독성을 감염 후 24시간에 측정하고, 그 결과를 농도-반응곡선으로 나타낸 것이다.
- [66] 도 3은 본 발명의 유효성분의 하나인 알테수네이트(artesunate)의 동시 처리에 의한 SARS-CoV-2 바이러스 감염 억제효과를 감염 후 24시간과 48시간에 측정하고 대조군인 클로로퀸과 비교한 결과이다.
- [67] 도 4는 SARS-CoV-2를 세포에 감염시키고 피로나리딘 인산염과 알테수네이트를 다양한 비율로 조합하여 처리한 후 바이러스 감염 억제효과를 비교하고, 최적 비율에서 감염 후 24시간과 48시간의 바이러스 억제율을 비교한 결과이다.
- [68] 도 5는 SARS-CoV-2를 사람의 폐세포주인 Calu-3세포에 감염시키고 피로나리딘 인산염 또는 알테수네이트를 동시 처리한 후 바이러스 감염 억제효과와 세포독성을 감염 후 24시간과 48시간에 측정하고 그 결과를 농도-반응곡선으로 나타내어 대조군인 히드록시클로로퀸(hydroxychloroquine)과 비교한 결과이다.
- [69] 도 6는 사람 폐세포주인 Calu-3에서 피로나리딘 인산염 또는 알테수네이트의 바이러스 감염 후처리에 의한 SARS-CoV-2 바이러스 감염 억제효과를 약물처리 후 48시간에 측정하고, 그 결과를 시간-반응 곡선으로 나타낸 것이다.
- [70] 도 7은 SARS-CoV-2를 햄스터에 감염시키고 피로나리딘 인산염과 알테수네이트를 저용량 혹은 고용량으로 3:1 병용으로 감염 후 1시간 후부터 1일1회 3일간 경구투여하거나, 피로나리딘 인산염만 고용량만을 단독으로 감염 후 25시간 후에 1회 투여하여 4일째 폐에서 바이러스 역가를 분석하고 약물을 투여하지 않은 바이러스 접종 대조군과 비교한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[71] 이하 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[72]

[73] **실시예 1: 피로나리딘 인산염 단독 정제의 제조**

[74] 히드록시프로필셀룰로스를 에탄올에 용해시켜 결합액을 제조하였다. 제조된 결합액을 이용하여 피로나리딘인산염을 습식과립한 후 건조, 정립하였다. 저치환도 히드록시프로필셀룰로스, 전분글리콜산나트륨, 미결정셀룰로스, 이산화규소를 혼합하였다. 스테아린산 마그네슘을 가하여 활택 한 후 타정하여 정제를 제조하였다.

[75] [표 1]

[76]

성분 함량 (mg/제제)	
피로나리딘인산염	360
미결정셀룰로오스	48
이산화규소	6
히드록시프로필셀룰로오스	12
저치환도 히드록시프로필셀룰로오스	18
전분글리콜산나트륨	24
스테아린산 마그네슘	12

[77]

[78] **실시예 2: 알테수네이트 단독 정제의 제조**

[79] 실리콘디옥시드와 라우릴황산나트륨을 체를 이용하여 체과하였다. 체과된 실리콘디옥시드와 라우릴황산나트륨을 알테수네이트, 미결정셀룰로오스, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 전분글리콜산나트륨을 혼합하고 스테아린산마그네슘을 가하여 활택 한 후 타정하여 정제를 제조하였다. 필름코팅기제로 코팅하였다.

[80] [표 2]

[81]

성분 함량 (mg/제제)	
알테수네이트	100
미결정셀룰로오스	228
저치환도 히드록시프로필셀룰로오스	30
전분글리콜산나트륨	20
실리콘디옥시드	5
라우릴황산나트륨	12
스테아린산마그네슘	5
필름코팅기제(오파드라이)	12

[82]

[83] 실시예 3: 피로나리딘 인산염/알테수네이트 혼합 정제의 제조

[84] 용융 분산 담체인 폴리에틸렌글리콜, 부틸히드록시톨루엔, 활성성분인 알테수네이트를 혼합한 후, 가열하여 용융시킨 후 급냉하고 미세하게 분쇄하였다. 여기에 미결정 셀룰로오스, 저치환도히드록시프로필셀룰로오스, 크로스포비돈, 스테아린산 마그네슘을 혼합하여 혼합물 1을 제조하였다. 히드록시프로필셀룰로오스를 에탄올에 용해시킨 후 피로나리딘 인산염을 습식 과립한 후 건조, 정립하여 혼합물 2를 제조하였다. 혼합물 1, 혼합물 2, 라우릴황산나트륨, 실리콘디옥사이드, 크로스포비돈과 혼합한 후 스테아린산마그네슘을 가하여 활택한 후 타정하여 정제를 제조하였다. 필름코팅기제로 코팅하였다.

[85] [표 3]

[86]

성분 함량 (mg/제제)	
알테수네이트	60
피로나리딘인산염	180
미결정셀룰로오스	93
크로스포비돈	120
저치환도 히드록시프로필셀룰로오스	38
라우릴황산나트륨	23
폴리에틸렌글리콜	90
히드록시프로필셀룰로오스	6
부틸히드록시톨루엔	0.12
실리콘디옥사이드	4.5
스테아린산 마그네슘	16.5
필름코팅기제(오파드라이)	20

[87]

[88] 본 발명의 피로나리딘 (pyronaridine) 또는 그의 염, 알테미시닌 (artemisinin) 또는 그의 유도체가 코로나바이러스에 항바이러스 활성을 갖는지 여부를 확인하기 위하여 이하의 실험예와 같이 약물을 단독 및 병용 처리하고 바이러스 감염 억제율을 평가하였다.

[89]

[90] 실험예 1: 피로나리딘 인산염의 항바이러스 효과 측정 (전처리)

[91] 실험예 1에서는 SARS-CoV-2 바이러스(한국 분리주)를 세포에 감염시키기 전에 피로나리딘 인산염을 1시간 전처리하고 바이러스 감염을 억제하는 효능이 있는지 평가하였다.

[92]

- [93] 1) 바이러스와 숙주 세포의 준비
- [94] Vero 세포주는 미국 ATCC에서 구입하였으며, 37°C, 5% CO₂ 배양 조건에서 10% 소혈청(fetal bovine serum, FBS)과 항생제를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 이용하여 배양하였다. SARS-CoV-2 바이러스는 한국 질병관리본부(Korea Centers for Disease Control and Prevention, KCDC)에서 분양받았다. 바이러스 증식 후 바이러스 증식에 이용한 세포에 바이러스를 감염시켜 바이러스 플라크를 측정하는 플라크 시험법 (plaque assay)를 통해 역가(viral titer)를 결정하였다.
- [95] 2) 면역형광염색법을 이용한 항바이러스 효능 측정
- [96] 시험 24시간 전 1.2 X 10⁴ cells/wells의 밀도로 Vero 세포주를 부착시킨 mClear 플레이트에 0.05-50 µM 농도 범위에서 10개 농도로 희석하여 희석된 약물을 포함하는 배양액으로 1시간 전처리하고, SARS-CoV-2 바이러스를 접종하였다 (바이러스 접종 역가 MOI=0.0125). 감염 24시간 후 4% 포름알데히드로 세포를 고정하고 SARS-CoV-2 바이러스의 N 단백질을 표지하는 항체를 이용하여 감염된 세포를 면역형광염색법으로 분석하였다. 이미징 분석 프로그램을 통해 양성 및 음성대조군과 비교하여 총 세포 수와 감염된 세포수의 비율로 감염률을 계산하였다. 약물의 항바이러스 효과를 용량-반응-곡선으로 나타내고, Graph Prism (ver. 8) 분석 프로그램을 사용하여 계산식 1과 같이 50% 유효농도(EC₅₀, 바이러스 감염으로 인한 세포독성을 50% 억제하는 농도)와 50% 세포독성 농도(CC₅₀, 정상 세포의 50%의 손상을 가하는 화합물의 농도)를 계산하였다.
- [97] <계산식 1>
- [98] Sigmoidal 모델, $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + (\text{IC}_{50}/X)^{\text{Hillslope}})$
- [99]
- [100] 그 결과, 도 1과 같이 SARS-CoV-2를 접종한 Vero cell의 경우 피로나리딘 50 µM 농도에서 70%의 바이러스 억제율이 관찰되었으나, 약물 전처리에 의해 세포독성 또한 17% 증가하였다. Vero 세포주는 아프리카 녹색 원숭이(*Chlorocebus* sp.)의 신장 상피세포에서 분리된 세포로 type-1 IFN이 결핍된 세포로 알려져 있다. 이전 연구 결과에서 피로나리딘의 에볼라 바이러스에 대한 *in vitro* 항바이러스성 효능 측정 시, vero 세포주에 접종시킨 경우에는 CC₅₀ 이하의 농도에서 항바이러스 활성이 관찰되지 않았으나 (CC₅₀ = 1.3 µM), 사람에서 유래한 Hela cell에 접종시킨 경우에는 CC₅₀가 보다 높고, 무독성 농도에서 항바이러스 활성이 나타남이 보고된 바 있다 (EC₅₀ = 0.42-1.12 µM, CC₅₀ = 3.1 µM). 또한, 피로나리딘은 에볼라 바이러스를 접종한 생쥐 시험에서도 사망률과 바이러스 감염률을 유의적으로 억제하였다(Lane et al, 2015). 이렇게 항바이러스제의 효능이 실험 숙주 세포의 특성과 세포 내 면역 신호전달계 차이에 따라, 세포시험과 동물시험에서 차이가 있을 수 있음이 잘 알려져 있어(Lane et al, 2015), 사람에서 유래된 숙주 세포주를 추가로 확립하고, 다양한 세포주와 동물시험에서 피로나리딘의 항바이러스 효능을 확인하였다.

[101]

[102] 실험예 2: 피로나리딘 인산염의 SARS-CoV-2 바이러스 억제 효과 (동시 처리)

[103] 실험예 2에서는 SARS-CoV-2 바이러스(한국 분리주)를 세포에 접종시킬 때 피로나리딘 인산염을 처리하여 바이러스 감염을 억제하는 효능이 있는 지 평가하였다. 클로로퀸은 endosomal pH를 증가시켜 바이러스와 세포의 결합과 숙주세포의 SARS-CoV 바이러스 수용체의 당화를 억제하여 항바이러스 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Vincent et al., 2005). 클로로퀸과 유사한 구조를 가지는 피로나리딘도 유사한 기전으로 작용할 수 있어, 약물과 바이러스를 동시에 처리하고 항바이러스 효능을 측정하였다. 실험예 1에서 일부 시험조건을 변경하여 세포독성이 비교적 적은 시험조건에서 시험을 실시하였다.

[104]

[105] 1) 바이러스와 숙주 세포의 준비

[106] Vero 세포주는 37°C, 5% CO₂ 배양 조건에서 10% 소혈청(fetal bovine serum, FBS)과 항생제를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 이용하여 배양하였다. SARS-CoV-2 바이러스는 한국 질병관리본부(Korea Centers for Disease Control and Prevention, KCDC)에서 분양받았다. 바이러스 증식 후 RNA copy number를 측정하는 qRT-PCR를 통해 역가(viral titer)를 결정하였다.

[107] 2) RNA copy number를 이용한 항바이러스 효능 측정

[108] 피로나리딘 인산염은 DMSO에 녹인 후 배지를 사용하여 0.033-100 µM 농도로 희석하였다. 시험 24시간 전 2 X 10⁴ cells/wells의 밀도로 Vero 세포주를 부착시킨 96-웰 플레이트에 SARS-CoV-2 바이러스를 접종하고 (MOI=0.1), 다양한 농도로 희석된 약물을 함유하는 배양액을 웰 마다 첨가하였다. 감염 24시간 후 세포 상층액을 수득하여 RNA를 추출하고 RdRp 유전자에 대한 qRT-PCR를 수행하였다. 약물의 항바이러스 효능은 RNA 바이러스의 copy number를 대조군과 비교하여 분석하였다. RNA copy number를 바이러스 역가(virus titer)로 역산하여 바이러스 감염 억제율(%inhibition)을 약물 용량-반응-곡선으로 나타내고, Graph Prism (ver. 8) 분석 프로그램을 사용하여 실험예 1과 같이 50% 유효농도(EC₅₀, 바이러스 역가를 50% 억제하는 농도)를 계산하였다.

[109] 3) 세포독성 (%cytotoxicity) 측정

[110] 세포 독성은 tetrazolium salts (WST-1)을 이용하여 측정하였다. WST-1은 살아있는 세포에서만 존재하는 미토콘드리아 탈수효소에 의해 formazan이라는 발색물질로 변환되며, WST-1 premix를 각 웰에 10 µl씩 첨가하여 1시간 추가 배양한 뒤 ELISA로 formazan의 생성량을 흡광도를 측정, 계산하였다. 50% 세포독성 농도(CC₅₀, 정상 세포의 50%의 손상을 가하는 화합물의 농도)를 계산하였다.

[111]

[112] 그 결과, 도 2와 같이 동시처리 조건에서 피로나리딘은 농도의존적인

항바이러스 효과를 나타냈으며, 일부 고농도에서 세포독성이 관찰되었으나 무독성 농도에서도 90% 이상의 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 나타내었다 ($EC_{50} = 8.27 \mu M$, $CC_{50} = 11.54 \mu M$; selectivity index, $SI > 1.40$).

[113]

[114] 실험예 3: 알테수네이트의 SARS-CoV-2 바이러스 억제 효과 (동시 처리)

[115] 실험예 3에서는 실험예 2와 동일 조건에서 알테수네이트의 항바이러스 효능을 측정하였다.

[116]

[117] 1) 바이러스와 숙주 세포의 준비

[118] Vero 세포주와 바이러스는 실험예 2와 같이 준비하였다.

[119] 2) RNA copy number를 이용한 항바이러스 효능 측정

[120] 알테수네이트는 DMSO에 녹인 후 배지를 사용하여 3.13, 12.5, 50 μM 농도로 희석하였다. 시험 24시간 전 2×10^4 cells/wells의 밀도로 Vero 세포주를 부착시킨 96-웰 플레이트에 SARS-CoV-2 바이러스를 접종하고 ($MOI=0.1$), 각각의 농도로 희석된 약물을 함유하는 배양액을 웰 마다 첨가하였다. 감염 24시간 및 48시간 후 세포 상층액을 수득하여 실험예 2와 같이 RdRp 유전자에 대한 qRT-PCR를 수행하여 바이러스 역가를 계산하고 바이러스 감염 억제율(%inhibition)을 계산하였다. 대조군은 클로로퀸을 사용하였다.

[121] 3) 세포독성 (%cytotoxicity) 측정

[122] 세포 독성은 실험예 2와 같이 측정하였다.

[123]

[124] 그 결과, 도 3과 같이 알테수네이트는 실험 농도 내에서 농도 의존적으로 항바이러스 활성을 보였으며, 50 μM 의 농도에서 83%의 바이러스 억제율을 보였다. 12.5 μM 에서는 감염 24시간 후 (24 hours post infection, 24 hpi)와 48시간 후(48 hpi)에 각각 40%와 51%의 억제율을 보였고, 3.13 μM 에서는 처리 후 48시간에서 39%의 바이러스 감염 억제 효과를 보였다. 모든 시험조건에서 유의적인 세포독성을 나타내지 않았다. 알테수네이트는 피로나리딘과 대조군으로 사용한 클로로퀸과 비교할 때 SARS-CoV-2에 대한 EC_{50} 가 낮고 onset 시간이 더 느리나, 항바이러스 효과가 오래 지속되어 바이러스 억제율이 시간에 따라 느리게 증가되는 패턴을 보였다.

[125]

[126] 실험예 4: 피로나리딘 인산염과 알테수네이트 조합 시 SARS-CoV-2 바이러스 억제 효과

[127] 에볼라 바이러스를 감염시킨 기니아 픽 동물모델에서 클로로퀸이 항바이러스 효과를 나타내지 못한 것과는 달리 피로나리딘은 에볼라 바이러스를 접종한 생쥐 동물모델에서 바이러스 역가와 생존률을 유의적으로 개선한 바 있어, 피로나리딘과 클로로퀸은 상이한 추가 작용기전을 가질 수 있다고 추정되었으며, type 1 IFN-1 경로 등의 면역조절기전이 제시된 바 있다 (Lane et

al., 2019). 알테수네이트도 *in vitro* 시험에서 에볼라 바이러스에 대해 피로나리딘보다 약한 항바이러스 작용을 나타낸 바 있으며, 클로로퀸 유도체인 아모디아퀸(amodiaquine)과 병용한 환자에서 에볼라 바이러스와 관련된 사망률이 31% 감소되었다고 보고된 바 있다 (Gignox et al., 2016). 따라서 실험에 4에서는 두 약물의 병용 처리와 조합비율에 따른 항바이러스 효능의 변화를 측정하였다.

[128]

[129] 1) 바이러스와 숙주 세포의 준비

[130] Vero 세포주와 바이러스는 실험에 2와 같이 준비하였다.

[131] 2) RNA copy number를 이용한 항바이러스 효능 측정

[132] 피로나리딘 인산염과 알테수네이트는 DMSO에 녹인 후 배지를 사용하여 다양한 농도로 희석하여 1:1, 3:1, 10:1 등으로 조합하였다. 시험 24시간 전 2×10^4 cells/wells의 밀도로 Vero 세포주를 부착시킨 96-웰 플레이트에 SARS-CoV-2 바이러스를 접종하고 (MOI=0.1), 각각의 농도로 희석된 약물을 함유하는 배양액을 웰 마다 첨가하였다. 감염 24시간 후 세포 상층액을 수득하여 실험에 2와 같이 RdRp 유전자에 대한 qRT-PCR를 수행하여 바이러스 역가를 계산하고 바이러스 감염 억제율(%inhibition)을 계산하였다. 피로나리딘 인산염 10 μ M과 알테수네이트 3.3 μ M을 같이 처리한 경우, 각각 감염 후 24시간과 48시간 켜의 바이러스 역가를 측정하여 대조군인 클로로퀸 및 로피나비르와 비교하였다.

[133] 3) 세포독성 (%cytotoxicity) 측정

[134] 세포 독성은 실험에 2와 같이 측정하였다.

[135]

[136] 그 결과, 도 4과 같이 알테수네이트 단독처리보다 병용처리 시, 또 병용되는 피로나리딘의 비율이 높을수록 항바이러스 효과가 증가하였으며, 특히 피로나리딘 인산염 10 μ M과 알테수네이트 3.3 μ M의 병용 처리 시 (비율 3:1) 90-100%의 항바이러스 감염률 억제 효과를 보여, 대조군으로 사용한 클로로퀸이나 로피나비르보다 더 높은 항바이러스 효과를 보였다. 이 경우 48시간까지 항바이러스 억제율이 유지되었다. 도 4의 모든 조합 조건에서 유의적인 세포독성이 나타나지 않았으며, 피로나리딘 인산염 10 μ M과 알테수네이트 3.3 μ M을 병용 처리한 경우 피로나리딘 인산염 10 μ M 단독 처리에 비해 낮은 세포독성이 관찰되었다 (49.5% 감소).

[137]

[138] **실험예 5: 사람 폐세포주에서의 피로나리딘 인산염과 알테수네이트의 SARS-CoV-2 바이러스 억제 효과 (동시 처리)**

[139] 항바이러스 작용은 수용체 구조 등 사람과 타 동물간 종 간 차이 (species difference)가 있을 수 있음이 보고되고 있다. 따라서, 사람의 폐세포주에서의 효능을 확인하고자, 실험예 5에서는 SARS-CoV-2 바이러스(한국 분리주)를 사람의 폐세포주인 Calu-3세포에 접종시킬 때 피로나리딘 인산염 또는

알테수네이트를 처리하여 바이러스 감염을 억제하는 효능이 있는 지 평가하였다.

[140]

[141] 1) 바이러스와 숙주 세포의 준비

[142] Calu-3 세포주는 37°C, 5% CO₂ 배양 조건에서 10% 소혈청(fetal bovine serum, FBS)과 항생제를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 이용하여 배양하였다. SARS-CoV-2 바이러스는 한국 질병관리본부(Korea Centers for Disease Control and Prevention, KCDC)에서 분양받았다.

[143] 2) RNA copy number를 이용한 항바이러스 효능 측정

[144] 피로나리딘 인산염은 DMSO에 녹인 후 배지를 사용하여 0.033-100 µM 농도로 희석하였다. 시험 24시간 전 2 X 10⁴ cells/wells의 밀도로 Calu-3 세포주를 부착시킨 96-웰 플레이트에 SARS-CoV-2 바이러스를 접종하고 (MOI=0.1), 다양한 농도로 희석된 약물을 함유하는 배양액을 웰 마다 첨가하였다. 감염 24시간 및 48 시간 후 실험예 2와 같이 RdRp 유전자에 대한 qRT-PCR를 수행하여 RNA copy number를 바이러스 역가(virus titer)로 역산하여 바이러스 감염 억제율(%inhibition)을 약물 용량-반응-곡선으로 나타내고, 50% 유효농도(IC₅₀, 바이러스 역가를 50% 억제하는 농도)를 계산하였다.

[145] 3) 세포독성 (%cytotoxicity) 측정

[146] 세포 독성은 실험예 2와 같이 측정하였다.

[147]

[148] 그 결과, 도 5와 같이 동시처리 조건에서 피로나리딘과 알테수네이트 모두 사람의 폐세포주에서도 농도의존적인 항바이러스 효과를 나타냈으며, 감염 후 24 시간 (24 hours post-infection, 24 hpi) 및 48시간 (48 hpi)에서 모두 무독성 농도에서도 90% 이상의 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 나타내었다 (피로나리딘의 48시간 IC₅₀ = 8.58 µM, CC₅₀ > 100 µM; selectivity index, SI>11.66; 알테수네이트의 48시간 IC₅₀ = 0.45 µM, CC₅₀ > 100 µM; selectivity index, SI>220.8). 특히, 알테수네이트의 경우 원숭이 신장 세포주인 Vero 세포주 대비 사람의 폐세포주에서 효과가 크게 증가하였다. 이와는 달리 히드록시클로로퀸(hydroxychloroquine)은 원숭이 세포주에서 항바이러스 효능을 보인 것과는 달리, 사람의 폐세포주에서는 50 µM 이하에서 항 바이러스 효능을 나타내지 않았다.

[149]

[150] 실험예 6: 피로나리딘 인산염과 알테수네이트의 사람 폐세포주에서의 감염 후 처리 시 SARS-CoV-2 바이러스 억제효과

[151] 실험예 6에서는 SARS-CoV-2 바이러스(한국 분리주)를 Calu-3 세포에 접종시킨 후 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 및 36시간에 피로나리딘 인산염 또는 알테수네이트를 각각 처리하여 각 약물이 바이러스 감염 이후 몇 시간 후까지 피로나리딘 인산염 또는 알테수네이트를 처리해도 바이러스를 억제하는 효능이 있는지를

평가하였다.

[152]

[153] 1) 바이러스와 숙주 세포의 준비

[154] Calu-3 세포주와 바이러스는 실험에 5와 같이 준비하였다.

[155] 2) 바이러스 플라크 시험법(plaque assay)을 이용한 항바이러스 효능 측정

[156] 피로나리딘 인산염과 알테수네이트를 각각 DMSO에 녹인 후 배지를 사용하여 12.5 μ M로 희석하였다. Calu-3 세포주에 SARS-CoV-2 바이러스를 접종한 후(MOI=0.1), 1시간 후에 상등액을 제거하고 세척한 후 2% 소혈청을 함유한 DMEM 배양액으로 첨가하였다. 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 및 36시간에 약물을 함유하는 배양액을 첨가하였다. 감염 48시간 후 세포 상층액을 수득하여 바이러스 증식에 이용한 Vero 세포에 바이러스를 감염시켜 생성된 플라크를 측정하는 플라크 시험법을 수행하였다. 감염된 Vero 세포주 위로 2% 아가로스(agarose)를 포함하는 DMEM-F12 배지층을 깔고 72시간 추가 배양 후 crystal violet으로 염색하여 플라크 수를 계수하였다. 약물의 항바이러스 효능은 형성된 플라크 수를 바이러스 역가(virus titer)로 역산하여 바이러스 감염 억제율(%inhibition)을 구한 후 대조군과 비교하여 분석하였다.

[157]

[158] 그 결과, 도 6과 같이 항 바이러스 최대 효능은 피로나리딘 12.5 μ M 처리 시, 감염 후 6시간까지 >99% 억제, 감염 후 12시간까지 >94% 억제, 감염 후 24시간까지 90% 억제가 나타났다. 한편 알테수네이트 12.5 μ M 처리 시에는 감염 후 6시간까지 92~96% 억제, 감염 후 12시간까지 >90% 억제, 감염 후 24시간까지 48% 억제가 나타났다.

[159]

[160] 실험예 7: 코로나19 질환 동물모델에서 피로나리딘 인산염과 알테수네이트 조합 시 SARS-CoV-2 바이러스 억제 효과

[161] 실험예 7에서는 SARS-CoV-2 바이러스(한국 분리주)를 접종한 햄스터(Syrian hamster)에 피로나리딘 인산염과 알테수네이트 (3:1 병용)을 경구투여 하여 동물에서의 *in vivo* 항 바이러스 효능을 평가하였다.

[162]

[163] 1) 바이러스와 코로나19 접종 햄스터 준비

[164] SARS-CoV-2 바이러스는 한국 질병관리본부(Korea Centers for Disease Control and Prevention, KCDC)에서 분양 받았다. 실험동물은 SARS-CoV-2 바이러스에 대해 높은 감수성을 보이고 개체 공급의 제한성이 낮은 햄스터(Syrian hamster)를 사용하여 SARS-CoV-2 바이러스(1×10^6 PFU/100 μ l)를 햄스터의 양쪽 비강에 50 μ l씩 접종하였다.

[165] 2) 플라크 형성 시험법(plaque assay)을 이용한 *in vivo* 항 바이러스 효능 측정

[166] SARS-CoV-2 바이러스를 비강 접종하고 1시간 후부터 피로나리딘 인산염 (180 mg/kg 또는 360 mg/kg)과 알테수네이트 (60 mg/kg 혹은 120 mg/kg)를 3:1로

병용하여 1일 1회 3일간 경구투여 하고, 두 약물의 병용 투여 시 SARS-CoV-2에 대한 *in vivo* 항 바이러스 효능을 평가하였다. 비교 시험군으로 피로나리딘 360 mg/kg을 단독으로 25시간 후 1회 경구투여하여 피로나리딘의 단독 효과 감염 후 효능의 지속시간을 평가하였다. 피로나리딘 인산염 및 알테수네이트는 모두 용시조제(mix just before use)로, 5% 중탄산나트륨(sodium bicarbonate)으로 완전 용해시켜 경구투여 하였다. 대조군으로는 바이러스를 접종하지 않은 정상 대조군 (Mock)과 용매만을 동일시간에 투여한 vehicle 대조군을 사용하였다. 바이러스 접종 후 4일째에서 폐의 좌·우엽을 모두 적출하고 바이러스를 추출하여 플라크 시험법(plaque assay)으로 실험예 6과 같이 폐조직 내 바이러스 역가를 분석하였다. 플라크 시험법으로 정량화된 폐의 역가는 폐 조직의 전체 무게(g)로 보정한 후 로그로 환산하여 최종 역가를 산정하여 비교하였다(Log₁₀ plaque forming unit/g, Log₁₀PFU/g).

[167]

[168] 그 결과, 도 7과 같이 감염 후 4일째에 피로나리딘인산염(P)-알테수네이트(A) 180/60 및 360/120 mg/kg 병용투여군 모두에서 폐조직 내 감염성 바이러스의 역가가 통계적으로 유의미하게 감소되었다 [Log₁₀PFU 중앙값(median): 바이러스 접종군 8.30 대비 병용투여군 PA 180/60 mg/kg 7.22 ($p < 0.001$); PA 360/120 mg/kg 투여군 7.61 ($p = 0.046$)]. 한편 피로나리딘 인산염을 단독 경구투여 했을 때에는 고용량 360 mg/kg의 투여 시 폐조직에 내 감염성 바이러스 역가의 유의미한 감소가 관찰되었으며, 바이러스 감염 후 25시간에 투여했음에 유의한 억제 효과가 관찰되었다 [바이러스 접종군 Log₁₀PFU 중앙값 8.30 vs 단독 고용량 25 hpi 투여군 7.22 ($p < 0.001$)].