



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0038130
(43) 공개일자 2023년03월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4535 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/4535 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-0164542(분할)
- (22) 출원일자 2022년11월30일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2021-0048319
원출원일자 2021년04월14일
심사청구일자 2021년04월14일
- (30) 우선권주장
1020200033407 2020년03월18일 대한민국(KR)
1020200062195 2020년05월25일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
재단법인 경기도경제과학진흥원
경기도 수원시 영통구 광교로 107 (이의동)
대한민국(질병관리청장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
(오송생명과학단지 보건의료행정타운)
- (72) 발명자
정귀완
경기도 용인시 수지구 상현로 101, 109동 102호(상현동, 상현마을수지센트럴아이파크)
김관수
경기도 수원시 장안구 천천로21번길 33, 612동 503호(정자동, 청솔마을주공아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 태웅

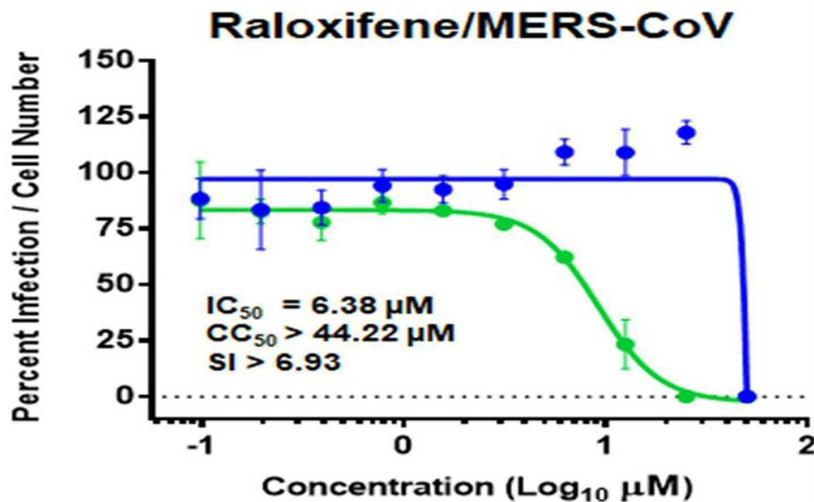
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **랄록시펜을 이용한 코로나바이러스 감염증 개선용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 코로나바이러스인 SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV-2의 감염세포 생존율을 향상시키거나 그 코로나바이러스 세포 내 증식을 억제하는 활성을 가진 랄록시펜을 코로나바이러스 감염증 개선용 조성물을 개시한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박선미

경기도 수원시 권선구 정조로 410, 110동 205호(세류동)

김승택

서울특별시 성북구 북악산로 847, 201동 504호 (정릉동, 정릉 쌍용아파트)

장소영

서울특별시 광진구 아차산로70길 61, 505동 601호 (광장동, 광장현대아파트)

김진희

경기도 성남시 분당구 분당로 190, 110동 103호 (분당동, 샛별마을라이프아파트)

민지영

서울특별시 동작구 사당로22나길 40(사당동)

이주연

대전광역시 서구 둔산남로 127, 201동 901호(둔산동, 목련아파트)

김경창

세종특별자치시 도움3로 75, 1109동 101호(종촌동, 가재마을 11단지)

김령의

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명5로 275 골드리치오피스텔 701호

명세서

청구범위

청구항 1

랄록시펜 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는, SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-OC43 및 SARS-CoV-2 중에서 선택된 코로나바이러스 감염증 개선용 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 랄록시펜을 이용한 코로나바이러스 감염증 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 랄록시펜(Raloxifene)은 에스트로젠과 구조적으로 유사하여 에스트로젠 수용체에 작용하여 에스트로젠을 길항하거나 항진하는 선택적 에스트로젠 수용체 조절 계열의 약물이다.

[0004] 랄록시펜은 폐경기 여성에서 증가하는 골다공증의 예방 및 치료에 사용되지만, 임상 연구들은 랄록시펜이 골다공증 예방 뿐 아니라 척추골절 발생 위험의 감소 효과(골다공증 치료), 콜레스테롤치를 낮추는 효과, 그리고 심혈관계 질환과 유방암 발생을 줄이는 등의 고무적인 결과를 제시하고 있다.

[0005] 한편 코로나바이러스는 외피가 있는 단일가닥의 양성 RNA 바이러스이며 유전자 크기는 25~32kb로, RNA 바이러스 중 비교적 큰 바이러스이다. 외피에 곤봉 모양의 스파이크(spike) 단백질이 발현되어 있어 왕관(라틴어로 Corona) 모양 구조를 가지고 있다. 1937년 닭에서 처음으로 발견된 후 소, 돼지, 고양이, 새, 박쥐, 쥐 등 다양한 동물에서 발견된 코로나바이러스는 4개의 속(알파, 베타, 감마, 델타 코로나바이러스)으로 나뉜다. 알파와 베타 코로나바이러스는 포유류, 감마와 델타코로나바이러스는 조류에 감염되며, 동물에서 위장 질환 및 호흡기 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다. 사람에게 감염되는 코로나바이러스 현재까지 SARS-CoV[중증급성호흡기증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS, 사스)을 일으키는 코로나바이러스], MERS-CoV[중동호흡기증후군(Middle East Respiratory Syndrome, MERS, 메르스)을 일으키는 코로나바이러스] HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV-2[코로나바이러스감염증-19(COVID-19)을 일으키는 바이러스] 등을 포함하여 7종이 보고되어 있다.

[0006] 클로프로마진(Chlorpromazine), 트리플루프로마진(Triflupromazine), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 다사티닙(Dasatinib), 겐시타빈(Gemcitabine), 토레미펜(Toremifene), 클로로퀸(Chloroquine), 로피나비르(Lopinavir)와 같은 기존의 저분자 약물이 세포 수준에서 메르스 코로나바이러스를 저해하는 활성이 보고되었다. 최근에는 스파이크에 대한 단클론항체, 세포막 융합을 억제하는 펩타이드 또한 개발 진행 중에 있다.

[0007] 본 발명은 랄록시펜의 SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV-2 등의 코로나바이러스에 대한 항바이러스 활성을 개시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 랄록시펜을 이용한 SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV-2 등에 의한 코로나바이러스 감염증의 개선용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제의 해결 수단

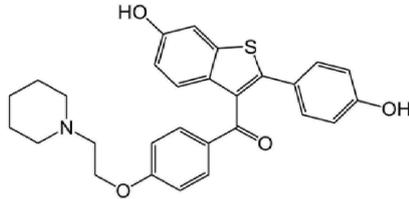
[0012] 본 발명자들은 아래의 실시예에서 확인되는 바와 같이, 랄록시펜이 코로나바이러스인 SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV-2의 감염세포 생존율을 향상시키거나 그 코로나바이러스 세포 내 증식을 억제

함을 확인함으로써 완성된 것이다.

[0013] 진술한 바를 고려할 때, 본 발명은 아래 화학식 1의 랄록시펜 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는, SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-OC43 및 SARS-CoV-2 중에서 선택된 코로나바이러스 감염증 개선용 조성물로 파악할 수 있다.

[0014] 랄록시펜(CAS ID: 84449-90-1)은 공지된 허가된 약물로서, 그 화학식은 아래에서 확인할 수 있다.

[0015] <화학식 1>



[0016] 본 명세서에서, "코로나바이러스 감염증"이란 코로나바이러스의 인체 감염, 감염 후의 인체 내 증식, 그 감염 및/또는 증식에 의한 증상을 의미한다.

[0018] 또 본 명세서에서, "코로나바이러스 감염증 개선"은 코로나바이러스 감염증 예방, 치료 또는 증상 경감을 의미한다.

[0019] 또 본 명세서에서 "유효성분"이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.

[0020] 본 발명의 <화학식 1>의 랄록시펜 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염을 사용될 수 있다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포나이드와 같은 무독성 유기산, 아세트산, 안식향산, 구연산, 젯산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설포나이드, 4-톨루엔설포나이드, 주석산, 푸마르산과 같은 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프릴레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서의 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, <화학식 1>의 랄록시펜 화합물을 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다. 특히 랄록시펜의 산 부가염은 랄록시펜 염산염(raloxifene hydrochloride)이 바람직하다.

[0021] 또한, 본 발명의 <화학식 1>의 랄록시펜 화합물은 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속 염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0022] 또한, 본 발명의 상기 <화학식 1>의 랄록시펜 화합물은 이의 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 입체이성질체 등의 형태로도 사용될 수 있다.

[0023] 본 발명의 조성물에서 그 유효성분은 항바이러스 활성을 나타낼 수 있는 한, 그 구체적 용도, 제형 등에 따라

임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.0001 중량 % 내지 20.0 중량 % 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 그 적용 대상인 포유동물 바람직하게는 사람에게 의료 전문가 등의 제언에 의한 투여 기간 동안 본 발명의 조성물이 투여될 때, 코로나바이러스 감염증의 치료, 예방, 증상 경감 효과 등 의도한 의료적·약리학적 효과를 나타낼 수 있는, 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.

- [0024] 본 발명의 조성물은 다른 구체적인 양태에 있어서는 약제학적 조성물로 파악될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적용 가능한 이상의 독성을 지니지 않는다는 의미이다.
- [0026] 본 발명의 약제학적 조성물이 경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이때 약제학적으로 허용되는 적합한 담체의 예로서는 락토스, 글루코오스, 슈크로스, 텍스트로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등의 당류, 옥수수 전분, 감자 전분, 밀 전분 등의 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 맥아, 젤라틴, 탈크, 폴리올, 식물성유 등을 들 수 있다. 제제화할 경우 필요에 따라 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 및/또는 부형제를 포함하여 제제화할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 약제학적 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 텍스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 경피 투여제로 제제화할 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태로 제제화할 수 있다. 비강 흡입제의 경우 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 등의 적합한 추진제를 사용하여 에어로졸 스프레이 형태로 제제화할 수 있으며, 좌제로 제제화할 경우 그 기재로는 위텡솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 폴리에틸렌글리콜류, 카카오지, 라우린지, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르류, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류, 소르비탄 지방산 에스테르류 등을 사용할 수 있다.
- [0028] 약제학적 조성물의 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 구체적으로 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다.
- [0029] 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.001mg/kg ~ 10g/kg 범위, 바람직하게는 0.001mg/kg ~ 1g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.
- [0030] 본 발명의 조성물은 구체적인 양태에 있어서, 식품 조성물로서 파악할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 식품 조성물은 어떠한 형태로도 제조될 수 있으며, 예컨대 차, 주스, 탄산음료, 이온음료 등의 음료류, 우유, 요구르트 등의 가공 유류, 껌류, 떡, 한과, 빵, 과자, 면 등의 식품류, 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리, 마 등의 건강기능식품 제제류 등으로 제조될 수 있다. 또 본 발명의 식품 조성물은 법률상·기능상의 구분에 있어서 제조·유통 시점의 시행 법규에 부합하는 한 임의의 제품 구분을 떨 수 있다. 예컨대 한국 "건강기능식품에관한법률"에 따른 건강기능식품이거나, 한국 "식품위생법"의 식품공전(식약처 고시, 식품의 기준 및 규격)상 각 식품유형에 따른 과자류, 두류, 다류, 음료류, 특수용도식품 등일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 식품 조성물에는 그 유효성분 이외에 식품첨가물이 포함될 수 있다. 식품첨가물은 일반적으로 식품을 제조, 가공 또는 보존함에 있어 식품에 첨가되어 혼합되거나 침윤되는 물질로서 이해될 수 있는데, 식품과 함께 매일 그리고 장기간 섭취되므로 그 안전성이 보장되어야 한다. 식품의 제조·유통을 규율하는 각국 법률(한국에서는 "식품위생법"임)에 따른 식품첨가물공전에는 안전성이 보장된 식품첨가물이 성분 면에서 또는 기능 면에서

한정적으로 규정되어 있다. 한국 식품첨가물공전(식약처 고시 "식품첨가물 기준 및 규격)에서는 식품첨가물이 성분 면에서 화학적 합성품, 천연 첨가물 및 혼합 제제류로 구분되어 규정되어 있는데, 이러한 식품첨가물은 기능 면에 있어서는 감미제, 풍미제, 보존제, 유화제, 산미료, 점증제 등으로 구분된다.

[0033] 감미제는 식품에 적당한 단맛을 부여하기 위하여 사용되는 것으로, 천연의 것이거나 합성된 것 모두 본 발명의 식품 조성물에 사용할 수 있다. 바람직하게는 천연 감미제를 사용하는 경우인데, 천연 감미제로서는 옥수수 시럽 고형물, 꿀, 수크로오스, 프룩토오스, 락토오스, 말토오스 등의 당 감미제를 들 수 있다.

[0034] 풍미제는 맛이나 향을 좋게 하기 위하여 사용될 수 있는데, 천연의 것과 합성된 것 모두 사용될 수 있다. 바람직하게는 천연의 것을 사용하는 경우이다. 천연의 것을 사용할 경우에 풍미 이외에 영양 강화의 목적도 병행할 수 있다. 천연 풍미제로서는 사과, 레몬, 감귤, 포도, 딸기, 복숭아 등에서 얻어진 것이거나 녹차잎, 등굴레, 대잎, 계피, 국화 잎, 자스민 등에서 얻어진 것일 수 있다. 또 인삼(홍삼), 죽순, 알로에 베라, 은행 등에서 얻어진 것을 사용할 수 있다. 천연 풍미제는 액상의 농축액이나 고형상의 추출물일 수 있다. 경우에 따라서 합성 풍미제가 사용될 수 있는데, 합성 풍미제로서는 에스테르, 알콜, 알데하이드, 테르펜 등이 이용될 수 있다.

[0035] 보존제로서는 소르브산칼슘, 소르브산나트륨, 소르브산칼륨, 벤조산칼슘, 벤조산나트륨, 벤조산칼륨, EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 등이 사용될 수 있고, 또 유화제로서는 아카시아검, 카르복시메틸셀룰로스, 잔탄검, 펙틴 등이 사용될 수 있으며, 산미료로서는 연산, 말산, 푸마르산, 아디프산, 인산, 글루콘산, 타르타르산, 아스코르브산, 아세트산, 인산 등이 사용될 수 있다. 산미료는 맛을 증진시키는 목적 이외에 미생물의 증식을 억제할 목적으로 식품 조성물이 적정 산도로 되도록 첨가될 수 있다.

[0036] 점증제로서는 현탁화 구형제, 칩강제, 겔형성제, 팽화제 등이 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 식품 조성물은 전술한 바의 식품첨가물 이외에, 기능성과 영양성을 보충, 보강할 목적으로 당업계에 공지되고 식품첨가물로서 안정성이 보장된 생리활성 물질이나 미네랄류를 포함할 수 있다.

[0038] 그러한 생리활성 물질로서는 녹차 등에 포함된 카테킨류, 비타민 B1, 비타민 C, 비타민 E, 비타민 B12 등의 비타민류, 토코페롤, 디벤조일티아민 등을 들 수 있으며, 미네랄류로서는 구연산칼슘 등의 칼슘 제제, 스테아린산 마그네슘 등의 마그네슘 제제, 구연산철 등의 철 제제, 염화크롬, 요오드칼륨, 셀레늄, 게르마늄, 바나듐, 아연 등을 들 수 있다.

[0039] 본 발명의 식품 조성물에는 전술한 바의 식품첨가물이 제품 유형에 따라 그 첨가 목적을 달성할 수 있는 적량으로 포함될 수 있다.

[0040] 본 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 기타의 식품첨가물과 관련하여서는 식품위생법에 따른 식품공전이나 식품첨가물 공전을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0042] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 람복시펜을 이용한 코로나바이러스 감염증 개선용 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명의 조성물은 식품 또는 약품으로 제품화될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1과 도 2는 각각 면역 형광 염색 분석법에 의한 람복시펜의 MERS-CoV 및 SARS-CoV 코로나바이러스 증식 억제 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 qRT-PCR에 의한 람복시펜의 MERS-CoV 코로나바이러스 증식 억제 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 CPE assay에 의한 람복시펜의 HCoV-OC43 코로나바이러스에 대한 증식 억제 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 5 및 도 6은 각각 qRT-PCR에 의한 람복시펜의 HCoV-229E 및 HCoV-OC43 코로나바이러스에 대한 증식 억제 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 7 및 도 8은 WST assay를 이용한 SARS-CoV-2 코로나바이러스 감염 세포의 세포생존율 실험 결과와 함께, 각각 qRT-PCR 및 플라크 실험법에 의한 람복시펜의 SARS-CoV-2 코로나바이러스 증식 억제 실험 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] <실시예> 람록시펜의 항바이러스 활성 실험
- [0048] <실시예 1> MERS-CoV 및 SARS-CoV 코로나바이러스에 대한 항바이러스 활성 실험
- [0049] 1.1 재료의 준비
- [0050] Vero (CCL-81)세포는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 5% CO₂, 37℃ 온도가 유지되는 습식 배양기 안에서 4 mM L-글루타민과 항생제/항진균제 혼합액을 첨가한 Opti-PRO™ SFM (#12309019, Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 배지에서 배양하였다. 메르스 코로나바이러스 (passage 4, MERS-CoV/KOR/KNIH/002_05_2015; GenBank accession No. KT029139.1)는 대한민국 국내 환자에서 분리된 것으로 질병 관리본부(한국)로부터 분양받았고, 사스 코로나바이러스(HKU39849)는 홍콩파스퇴르연구소에서 분양받아 한국파스퇴르연구소 생물 안전 3등급 (BSL-3) 연구 시설에서 엄격한 관리 하에 사용되었다. 메르스 코로나바이러스와 사스 코로나바이러스는 Vero 세포에서 증식되었고, 플라크 어세이를 이용하여 바이러스 역가를 측정하였다. 실험에 쓰인 람록시펜은 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서 파우더 형태로 구매하여 DMSO 용매에 녹여서 사용하였다.
- [0051] 1.2 면역 형광 염색 분석법에 의한 바이러스 증식 억제 실험
- [0052] 실험 24시간 전에 384-well black μ Clear plate의 각 well에 Vero 세포를 1.2×10^4 개씩 넣어주었다. 시험 화합물인 람록시펜은 최고 50 μ M 농도에서부터 최소 0.0977 μ M로 1/2씩 연속적으로 희석하여 10개의 농도로 처리하였으며, DMSO 농도는 0.5% 이하로 유지되었다.
- [0053] 세포와 람록시펜이 담긴 플레이트를 생물안전 3등급 실험구역으로 옮긴 후, 메르스 코로나바이러스와 사스 코로나바이러스는 각각 0.0625, 0.05의 MOI(multiplicity of infection)로 감염시키고 24시간 후에 4% 파라포름알데히드로 세포를 고정시킨 다음, 면역 형광 염색을 수행하였다. 메르스 코로나바이러스와 사스 코로나바이러스는 각각 토끼에서 분리된 메르스 코로나바이러스 spike에 대한 1차 항체 및 anti-SARS-CoV spike S1 항체 (Sino Biological Inc., Beijing, China)로 탐지한 후 AlexFluor™ 488 형광 2차 항체 (#A-11008 Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 붙여 감염을 관찰하였고, Hoechst 33342 (#H3570, Invitrogen) 염색을 통해 세포 생존율을 평가하였다. Operetta™ High-Content Imaging System (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)으로 20배 확대 이미지를 수집하여 한국파스퇴르연구소에서 자체 개발한 Image Mining 3.0 (IM 3.0) 플러그인 소프트웨어로 분석하였다. 2회 반복수행하여 얻은 실험 결과로부터 GraphPad Prism 6 프로그램 (GraphPad Prism Software Inc., La Jolla, USA)을 이용하여, 바이러스 복제를 50% 저해시키는 람록시펜의 농도인 IC₅₀ 값 및 숙주세포의 사멸을 50% 저해시키는 람록시펜의 농도인 CC₅₀ 값을 산출하였다. 해당 분석법의 유효성을 평가하는 기준인 Z' factor는 0.97로 나타났으며 메르스 코로나바이러스에 대해 항바이러스 활성을 가지고 있다고 알려진 2개의 화합물 (Chloroquine diphosphate과 Lopinavir)을 사용하여 용량-반응 곡선을 제작하여 유효성을 검증하였다.
- [0054] 감염 백분율(PI)은 아래의 수식으로 계산된다.
- [0055] 감염 백분율 (PI) = $[1 - (IN_{test} - \mu IN_{mock}) / (\mu IN_{vehicle} - \mu IN_{mock})] \times 100\%$
- [0056] IN_{test}는 람록시펜을 처리하고 바이러스를 감염시킨 시험군의 감염율, μIN_{mock} 은 DMSO를 처리하고 바이러스를 감염시키지 않은 음성 대조군의 감염율, $\mu IN_{vehicle}$ 은 DMSO를 처리하고 바이러스를 감염시킨 감염 대조군의 감염율이다.
- [0057] 감염 생존율 (PV)은 아래의 수식으로 계산된다.
- [0058] 감염 생존율 (PV) = $(CN_{test} / \mu CN_{mock}) \times 100\%$
- [0059] CN_{test} 와 μCN_{mock} 는 각각 람록시펜을 처리하고 바이러스를 감염시킨 시험군과 DMSO를 처리하고 감염시키지 않은 음성 대조군의 평균 세포수이다. 수치를 표준화한 다음, 바이러스 복제를 50% 저해시키는 람록시펜의 농도인 IC₅₀와 숙주세포의 사멸을 50% 저해시키는 람록시펜의 농도인 CC₅₀값을 GraphPad Prism 6 프로그램 (GraphPad Software)로 분석하였고, CC₅₀값을 IC₅₀값으로 나누어 선택성 지수 (SI)를 구하였다.

- [0060] 결과를 메르스 코로나바이러스와 사스 코로나바이러스에 대해서 각각 도 1과 도 2에 나타내었다. 도 1과 도 2를 참조하여 보면, 람록시펜의 메르스 코로나바이러스에 대한 IC₅₀는 6.38 μM, CC₅₀는 44.22 μM 이상, SI는 6.93 이상으로 나타났으며, 람록시펜의 사스 코로나바이러스에 대한 IC₅₀는 8.90 μM, CC₅₀는 50 μM 이상, SI는 5.62 이상으로 나타났다(도 1과 2에서 녹색선은 바이러스 증식율, 파란색 선은 세포 생존율이다).
- [0061] **1.3 qRT-PCR에 의한 메르스 코로나바이러스 증식 억제 실험**
- [0062] **1.3.1 바이러스 감염 및 화합물 처리**
- [0063] 실험 24시간 전 24-well plate (Corning® Costar® NY, USA)의 각 well 에 Vero 세포를 3.0 x 10⁵ 개 씩 넣어 배양하였다. 람록시펜을 메르스 코로나바이러스 감염 직전에 각 well 에 첨가하였다. 람록시펜의 최종 농도는 1, 3, 10, 30 μM 이며, DMSO 농도는 0.5% 이하로 유지되었다. 세포와 람록시펜이 담긴 플레이트를 생물안전 3 등급 실험구역으로 옮긴 후, 바이러스를 0.0625의 MOI 로 감염시켰다. 24시간 후에 세포와 람록시펜을 PBS로 세척하고 1% beta-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)이 첨가된 RLT buffer (#79216, QIAGEN GmbH, Germany) 를 넣어 세포를 용해하였다.
- [0064] **1.3.2 RNA 추출**
- [0065] 총 RNA는 위에서 얻어낸 세포 용해액으로부터 RNeasy[®] mini Kit (#74106, QIAGEN GmbH, Germany)와 제조사 매뉴얼을 이용하여 Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리한 물에 50 μl 부피로 추출하였다. 추출된 RNA 농도는 NanoDrop[™] One spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였다.
- [0066] **1.3.3 qRT-PCR**
- [0067] 감염된 세포의 총 RNA는 multiplex RT-PCR (multiplex real-time reverse-transcription polymerase chain reaction) 실험법을 적용하여 메르스 코로나바이러스의 RNA를 탐지하고, 정량분석 하였다. TOPscript[™] One-step RT-PCR DryMIX kit (Enzymomics, #RT412)을 사용하여 upstream of E gene (upE)양을 측정하였다. 각 25 ul 반응은, TOPscript[™] One-step RT-PCR DryMIX kit에서 제공된 시약 혼합액 튜브에 1 μl의 총 RNA, upE 유전자 발현을 확인하기 위해 논문(Corman VM et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Eurosurveillance* 2012; 17:20285)에 사용된 400 nM 농도의 upE-Fwd (GCAACGCGGATTGAGTT)(서열번호 1), upE-Rev (GCCTCTACACGGGACCCATA)(서열번호 2) 프라이머쌍과 upE-Prb (6-carboxyfluorescein [FAM]- CTCTTCACATAATCGCCCCGAGCTCG-6-carboxy-N,N,N,N'-tetramethylrhodamine [TAMRA]) 프로브(프로브 염기서열: 서열번호 3)를 첨가하여 반응시켰다. 내부 대조군으로서 GAPDH 유전자 발현 양 측정을 위하여 400 nM 농도의 GAPDH-Fwd (GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC)(서열번호 4), GAPDH-Rev (CAGAGTAAAAGCAGCCCTGGT)(서열번호 5) 프라이머쌍과 GAPDH-Prb (6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein[JOE]-TTTGGTCGTATTGGGCGCT-6-carboxy-N,N,N,N'-tetramethylrhodamine[TAMRA]) 프로브(프로브 염기서열: 서열번호 6)를 첨가하여 반응시켰다. 역전사 반응과 유전자 증폭은 ViiA[™] 7 Real-Time PCR System (Thermo Scientific)을 이용하여 50℃에 30분, 95℃에 3분, (95℃에 30초, 58℃에 1분)×40사이클로 진행하였다. 측정된 메르스 코로나바이러스의 upE 유전자 발현양은 GAPDH 양으로 보정하여 Comparative CT Method (ΔΔCT Method)로 분석하였다. 참고로 E 유전자는 외피단백질 유전자로, E 유전자의 상위 영역(upstream of E gene)의 발현 정도는 바이러스의 증식 정도를 보여주는 지표로 사용될 수 있다(Corman VM et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Eurosurveillance* 2012; 17:20285).
- [0068] **1.3.4 결과**
- [0069] 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3을 참조하여 보면 람록시펜은 농도 의존적으로 E 유전자의 상위 영역의 발현을 억제함을 보여준다.
- [0070] <실시예 2> HCoV-229E와 HCoV-OC43 코로나바이러스 증식 억제 실험
- [0071] **2.1 재료의 준비**
- [0072] MRC-5 세포 (ATCC[®] CCL-171)는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 4 mM L-글루타민과 항생제/항진균제

혼합액을 첨가한 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (ATCC® 30-2003™) 배지에서 배양하였다. HCoV-229E (ATCC® VR-740™) 바이러스와 HCoV-OC43 (ATCC® VR-1558™)은 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 분양받아 경기바이오센터 생물 안전 2등급 (BSL-2) 연구 시설에서 엄격한 관리 하에 사용되었다. 두 코로나바이러스는 MRC-5 세포에서 증식되었고, 플라크 어세이를 이용하여 바이러스 역가를 측정하였다.

[0073] **2.2 HCoV-229E 코로나바이러스 감염세포의 생존율 측정 실험 - Cytopathic effect assay**

[0074] HCoV-229E 코로나바이러스 감염세포의 생존율을 Cytopathic effect assay(CPE assay)로 측정하였다. 먼저 실험 24 시간 전에 384 웰 플레이트(white 384-well opaque plate)의 각 웰에 MRC-5 세포를 2×10^3 cells 넣어주었다. 락록시펜을 DMSO를 이용하여 연속적으로 희석하여 처리하고, 2시간 후에 HCoV-229E를 5 MOI로 감염시켰다. 48 시간 배양 후에 CellTiter-glo® 시약(Promega, USA)를 1% TX-100과 함께 첨가하고 20분 후에 EnVision® multilabel plate reader(PerkinElmer, USA)를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다. EC₅₀(바이러스에 감염된 세포의 생존율을 50% 증가시키는 시료의 농도)은 GraphPad Prism 6 프로그램 (GraphPad Prism Software Inc., La Jolla, USA)을 이용하여 비선형 회귀 분석으로 산출하였다.

[0075] 결과를 도 4에 나타내었는데, 락록시펜의 HCoV-OC43 코로나바이러스에 대한 EC₅₀는 4.5 μM, CC₅₀는 18.5 μM로 나타났다(도 4에서 막대는 바이러스를 감염시킨 세포에 락록시펜을 처리하였을 때의 세포생존율로 EC₅₀를 계산하는데 사용하였고, 실선은 바이러스에 감염시키지 않은 세포에 락록시펜을 처리하였을 때의 세포생존율로 CC₅₀를 계산하는데 사용하였다).

[0076] **2.3 qRT-PCR에 의한 HCoV-229E 코로나바이러스와 HCoV-OC43 코로나바이러스의 증식 억제 실험**

[0077] 락록시펜의 qRT-PCR에 의한 HCoV-229E 코로나바이러스와 HCoV-OC43 코로나바이러스의 증식 억제 효과를 측정하기 위하여, 코로나바이러스 감염 또는 비감염 MRC-5 세포로부터 총 RNA를 TRIZOL 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 분리하였다. 20μl의 반응 혼합물에 20ng RNA를 첨가하고, One Step RT-PCR MasterMix 키트(MERK, Germany)와 SYBR Green 시약(MGmed, Seoul, Korea)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 cDNA를 합성하고 정량 RT-PCR를, LightCycler® 480 장치(Roche Life Science, Germany)를 이용하여 50°C에 30분, 95°C에 10분, (95°C에 5초, 60°C에 30초)×40 사이클로 진행하였다.

[0078] HCoV-229E 코로나바이러스 표적 유전자(Virol J. 2017; 14: 55)와 HCoV-OC43 코로나바이러스 표적 유전자(Emerg Infect Dis. 2008 Mar; 14(3): 484-486)의 RT-PCR에 사용된 프라이머와 대조군 유전자(GAPDH)의 프라이머는 아래의 표와 같다.

표 1

프라이머 서열

[0079]

Primer	5' -Sequence-3'	References
HCoV-229E F	F: CGCAAGAATTCAGAACCAGAG (서열번호 7)	Virol J. 2017; 14: 55
HCoV-229E R	R: GGCAGTCAGGTTCTCAACAA (서열번호 8)	
HCoV-OC43 F	F: ACTCAAATGAATTTGAAATATGC (서열번호 9)	Emerg Infect Dis. 2008 Mar; 14(3):484-486
HCoV-OC43 R	R: TCACACTTAGGATAATCCCA (서열번호 10)	
GAPDH	F: GTCGGAGTCAACGGATT (서열번호 11)	
GAPDH	R: AAGCTTCCCGTTCTCAG (서열번호 12)	

[0080] 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다. 도 5 및 도 6에서 확인되는 바와 같이, HCoV-229E 코로나바이러스 표적 유전자와 HCoV-OC43 코로나바이러스의 표적 유전자는 락록시펜의 처리 농도에 비례하여 그 발현이 감소하였다.<실시예 3> SARS-CoV-2 코로나바이러스에 대한 항바이러스 활성 실험

[0081] **3.1. 재료의 준비**

[0082] Vero E6 세포는(ATCC CRL-1586) ATCC (Manassas, USA)에서 구입하였고, 5% CO₂, 37°C 배양기에서 불활성화된 10% FBS (Fetal bovine serum, Gibco, USA)와 1% penicillin/streptomycin (Gibco, USA)이 첨가된 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA) 배지에서 배양하였다. SARS-CoV-2 (passage 4,

betaCoV/Korea/KCDC03/20)는 대한민국 국내 환자로부터 분리된 것으로 질병관리본부 생물안전 3등급(BSL-3) 연구시설에서 엄격한 관리 하에 사용되었다. SARS-CoV-2는 Vero E6 세포에서 증식하였고 플라크 실험법을 이용하여 역가를 측정하였다. 실험에 쓰인 랄록시펜은 전문의약품인 에비스타정(Evista tab, Eis Lilly, USA)을 3차 증류수(DW)에 녹여서 사용하였다.

[0083] 3.2. SARS-CoV-2 바이러스에 의한 감염세포의 생존율 측정 실험 - WST assay

[0084] 실험 24시간 전 24 well plate (Eppendorf, Germany)의 각 well에 Vero E6 세포를 1.5×10^5 개 씩 분주하여 배양하였다. 각 well에 연속 희석된 랄록시펜이 포함된 배지를 첨가하고 37°C CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 랄록시펜의 최종농도는 80, 20, 5, 1.25, 0.3125 µg/ml이다. Cell debris를 제거하기 위해 PBS로 세척하였다. 여기에 WST substrate (EZ-cytox, Dogen, Korea)가 포함된 배지를 첨가하여 배양기에서 30분 동안 배양하고 450nm에서 흡광도를 측정하였다. CC₅₀(50% 세포독성을 나타내는 농도)는 GraphPad Prism5 프로그램을 이용하여 비선형 회귀분석으로 산출하였다.

[0085] 결과를 도 7과 도 8에 나타내었다. 도 7 및 도 8을 참조하여 보면 랄록시펜의 CC₅₀은 46.92 µg (99.1 µM)이다. 랄록시펜 비처리군 대비, 처리군의 세포생존율을 사각형실선으로 표시하였다.

[0086] 3.3. qRT-PCR에 의한 SARS-CoV-2 바이러스 증식 억제 실험

[0087] 3.3.1 바이러스 감염 및 화합물 처리

[0088] 실험 24시간 전 24 well plate의 각 well에 Vero E6 세포를 1.5×10^5 개 씩 분주하여 배양하였다. 생물안전 3등급 실험실에서 바이러스를 0.05 MOI로 1시간 동안 접종시켰다. 접종액을 제거한 후 감염되지 않은 바이러스를 제거하기 위해 PBS로 세척하고 1ml의 랄록시펜이 포함된 배지를 첨가하였다. 랄록시펜의 최종농도는 80, 20, 5, 1.25, 0.3125 µg/ml이다. 48시간 후 100 µl의 세포 배양액을 수거하여 프로테이나제 K(proteinase K)가 첨가된 ACL buffer (QIAGEN, Germany)를 넣어 용해시켰다.

[0089] 3.3.2 RNA 추출

[0090] 총 RNA는 세포배양액 용해액으로부터 QIAamp 96 virus QIAcube HT kit (QIAGEN, Germany)와 QIAcube HT system을 이용하여 제조사 매뉴얼에 따라 AVE buffer 100 µl 부피로 추출하였다.

[0091] 3.3.3 qRT-PCR

[0092] 세포 배양액의 총 RNA는 qRT-PCR 실험법을 적용하여 SARS-CoV-2 RNA를 탐지하고, 정량 분석하였다. PowerChek 2019-nCoV real-time PCR kit (Kogen biotech, Korea)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 5 µl의 RNA에서의 E 유전자(E gene) 양을 측정하였다. Genome copy를 측정하기 위해 농도를 알고 있는 SARS-CoV-2 genome을 일정 농도로 희석시킨 후, qRT-PCR 수행하여 기준곡선을 정하였다. IC₅₀(바이러스 농도를 50% 저해하는 화합물의 농도)는 GraphPad Prism5 프로그램을 이용하여 비선형 회귀분석으로 산출하였고 CC₅₀값을 IC₅₀값으로 나누어 선택성 지수 (selectivity index, SI)를 구하였다.

[0093] 3.3.4 결과

[0094] 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7을 참조하여 보면, 랄록시펜은 농도 의존적으로 SARS-CoV-2의 E 유전자 발현을 억제함을 보여준다. 랄록시펜의 SARS-CoV-2에 대한 IC₅₀는 1.47 µg, CC₅₀는 46.92 µg 이상, SI는 31.9로 나타났다. 랄록시펜 비처리군 대비, 처리군의 genome copy 감소율(파란색 선)과 세포생존율(빨간색 선)을 표시하였다.

[0095] 3.4. 플라크 실험법에 의한 SARS-CoV-2 바이러스 증식 억제 실험

[0096] 3.4.1 바이러스 감염 및 화합물 처리

[0097] 실험 24시간 전 24 well plate의 각 well에 Vero E6 세포를 1.5×10^5 개 씩 분주하여 배양하였다. 생물안전 3등급 실험실에서 바이러스를 0.05의 MOI로 1시간 동안 접종시켰다. 접종액을 제거한 후 감염되지 않은 바이러스를 제거하기 위해 PBS로 세척하고 랄록시펜이 포함된 배지를 첨가하였다. 랄록시펜의 최종농도는 80, 20, 5, 1.25, 0.3125 µg/ml이었다. 48시간 후 1ml의 세포배양액을 harvest하여 플라크 실험 수행하기 전까지 -70°C 초

저온냉동고에 보관하였다.

[0098] **3.4.2 플라크 실험**

[0099] 실험 24시간 전 24 well palte의 각 well에 Vero E6 세포를 2.0×10^5 개씩 넣어 배양하였다. 바이러스를 10배 연속 희석 한 후 배양 세포 단층에 접종하고, 1시간 동안 37°C, CO₂ 배양기에서 흡착시켰다. 접종액을 제거하고 감염되지 않은 바이러스를 제거하기 위해 PBS로 세척하였다. 이후 plaque assay를 통해 plaque forming unit (PFU)를 산출하였다. IC₅₀(바이러스 농도를 50% 저해하는 화합물의 농도)는 GraphPad Prism5 프로그램을 이용하여 비선형 회귀분석으로 산출하였고 CC₅₀값을 IC₅₀값으로 나누어 선택성 지수 (selectivity index, SI)를 구하였다.

[0100] **3.4.3 결과**

[0101] 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8을 참조하여 보면 랄록시펜은 농도 의존적으로 SARS-CoV-2 증식을 억제함을 보여준다. 랄록시펜의 SARS-CoV-2에 대한 IC₅₀는 1.76 µg (3.7 µM)으로 나타났고, 랄록시펜의 CC₅₀는 46.92 µg (99.1 µM) 이상, SI는 26.7 로 나타났다. 랄록시펜 비처리군 대비, 처리군의 플라크 감소율(파란색 선)과 세포 생존율(사각형 실선)을 표시하였다.

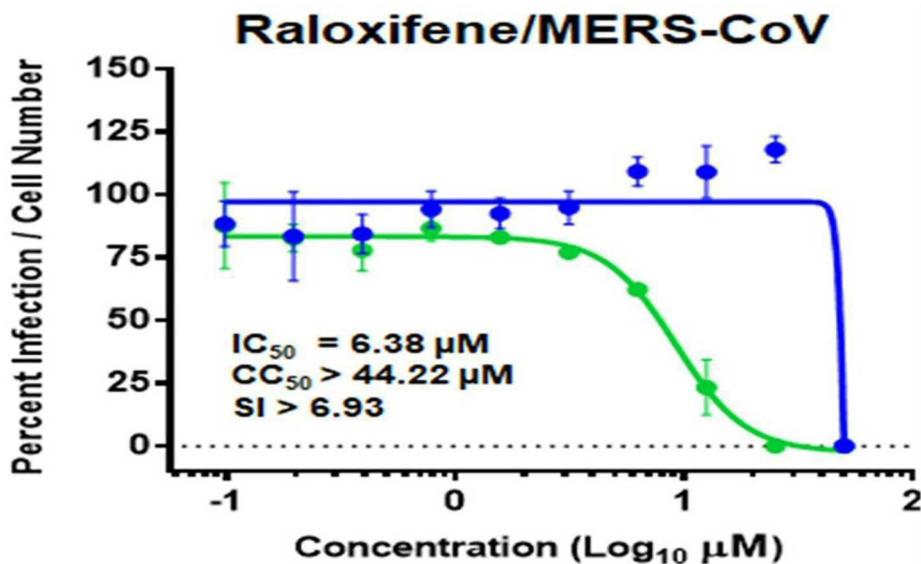
[0102] **통계분석**

[0103] 실험군 간에 통계적 유의성 검증을 위하여 일원변량분석(one-way ANOVA)을 실시하였고, 사후 검증을 위해서 Duncan 다중 범위 검증(Duncan's multiple comparison test)를 실시하였다. 통계적 유의성 검증은 p<0.05 수준에서 이루어졌다. 통계분석에는 Prism® 5 소프트웨어를 사용하였다.

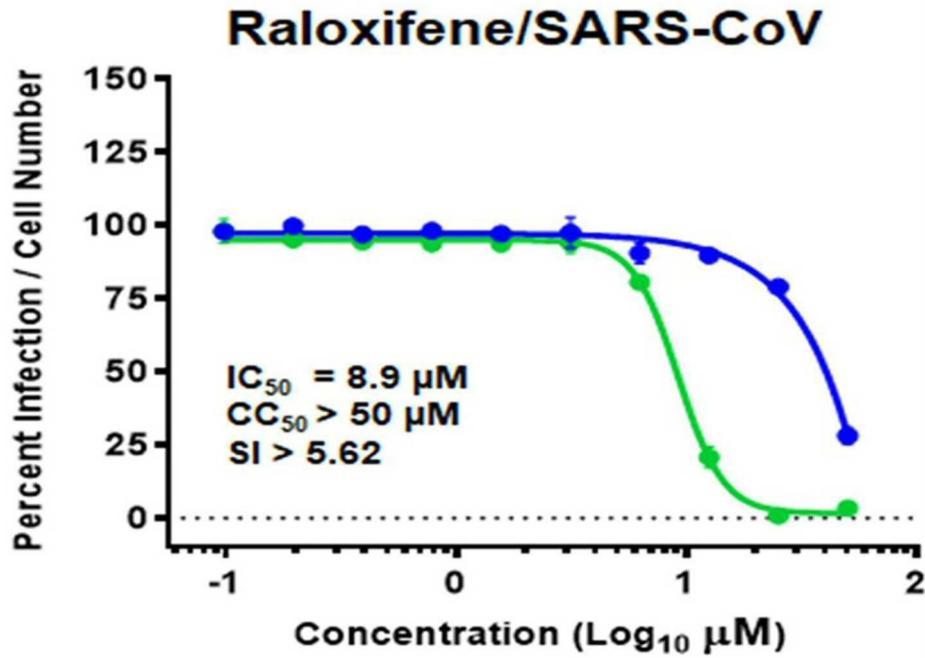
[0107] *

도면

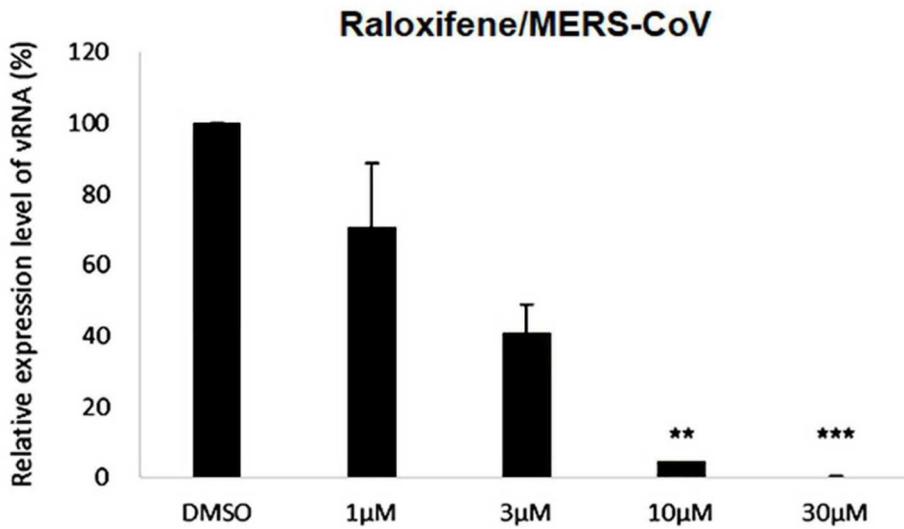
도면1



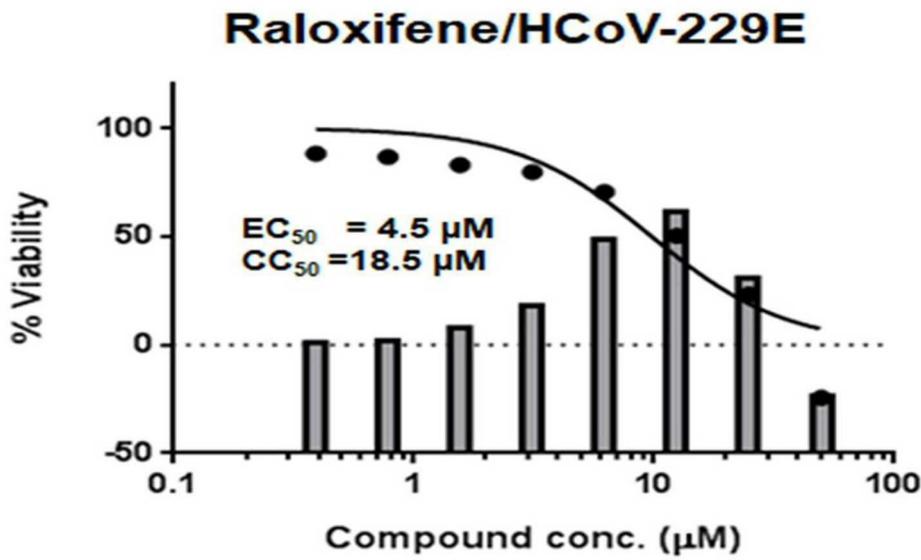
도면2



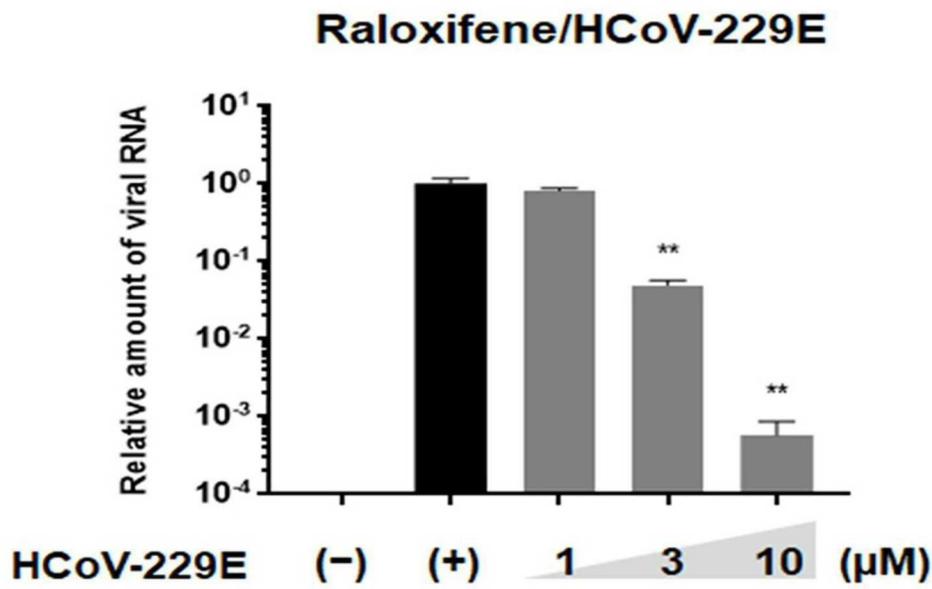
도면3



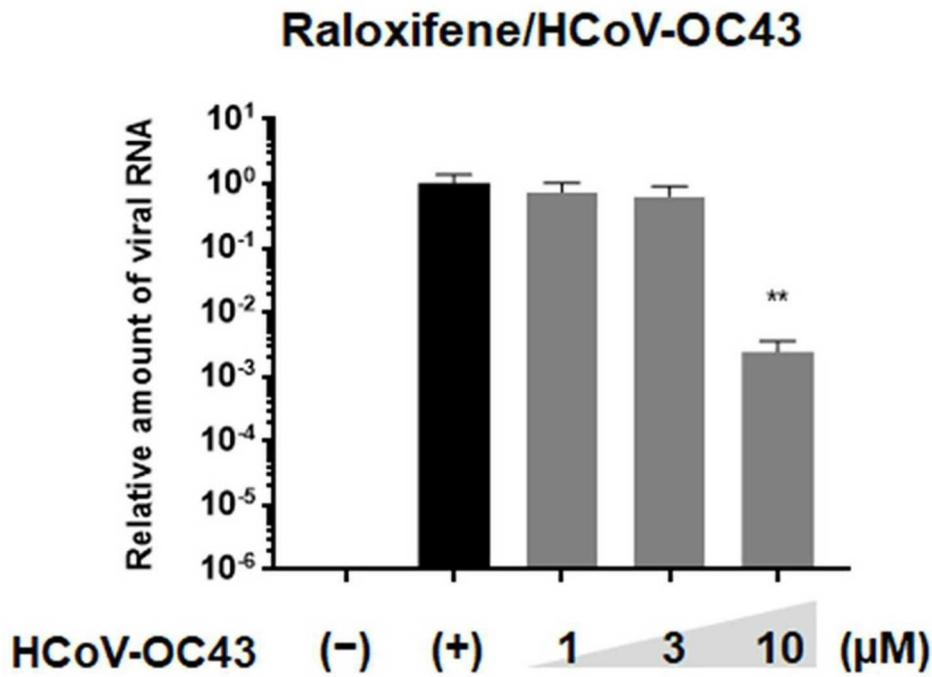
도면4



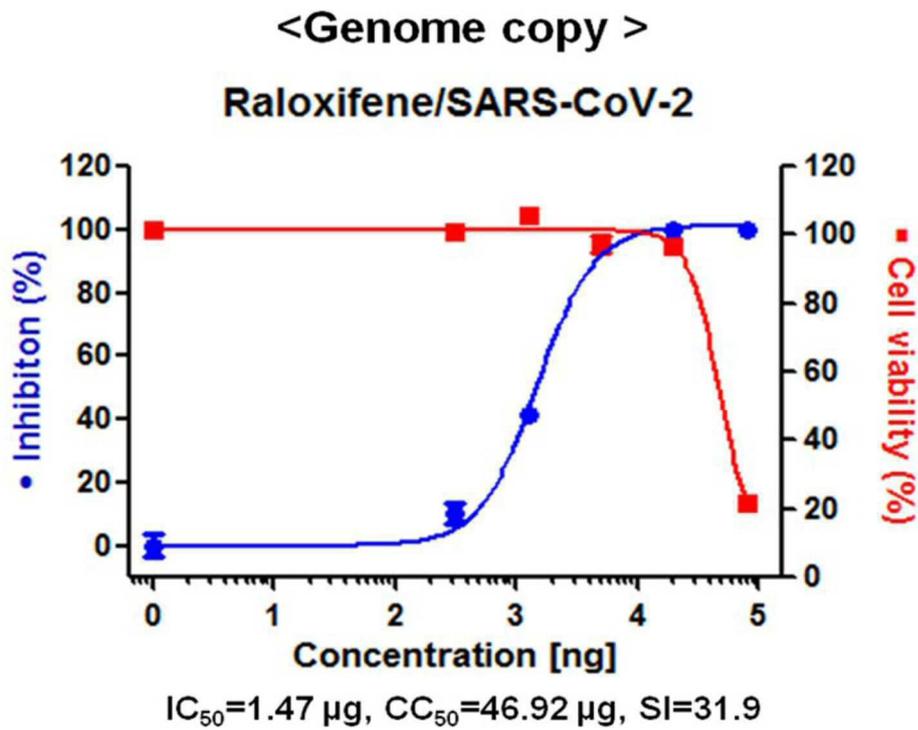
도면5



도면6



도면7



도면8

