



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0138835  
(43) 공개일자 2022년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/4738 (2006.01) A61K 31/28 (2006.01)  
A61K 31/357 (2006.01) A61K 31/675 (2006.01)  
A61K 45/06 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)  
A61P 31/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/4738 (2013.01)  
A61K 31/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0043023

(22) 출원일자 2022년04월06일

심사청구일자 2022년04월06일

(30) 우선권주장

1020210044817 2021년04월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

오중원

경기도 고양시 일산동구 위시티4로 79, 311동 902호(식사동, 위시티블루밍3단지아파트)

정해광

서울특별시 서대문구 연희로10길 48, 502호(연희동)

서한영

서울특별시 서대문구 증가로 50, 301호(연희동, 라이온스톤)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이스

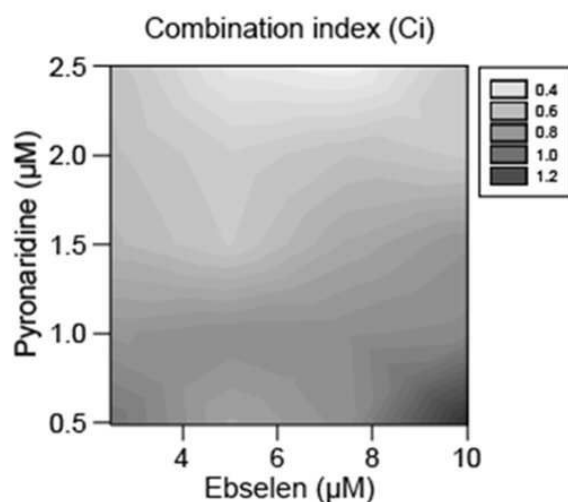
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 포함하는 항-코로나바이러스 병용투여 치료제 조성물

(57) 요약

일 양상은 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 포함하는 항-코로나바이러스용 조성물 또는 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 일 양상에 따르면, 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 병용 투여하는 경우, 코로나바이러스의 세포 내 진입을 억제하고, 코로나바이러스의 단백질분해효소의 활성까지 억제함으로써, 항-코로나바이러스 효과 및 코로나바이러스 감염증의 예방, 개선 또는 치료 효과에 있어서 보다 현저한 시너지 효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도4d



(52) CPC특허분류

*A61K 31/357* (2013.01)

*A61K 31/675* (2013.01)

*A61K 45/06* (2013.01)

*A61K 9/0053* (2013.01)

*A61P 31/14* (2018.01)

*A61K 2300/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 포함하는 항-코로나바이러스용 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소는 3C 유사 프로테아제(3CL protease: 3C-like protease) 계열의 효소인, 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소는 nsp5 프로테아제인, 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 코로나바이러스는 사스코로나바이러스2(SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus2)인, 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물 내 상기 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제의 농도비는 1:0.1 내지 1:10인, 조성물.

#### 청구항 6

코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 포함하는 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 약학적 조성물 내 상기 코로나바이러스의 진입 억제제 및 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제의 농도비는 1:0.1 내지 1:10인, 약학적 조성물.

#### 청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 약학적 조성물은 경구 투여되는 것인, 약학적 조성물.

## 발명의 설명

## 기술분야

[0001] 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 포함하는 항-코로나바이러스 병용투여 치료제 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0003] 2019년 12월, 중국 후베이성 우한에서 신종 코로나바이러스가 발생하였다. 우한 시의 수산물시장에서부터 번지기 시작한 이 바이러스는 폐렴을 유발하기 때문에 초기에 우한 폐렴 바이러스(Wuhan seafood market pneumonia virus)라고 불렸으나, 이후 WHO에서 공식적으로 COVID-19라는 질병으로 명명하였고, 베타 코로나바이러스에 속하는 SARS-CoV와 유전자 서열이 매우 유사하기에 국제바이러스 분류위원회에서는 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus2 (SARS-CoV-2)라 명명하였다. 발병 후 2020년 2월까지 약 20개 국가로 빠르게 퍼져 WHO는 2020년 3월 11일 바이러스 대유행(Pandemic)을 선언하였다. 2003년에 출현한 SARS-CoV는 발병 기간(2002년 11월 ~ 2003년 7월) 동안 약 8천여 명의 감염자와 약 700여 명의 사망자(약 9.6%)를 낸 것에 비해 SARS-CoV-2는 전파속도가 이례적으로 빠르고, 현재까지 사망률이 SARS-CoV보다는 낮으나 전 세계적으로 사망자 수가 증가하고 있는 추세이다. SARS-CoV-2는 현재도 진행 중으로 모든 국가에서 지속적으로 감시하고 있는 상황이다.

[0004] 사스코로나바이러스2는 유전자 구조상 코로나비리데 과(*Coronaviridae family*)의 코로나바이러스 속(*Coronavirus genus*)에 속하는 양성 단일 가닥 RNA 바이러스로써 약 ~30 kb 크기의 유전자를 가지고 있다. 이 바이러스 유전자는 5' 말단에 캡 구조를 가지고 있으며, 3' -poly(A) 서열을 3' 말단에 지니고 있다. 바이러스가 세포 안으로 들어온 후 RNA 유전자는 번역되어, 두 개의 ORF(ORF1a and ORFb)로부터 비구조단백질이 만들어지는데, ORF1a는 폴리펩티드1a(pp1a, 440 - 500 kDa)로 번역되고, 이후 바이러스의 단백질분해효소에 의해 11개의 비구조단백질이 생성된다. ORF1b의 번역에 있어서 특이하게도 ORF1a 정지 코돈의 업스트림(upstream)에서 -1 리보솜 프레임 시프트(frameshift)가 일어나면서 정지가 일어나지 않고, ORF1b 번역이 지속되면서 긴 폴리펩티드(pp1ab, 740 - 810 kDa)가 생성된다. 이 단백질은 바이러스 유래 단백질분해효소인 비구조단백질3(nsp3: nonstructural protein 3)과 비구조단백질5(nsp5: nonstructural protein 5)에 의해 잘려 16개의 비구조단백질이 생성된다. 16개의 nsp 중 복제에 중요하다고 알려진 비구조단백질12(nsp12: nonstructural protein 12)의 RNA 중합효소(RNA-dependent RNA polymerase) 활성에 의해 genomic RNA(gRNA)를 주형으로 음성 가닥 RNA 중간체가 생성되고, 다시 이 음성 가닥 RNA 중간체로부터 subgenomic RNA (sgRNA)가 생성된다. gRNA는 구조단백질에 의해 조립되어 감염성이 있는 바이러스 입자가 만들어지고, 다양한 길이의 sgRNA는 4개의 구조단백질(spike, envelope, membrane 및 nucleocapsid 단백질)과 6개의 악세서리 단백질(ORF3a, 6, 7a, 7b, 8 및 10)로 번역된다.

[0005] 바이러스 표적 약물은 크게 두 가지로 전략으로 개발되고 있다. 첫째는 바이러스의 세포 내 진입을 억제하는 전략, 둘째는 세포 내 증식을 억제하는 전략이다. 바이러스의 진입을 막는 방법은 바이러스의 세포 내로 침투를 원천 차단하는 방법으로 가장 효율적이고 효과적인 방법이라고 할 수 있다. 이와 더불어 세포 내 증식 억제를 위한 약물과 함께 투여한다면 더욱더 효과적으로 바이러스의 증식을 억제할 수 있다. 통상적인 신약개발 과정은 약물 작용점 선정, 스크리닝, 전임상, 임상 등 개발 단계가 복잡하여 오랜 시간과 많은 개발 비용이 소요된다. 사스코로나바이러스2와 같은 신종 바이러스에 신속하게 대응하기 위해서는 신약 채창출을 통해 안전성이 검증된 약물을 활용하는 것이 바이러스의 확산을 초기에 억제하는데 기여할 수 있다. 또한, 발굴한 약물의 작용 부위를 찾아내고, 이 정보에 기반하여 약물의 구조를 변경함으로써 약물의 효능 및 전달 효과 등이 향상된 물질 발굴이 가능할 수 있다.

[0006] 이에, 본 발명에서는 2019년 12월 발병하여 현재까지 높은 감염률과 사망률을 기록하고 있는 사스코로나바이러스2를 제어하기 위해 FDA승인 약물군을 테스트하여 피로나리딘(pyronaridine) 및 엡셀렌(ebselen)을 발굴하였다. 피로나리딘은 1970년 말라리아 치료제로 개발된 약물로 현재 아르테수네이트(artesunate)와 병용하여 사스코로나바이러스2 치료제로 임상 2/3상이 진행 중인 약물이다. 또 다른 약물인 엡셀렌은 항염증, 항산화 작용과 항우울증, 난청 치료제 및 사스코로나바이러스2를 대상으로 임상 시험 중에 있다. 바이러스의 단백질분해효소인 nsp5는 SARS-CoV-2 바이러스 폴리 단백질 프로세싱에 관여하는 바이러스 증식에 필요한 효소이다. 이 효소의 활성이 억제되면 상기한 개별 비구조단백질이 생성되지 못하게 되어 복제가 정상적으로 일어나지 못하게 되고, 이로 인해 바이러스 증식이 저해된다. 따라서 nsp5 특이적 활성억제제 스크리닝 에세이 확립과 이를 통해 발굴한 활성 억제 기능이 있는 물질은 바이러스 특이적 치료제로 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용한 엡셀렌은 사스코로나바이러스2 단백질분해효소인 nsp5 단백질의 활성을 억제하는 활성이 있으며 본 발명의 실시예 결과와도 일치한다.

[0007] 본 발명자들은 코로나바이러스 세포 내 진입 억제제인 피로나리딘과 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제인 엠셀렌을 병용 투여하는 경우, 바이러스 진입과 세포 내 증식을 동시에 억제시켜, 시너지 효과를 보이며 사스코로나바이러스2를 제어할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2021-0116008호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 일 양상은 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 포함하는 항-코로나바이러스 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 다른 양상은 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 포함하는 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또 다른 양상은 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 이룰 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 또 다른 양상은 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제의 용도를 제공하는 것이다.

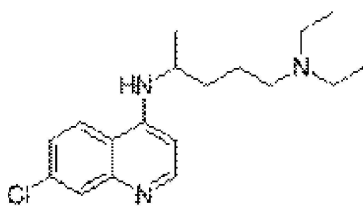
### 과제의 해결 수단

[0015] 일 양상은 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 포함하는 항-코로나바이러스 조성물을 제공한다.

[0016] 일 양상에 있어서, 상기 코로나바이러스의 세포 진입 억제제는 클로로퀸(chloroquine), 하이드록시클로로퀸(hydroxychloroquine), 티로론(tilorone) 및 피로나리딘(pyronaridine)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 구체적으로는 피로나리딘(pyronaridine)일 수 있다.

[0017] 상기 클로로퀸(chloroquine, (RS)-N'-(7-chloroquinolin-4-yl)-N, N-diethyl-pentane-1,4-diamine)은 하기 화학식 1의 화합물이고, 319.872의 분자량과  $C_{18}H_{26}ClN_3$ 의 분자식으로 이루어져 있으며, 천연으로부터 유래되는 것일 수 있고, 공지의 유기 합성 방법을 이용하여 합성되는 것일 수 있으며, 비단백질 화합물, 펩티드, 식물 유래 조직이나 세포의 추출물, 미생물(예를 들어 세균류 또는 진균류, 그리고 특히 효모)의 배양으로 얻어진 생산물일 수 있다:

[0018] [화학식 1]

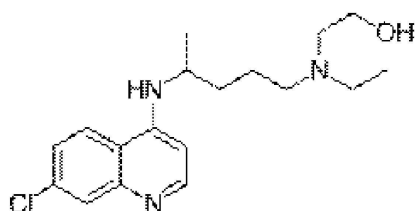


[0019]

[0020] 상기 하이드록시클로로퀸(hydroxychloroquine, 2-[4-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]pentyl-ethylamino]ethanol)은 하기 화학식 2의 화합물이고, 335.872의 분자량과  $C_{18}H_{26}ClN_3O$ 의 분자식으로 이루어져 있

으며, 천연으로부터 유래되는 것일 수 있고, 공지의 유기 합성 방법을 이용하여 합성되는 것일 수 있으며, 비단백질 화합물, 펩티드, 식물 유래 조직이나 세포의 추출물, 미생물(예를 들어 세균류 또는 진균류, 그리고 특히 효모)의 배양으로 얻어진 생산물일 수 있다:

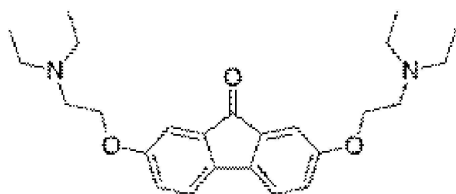
[0021] [화학식 2]



[0022]

[0023] 상기 티로론(tilorone, 2,7-Bis[2-(diethylamino)ethoxy]-9-fluorenone dihydrochloride)은 하기 화학식 3의 화합물이고, 410.558의 분자량과  $C_{25}H_{34}N_2O_3$ 의 분자식으로 이루어져 있으며, 천연으로부터 유래되는 것일 수 있고, 공지의 유기 합성 방법을 이용하여 합성되는 것일 수 있으며, 비단백질 화합물, 펩티드, 식물 유래 조직이나 세포의 추출물, 미생물(예를 들어 세균류 또는 진균류, 그리고 특히 효모)의 배양으로 얻어진 생산물일 수 있다:

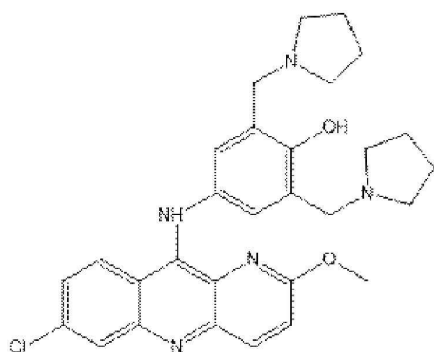
[0024] [화학식 3]



[0025]

[0026] 상기 피로나리딘(pyronaridine, 4-[(7-chloro-2-methoxybenzo[b][1,5]naphthyridin-10-yl)amino]-2,6-bis(pyrrolidin-1-ylmethyl)phenol)은 하기 화학식 4의 화합물이고, 518.06의 분자량과  $C_{29}H_{32}ClN_5O_2$ 의 분자식으로 이루어져 있으며, 천연으로부터 유래되는 것일 수 있고, 공지의 유기 합성 방법을 이용하여 합성되는 것일 수 있으며, 비단백질 화합물, 펩티드, 식물 유래 조직이나 세포의 추출물, 미생물(예를 들어 세균류 또는 진균류, 그리고 특히 효모)의 배양으로 얻어진 생산물일 수 있다:

[0027] [화학식 4]



[0028]

[0029] 일 실시예에서는 사스코로나바이러스2에 대한 피로나리딘(코로나바이러스의 세포 진입 억제제)의 항-코로나바이러스 효능을 확인하기 위해 사스코로나바이러스2를 감염 다중도로 감염시킨 후 피로나리딘을 농도별(0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M 및 40  $\mu$ M)로 처리한 결과, 피로나리딘 4  $\mu$ M 농도부터 세포 생존성이 80% 이상 유지되었고, 세포 독성이 나타나지 않은 2  $\mu$ M 농도에서 세포 내 바이러스 유전자 카피수가 감소한 것을 확인하였다(실시예 1 참조).

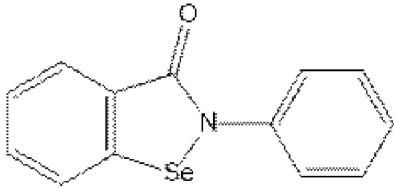
[0030] 다른 실시예에서는 사스코로나바이러스2에 대한 피로나리딘의 바이러스 진입 억제 효능을 확인하기 위해 사스코로나바이러스2 수용체인 hACE2를 발현하고 있는 세포주에 코로나바이러스의 세포 진입 억제제인 클로로퀸(chloroquine), 하이드록시클로로퀸(hydroxychloroquine) 및 피로나리딘(pyronaridine)을 농도별로(1  $\mu$ M, 2

$\mu\text{M}$  및  $10\ \mu\text{M}$ ) 처리한 결과, 피로나리딘의 억제 효과가 약물의 세포 생존성에 큰 영향을 주지 않는  $2\ \mu\text{M}$  농도에서 통계적으로 유의성을 보이며, 다른 화합물 대비 가장 우수한 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다(실시예 2 참조).

[0031] 일 양상에 있어서, 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제는 엡셀렌(ebselen)일 수 있다.

[0032] 상기 엡셀렌(ebselen, 2-Phenyl-1,2-benzoselenazol-3(2H)-one)은 하기 화학식 5의 화합물이고, 274.18의 분자량과  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NOSe}$ 의 분자식으로 이루어져 있으며, 천연으로부터 유래되는 것일 수 있고, 공지의 유기 합성 방법을 이용하여 합성되는 것일 수 있으며, 비단백질 화합물, 펩티드, 식물 유래 조직이나 세포의 추출물, 미생물(예를 들어 세균류 또는 진균류, 그리고 특히 효모)의 배양으로 얻어진 생산물일 수 있다:

[0033] [화학식 5]



[0034]

[0035] 일 실시예에서는 비구조단백질 표적 약물의 항-코로나바이러스 효능을 분석하기 위해 Huh7 세포(인간 간암 세포)에 사스코로나바이러스 서브지노믹 레플리콘 플라스미드를 형질주입한 뒤 바이러스 RNA 중합효소 억제제로 알려진 렘데시비르(remdesivir)  $2\ \mu\text{M}$  및 단백질분해효소 활성을 억제하는 것으로 알려진 엡셀렌(코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제)  $10\ \mu\text{M}$ 를 세포에 처리하고, 루시페레이스(luciferase) 활성을 통해 바이러스 복제 억제능을 확인한 결과, 렘데시비르 및 엡셀렌 모두 루시페레이스 활성을 낮추는 것을 확인함으로써 이들 약물이 각각의 표적에 작용하여 바이러스 복제 억제 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

[0036] 또한, FRET 기반 분석법을 이용하여 엡셀렌의 사스코로나바이러스2 nsp5 3CL 프로테아제 활성억제능을 확인하였다. 그 결과, 엡셀렌을 처리한 군에서는 엡셀렌에 의해 단백질분해효소 활성이 억제되어 형광 세기가 현저히 억제됨을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0037] 일 양상에 있어서, 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소는 3C 유사 프로테아제(3CL protease: 3C-like protease) 계열의 효소일 수 있고, 구체적으로는 nsp5 프로테아제일 수 있다.

[0038] 상기 용어 "단백질분해효소(protease)"는 단백질을 가수분해하는 효소를 통틀어 이르는 말로, 아미노산 또는 펩티드 혼합물을 만드는 효소이다.

[0039] 상기 용어 "3C 유사 프로테아제(3CL protease: 3C-like protease)"는 코로나바이러스에서 발견되는 주요 단백질 분해효소를 의미하고, 11개의 보존된 위치에서 코로나바이러스 폴리프로테인을 절단한다.

[0040] 상기 "nsp5 프로테아제"는 단백질분해효소이며, 바이러스 폴리 단백질 프로세싱에 관여하는 바이러스 증식에 필요한 효소이다. 상기 효소의 활성이 억제되면 상기한 개별 비구조단백질이 생성되지 못하게 되어 복제가 정상적으로 일어나지 못하게 되고, 이로 인해 바이러스 증식이 저해된다.

[0041] 일 양상에 있어서, 상기 코로나바이러스는 사스코로나바이러스2(SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus2)일 수 있다.

[0042] 상기 용어 "코로나바이러스는(Corona virus)" 코로나바이러스과(Coronaviridae)에 속하며 구형의 외막을 가지는 약 100 내지 220 nm 크기의 단일 가닥 양성 RNA 바이러스이다.

[0043] 상기 용어 "사스코로나바이러스2(SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus2)"는 유전자 구조상 코로나비리데 과(Coronaviridae family)의 코로나바이러스 속(Coronavirus genus)에 속하는 양성 단일 가닥 RNA 바이러스이다.

[0044] 상기 용어 "항-코로나바이러스"는 최초에 코로나바이러스가 세포에 흡착/진입하는 것을 막거나, 세포 안으로 들어온 바이러스의 RNA 등 유전물질이 합성되는 것을 방해하는 방식 등으로 바이러스의 증식을 억제하는 것을 의미한다.

[0045] 상기 용어 "세포(cell)"는 바이러스, 특히 코로나바이러스에 감염될 수 있는 세포를 의미하고, 식물 또는 동물 세포일 수 있으며, 분리된 세포 또는 살아있는 유기체, 기관, 조직에서 분리되지 않은 세포일 수 있다. 구체적



으로 상기 세포는 포유동물 세포일 수 있으며, 보다 구체적으로는 인간세포일 수 있다.

- [0046] 상기 용어 "세포 진입"은 바이러스의 유전정보가 숙주가 되는 세포 내로 유입되는 것을 의미하고, 상기 용어 "세포 진입 억제"란 수용체를 차단하는 등 여러 방식으로 바이러스가 세포로 들어가는 것을 방지하는 것을 의미한다.
- [0047] 일 양상에 따르면, 상기 조성물이 상기 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 포함하는 경우, 코로나바이러스의 세포 내 진입을 억제하고, 코로나바이러스의 단백질분해효소의 활성을 억제함으로써, 항-코로나바이러스에 있어서, 보다 현저한 시너지 효과를 나타낼 수 있다.
- [0048] 일 양상에 있어서, 상기 조성물 내 상기 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제의 농도비는 1:0.1 내지 1:10, 1:0.1 내지 1:5, 1:0.1 내지 1:4, 1:1 내지 1:10, 1:1 내지 1:5, 1:1 내지 1:4, 1:2 내지 1:10, 1:2 내지 1:5 또는 1:2 내지 1:4일 수 있다.
- [0049] 일 양상에 있어서, 상기 조성물 내 상기 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제의 농도비가 1:0.1 내지 1:10인 경우, 세포 내의 바이러스 유전자 카피수가 현저히 감소하는 바, 보다 우수한 항-코로나바이러스 효과를 나타낼 수 있다.
- [0050] 일 실시예에서는 Vero E6 세포에 피로나리딘과 엡셀렌을 병행 사용함으로써, 사스코로나바이러스2 진입 억제 및 단백질분해효소 활성을 동시에 억제시켜 항-코로나바이러스 효능이 증대되는지 분석하기에 앞서 엡셀렌 또는 피로나리딘과 엡셀렌을 병행 사용시 세포 활성에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과, 엡셀렌은 40  $\mu$ M 처리 농도에서 세포에 독성을 보이지 않았으며, 엡셀렌 (2.5  $\mu$ M, 5.0  $\mu$ M, 7.5  $\mu$ M 및 10  $\mu$ M)의 농도와 피로나리딘 (0.5  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M, 1.5  $\mu$ M, 2.0  $\mu$ M 및 2.5  $\mu$ M)의 농도를 조합해 처리하는 경우에도 세포 활성이 80% 이상 유지되는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0051] 또한, Vero E6 세포에 피로나리딘과 엡셀렌을 병행 사용하여 항-코로나바이러스 효능을 분석한 결과, 각 농도 구간(피로나리딘의 농도 구간: 0.5  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M, 1.5  $\mu$ M, 2.0  $\mu$ M 및 2.5  $\mu$ M, 엡셀렌의 농도 구간: 2.5  $\mu$ M, 5.0  $\mu$ M, 7.5  $\mu$ M 및 10  $\mu$ M)에서 세포 내의 바이러스 유전자 카피수가 현저히 감소한다는 것을 확인하였으며, 피로나리딘 2.5  $\mu$ M 및 엡셀렌 7.5  $\mu$ M 병용 처리 조건에서 최대의 항-코로나바이러스 시너지 효과가 나타난다는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0052] 또한, 단독으로 사용하는 경우보다 피로나리딘 2.5  $\mu$ M 및 엡셀렌 7.5  $\mu$ M 병용 처리하는 경우가 플라크 형성을 검출 수준 이하(검출 하한치: 10 PFU/ml)까지 감소시키는 높은 항-코로나바이러스 활성을 나타낸다는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0053] 다른 실시예에서는 말라리아 치료제에서 현재 사스코로나바이러스2 치료제로 용도를 변경해 임상 시험 진행 중에 있는 피로나리딘/아르테수네이트(pyronaridine/artesunate)가 병용 처리시, 시너지 효과를 보이며 항코로나바이러스 효과를 보이는지를 평가하였다. 그 결과, 아르테수네이트는 40  $\mu$ M 농도에서 세포 활성을 20% 미만으로 감소시킬 수 있으며, 피로나리딘 2.5  $\mu$ M과 아르테수네이트 2.5  $\mu$ M, 7.5  $\mu$ M 및 12.5  $\mu$ M 농도에서 병행 처리하는 경우에도 세포 독성이 크게 나타나지 않음(20% 이하 세포 활성 감소)을 확인할 수 있었다. 이러한 병행 투여 조합에서 피로나리딘의 항바이러스 효과는 아르테수네이트에 의해 증대되지 않았다. 이를 통해 피로나리딘과 엡셀렌을 병용 투여의 시너지 효과가 이들의 조합 특이적인 효과임을 확인할 수 있었다(실시예 5 참조).
- [0054] 또 다른 실시예에서는 주사제인 RNA 복제효소 억제제인 램테시비르와 비교하여 피로나리딘/엡셀렌의 병행 투여 효과를 비교하였다. 그 결과, 램테시비르는 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M 및 20  $\mu$ M 농도구간에서 세포 생존성 감소가 나타나지 않음을 확인하였다 (실시예 6 참조).
- [0055] 또한, 램테시비르(0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M 및 10  $\mu$ M)와 피로나리딘/엡셀렌(피로나리딘 2.5  $\mu$ M 및 엡셀렌 7.5, 10  $\mu$ M) 병용 투여의 항-코로나바이러스 역가를 비교하는 실험을 사스코로나바이러스2로 감염된 Vero E6 세포주에서 수행하였다. 세포 내 잔존 바이러스 RNA 카피수를 분석한 결과, 경구제인 피로나리딘/엡셀렌의 병용 투여가 미국 FDA 승인된 램테시비르 주사제 약물이 보이는 정도의 항-코로나바이러스 효과를 나타내는 것을 확인하였다(실시예 6 참조).
- [0057] 다른 양상은 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 포함하는



코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0058] 상기 "코로나바이러스의 세포 진입 억제제", "코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제", "코로나바이러스" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0059] 상기 용어 "코로나바이러스 감염증(COVID-19: coronavirus disease 2019)"은 코로나바이러스가 일으키는 중증 호흡기 증후군으로, 일 양상에 있어서, 상기 코로나바이러스는 사스코로나바이러스2일 수 있다.
- [0060] 상기 용어 "예방"은 일 양상에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 개체의 코로나바이러스의 감염을 억제시키거나 코로나바이러스 감염증의 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0061] 상기 용어 "치료"는 일 양상에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 개체의 코로나바이러스 감염증에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0062] 용어 "투여"는 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, "개체"는 코로나바이러스를 보유할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 생물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유 동물일 수 있다.
- [0063] 또한, 상기 약학적 조성물은 유효성분을 단독으로 포함하거나, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하여 약학적 조성물로 제공될 수 있다.
- [0064] 상기 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.
- [0065] 구체적으로, 상기 담체는 예를 들어, 콜로이드 현탁액, 분말, 식염수, 지질, 리포솜, 미소구체(microspheres) 또는 나노 구형입자일 수 있다. 이들은 운반 수단과 복합체를 형성하거나 관련될 수 있고, 지질, 리포솜, 미세입자, 금, 나노입자, 폴리머, 촉합 반응제, 다당류, 폴리아미노산, 텐드리머, 사포닌, 흡착 증진 물질 또는 지방산과 같은 당업계에 공지된 운반 시스템을 사용하여 생체 내 운반될 수 있다.
- [0066] 상기 약학적 조성물이 제제화될 경우에는 통상적으로 사용하는 윤활제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propyleneglycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 제라틴 등이 사용될 수 있고, 점안제 형태로 제조 시 공지의 희석제 또는 부형제 등이 사용될 수 있다.
- [0067] 일 양상에 있어서, 상기 약학적 조성물은 경구 투여되는 것일 수 있다. 상기 용어 "경구 투여"는 입을 통하여 약을 투여한다는 것을 의미한다.
- [0068] 구체적으로, 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있고, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calciumcarbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0069] 일 양상에 있어서, 상기 코로나바이러스의 진입 억제제 및 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제는 약학적 조성물에 동시에 혼입되어 제공되는 경우 외에도, 병용 투여되는 것일 수 있다.
- [0070] 상기 용어 "병용 투여"는 동시에 사용하거나 거의 동시에(하나씩 차례로, 또는 같은 날에 투여 등) 사용하는 두 개 이상의 약물을 적절한 방법으로 개체에게 도입하는 것을 의미한다.
- [0071] 일 양상에 있어서, 상기 코로나바이러스의 진입 억제제 및 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제가 병용 투여되는 경우, 코로나바이러스의 세포 내 진입을 억제할 뿐만 아니라 코로나바이러스의 단백질분해효소의 활성까지 억제함으로써, 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료에 있어서, 보다 현저한 시너지 효과를 나타낼 수 있다. 또한 단독 처리 보다 약물 내성바이러스 출현을 억제하는 효과를 얻을 수 있다.
- [0072] 일 양상에 있어서, 상기 코로나바이러스의 진입 억제제 및 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제

의 병용 투여 시 농도비는 1:0.1 내지 1:10, 1:0.1 내지 1:5, 1:0.1 내지 1:4, 1:1 내지 1:10, 1:1 내지 1:5, 1:1 내지 1:4, 1:2 내지 1:10, 1:2 내지 1:5 또는 1:2 내지 1:4일 수 있다.

[0073] 일 양상에 있어서, 상기 코로나바이러스의 진입 억제제 및 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소 억제제의 병용 투여 시 농도비가 1:0.1 내지 1:10인 경우, 세포 내의 바이러스 유전자 카피수가 현저히 감소하는 바, 보다 우수한 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0074] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0075] 일 양상에 있어서, 상기 약학적 조성물의 투여는 하루에 한 번 투여되는 것일 수도 있고, 수 회 나누어 투여되는 것일 수도 있다. 예를 들어, 격일로 투여되는 것일 수도 있으며, 일주일에 하루 투여되는 것일 수도 있다. 구체적으로, 상기 약학적 조성물은 0.001 내지 1000 mg/kg/day로, 보다 구체적으로 0.1 내지 100 mg/kg/day로 투여될 수 있다. 상기 투여는 하루에 한 번 투여되는 것일 수도 있고, 수 회 나누어 투여되는 것일 수도 있다.

[0077] 또 다른 양상은 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0078] 상기 "코로나바이러스의 세포 진입 억제제", "코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제", "개체", "투여", "코로나바이러스 감염증", "예방", "치료" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0079] 상기 방법은 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료 효과를 가지는 공지의 조성물 또는 다른 약학적 조성물과 병행하여 투여하는 것일 수 있고, 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여하는 것일 수 있으며, 단일 또는 다중 투여하는 것일 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0080] 일 양상에 따르면, 상기 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 상기 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제가 병용 투여되는 경우, 코로나바이러스의 세포 내 진입을 억제하고, 코로나바이러스의 단백질분해효소의 활성을 억제함으로써, 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료에 있어서, 보다 현저한 시너지 효과를 나타낼 수 있다. 나아가 각 약물 다독 사용 대비, 약물 내성 바이러스 출현을 억제할 수 있는 효과를 얻을 수 있다.

[0082] 또 다른 양상은 코로나바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제의 용도를 제공한다.

[0083] 상기 "코로나바이러스 감염증", "예방", "치료", "코로나바이러스의 세포 진입 억제제", "코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

## 발명의 효과

[0085] 일 양상에 따르면, 코로나바이러스의 세포 진입 억제제 및 코로나바이러스의 단백질분해효소 활성 억제제를 병용 투여하는 경우, 코로나바이러스의 세포 내 진입을 억제하고, 코로나바이러스의 단백질분해효소의 활성까지 억제함으로써, 항-코로나바이러스 효과 및 코로나바이러스 감염증의 예방, 개선 또는 치료 효과에 있어서 보다 현저한 시너지 효과를 나타낼 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0087] 도 1은 사스코로나바이러스2에 대한 피로나리딘(pyronaridine)의 항바이러스 활성 분석한 결과를 나타내는 도이다(\*는  $P < 0.05$ ).

도 2는 HEK293T-hACE2[사스코로나바이러스2 수용체인 인간 ACE2 (hACE2)를 발현하는 HEK293T 세포주] 세포에서

사스코로나바이러스2 스파이크 슈도타입바이러스[pseudotyped virus; 사스코로나바이러스2 스파이크 단백질을 murine leukemia retrovirus (MLV) 표면에 발현하고 있는 재조합바이러스]를 이용하여 클로로퀸(chloroquine), 하이드록시클로로퀸(hydroxychloroquine) 및 피로나리딘의 사스코로나바이러스2 진입 억제능을 분석한 결과를 나타내는 도이다(\*\*는  $P < 0.01$ , ns는 통계적 유의성 없음).

도 3은 사스코로나바이러스 서브지놈 레플리콘을 이용하여 램데시비르와 엠셀렌이 바이러스 복제를 억제하는 효과를 분석하고, 엠셀렌의 단백질분해효소 활성 억제제로서의 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다(\*\*는  $P < 0.001$ ).

도 4는 피로나리딘과 엠셀렌(ebselen)의 병용 처리 시 나타나는 세포독성, 바이러스 억제능 및 시너지 효과를 Vero E6 세포에서 분석한 결과를 나타내는 도이다(\*\*는  $P < 0.01$ ).

도 5는 임상 시험 진행중인 피로나리딘과 아르테수네이트(artesunate)의 병용 투여의 효능과 세포 독성을 Vero E6 세포에서 확인한 결과를 나타내는 도이다(ns는 통계적 유의성 없음).

도 6은 사스코로나바이러스2 치료제로써 FDA 승인을 받은 RNA 중합효소 억제제 램데시비르(remdesivir)와 피로나리딘과 엠셀렌 병용 투여의 항바이러스 효능 및 세포 독성을 분석한 결과를 나타내는 도이다(\*는  $P < 0.05$ , ns는 통계적 유의성 없음).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0088] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

### [0090] 실시예

#### [0091] 1. 사스코로나바이러스2에 대한 피로나리딘의 항바이러스 활성 분석

[0092] 사스코로나바이러스2(SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus2)에 대한 피로나리딘(pyronaridine)의 항바이러스 활성을 알아보기 앞서 Vero E6 세포(녹색 원숭이의 신장 세포;  $2.2 \times 10^4$  cells/96-well-plate well)에서 약물에 대한 세포 독성을 측정하였다.

[0093] Vero E6세포에 피로나리딘을 농도별(0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M 및 40  $\mu$ M)로 처리한 후 24 시간 뒤 MTS(tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt])분석을 진행한 결과, 4  $\mu$ M 농도까지는 세포 생존성(cell viability)이 80% 이상 유지되는 것을 확인하였다(도 1a).

[0094] 또한, 사스코로나바이러스2를 감염 다중도(MOI: multiplicity of infection) 0.01로 감염시킨 후 세포 독성이 나타나지 않은 2  $\mu$ M 농도로 처리하여 24시간 뒤 항바이러스 효능을 확인한 결과, 세포 내 바이러스 유전자 카피수가 약  $1 \log_{10}$  감소한 것을 확인하였다(도 1b).

#### [0096] 2. 피로나리딘의 사스코로나바이러스2 억제 기전 분석

[0097] 사스코로나바이러스2 수용체인 hACE2를 발현하고 있는 HEK293T-hACE2 세포주( $2 \times 10^5$  cells/12-well-plate well)에 사스코로나바이러스2 spike-pseudotyped 레트로바이러스를 형질도입(transduction: 트랜스덕션)하기 한 시간 전에 클로로퀸(chloroquine), 하이드록시클로로퀸(hydroxychloroquine) 및 피로나리딘(pyronaridine)을 농도별로(1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M 및 10  $\mu$ M) 처리하였다(도 2a). 그 후, 세포 내로 진입한 바이러스 유전자에 의해 발현되는 루시페레이즈 리포터 활성(luciferase reporter activity)을 정량하는 바이러스 진입 분석 실험을 진행하였다. 구체적으로, 슈도타입바이러스(pseudotyped virus)로 형질도입 후 12시간 뒤 세포를 세척하고, 완전배지에서 추가로 36시간 배양 후 리포터 활성을 측정하였다.

[0098] 그 결과, 3가지 약물 모두 진입 억제 효능이 있다는 것을 확인하였으며, 클로로퀸, 하이드록시클로로퀸보다 피로나리딘의 억제 효과가 약물의 세포 생존성에 큰 영향을 주지 않는 2  $\mu$ M 농도에서 통계적으로 유의성을 보이며, 우수한 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다(도 2b).

[0100] **3. 사스코로나바이러스 서브지노믹 레플리콘을 이용한 비구조단백질 표적 약물의 항바이러스 효능 분석**

[0101] 사스코로나바이러스 서브지노믹 레플리콘을 이용한 비구조단백질 표적 약물의 항바이러스 효능을 사스코로나바이러스 서브지노믹 레플리콘 플라스미드(SARS-CoV subgenomic replicon plasmid, 도 3a)를 이용하여 분석하였다. 상기 레플리콘은 바이러스 구조단백질 코딩 유전자가 결손되어 있어 감염성 바이러스 입자는 형성하지 못하나 복제에 필요한 레플리카이스(replicase) 복합체 단백질 코딩 유전자, 즉 nsp5 3CL 프로테아제(protease: 단백질분해효소)를 포함한 비구조단백질 코딩 유전자를 모두 지니고 있어 복제 억제제 및 nsp5 프로테아제 억제제의 항바이러스 효능을 평가할 수 있다. 구체적으로 Huh7 세포(인간 간암 세포;  $1 \times 10^5$  cells/12-well-plate well)에 사스코로나바이러스 서브지노믹 레플리콘 플라스미드를 형질주입(transfection: 트랜스펙션)한 뒤 바이러스 RNA 중합효소 억제제로 알려진 렘데시비르(remdesivir) 2  $\mu$ M과 nsp5 단백질분해효소 활성을 억제하는 것으로 알려진 엡셀렌(ebselen) 10  $\mu$ M를 세포에 처리하여 24시간 뒤 루시퍼레이즈(luciferase) 활성 에세이를 수행하여 바이러스 복제 억제능을 평가하였다.

[0102] 그 결과, 렘데시비르 및 엡셀렌 모두 표적에 작용해 바이러스 복제를 억제함을 확인할 수 있었다(도 3b).

[0103] 또한, 엡셀렌이 실제로 사스코로나바이러스2 단백질분해효소를 억제하는지 확인하고자 단백질분해효소 활성 분석을 진행하였다. 정제된 nsp5 단백질분해효소와 FRET 기질 펩티드(DABCYL-KTSAVLQSGFRKME-EDANS)를 혼합하고 25℃에서 반응시킨 후 형광측정기(excitation 파장: 340 nm, emission 파장: 535 nm)를 이용해 형광 신호의 세기를 측정하였다.

[0104] 그 결과, 엡셀렌을 처리하지 않은 대조군에서는 시간에 따라 형광 세기가 증가함을 확인하였으나, 엡셀렌을 처리한 군에서는 엡셀렌에 의해 단백질분해효소 활성이 억제되어 형광 세기가 현저히 억제됨을 확인하였다(도 3c).

[0106] **4. 피로나리딘 및 엡셀렌의 병용 처리 효과 분석**

[0107] 단일 바이러스 표적 DAA (direct-acting antiviral agent)는 내성 바이러스 출현이 빠르게 나오게 할 수 있는 문제점을 가지고 있기 때문에, 사스코로나바이러스2를 효과적으로 제어하기 위해서는 다수의 직접 작용 항바이러스제(DAA)를 조합하여 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명에서는 Vero E6 세포( $1 \times 10^5$  cells/12-well-plate well)에 FDA 승인을 받아 안전성이 확보되어 있는 피로나리딘과 엡셀렌을 병행 사용함으로써, 사스코로나바이러스2 진입 억제 및 단백질분해효소 활성을 동시에 억제시켜 항바이러스 효능이 증대되는지 분석하였다. 실험에 앞서 약물의 단독 및 병용 처리에 대한 세포 독성을 평가하였으며, 그 결과, 엡셀렌은 40  $\mu$ M 처리 농도에서 세포에 독성을 보이지 않았으며, 엡셀렌 (2.5  $\mu$ M, 5.0  $\mu$ M, 7.5  $\mu$ M 및 10  $\mu$ M)의 농도와 피로나리딘 (0.5  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M, 1.5  $\mu$ M, 2.0  $\mu$ M 및 2.5  $\mu$ M)의 농도를 조합해 처리하는 경우에도 세포 활성이 80% 이상 유지되는 것을 확인하였다(도 4a 및 도 4b).

[0108] 이와 동일한 병용 처리 조건에서 항바이러스 효능을 분석한 결과, 각 농도 구간(피로나리딘의 농도 구간: 0.5  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M, 1.5  $\mu$ M, 2.0  $\mu$ M 및 2.5  $\mu$ M, 엡셀렌의 농도 구간: 2.5  $\mu$ M, 5.0  $\mu$ M, 7.5  $\mu$ M 및 10  $\mu$ M)에서 세포 내의 바이러스 유전자 카피수가 현저히 감소한다는 것을 확인하였다(도 4c). 이 결과를 바탕으로 Compusyn 프로그램을 이용하여 시너지 효과를 분석한 결과, 피로나리딘 2.5  $\mu$ M 및 엡셀렌 7.5  $\mu$ M 병용 처리 조건에서 최대의 항바이러스 시너지 효과(combination index, CI < 1)가 나타난다는 것을 확인하였다(도 4d).

[0109] 또한, 상기 조건에서 회수한 상등액을 이용하여 감염성 바이러스 타이터(titer)를 플라크(plaque) 형성 에세이로 분석하였다. 그 결과, 피로나리딘 2.5  $\mu$ M 및 엡셀렌 7.5  $\mu$ M를 병용 처리하는 경우에 단독 처리와 대조적으로 플라크 형성을 검출 수준 이하(검출 하한치: 10 PFU/ml)까지 감소시키는 높은 항바이러스 활성을 나타낸다는 것을 확인하였다(도 4e). 또한 웨스턴 블랏 분석 결과, 세포 내 바이러스 캡시드 단백질(N)의 발현이 확연하게 감소한다는 것을 확인하였다(도 4f).

[0110] 이러한 바이러스 캡시드 단백질의 발현 감소 정도는 RNA 복제 효소 억제제인 렘데시비르를 5  $\mu$ M 농도로 처리시 얻어지는 항바이러스 역가와 비슷하며, 이상의 결과는 이들 조합을 경구용 치료제로 사용할 수 있는 가능성을 보여준다.

[0112] **5. 피로나리딘/아르테수네이트 병용 투여 효능 분석**

[0113] 현재 피로나리딘/아르테수네이트(pyronaridine/artesunate)의 사스코로나바이러스2 치료 효과 평가를 위한 병용 투여가 임상 시험 진행 중이다. 본 발명자는 피로나리딘/아르테수네이트(pyronaridine/artesunate)를 Vero E6 세포( $1 \times 10^5$  cells/12-well-plate well)에 병용 투여하여 피로나리딘/엡셀렌(pyronaridine/epselen)과 같은 시너지 효과가 나오는지 평가하였다.

[0114] 그 결과, Vero E6 세포에서 아르테수네이트는 2.5  $\mu$ M, 7.5  $\mu$ M 및 12.5  $\mu$ M 농도의 단독 투여 시 항바이러스 활성을 나타내지 않았으며, 피로나리딘 2.5  $\mu$ M과 병용 투여에서 모두 피로나리딘의 항바이러스 역가를 증대시키는 효능이 없는 것을 확인하였다(도 5A).

[0115] 또한, 상기 약물 농도에 대한 MTS(tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt])분석을 진행하였다. 그 결과, 피로나리딘 2.5  $\mu$ M 처리 시 보이는 세포 생존성에 변화를 주지는 않았으며, 80% 이상 생존성이 유지된다는 것을 확인하였다(도 5b 및 도 5c).

[0116] 상기 피로나리딘 및 엡셀렌의 병용 투여는 바이러스 진입과 nsp5 프로테아제 활성을 억제하여 시너지를 나타냄으로써, 피로나리딘/아르테수네이트 보다 더 높은 항바이러스 효능을 나타낼 수 있음을 보여줌으로써, 피로나리딘과 엡셀렌의 병용 투여가 약물 특이적으로 나타나는 효능임을 보여준다.

[0118] **6. 램데시비르 및 피로나리딘/엡셀렌 병용 투여의 효능 비교 분석**

[0119] 사스코로나바이러스2 RNA 복제효소 표적 치료제로 승인된 주사제 약물인 램데시비르는 사스코로나바이러스2 감염 세포에서 분석 시 높은 항바이러스 효능을 보이고 있다. Vero E6 세포( $1 \times 10^5$  cells/12-well-plate well)에 램데시비르 처리 후, 이와 같은 조건에서 본 발명에서 발견한 높은 항바이러스 효능을 보이는 경구 투여가 가능한 피로나리딘/엡셀렌 복합제를 처리하여 항바이러스 역가를 비교하였다.

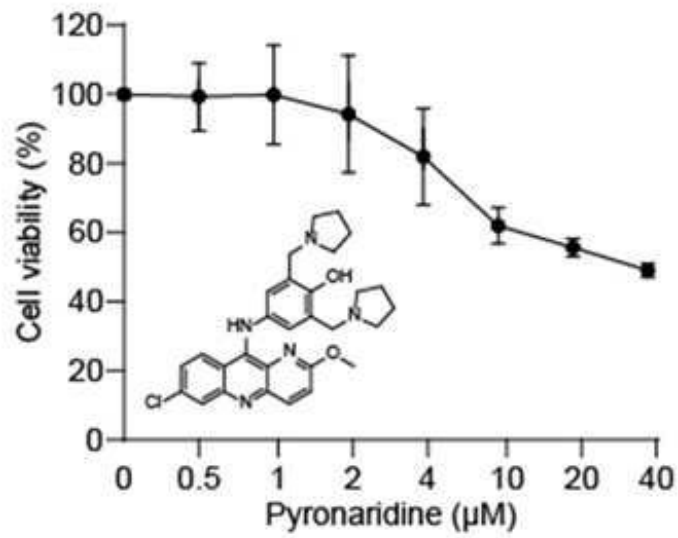
[0120] 약물의 병용 투여에 앞서 램데시비르 단독 투여의 세포 생존성 측정을 진행하였다. 그 결과, 램데시비르 단독 투여의 경우, 세포 활성 감소를 유도하지 않는다는 것을 확인하였다(도 6a).

[0121] 피로나리딘/엡셀렌 복합제와 램데시비르 단독 처리의 항바이러스 효능을 비교한 결과, 피로나리딘과 엡셀렌 병용 투여의 두 가지 비율(피로나리딘 2.5  $\mu$ M 및 엡셀렌 7.5  $\mu$ M, 피로나리딘 2.5  $\mu$ M 및 엡셀렌 10  $\mu$ M)의 병용 투여가 램데시비르 5  $\mu$ M의 항바이러스 효과보다 유의미한 억제 효과를 얻을 수 있음을 세포 내 잔존 바이러스 RNA 카피수를 분석하여 확인하였다(도 6b).

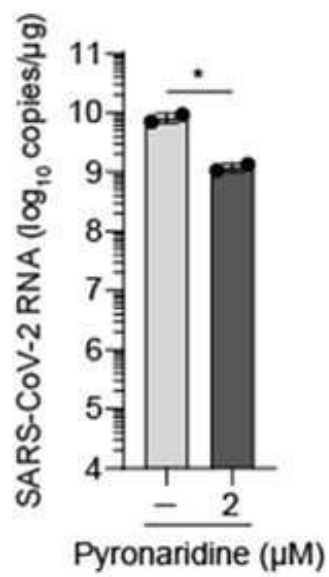
도면

도면1

**A**



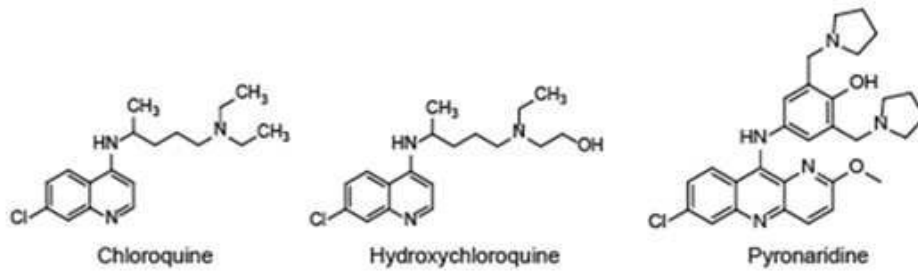
**B**



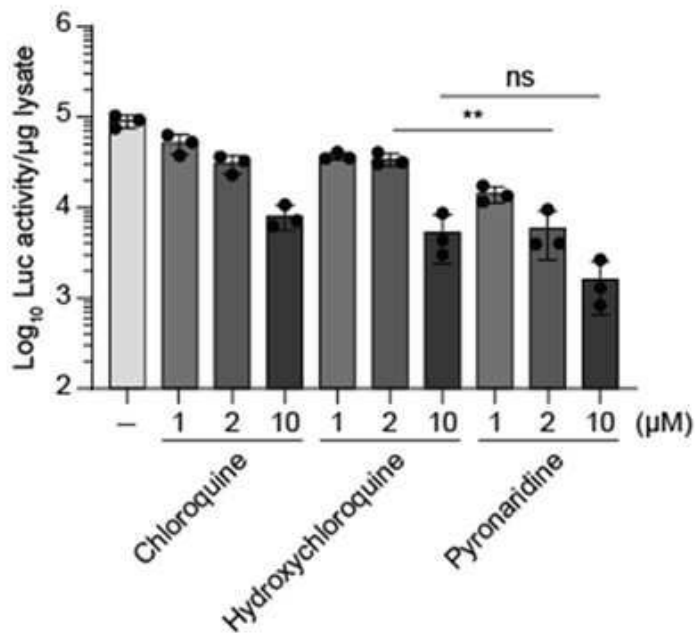


도면2

**A**



**B**

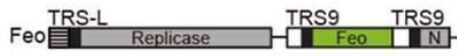




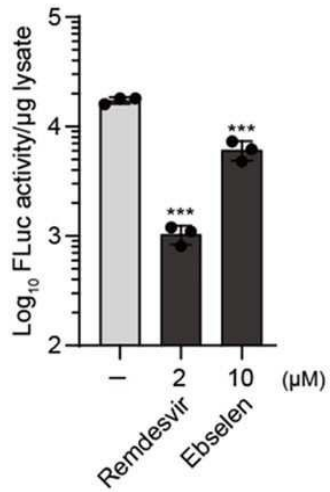
도면3

A

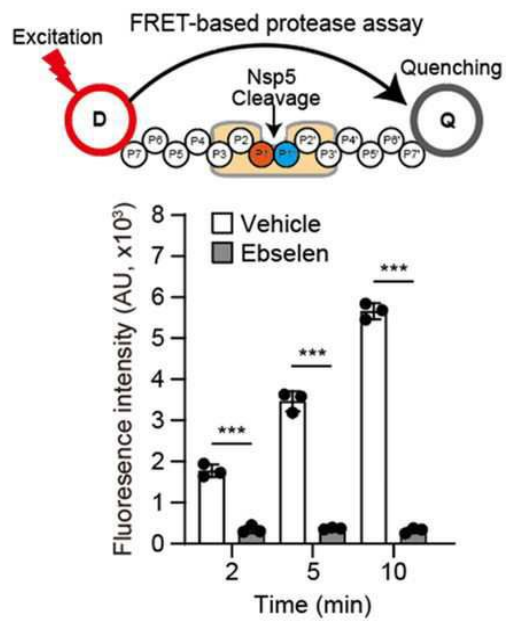
SARS-CoV subgenomic replicon



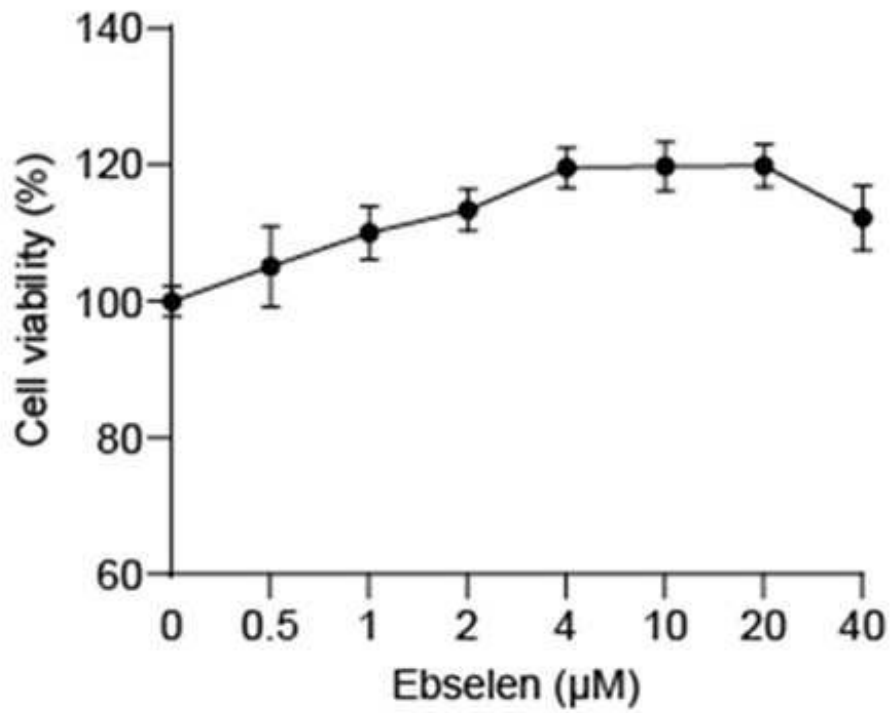
B



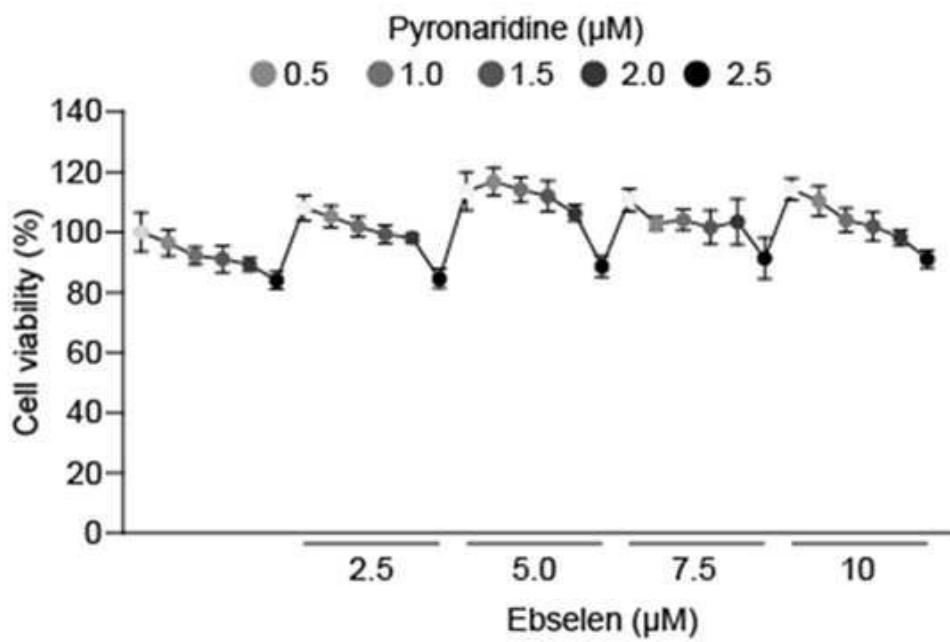
C



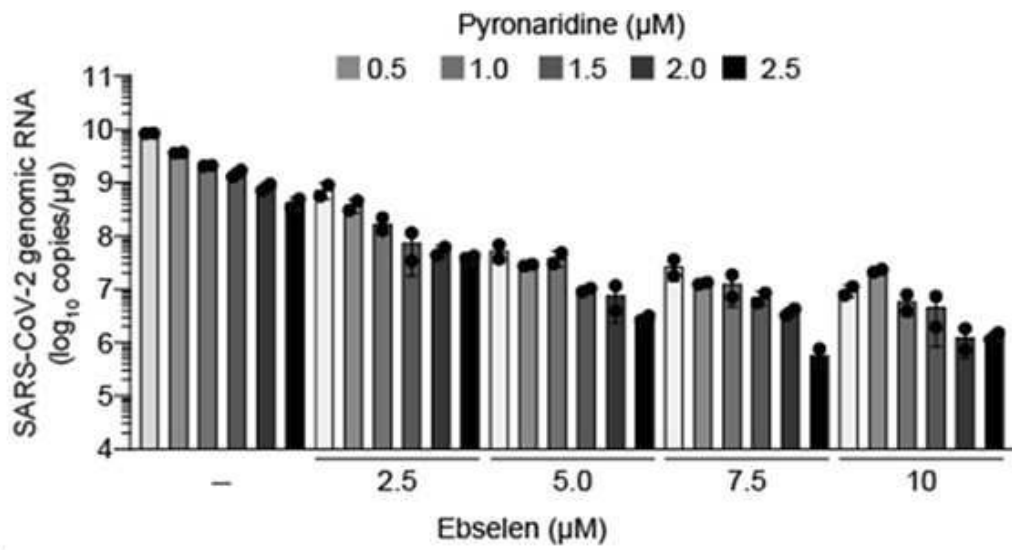
도면4a



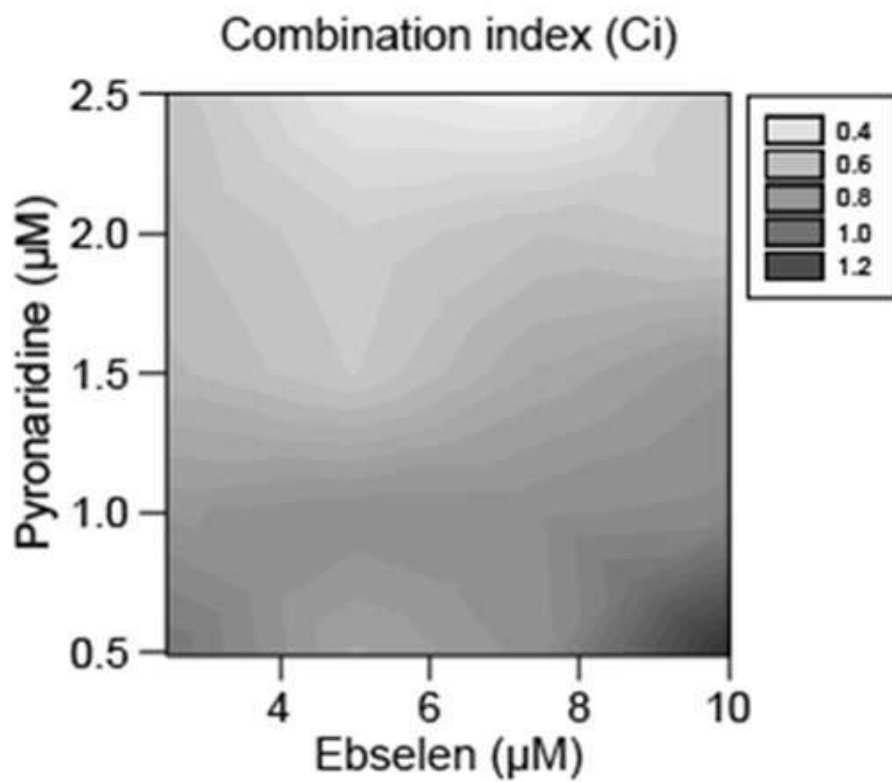
도면4b



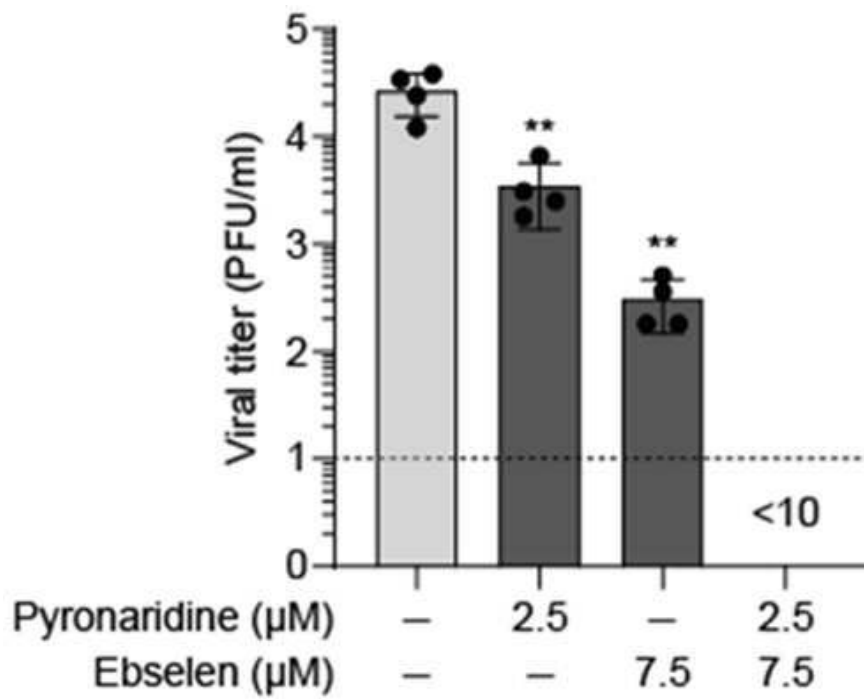
도면4c



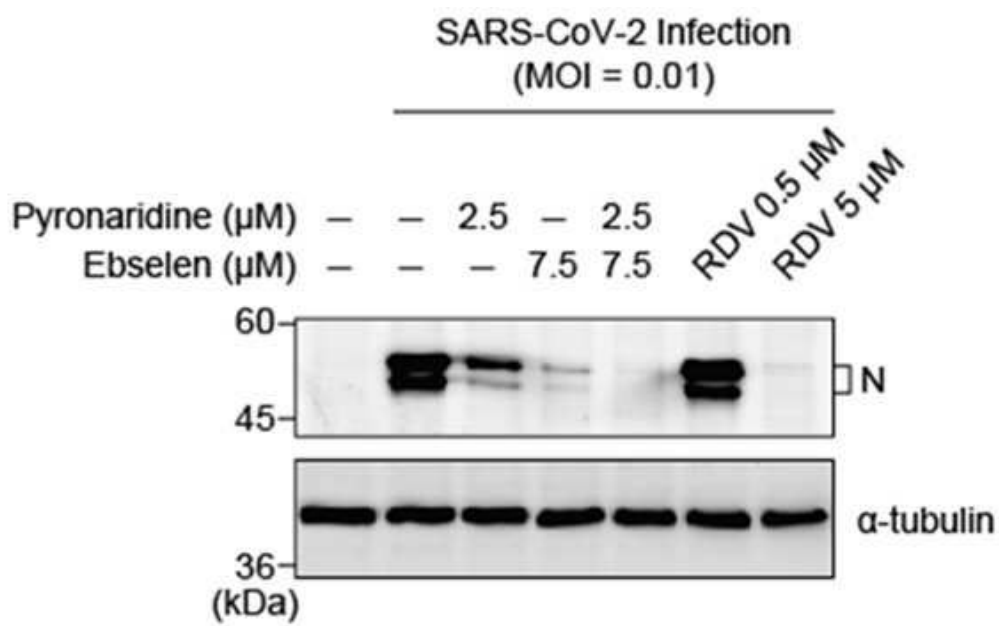
도면4d



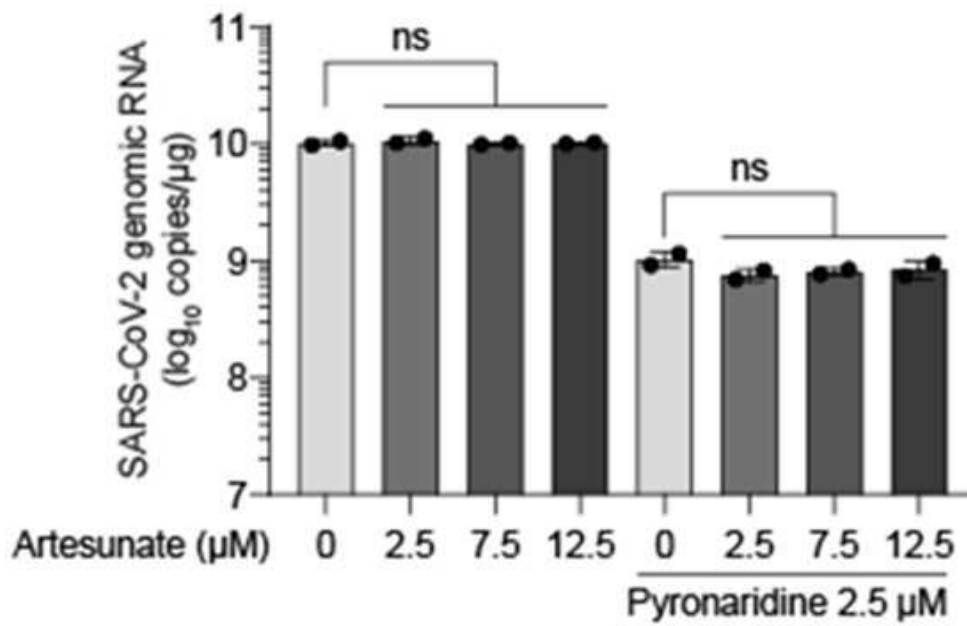
도면4e



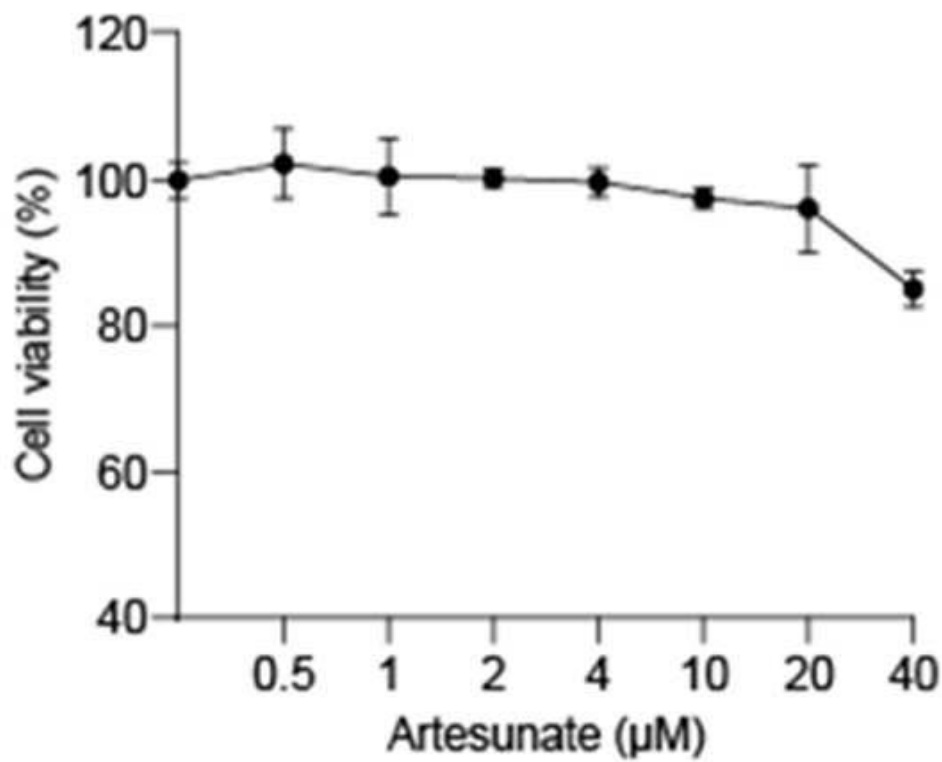
도면4f



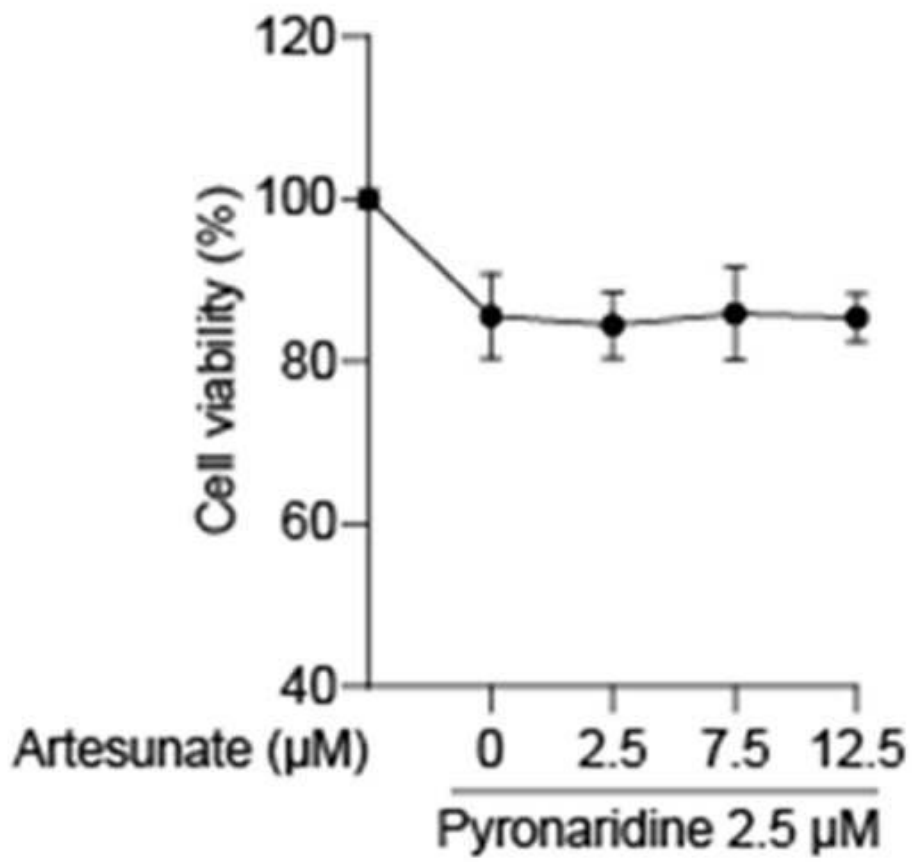
도면5a



도면5b



도면5c



도면6

