



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0134489
(43) 공개일자 2022년10월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 33/42 (2006.01) A23K 20/26 (2016.01)
A23L 29/00 (2016.01) A23L 33/16 (2016.01)
A61P 31/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 33/42 (2013.01)
A23K 20/26 (2016.05)
- (21) 출원번호 10-2022-0105899(분할)
(22) 출원일자 2022년08월24일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-0123355
원출원일자 2020년09월23일
심사청구일자 2020년09월23일
(30) 우선권주장
1020200050184 2020년04월24일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
김홍렬
서울특별시 성동구 매봉길 15, 103동 1005호(옥수동, 래미안옥수리버젠타파트)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
줄로, 마시모
이탈리아 나폴리 279-80131 아미네이 콜리 비알레
- (72) 발명자
정재호
서울특별시 서초구 반포대로 122, 1302호 (서초동, 현대ESA2아파트)
김홍렬
서울특별시 성동구 매봉길 15, 103동 1005호(옥수동, 래미안옥수리버젠타파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
파도특허법인유한회사

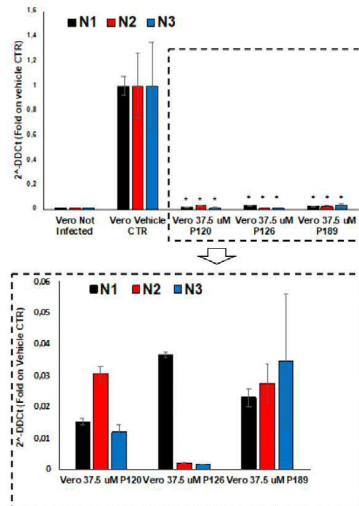
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 폴리포스페이트를 포함하는 코로나바이러스 감염 또는 감염 질환의 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 폴리포스페이트를 이용하여, 이들 화합물의 코로나바이러스 억제 활성을 통해, 코로나바이러스에 의한 감염 또는 상기 감염에 의한 질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A23L 29/015 (2016.08)

A23L 33/16 (2016.08)

A61P 31/14 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/1618 (2013.01)

(72) 발명자

윤경섭

서울특별시 노원구 노원로19길 31 시영4단지목화아
파트 413동 801호

공대영

경기도 오산시 세마문화로 50 e편한세상 122동
2503호

줄로, 마시모

이탈리아 나폴리 279-80131 아미네이 콜리 비알레

페루시, 베로니카

이탈리아 나폴리 포르티시 72 폴리 비아

명세서

청구범위

청구항 1

폴리포스페이트(polyphosphate) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는, 바이러스 감염 또는 감염 질환의 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 폴리포스페이트는 인산염 단위체가 2 이상 200 이하인 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 폴리포스페이트는 인산염 단위체가 100 이상 200 이하인 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 폴리포스페이트는 인산염 단위체가 2 이상 9 이하, 100 이상 125 미만, 125 이상 130 미만 또는 180 이상 190 이하인 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 폴리포스페이트는 인산염 단위체가 8, 120, 126 또는 189인 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 바이러스는 코로나바이러스(coronavirus)인, 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 코로나바이러스는 인간 코로나바이러스 229E(HCoV-229E), 인간 코로나바이러스 OC43(HCoV-OC43), 인간 코로나바이러스 HKU1(HCoV-HKU1), 인간 코로나바이러스 NL63(HCoV-NL63), 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중증 급성 호흡기 증후군-2 바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome virus-2; Sars-CoV-2), 중등 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 돼지 전염성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus; PEDV), 전염성 위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV), 돼지 혈구 응집성뇌척수염 바이러스(porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus; PHEV), 우 코로나바이러스(bovine coronavirus; BCoV), 말 코로나바이러스(equine coronavirus; EqCoV), 쥐 코로나바이러스(murine coronavirus; MuCoV), 개코로나바이러스(canine coronavirus; CCoV), 고양이 코로나바이러스 (feline coronavirus; FCoV), 박쥐 코로나바이러스-1(Miniopterus bat coronavirus1), 박쥐 코로나바이러스 HKU8(Miniopterus bat coronavirus HKU8), 박쥐 코로나바이러스 HKU2(Rhinolophus bat coronavirus HKU2), 박쥐 코로나바이러스 512(Scotophilus bat coronavirus 512), 박쥐 코로나바이러스 HKU4(Tylonycteris bat coronavirus HKU4), 박쥐 코로나바이러스 HKU5(Pipistrellus bat coronavirus HKU5), 박쥐 코로나바이러스 HKU9(Rousettus bat coronavirus HKU9), 새 코로나바이러스(Avian coronavirus), 흰색 돌고래 코로나바이러스 SW1(Beluga whale coronavirus SW1), 제주직박구리 코로나바이러스 HKU11(Bulbul coronavirus HKU11), 개똥지빠귀 코로나바이러스 HKU12(Thrush coronavirus HKU12) 및 긴바라 코로나바이러스 HKU13(Munia coronavirus HKU13)로 이루어진

군에서 선택된 1종 이상인, 약학적 조성물.

청구항 8

폴리포스페이트(polyphosphate) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 바이러스 감염 또는 감염 질환의 개선용 식품 또는 식품 첨가제 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 바이러스는 코로나바이러스(coronavirus)인, 식품 또는 식품 첨가제 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 코로나바이러스는 인간 코로나바이러스 229E(HCoV-229E), 인간 코로나바이러스 OC43(HCoV-OC43), 인간 코로나바이러스 HKU1(HCoV-HKU1), 인간 코로나바이러스 NL63(HCoV-NL63), 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중증 급성 호흡기 증후군-2 바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome virus-2; Sars-CoV-2), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 돼지 전염성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus; PEDV), 전염성 위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV), 돼지 혈구 응집성뇌척수염 바이러스(porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus; PHEV), 우 코로나바이러스(bovine coronavirus; BCoV), 말 코로나바이러스(equine coronavirus; EqCoV), 쥐 코로나바이러스(murine coronavirus; MuCoV), 개코로나바이러스(canine coronavirus; CCoV), 고양이 코로나바이러스 (feline coronavirus; FCoV), 박쥐 코로나바이러스-1(Miniopterus bat coronavirus1), 박쥐 코로나바이러스 HKU8(Miniopterus bat coronavirus HKU8), 박쥐 코로나바이러스 HKU2(Rhinolophus bat coronavirus HKU2), 박쥐 코로나바이러스 512(Scotophilus bat coronavirus 512), 박쥐 코로나바이러스 HKU4(Tylonycteris bat coronavirus HKU4), 박쥐 코로나바이러스 HKU5(Pipistrellus bat coronavirus HKU5), 박쥐 코로나바이러스 HKU9(Rousettus bat coronavirus HKU9), 새 코로나바이러스(Avian coronavirus), 흰색 돌고래 코로나바이러스 SW1(Beluga whale coronavirus SW1), 제주직박구리 코로나바이러스 HKU11(Bulbul coronavirus HKU11), 개똥지빠귀 코로나바이러스 HKU12(Thrush coronavirus HKU12) 및 긴바라 코로나바이러스 HKU13(Munia coronavirus HKU13)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 식품 또는 식품 첨가제 조성물.

청구항 11

폴리포스페이트(polyphosphate) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 바이러스 감염 또는 감염 질환의 개선용 사료 또는 사료 첨가제 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 바이러스는 코로나바이러스(coronavirus)인, 사료 또는 사료 첨가제 조성물.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 코로나바이러스는 인간 코로나바이러스 229E(HCoV-229E), 인간 코로나바이러스 OC43(HCoV-OC43), 인간 코로나바이러스 HKU1(HCoV-HKU1), 인간 코로나바이러스 NL63(HCoV-NL63), 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중증 급성 호흡기 증후군-2 바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome virus-2; Sars-CoV-2), 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 돼지 전염성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus; PEDV), 전염성 위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV), 돼지 혈구 응집성뇌척수염 바이러스(porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus; PHEV), 우 코로나바이러스(bovine coronavirus; BCoV), 말 코로나바이러스(equine coronavirus; EqCoV), 쥐 코로나바이러스(murine coronavirus; MuCoV), 개코로나바이러스(canine coronavirus; CCoV), 고양이 코로나바이러스 (feline coronavirus; FCoV), 박쥐 코로나바이러스-1(Miniopterus bat coronavirus1), 박쥐 코로나바이러스 HKU8(Miniopterus bat

coronavirus HKU8), 박쥐 코로나바이러스 HKU2(Rhinolophus bat coronavirus HKU2), 박쥐 코로나바이러스 512(Scotophilus bat coronavirus 512), 박쥐 코로나바이러스 HKU4(Tylonycteris bat coronavirus HKU4), 박쥐 코로나바이러스 HKU5(Pipistrellus bat coronavirus HKU5), 박쥐 코로나바이러스 HKU9(Rousettus bat coronavirus HKU9), 새 코로나바이러스(Avian coronavirus), 흰색 돌고래 코로나바이러스 SW1(Beluga whale coronavirus SW1), 제주직박구리 코로나바이러스 HKU11(Bulbul coronavirus HKU11), 개똥지빠귀 코로나바이러스 HKU12(Thrush coronavirus HKU12) 및 긴바라 코로나바이러스 HKU13(Munia coronavirus HKU13)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 사료 또는 사료 첨가제 조성물.

청구항 14

인간을 제외한 개체에게 폴리포스페이트; 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는, 바이러스 감염 또는 감염 질환의 치료 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 바이러스는 코로나바이러스(coronavirus)인, 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 코로나바이러스는 인간 코로나바이러스 229E(HCoV-229E), 인간 코로나바이러스 OC43(HCoV-OC43), 인간 코로나바이러스 HKU1(HCoV-HKU1), 인간 코로나바이러스 NL63(HCoV-NL63), 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 중증 급성 호흡기 증후군-2 바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome virus-2; Sars-CoV-2), 중등 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 돼지 전염성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus; PEDV), 전염성 위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV), 돼지 혈구 응집성뇌척수염 바이러스(porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus; PHEV), 우 코로나바이러스(bovine coronavirus; BCoV), 말 코로나바이러스(equine coronavirus; EqCoV), 쥐 코로나바이러스(murine coronavirus; MuCoV), 개코로나바이러스(canine coronavirus; CCoV), 고양이 코로나바이러스 (feline coronavirus; FCoV), 박쥐 코로나바이러스-1(Miniopterus bat coronavirus1), 박쥐 코로나바이러스 HKU8(Miniopterus bat coronavirus HKU8), 박쥐 코로나바이러스 HKU2(Rhinolophus bat coronavirus HKU2), 박쥐 코로나바이러스 512(Scotophilus bat coronavirus 512), 박쥐 코로나바이러스 HKU4(Tylonycteris bat coronavirus HKU4), 박쥐 코로나바이러스 HKU5(Pipistrellus bat coronavirus HKU5), 박쥐 코로나바이러스 HKU9(Rousettus bat coronavirus HKU9), 새 코로나바이러스(Avian coronavirus), 흰색 돌고래 코로나바이러스 SW1(Beluga whale coronavirus SW1), 제주직박구리 코로나바이러스 HKU11(Bulbul coronavirus HKU11), 개똥지빠귀 코로나바이러스 HKU12(Thrush coronavirus HKU12) 및 긴바라 코로나바이러스 HKU13(Munia coronavirus HKU13)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 코로나바이러스 감염 또는 상기 감염에 의한 질환을 효과적으로 치료할 수 있는 다양한 용도의 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

코로나바이러스는 현대 문명에서 치명적인 감염병을 일으키는 대표적인 바이러스로 2003년 4월에는 중증급성호흡기증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS), 일명 사스가 유행해 사망률 9.6%를 기록하며 많은 사람이 사망했으며, 2015년에는 중등 호흡기 증후군(Middle East Respiratory Syndrome; MERS), 일명 메르스가 중동에서 전 세계로 퍼지면서 사망률 약 36%로써 사망자가 다수 발생한 바 있다. 또한, 코로나바이러스감염증-19(Coronavirus disease 19; COVID-19)는 2019년 12월 처음 발생하여 전세계로 확산된 새로운 유형의 코로나바이러스인 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; Sars-CoV-2)에 의한 호흡기 감염질환이다. 코로나바이러스감염증-19는 감염자의 비말(침방울)이 호흡기나 눈·코·입

의 점막으로 침투될 때 전염된다. 감염되면 약 2~14일(추정)의 잠복기를 거친 뒤 발열(37.5도) 및 기침이나 호흡곤란 등 호흡기 증상, 폐렴이 주증상으로 나타나고 치사율도 2020년 3월까지 집계된 자료에 따르면 5.6%에 달한다.

[0003] 신변종 바이러스의 유행은 인류에게 크나큰 문제를 야기하고 있으나, 지금까지 코로나바이러스에 대한 치료제 개발이 추진되고 있음에도, 마땅한 치료를 위한 조성물은 완성되지 않은 상황이다. 따라서 코로나바이러스 감염 또는 감염 질환을 효과적으로 치료할 수 있는 조성물이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 일 목적은 코로나바이러스에 의한 감염 또는 상기 감염에 의해 유발된 다양한 질환을 개선 또는 치료할 수 있는 다양한 용도의 조성물을 제공하자 한다.

[0005] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0007] 본 발명 내 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0009] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 폴리포스페이트(polyphosphate) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는, 바이러스 감염 또는 감염 질환의 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 개체에게 상기 폴리포스페이트(polyphosphate) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는, 바이러스 감염 또는 감염 질환의 개선 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0011] 본 발명의 상기 "폴리포스페이트(polyphosphate; PolyP)"는 인산염 무수물 결합에 의해 연결된 정인산염(오르토포스페이트, orthophosphate)의 선형 중합체이다. 포유류 세포의 리소솜, 조밀과립, 미토콘드리아 및 핵에 국한되어 있다. 생리적 pH에서, 각각의 내부 단위는 1가 음전하를 가지며, 따라서 중합체는 높은 음이온성(anion)이다. 상기 음이온성은 폴리포스페이트가 XII 인자(factor XII)의 생리학적 음이온 표면을 제공할 수 있다는 발견으로 이어졌고, 특히 프리칼리크레인(prekallikrein) 및 고분자 키니노겐(HMW kininogen) 등의 응고 캐스케이드의 활성화를 통해 트롬빈 매개 활성화를 가속화시켜 응고를 유발하고 피브린 중합을 향상시키는 것으로 밝혀졌다.

[0012] 본 발명에서, 상기 폴리포스페이트는 인산염 단위체(phosphate unit)가 2 이상 200 이하인 것일 수 있고, 바람직하게는 2 이상 9 이하, 또는 100 이상 200 이하인 것일 수 있고, 보다 바람직하게는 100 이상 125 미만, 125 이상 130 미만, 130 이상 140 미만, 140 이상 150 이하, 160 이상 170 이하 또는 180 이상 190 이하인 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 8, 120, 126, 137, 145, 162 또는 189일 수 있고, 가장 바람직하게는 8, 120, 126 또는 189일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0013] 본 발명에서, 상기 폴리포스페이트는 상기 조성물 내에 5 μ M 이상 100 μ M 이하의 농도로 포함될 수 있고, 바람직하게는 10 μ M 이상 50 μ M 이하의 농도로 포함될 수 있다. 상기 폴리포스페이트의 농도가 5 μ M 미만인 경우 상기 폴리포스페이트의 첨가 효과가 미미할 수 있고, 상기 농도가 100 μ M을 초과하는 경우 첨가에 따른 더 이상의

상승 효과를 기대하기 어려워 첨가의 효율성이 저하될 수 있다.

[0014] 본 발명에서 상기 약학적으로 허용되는 염은, 의학적 적용에 적합한 것으로 당업자에 의해 일반적으로 간주되는 염(예를 들어 이러한 염이 상기 염으로 치료될 수 있는 대상체에게 유해하지 않기 때문임), 또는 각각의 치료 내에서 허용 가능한 부작용을 야기하는 염이다. 일반적으로, 상기 약학적으로 허용되는 염은 미국 식품 의약국(FDA), 유럽 의약청(EMA), 또는 일본 후생성의 의약품 의료기기 종합기구(PMDA)와 같은 규제 당국에 의해 허용되는 것으로 간주되는 염이다. 그러나, 본 발명은 원칙적으로, 예를 들어 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체의 제조에서의 중간체, 또는 본 발명에 따른 화합물의 약학적으로 허용되는 염 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체의 제조에서의 중간체로서, 그 자체로는 약학적으로 허용되지 않는 본 발명에 따른 화합물의 염을 또한 포함한다. 상기 염은 수불용성 염을 포함하고, 특히, 수용성 염을 포함한다.

[0015] 각각의 경우에, 당업자는 본 발명에 따른 특정 화합물 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체가 염을 형성할 수 있는지 여부, 즉, 상기 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체가, 예를 들어 아미노기, 카복실산기 등과 같은 전하를 띌 수 있는기를 가지는지 여부를 쉽게 결정할 수 있다.

[0016] 본 발명의 화합물의 예시적인 염은 산 부가 염 또는 염기와의 염, 특히 약학적으로 허용되는 무기산 및 유기산 부가 염 및 약학에서 통상적으로 사용되는 염기와의 염이며, 이는 수불용성 또는 특히 수용성 산 부가 염이다. 본 발명의 화합물의 치환기에 따라 염기와의 염이 또한 적합할 수 있다. 산 부가 염은, 예를 들어, 본 발명의 화합물의 용액을 염산, 황산, 푸마르산, 말레산, 석신산, 아세트산, 벤조산, 시트르산, 타르타르산, 탄산 또는 인산과 같은 약학적으로 허용되는 산의 용액과 혼합함으로써 형성될 수 있다. 마찬가지로, 약학적으로 허용되는 염기 부가 염은 알칼리 금속염(예를 들어, 나트륨 또는 칼륨 염); 알칼리 토금속 염(예를 들어, 칼슘 또는 마그네슘 염); 및 적합한 유기 리간드로 형성된 염(예를 들어, 할라이드, 하이드록사이드, 카복실레이트, 설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 알킬 설포네이트 및 아릴 설포네이트와 같은 반대 음이온을 사용하여 형성된 암모늄, 4차 암모늄 및 아민 양이온)을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 염의 예시적인 예로는 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아르기네이트, 아스코르베이트, 아스파테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이카르보네이트, 바이설페이트, 바이타르트레이트, 보레이트, 브로마이드, 부티레이트, 칼슘 에데테이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 캄실레이트, 카르보네이트, 클로라이드, 시트레이트, 디글루코네이트, 디하이드로클로라이드, 도데실설페이트, 에데테이트, 에디설페이트, 에탄설포네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 갈락테이트, 갈락투로네이트, 글루코네이트, 글루타메이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 헥실레스르시네이트, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 하이드록시나프토에이트, 요오다이드, 이소부티레이트, 이소티오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설페이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트), 메틸설페이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 판토테네이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트/디포스페이트, 프탈레이트, 피크레이트, 피발레이트, 폴리갈락투로네이트, 프로피오네이트, 살리실레이트, 스테아레이트, 설페이트, 수베레이트, 석시네이트, 탄네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 운데카노에이트, 발레레이트 등이 포함되지만 이로 한정되지 않는다(예를 들어, 문헌[S. M. Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 66, pp. 1-19 (1977)] 참조).

[0017] 본 발명에서 약학적으로 허용되지 않으며, 예를 들어, 산업적 규모로 본 발명에 따른 화합물을 제조하는 동안 공정 생성물로서 수득될 수 있는 염이 또한 본 발명에 포함되고, 요망되는 경우, 이는 당업자에게 알려진 방법에 의해 약학적으로 허용되는 염으로 전환될 수 있다.

[0018] 본 발명에서 상기 바이러스는 RNA 바이러스일 수 있다. 본 발명에서, 상기 "RNA 바이러스"는 RNA를 유전물질로 사용하는 모든 바이러스를 의미한다. 예를 들어, 상기 RNA 바이러스는 코로나비리대(Coronaviridae), 아말가비리대(Amalgaviridae), 비르나비리대(Birnaviridae), 크리소비리대(Chrysoviridae), 시스토비리대(Cystoviridae), 엔도르나비리대(Endornaviridae), 하이포비리대(Hypoviridae), 메가비르나비리대(Megabirnaviridae), 파르티티비리대(Parfitiviridae), 피코비르나비리대(Picobirnaviridae), 레오비리대(Reoviridae), 토티비리대(Totiviridae), 콰드리비리대(Quadriviridae), 아르테리비리대(Arteriviridae), 메소니비리대(Mesoniviridae), 로니비리대(Roniviridae), 디시스트로비리대(Dicistroviridae), 이플라비리대(Iflaviridae), 마르나비리대(Marnaviridae), 피코르나비리대(Picornaviridae), 세코비리대(Secoviridae), 알파플렉시비리대(Alphaflexiviridae), 베타플렉시비리대(Betaflexiviridae), 감마플렉시비리대(Gammaplexiviridae), 티모비리대(Tymoviridae), 보르나비리대(Bornaviridae), 필로비리대(Filoviridae), 파라믹소비리대(Paramyxoviridae), 랍도비리대(Rhabdoviridae), 니아미비리대(Niamiviridae)

(Nyamiviridae), 칼리시비리대 (Caliciviridae), 플라비비리대 (Flaviviridae), 루테오비리대 (Luteoviridae), 토가비리대 (Togaviridae), 뉴모바라대 (Pneumoviridae), 아레나비리대 (Arenaviridae), 델타비리대 (Deltavirus), 또는 오르토믹스비리대 (Orthomyxoviridae) 바이러스일 수 있으나, 바람직하게는 코로나비리대일 수 있으며, 보다 바람직하게는 코로나비리대에 속하는 코로나바이러스일 수 있다.

[0019] 본 발명에서 상기 "코로나바이러스(Coronavirus)"는 코로나비리대(Coronaviridae)의 코로나바이러스아과(Coronavirinae)에 4개의 속(알파, 베타, 감마, 델타)이 있으며, 유전자 크기 27 내지 32kb의 RNA 바이러스로 사람과 동물의 호흡기와 소화기계 감염을 유발하는 것으로 알려져 있다. 주로 점막 전염, 비말 전파로 쉽게 감염되며, 사람은 일반적으로 경미한 호흡기 감염을 일으키지만 드물게 치명적인 감염을 일으키기도 하며, 소와 돼지는 설사, 닭은 호흡기 질환이 발생하기도 한다. 코로나바이러스 중에서 사람을 숙주로 하는 코로나바이러스는 하기 표 1의 분류로 나뉜다(질병관리본부, 2020). 4개의 속 중에서 알파와 베타는 사람과 동물에게 감염이 되며, 감마와 델타는 동물에게만 감염되는 것으로 보고되고 있다.

표 1

속(genus)	사람-코로나바이러스	사람 외 감염 코로나바이러스
알파 코로나바이러스	229E, NL63	돼지 유행성 설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus; PEDV), (돼지)전염성 위장염 바이러스(transmissible gastroenteritis virus; TGEV), 개코로나바이러스(canine coronavirus; CCoV), 고양이 코로나바이러스(feline coronavirus; FCoV), Miniopterus bat(박쥐) coronavirus HKU8, Rhinolophus bat(박쥐) coronavirus HKU2, Scotophilus bat(박쥐) coronavirus 512
베타 코로나바이러스	OC43, HKU1, SARS-CoV, SARS-CoV2, MERS-CoV	돼지 혈구 응집성뇌척수염 바이러스(porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus; PHEV), 우코로나바이러스(bovine coronavirus; BCoV), 말코로나바이러스(equine coronavirus; EqCoV), 쥐코로나바이러스(murine coronavirus; MuCoV), Tylonycteris bat(박쥐) coronavirus HKU4, Pipistrellus bat(박쥐) coronavirus HKU5, Rousettus bat(박쥐) coronavirus HKU9
감마 코로나바이러스	-	새코로나바이러스(Avian coronavirus), 흰색 돌고래(Beluga whale)-코로나바이러스 SW1
델타 코로나바이러스	-	제주직박구리(Bulbul)-코로나바이러스 HKU11, 개똥지빠귀(Thrush)-코로나바이러스 HKU12, 긴바라(Munia)-코로나바이러스 HKU13

[0023] 특히, 현재 사람에 감염력이 있는 코로나바이러스로는 하기 표 2의 7종이 존재하며, 감기를 일으키는 유형(229E, OC43, NL63, HKU1)과 중증 폐렴을 일으키는 유형(SARS-CoV, SARS-CoV2, MERS-CoV)으로 나뉜다.

표 2

바이러스명	속(Genus)	숙주(host)	증상
HCoV-229E	Alpha	Human	가벼운 호흡기 증상
HCoV-NL63	Alpha	Human	가벼운 호흡기 증상
SARS-CoV	Beta	Human	심각한 호흡기 증상
MERS-CoV	Beta	Human	심각한 호흡기 증상
HCoV-OC43	Beta	Human	가벼운 호흡기 증상
HCoV-HKU1	Beta	Human	폐렴 증상
Sars-CoV-2	Beta	Human	가벼운 호흡기 증상 심한 경우 호흡곤란 유발

- [0027] 본 발명에서 상기 "베타 코로나바이러스(Beta coronavirus)"는 코로나바이러스과의 네 속의 코로나바이러스 중 하나로 인수공통 감염증에 해당한다. 베타 코로나바이러스의 예로는 중증 급성 호흡기 증후군 바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome virus; SARS; SARS-CoV), 중증 급성 호흡기 증후군-2 바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome virus-2; Sars-CoV-2), 중등 호흡기 증후군 바이러스(Middle East Respiratory Syndrome virus; MERS; MERS-CoV), 인간 코로나바이러스 OC43(HCoV-OC43) 또는 인간 코로나바이러스 HKU1(HCoV-HKU1) 등이 존재하는 것으로 알려져 있다.
- [0028] 본 발명에서 상기 "중증 급성 호흡기 증후군-2 바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome virus-2; SARS-CoV-2)"는 코로나비리대 패밀리에 속하는 외피로 둘러싸인, 양성-극성 외가닥 RNA 베타 코로나바이러스에 해당한다. 역사적으로 인간을 감염시키는 코로나바이러스는 중증 공통의 감기 바이러스로, hCoV-OC43, HKU 및 229E5 등을 포함한다. SARS-CoV-2 분리체의 서열을 분석하면, 30-kb 게놈은 14개의 오픈 리딩 프레임(open-reading frames; ORFs)을 코딩하는 것으로 알려져 있고, 바이러스 게놈의 3' 말단에서 13개의 ORF는 9개의 예측되는 서브-게놈 RNA로부터 발현되며, 이들은 4개의 구조 단백질인, 스파이크(spike; S), 외피(envelope; E), 막(membrane; M) 및 뉴클레오캡시드(nucleocapsid; N)와, 9개의 추정적 부가 요소로부터 발현된다. 여기서, 상기 뉴클레오캡시드 단백질은 N1, N2 및 N3 절편을 포함한다.
- [0029] 본 발명에서, 상기 코로나바이러스는 자연적으로 또는 인공적으로 돌연변이가 발생한 변이체를 포함한다.
- [0030] 본 발명에서 상기 코로나바이러스에 의한 감염 질환은 코로나바이러스성 장염, 코로나바이러스성 설사, 중증 급성 호흡기 증후군(severe acute respiratory syndrome coronavirus; SARS), 중등 호흡기 증후군(Middle East respiratory syndrome; MERS), 또는 이들의 조합일 수 있으나, 상기 코로나바이러스 감염에 의해 유발될 수 있는 질환이라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 상기 "개체"란 바이러스 감염 증상이 있거나 의심되어, 바이러스 활성을 억제하는 등으로 바이러스 감염 또는 상기 감염에 기인하여 유발된 질환을 개선 또는 치료가 필요한 대상체로, 상기 바이러스에 이미 감염되었거나 감염될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물, 식품 조성물, 식품 첨가제 조성물, 사료 조성물 또는 사료 첨가제 조성물의 용도로 사용될 수 있으나, 특별히 제한되지는 않는다.
- [0033] 본 발명에서 "치료" 및 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 바이러스의 감염 또는 증식을 억제하여 바이러스 감염증을 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 폴리포스페이트 또는 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 운할제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0036] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 운할제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 화합물 또는 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 장관, 국소, 설하 또는 직장 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.

- [0038] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 화합물 또는 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 성식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다. 또한 상기 식품 조성물의 제조에 필요한 식품 첨가제 조성물로도 이용될 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 유효 성분으로 포함되는 상기 폴리포스페이트가 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있다. 여기서, 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다.
- [0042] 그 외 본 발명의 식품 조성물 또는 식품 조성물 첨가제는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0043] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0044] 본 발명의 상기 폴리포스페이트가 사료 조성물 또는 사료 첨가제 조성물에 함유되어 이용될 경우, 상기 조성물은 20 내지 90% 고농축액이거나 분말 또는 과립형태로 제조될 수 있다. 상기 사료 첨가제는 구연산, 후발산, 아디픽산, 젖산, 사과산 등의 유기산이나 인산나트륨, 인산칼륨, 산성 피로인산염 등의 인산염이나, 폴리페놀, 카테킨, 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물, 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등의 천연 항산화제 중 어느 하나 또는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서, 상기 폴리포스페이트가 사료로 이용될 경우, 상기 조성물은 통상의 사료 형태로 제제화될 수 있으며, 통상의 사료 성분을 함께 포함할 수 있다. 상기 사료 첨가제 및 사료는 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 콩 및 해바라기를 주성분으로 하는 사료; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조 성분 등을 더 포함할 수 있으며, 이외에도 영양 보충제, 소화 및 흡수 향상제, 성장 촉진제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명에서, 상기 폴리포스페이트가 상기 사료 첨가제로 사용될 경우에는 동물에게 단독으로 투여하거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합하여 투여할 수도 있다. 또한, 상기 사료 첨가제는 탑 드레싱으로서 또는 이들을 동물 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도의 경구 제형으로 용이하게 동물에게 투여할 수 있다. 상기 사료 첨가제를 동물 사료와 별도로 투여할 경우, 당해 기술분야에 잘 알려진 바와 같이 약제학적으로 허용 가능한 식용 담체와 조합하여, 즉시 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 고체 또는 액체, 예를 들어 옥수수 전분, 락토오스, 수크로오스, 콩 플레이크, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 및 프로펠렌글리콜일 수 있다. 고체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 정제, 캡슐제, 산제, 트로키제 또는 함당정제 또는 미분산성 형태의 탑 드레싱일 수 있다. 액체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 젤라틴 연질 캡슐제, 또는 시럽제나 현탁액, 에멀전제, 또는 용액제의 제형일 수 있다. 상기 사료는 동물의 식이 욕구를 충족시키는데 통상적으로 사용되는 임의의 단백질-함유 유기 곡분을 포함할 수 있다. 이러한 단백질-함유 곡분은 통상적으로

옥수수, 콩 곡분, 또는 옥수수/콩 곡분 믹스로 구성되어 있다. 또한 사료 조성물 또는 사료 첨가제 조성물은 예를 들어 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액 촉진제 등을 함유할 수 있다. 또한 사료 첨가제 조성물은 침지, 분무 또는 혼합하여 동물의 사료에 첨가하여 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0047]

본 발명에서 제공하는 조성물은 코로나바이러스 억제 활성을 가져, 코로나바이러스에 의한 감염 또는 상기 감염에 의한 질환을 효과적으로 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0048]

도 1은 준비예 1에서 본 발명의 일실시예에 따른 폴리포스페이트의 화학식을 나타낸 것이다.

도 2는 준비예 2에서 건강한 사람의 비강으로부터 수득한 일차 세포를 현미경으로 확대하여 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 3은 실험예 1에서 폴리포스페이트의 처리시 독성을 나타내는 농도를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 실험예 2에서 폴리포스페이트의 처리 농도 별 코로나바이러스의 감염 억제 효과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 실험예 3에서 단위체 120의 폴리포스페이트를 처리한 경우 코로나바이러스의 억제 효과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 6은 실험예 4에서 단위체 8의 폴리포스페이트를 처리한 경우 코로나바이러스의 억제 효과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 7은 실험예 5에서 폴리포스페이트 단위체에 따른 N1, N2 및 N3 유전자의 억제 능력을 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 8은 실험예 5에서 폴리포스페이트의 ACE2, Cov2-N1, 외피 단백질 유전자, RdRp, 스파이크 유전자, 서브 게놈 N 및 서브 게놈 S 전사체 억제 능력을 그래프로 나타낸 것이다.

도 9는 실험예 5에서 폴리포스페이트의 ACE2 및 N 단백질 억제 능력을 면역 블로팅 분석(Immunoblotting analyses)을 통해 확인한 것이다.

도 10은 실험예 5에서 폴리포스페이트의 ACE2 외피 단백질 및 N 단백질 억제 능력을 면역 형광 분석(immunofluorescence; IF)을 통해 확인한 것이다.

도 11은 실험예 5에서 폴리포스페이트의 ACE2 외피 단백질 및 N 단백질 억제 능력을 면역 형광 분석(immunofluorescence; IF) 및 정량을 통해 확인한 것이다.

도 12는 실험예 5에서 감염된 배로 세포에 폴리포스페이트를 처리한 경우 N1, N2 및 N3 유전자의 억제 능력을 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 13은 실험예 5에서 감염된 배로 세포에 폴리포스페이트를 처리한 경우 sgM, sgE, sgN 및 sgS 억제 능력을 그래프로 나타낸 것이다.

도 14는 실험예 5에서 폴리포스페이트의 RdRP 억제 효과를 면역 형광 분석(immunofluorescence; IF)을 통해 확인한 것이다.

도 15는 실험예 6에서 감염된 일차 세포에 폴리포스페이트를 처리한 경우 N1, N2 및 N3 유전자의 억제 능력을 비교한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 16은 실험예 6에서 감염된 일차 세포에 폴리포스페이트를 처리한 경우 ACE2, Cov2-N1, RdRp, 스파이크 유전자 및 서브 게놈 N 전사체 억제 능력을 그래프로 나타낸 것이다.

도 17은 실험예 6에서 감염된 일차 세포에 폴리포스페이트를 처리한 경우 ACE2 및 N 단백질 억제 능력을 면역 블로팅 분석(Immunoblotting analyses)을 통해 확인한 것이다.

도 18은 실험예 6에서 감염된 일차 세포에 폴리포스페이트를 처리한 경우 사이토카인 억제 효과를 나타낸 것을 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0049] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0051] **실시예**
- [0053] [준비예 1] 폴리포스페이트 합성
- [0054] 선형 폴리포스페이트를 인산나트륨 단위체($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \geq 9.0\%$; Sigma Aldrich)를 700 °C에서 1시간 동안 전기로(HQ-DMF3; Coretech, Korea)에서 중합시켰다. 이어서, 용융된 폴리포스페이트 나트륨을 구리판에 부어 급속 냉각시켜 분쇄하였다. 상기 과정은 하기 화학식 1로 나타낼 수 있다. 그 결과 도 1의 화학식과 같은 폴리포스페이트를 합성하였다.
- [0055] [화학식 1]
- [0056]
$$n\text{NaH}_2\text{PO}_4 = (\text{NaPO}_3)_n + n\text{H}_2\text{O}$$
- [0057] 얻어진 중합체는 Graham의 염으로 알려져 있으며, 선형, 고리형 및 분지형의 3 가지 혼합 분자 구조의 폴리포스페이트(PolyP)를 함유하고 있다. 분지형 폴리포스페이트는 매우 불안정하고, 물에 용해될 때, 이들 폴리포스페이트의 분지점은 pH에 상관없이, 심지어 실온에서도 가수 분해된다. 대조적으로, 선형 폴리포스페이트 및 고리형 폴리포스페이트(cyclo PolyP)는 중성 pH 및 실온에서 매우 느리게 가수 분해된다. 상온에서 pH 7의 선형 폴리포스페이트의 P-O-P 결합에 대한 가수분해 반감기는 몇 년에 달한다. 합성된 폴리포스페이트는 일반적으로 매우 소량의 고리형 폴리포스페이트를 함유할 수 있으나, 고리형 폴리포스페이트는 주로 짧은 사슬 길이를 가져, 본 실시예에서는 합성되지 않았다.
- [0058] 또한 얻어진 중합체는 광범위한 사슬 길이를 가져 분별 침전을 수행하였다. 소듐 폴리포스페이트 분말을 증류수(1:10 w/v)에 용해시키고, pH를 7로 조정하고 25 °C에서 12시간 동안 방치하였다. 이어서, 폴리포스페이트 침전을 위하여 아세톤을 용액 추가하였다. 침전된 폴리포스페이트를 4200rpm에서 5분 동안 원심 분리를 통하여 나누었다. 상기 분획 침전을 25회 반복하고, 수득된 폴리포스페이트 분획을 48시간 동안 건조시켰다.
- [0059] 상기 폴리포스페이트는 HPLC 시스템(LC-20AD; Shimadzu, Japan) 및 다중 각도 광 산란 검출기(miniDawn Treos II; Wyatt Technology, USA)에 의해 분별되었다. 상기 HPLC 시스템은 겔 투과 크로마토그래피(PL aquagel-OH; 7.5 X 50 mm; 8 μm; Agilent Technology, USA) 가드 칼럼(PL aquagel-OH Mixed-M; 7.5 X 300 mm; 8 μm; Agilent Technology, USA)을 포함하고, 주입된 폴리포스페이트 샘플의 농도는 25 mg/mL이며, 주입 부피는 50 μL이다. 칼럼의 온도는 30 °C로 유지되었다. 상기 과정에 의해 분리된 폴리포스페이트의 사슬 길이(n)를 하기 화학식 2에 따라 결정하였다.
- [0060] [화학식 2]
- [0061]
$$\text{Mn(평균 물 질량 수)} = \text{Na}_{n+2}\text{P}_n\text{O}_{3n+1}$$
- [0062] 이어서, Astra 소프트웨어, 버전 6.1(Wyatt Technology, USA)을 사용하여, 다 분산 지수(중량 평균 물 질량/평균 물 질량 수; Mw/Mn)를 통해 각 분획의 사슬 길이의 범위를 수득 하였다.
- [0064] [준비예 2] 세포의 준비
- [0065] 이하의 실험을 위하여, 3 명의 건강한 사람의 비강 브러싱을 통하여 인간 일차 세포(Primary cell)를 수득하였고, 상기 세포를 40배로 관찰한 결과를 도 2와 같이 나타내었다.
- [0067] [준비예 3] 유전자 증폭을 위한 프라이머 준비

[0068] 유전자 증폭을 위하여, 타겟 유전자 별로 사용된 프라이머는 하기 표 3과 같다.

표 3

[0070]

타겟 유전자	프라이머 종류	프라이머 서열	서열번호
ACE2	포워드 프라이머	GAAATTCCTCCAAAGACCAGTGGGA	서열번호 1
ACE2	리버스 프라이머	CCCCAACTATCTCTCTCGCTTCAT	서열번호 2
RdRp	포워드 프라이머	GTGAAATGGTCATGTGTGGCGG	서열번호 3
RdRp	리버스 프라이머	CAAAATGTTAAAAACACTATTAGCATA	서열번호 4
N1	포워드 프라이머	GACCCCAAAATCAGCGAAAT	서열번호 5
N1	리버스 프라이머	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG	서열번호 6
스파이크	포워드 프라이머	ATTGCCACTAGTCTCTAGT	서열번호 7
스파이크	리버스 프라이머	AGGATCTGAAAACTTTGTCA	서열번호 8
외피	포워드 프라이머	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	서열번호 9
외피	리버스 프라이머	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	서열번호 10
sg	포워드 프라이머	CAACCAACCAACTTTCGATCTCTGTGA	서열번호 11
sgS	리버스 프라이머	TGAAAGAATTAGTGATGCA	서열번호 12
sgE	리버스 프라이머	AGAAGTACGCTATTAACATTT	서열번호 13
sgM	리버스 프라이머	TATTACTAGGTCCATTGTCAA	서열번호 14
sgN	리버스 프라이머	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATC	서열번호 15
Interleukin-6	포워드 프라이머	GCCACTCACCTCTTCAGAAC	서열번호 16
Interleukin-6	리버스 프라이머	AGCATCCATCTTTTCAGCC	서열번호 17
Interleukin-10	포워드 프라이머	CCTGCCTAACATGCTTCGAGA	서열번호 18
Interleukin-10	리버스 프라이머	TGTCCAGCTGATCCTTCATTG	서열번호 19
Interleukin-12	포워드 프라이머	TGATGGCCCTGTGCCTTAGT	서열번호 20
Interleukin-12	리버스 프라이머	GGATCCATCAGAAGCTTTGCA	서열번호 21
Interferon- gamma	포워드 프라이머	AGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGA	서열번호 22
Interferon- gamma	리버스 프라이머	AGTAAAAGGAGACAATTTGGCTCT	서열번호 23
Tumour necrosis factor- alpha	포워드 프라이머	TCTCTCTAATCAGCCCTCTGG	서열번호 24
Tumour necrosis factor- alpha	리버스 프라이머	GCTACATGGGCTACAGGC	서열번호 25

[0072] [실험예 1] 폴리포스페이트의 독성 확인

[0073] 폴리포스페이트의 농도에 따른 세포 독성 효과를 알아보기 위하여, 세포 지수 접근법(Cell Index approach)을 통한 실시간 세포 증식 분석(Real-Time cell proliferation analyses)을 실시하였다. 인간 일차 세포 8,000개를 도말한 후, 4.16uM, 12.5uM, 37.5uM 및 112uM의 상이한 농도의 단위체 120의 폴리포스페이트(인산염 단위체가 120인 폴리포스페이트, P120 PolyP)로 각각 처리하였고, 음성 대조군으로는 비히클(Vehicle) 처리된 세포를 사용하였다. 이후 36 분 동안 2 분마다 임피던스를 측정하여, 세포 지수를 도출하였고, 그 결과를 도 3과 같이 나타내었다.

[0074] 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이, 112uM 농도의 폴리포스페이트로 처리된 세포에서는 세포 독성 효과를 나타낸 것을 확인할 수 있었다.

[0076] [실험예 2] 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과 확인(1)

[0077] 폴리포스페이트의 항 바이러스 효과를 알아보기 위하여, 한국인 환자로부터 얻은 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(Sars-CoV-2)로 감염된 베로 E6 세포를 상이한 농도(9.375 내지 37.5 μM 범위)의 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)로 처리하여 그 결과를 도 4와 같이 나타내었다.

[0078] 도 4와 같이, 낮은 농도의 폴리포스페이트로 처리된 경우를 포함하여 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 Poly P)로 처리된 베로 E6 세포에서 N 및 RdRp 및 E 유전자에 대한 증가된 주기 임계값(cycle threshold; Ct)을 보

였는 바, 코로나바이러스에 대하여 뛰어난 항 바이러스 효과를 확인할 수 있었다.

[실험예 3] 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과 확인(2)

멸균 처리된 유리 커버슬라이드가 들어 있는 6웰 플레이트에 배로 세포를 분주한 후, 커버슬라이드에 단층으로 세포가 성장하도록 배양하였다. 배양한 세포에 Sars-CoV-2를 0.01 MOI(multiplicity of infection)로 처리하여 2시간 동안 감염시켰다. 이후, 신선한 배지를 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포의 플레이트들에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 하기 표 4에 나타난 농도로 처리한 뒤 24 내지 48시간 동안 배양하여, 세척액으로 세포 용해를 진행하였다. 이후 RT-PCR 어썰이를 진행하여, Sars-CoV-2의 농도를 측정하여 그 결과를 도 5에 나타내었다. 이때 양측검정 T-test를 사용하여 통계적으로 처리하였다.

표 4

구분	폴리포스페이트 인산염 단위체 수	농도
1	Poly P(120-mer)	37.5uM
2	Poly P(120-mer)	18.75uM
3	Poly P(120-mer)	9.375uM
4	대조군(무처리군)	-

도 5에서 보는 바와 같이, 대조군에 비하여 폴리포스페이트를 처리한 군에서 Sars-CoV-2의 증식 억제 효과가 현저히 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 상세하게는, 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 37.5uM, 18.75uM, 9.375uM의 농도로 처리한 경우 Sars-CoV-2 유전자의 Ct 값은 25 이상으로, Sars-CoV-2 유전자의 Ct 값이 20인 대조군에 비하여 코로나바이러스 억제 효과가 현저히 뛰어난을 확인할 수 있었다($p < 0.000003$).

[실험예 4] 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과 확인(3)

실험예 3과 마찬가지로, 멸균 처리된 유리 커버 슬라이드가 들어 있는 6웰 플레이트에 배로 세포를 분주한 후, 상기 커버 슬라이드에 단층으로 세포가 성장하도록 배양하였다. 배양한 세포에 Sars-CoV-2를 0.01 MOI(multiplicity of infection)로 처리하여 2시간 동안 감염시켰다. 이후, 신선한 배지를 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포의 플레이트들에 단위체 8의 폴리포스페이트(인산염 단위체가 8인 포스페이트, P8 PolyP)를 하기 표 5에 나타난 농도로 처리한 뒤 24 내지 48시간 동안 배양하여, 세척액으로 세포 용해를 진행하였다. 이후 RT-PCR 어썰이를 진행하여, Sars-CoV-2의 농도를 측정하여 그 결과를 도 6에 나타내었다. 이때 양측검정 T-test를 사용하여 통계적으로 처리하였다.

표 5

구분	폴리포스페이트 인산염 단위체 수	농도
5	Poly P(8-mer)	300uM
6	대조군(무처리군)	-

도 6에서 보는 바와 같이, 단위체 8의 폴리포스페이트(P8 PolyP)를 300uM의 농도로 처리한 경우 Sars-CoV-2 유전자의 Ct 값은 25 이상으로, Sars-CoV-2 유전자의 Ct 값이 20인 대조군에 비하여 코로나바이러스 억제 효과가 현저히 뛰어난을 확인할 수 있었다($p < 0.00000219$).

[실험예 5] 폴리포스페이트의 코로나 바이러스 억제 효과 확인(4)

[0095] 5.1. RT-실시간 PCR 분석

[0096] 이하, 폴리포스페이트(PolyP)의 코로나바이러스 억제 효과 확인을 위해, RT-실시간 PCR 분석을 실시하였다. 구체적으로는 BSL3 실험실에서 425,000개의 베로(VERO) 세포를 24개의 다중 웰에 각각 85,000개씩 도포하였다. 다음으로, Sars-CoV-2 양성 환자로부터 채취한 냉동 면봉으로부터 얻은 Sars-CoV-2를 세포에 감염시켰다(0.09 MOI). 감염되지 않은 세포는 감염의 음성 대조군으로 사용하였다. 감염 24시간 후 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP), 단위체 126의 폴리포스페이트(인산염 단위체가 126인 폴리포스페이트, P126 PolyP) 및 단위체 189의 폴리포스페이트(인산염 단위체가 189인 폴리포스페이트, P189 PolyP)을 각 37.5 μ M씩 처리하고, 비히클 처리된 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 처리 24시간 후(즉, 감염 48시간 후), 베로(VERO) 세포를 용해시키고 RNA를 추출하였다. 이후 "CLONIT quanty COVID-19" [Ref. RT-25](IVD 승인) 키트 및 BioRad CFX96 기기를 사용하여 25℃, 2분; 50℃, 15분; 95℃, 2분; 95℃, 3초; 55℃, 30초의 조건으로 45회 사이클을 수행하였다. RT-실시간 PCR 분석을 통하여 타겟(N1, N2, N3)의 Cq값은 내부 대조군(Delta Ct)으로 정규화 하여 표 6과 같이 나타내었다. 또한 비히클 처리된 대조군에 대한 상기 정량값의 배수를 계산하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0097] 도 7과 표 6에서 보는 바와 같이, Sars-CoV-2에 감염된 베로 세포에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP), 단위체 126의 폴리포스페이트(P126 PolyP) 및 단위체 189의 폴리포스페이트(P189 PolyP)를 처리한 결과, 대조군에 비하여 N1, N2 및 N3 유전자 절편의 발현 수준이 현저히 감소하였는 바, 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과가 현저히 뛰어남을 확인할 수 있었다.

표 6

[0099]

시료	타겟	Cq(평균)
비감염된 Vero 세포	N1	25.72499724
	N2	25.68866502
	N3	25.63857615
	INT CTR	23.81039344
비히클 CTR 처리된 Sars-CoV-2 감염 Vero 세포	N1	9.827283488
	N2	5.728177784
	N3	5.800394262
	INT CTR	18.72457191
P120 PolyP 처리된 Sars-CoV-2 감염 Vero 세포	N1	11.55999429
	N2	6.439598231
	N3	7.746705892
	INT CTR	14.41831947
P126 PolyP 처리된 Sars-CoV-2 감염 Vero 세포	N1	15.11217524
	N2	15.10407791
	N3	15.34805346
	INT CTR	19.23622464
P189 PolyP 처리된 Sars-CoV-2 감염 Vero 세포	N1	11.28845692
	N2	6.924056959
	N3	6.64257432
	INT CTR	14.73400147

[0101] 5.2. RT-실시간 PCR 분석

[0102] 폴리포스페이트(PolyP)의 코로나바이러스 억제 효과 확인을 위해, 마찬가지로 방법으로 RT-실시간 PCR 분석을 실시하였다. 감염된 베로(VERO) 세포의 안지오텐신 전환효소 2(Angiotensin-converting enzyme 2; ACE2), Cov2-N1, 외피 단백질 유전자, RdRp, 스파이크 유전자, 서브 게놈 N 및 서브 게놈 S 전사체의 발현량을 RT-실시간 PCR 분석을 실시하여 정량값을 도출하였고, 비히클 처리된 대조군에 대한 상기 정량값의 배수를 계산하여 도 8과 같이 나타내었다.

[0103] 도 8에서와 같이, Sars-CoV-2에 감염된 베로(VERO) 세포에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 처리한 경우 ACE2, Cov2-N1, 외피 단백질 유전자, RdRp, 스파이크 유전자, 서브 게놈 N(sgN) 및 서브 게놈 S(sgS) 전

사체의 Ct 값이 증가하였는 바, 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과가 현저히 뛰어남을 확인하였다.

[0104] 5.3. 면역 블로팅 분석

[0105] 폴리포스페이트(PolyP)의 코로나바이러스 억제 효과 확인을 위해, 면역 블로팅 분석(Immunoblotting analyses)을 실시하였다. 구체적으로는 0.09 MOI Sars-CoV-2에 감염된 베로(VERO) 세포에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP) 37.5 μ M을 처리하였다. 대조군으로는 비히클 처리된 세포를 음성 대조군으로 사용하였으며, 감염되지 않은 세포는 감염의 음성 대조군으로 사용하였다. 이후 폴리포스페이트를 처리한 세포들과 대조군에서 ACE2 및 N 단백질의 발현 정도를 항체로 확인하여 도 9에서 나타내었다.

[0106] 도 9에서와 같이, 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 Sars-CoV-2에 감염된 베로(VERO) 세포에 처리한 경우, 비히클 처리된 대조군에 비하여 ACE2 및 Cov2-N 단백질 발현이 감소되었는 바, 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과가 현저히 뛰어남을 확인하였다.

[0107] 5.4. 면역 형광 분석

[0108] 폴리포스페이트(PolyP)의 코로나바이러스 억제 효과 확인을 위해, 면역 형광 분석(immunofluorescence; IF)을 실시하였다. 0.09 MOI Sars-CoV-2에 감염된 베로 세포에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP) 37.5 μ M을 처리하였다. 음성 대조군으로는 감염후 비히클 처리된 세포를 사용하였다. 이후 면역 형광 분석(immunofluorescence; IF)을 수행하기 위하여 항-ACE2, 항-Cov2-외피, 항-Cov2-스파이크, 항-Cov2-N 및 RdRp를 사용하여 배율 63x. 라이카 TCS SP8 MP 다 광자 현미경으로 관찰한 결과를 도 10에 나타내었고, 이를 MANTRA 정량적 병리학 워크 스테이션으로 정량하여 도 11에 나타내었다.

[0109] 도 10 및 11에서와 같이, 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 처리한 경우 대조군에 비하여 ACE2 외피 단백질 및 N 단백질에 대하여 형광세기가 감소하였는 바, 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과가 현저히 뛰어남을 확인하였다.

[0110] 5.5. RT-실시간 PCR 분석

[0111] 폴리포스페이트(PolyP)의 코로나바이러스 억제 효과 확인을 위해, RT-실시간 PCR 분석을 실시하였다. 구체적으로는 베로(VERO) E6 세포를 도포한 뒤, Sars-CoV-2 양성 환자로부터 채취한 냉동 면봉으로부터 얻은 Sars-CoV-2를 세포에 감염시켰다(0.1 MOI). 감염되지 않은 세포는 감염의 음성 대조군으로 사용하였다. 감염 24시간 후(즉, 감염 60시간 후) 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 37.5 μ M 처리하고, 비히클 처리된 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 처리 36시간 후, 베로(VERO) 세포를 용해시키고 RNA를 추출하였다. 이후 "CLONIT quanty COVID-19" [Ref. RT-25](IVD 승인) 키트를 사용하여 RT-실시간 PCR 분석을 시행하였고, 타겟(N1, N2, N3)의 Ct 값을 도출하여 도 12에 나타내었다.

[0112] 도 12에서 보는 바와 같이, 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)로 전처리된 베로 세포에 Sars-Cov2를 감염시킨 결과, 대조군에 비하여 N1, N2 및 N3 유전자 절편의 Ct 값이 높아 발현 수준이 현저히 감소한 것을 확인하였는 바, 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과가 현저히 뛰어남을 확인하였다.

[0113] 5.6. RT-실시간 PCR 분석

[0114] 폴리포스페이트(PolyP)의 코로나바이러스 억제 효과 확인을 위해, RT-실시간 PCR 분석을 실시하였다. 베로(VERO) 세포에 Sars-CoV-2를 감염시켰고(0.1 MOI), 감염되지 않은 세포는 감염의 음성 대조군으로 사용하였다. 24시간 후 상기 감염된 베로 세포에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP) 37.5 μ M를 처리하고, 비히클 처리된 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 처리 36시간 후(즉, 감염 50시간 후), 베로(VERO) 세포를 용해시키고 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA에 대하여 RT-실시간 PCR 분석을 통하여 서브 게놈 전사체인 sgM, sgE, sgN 및 sgS의 정량값을 계산 후, 비히클 처리된 대조군에 대한 상기 정량값의 배수를 계산하여 그 결과를 도 13과 같이 나타내었다.

[0115] 도 13에서와 같이, 0.1 MOI로 감염된 베로(VERO) 세포에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 처리한 경우 sgM, sgE, sgN 및 sgS의 발현량이 감소하였는 바, 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과가 현저히 뛰어남을 확인하였다.

[0116] 5.7. 면역 형광 분석

[0117] 폴리포스페이트(PolyP)의 작용 부위 확인 및 코로나바이러스 억제 효과 확인을 위해, 면역 형광 분석(immunofluorescence; IF)을 실시하였다. 베로 세포에 RdRp를 표지하기 위하여 FLAG-RdRp 플라스미드 컨스트럭

트를 형질 감염 시킨 후, 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP) 37.5 μ M을 처리하였고, 비히클 처리된 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 이후 면역 형광 분석(immunofluorescence; IF)을 수행하기 위하여 배율 63x. 라이카 TCS SP8 MP 다 광자 현미경으로 관찰하였고, 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[0118] 도 14에서와 같이, 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 처리한 경우 배로 세포에서 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)와 RdRp의 공동 국소화 현상이 관찰되었고, RdRp 발현이 감소하였는 바, 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과가 현저히 뛰어남을 확인할 수 있었다.

[0120] [실험예 6] 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과 확인(5)

[0121] 6.1. RT-실시간 PCR 분석

[0122] 폴리포스페이트(PolyP)의 코로나바이러스 억제 효과 확인을 위해, RT-실시간 PCR 분석을 실시하였다. 구체적으로는 비강 일차 세포에 Sars-CoV-2를 0.002 MOI로 감염시켰고, 감염되지 않은 세포를 감염의 음성 대조군으로 사용하였다. 감염후 24시간 뒤에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 37.5 μ M 처리하였고, 비히클 처리된 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 처리 36시간 후(즉, 감염 60시간 후), 일차 세포를 용해시키고 RNA를 추출하였다. 이후 "CLONIT quanty COVID-19" [Ref. RT-25](IVD 승인) 키트를 사용하여 RT-실시간 PCR 분석을 시행하였고, 타겟(N1, N2, N3)의 정량값을 도출한 후 비히클 처리된 대조군에 대한 상기 정량값의 배수를 계산하여 도 15에 나타내었다.

[0123] 도 15에서 보는 바와 같이, Sars-CoV-2에 감염된 일차 세포에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)을 처리한 결과, 대조군에 비하여 N1, N2 및 N3 유전자 절편의 발현 수준이 현저히 감소하였는 바, 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과가 현저히 뛰어남을 확인할 수 있었다.

[0124] 6.2. RT-실시간 PCR 분석

[0125] 폴리포스페이트(PolyP)의 코로나바이러스 억제 효과 확인을 위해, RT-실시간 PCR 분석을 실시하였다. 구체적으로는 일차 세포에 Sars-CoV-2 0.002 MOI를 감염시켰고, 감염되지 않은 세포를 감염의 음성 대조군으로 사용하였다. 감염후 24시간 뒤에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 37.5 μ M 처리하였고, 비히클 처리된 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 처리 36시간 후(즉, 감염 60시간 후), 일차 세포를 용해시키고 RNA를 추출하였다. 이후 ACE2, Cov2-N1, RdRp, 스파이크 유전자 및 서브 게놈 N 전사체를 검출할 수 있는 키트를 사용하여 RT-실시간 PCR 분석을 시행하였고, 타겟(ACE2, Cov2-N1, RdRp, 스파이크 유전자 및 서브 게놈 N 전사체)의 정량값을 도출한 후 비히클 처리된 대조군에 대한 상기 정량값의 배수를 계산하여 도 16에 나타내었다.

[0126] 도 16에서와 같이, 감염된 일차 세포에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 처리한 경우 ACE2, Cov2-N1, RdRp, 스파이크 유전자 및 서브 게놈 N(sgN) 전사체의 발현이 감소하였는 바, 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과가 현저히 뛰어남을 확인하였다.

[0127] 6.3. 면역 블로팅 분석

[0128] 폴리포스페이트(PolyP)의 처리에 따른 코로나바이러스 억제 효과를 확인하기 위하여 면역 블로팅 분석(Immunoblotting analyses)을 수행하였다. 일차 세포에 Sars-CoV-2 0.002 MOI를 감염시켰고, 감염되지 않은 세포를 감염의 음성 대조군으로 사용하였다. 감염후 24시간 뒤에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 37.5 μ M 처리하였고, 비히클 처리된 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 이후 폴리포스페이트를 처리한 세포들과 대조군에서 ACE2 및 N 단백질의 발현 정도를 항체로 확인하여 그 결과를 도 17과 같이 나타내었다.

[0129] 도 17에서와 같이, 폴리포스페이트가 처리된 세포에서 ACE2 및 N 단백질의 감소를 확인하였는 바, 폴리포스페이트의 코로나바이러스 억제 효과가 현저히 뛰어남을 확인하였다.

[0130] 6.4. RT-실시간 PCR 분석

[0131] 폴리포스페이트(PolyP)의 코로나바이러스 감염증에 대한 치료적 효과 확인을 위해, 염증성 사이토카인 발현량에 대하여 RT-실시간 PCR 분석을 실시하였다. 일차 세포에 Sars-CoV-2 0.002 MOI를 감염시켰고, 감염되지 않은 세포를 감염의 음성 대조군으로 사용하였다. 감염 후 24시간 뒤에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 37.5 μ M 처리하였고, 비히클 처리된 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 처리 36시간 후(즉, 감염 60시간 후), 일차 세포를 용해시키고 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA에 대하여 RT-실시간 PCR 분석을 시행하였고, 타겟(IFN- γ , IL-10, IL-12, TNF- α 및 IL-6)의 정량값을 도출한 후 비히클 처리된 대조군에 대한 상기 정량값의

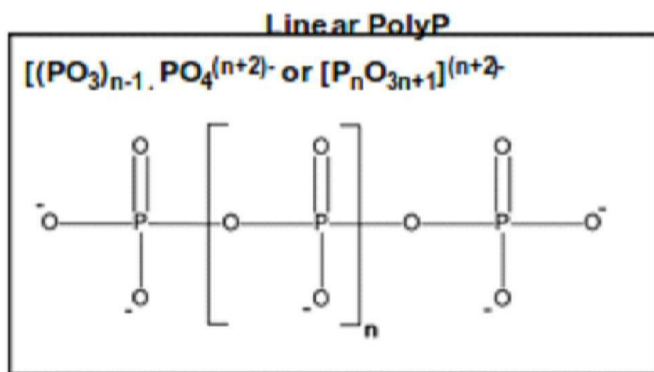
배수를 계산한 결과를 도 18에 나타내었다.

[0132] 도 18에서와 같이, 감염된 일차 세포에 단위체 120의 폴리포스페이트(P120 PolyP)를 처리한 경우 감염되어 비히클 처리된 대조군 및 감염되지 않은 대조군에 비하여 IFN-gamma, IL-10, IL-12, TNF-alpha 및 IL-6의 발현이 감소하였는 바, 폴리포스페이트가 코로나바이러스에 의해 야기된 사이토카인 폭풍을 억제하는 효과가 뛰어남을 확인하였다.

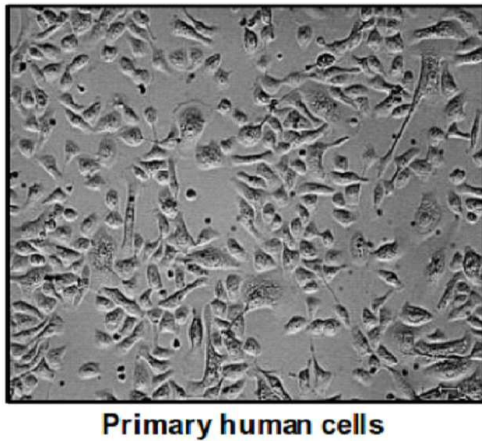
[0134] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

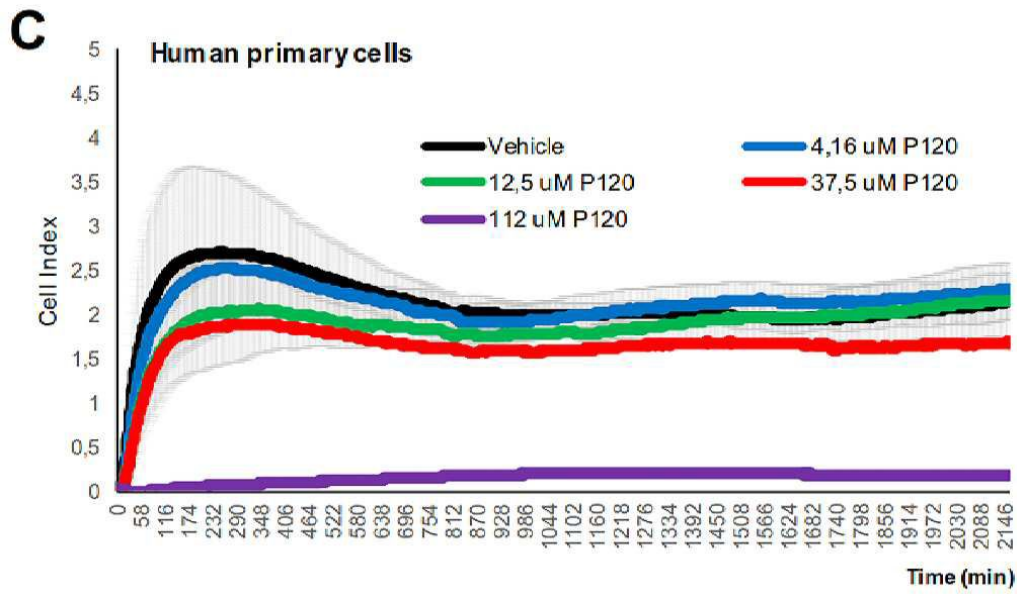
도면1



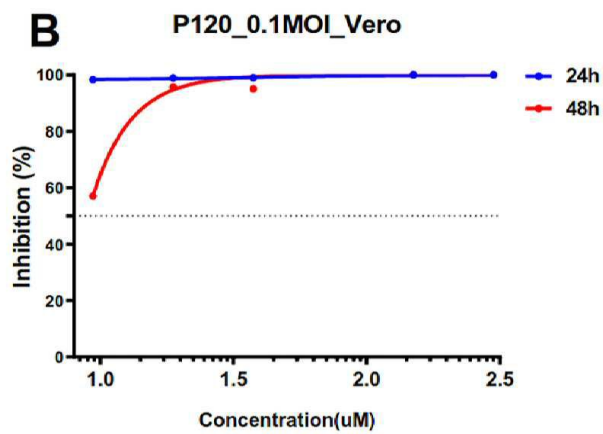
도면2



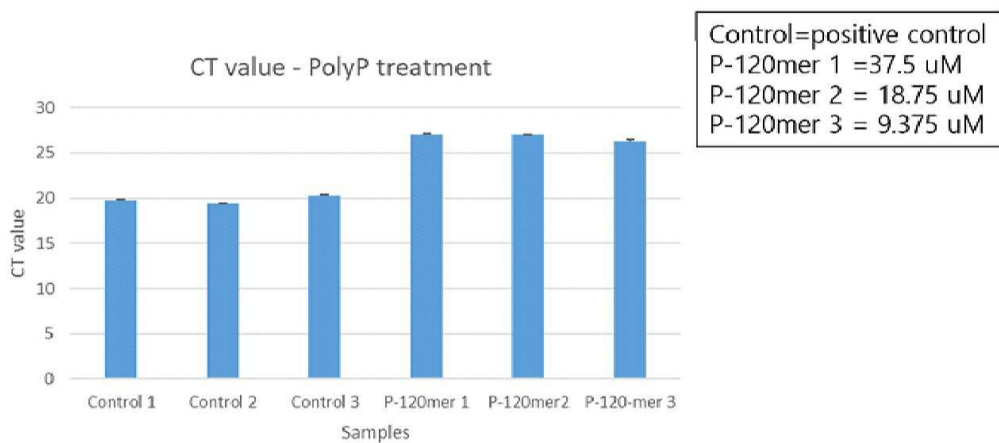
도면3



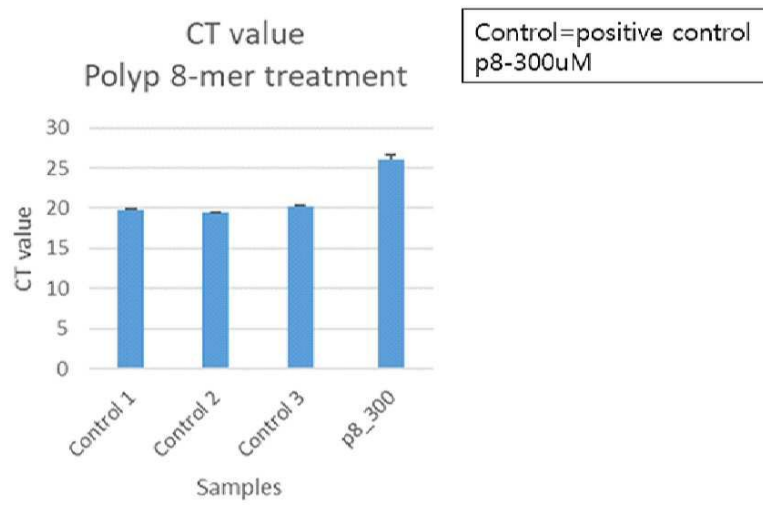
도면4



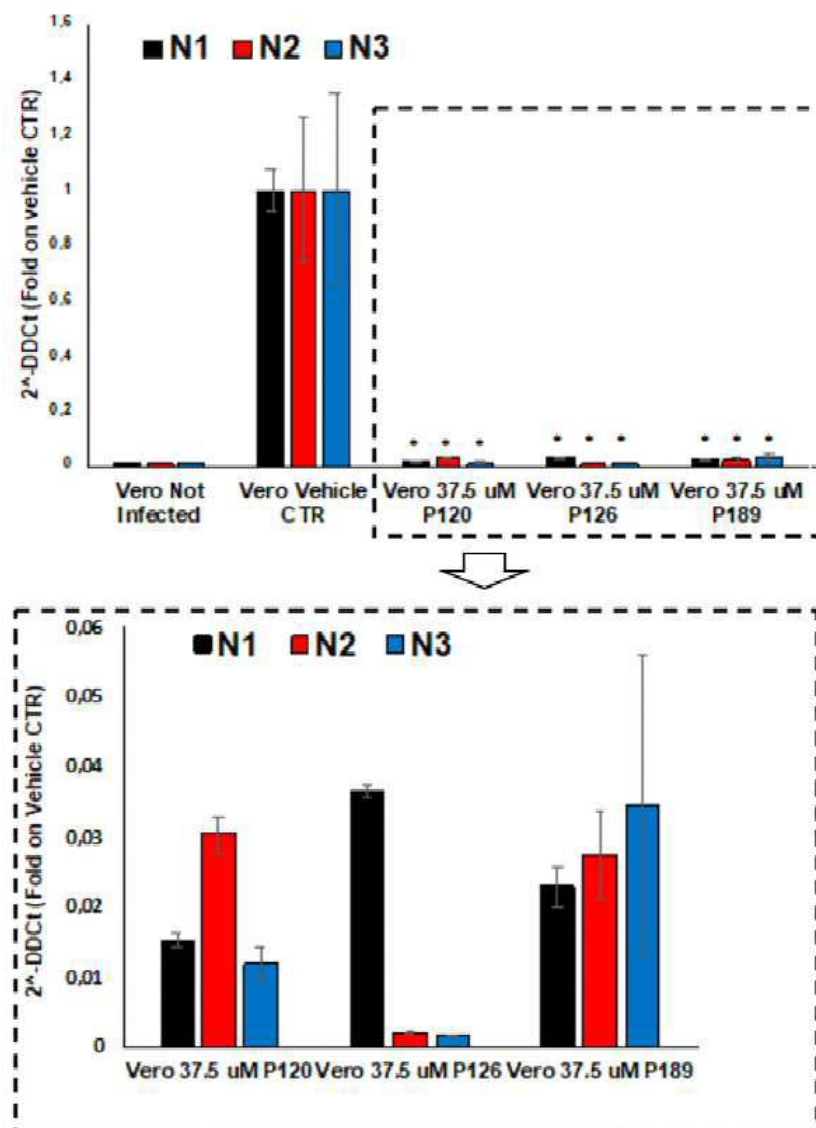
도면5



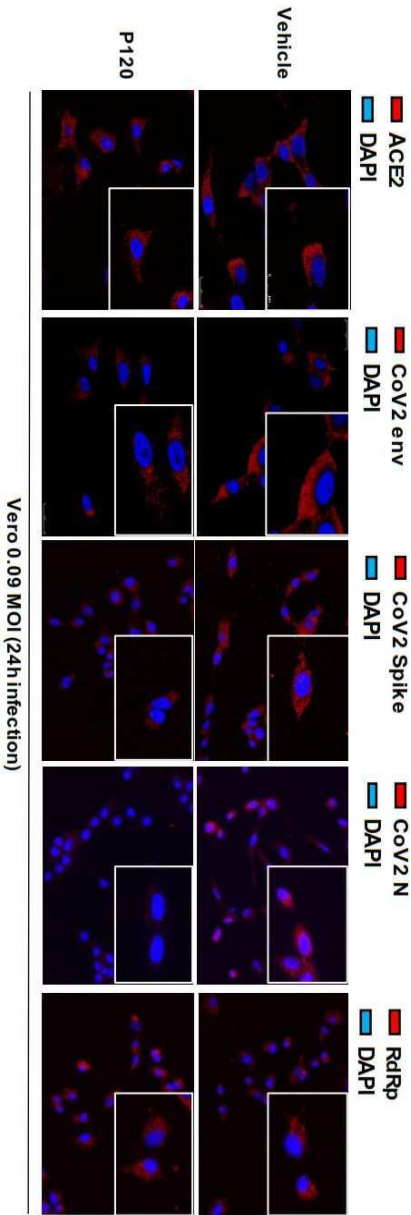
도면6



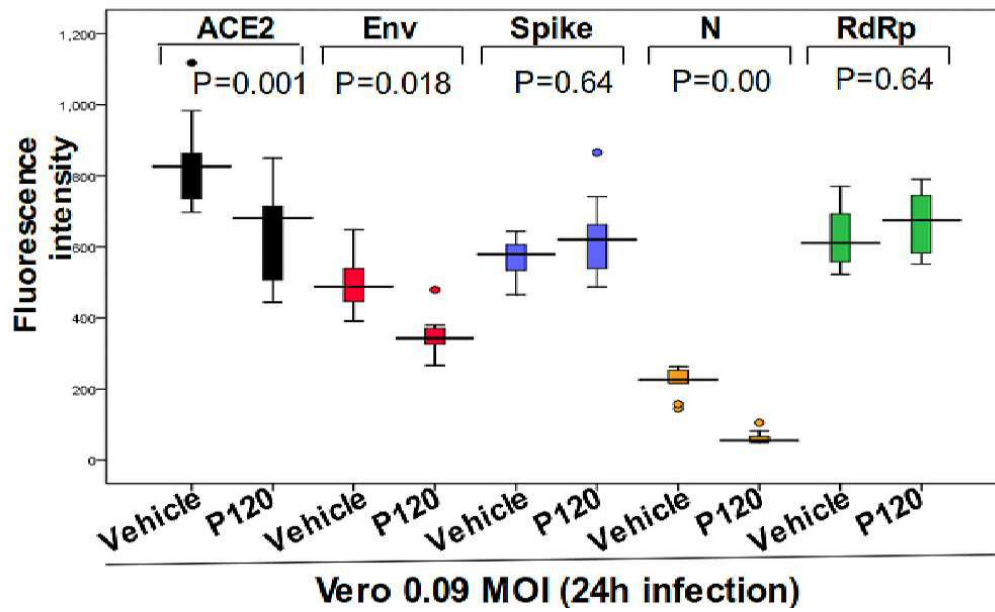
도면7



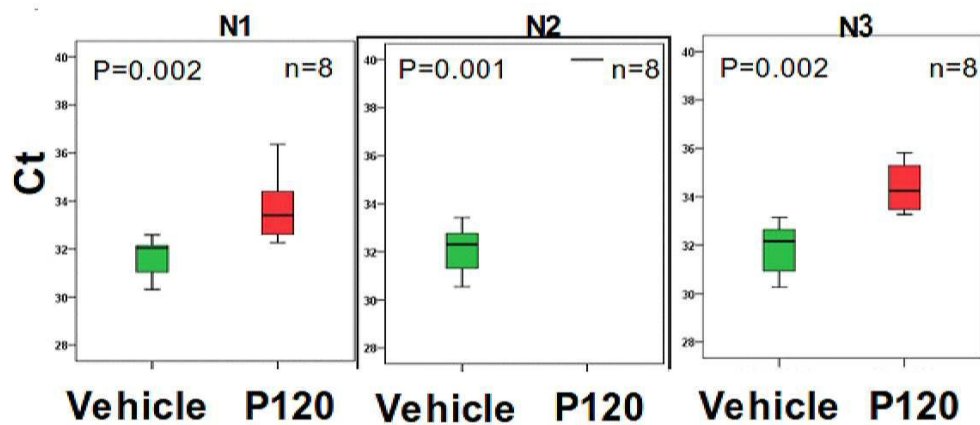
도면10



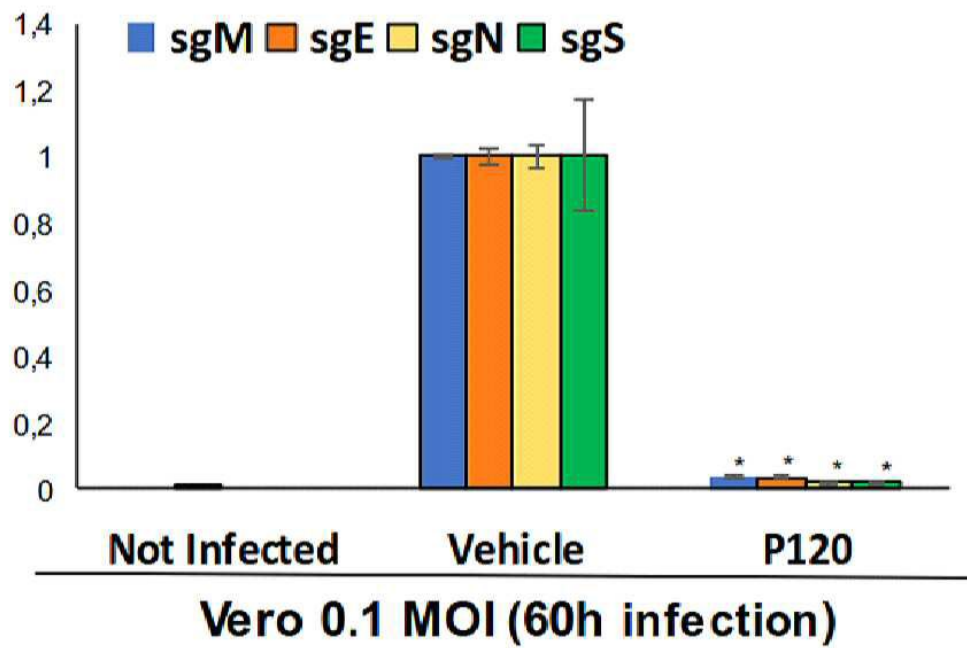
도면11



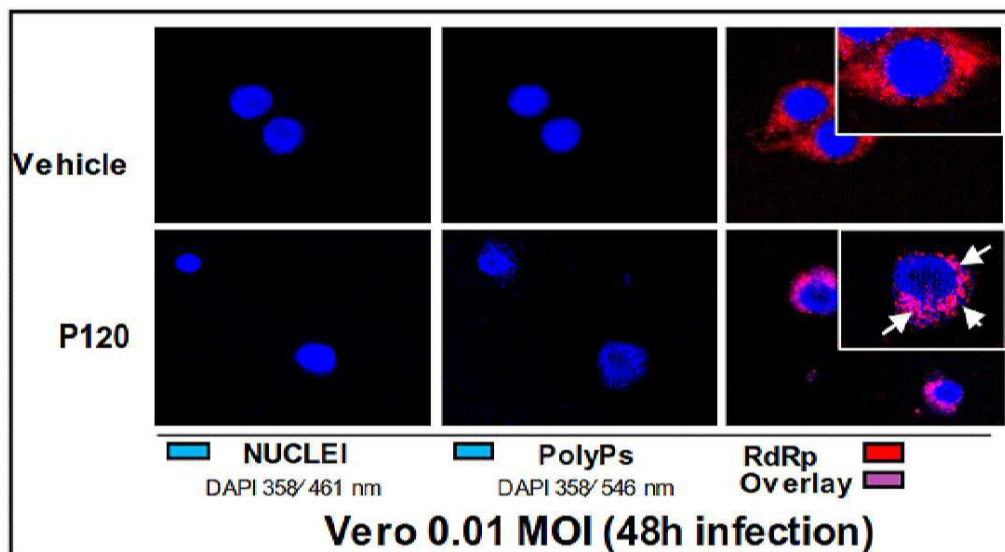
도면12



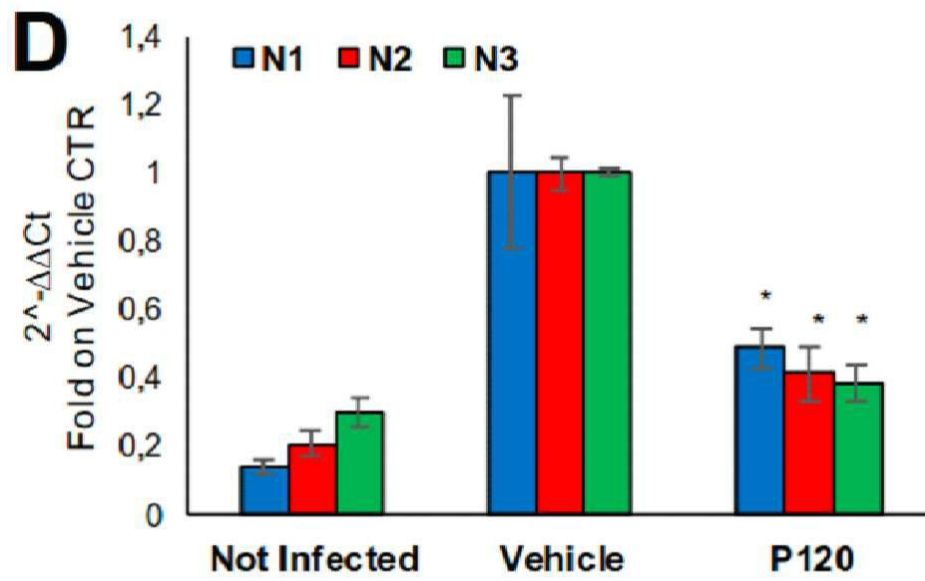
도면13



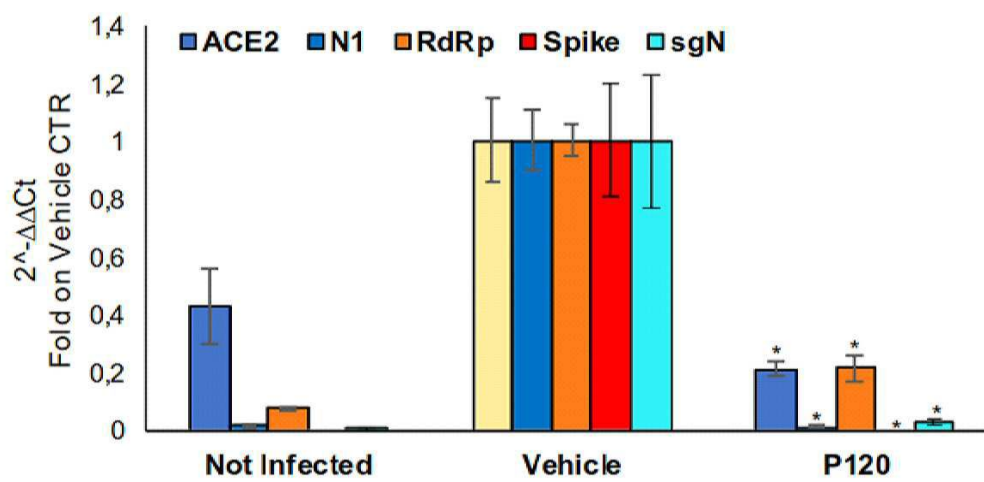
도면14



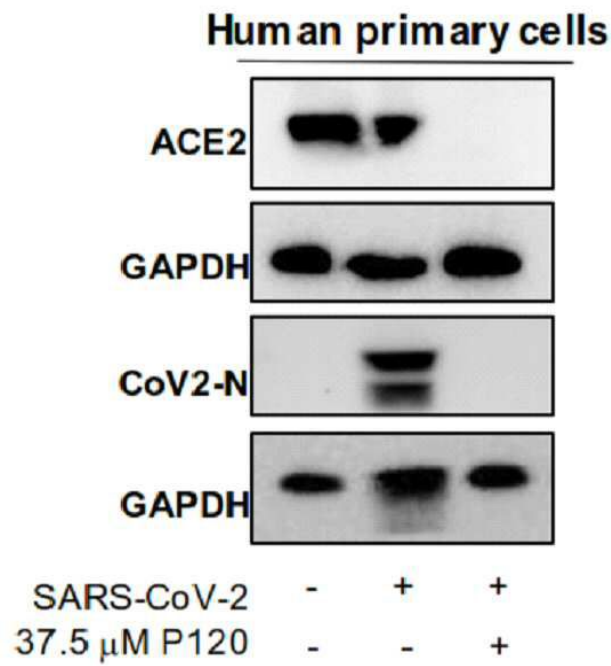
도면15



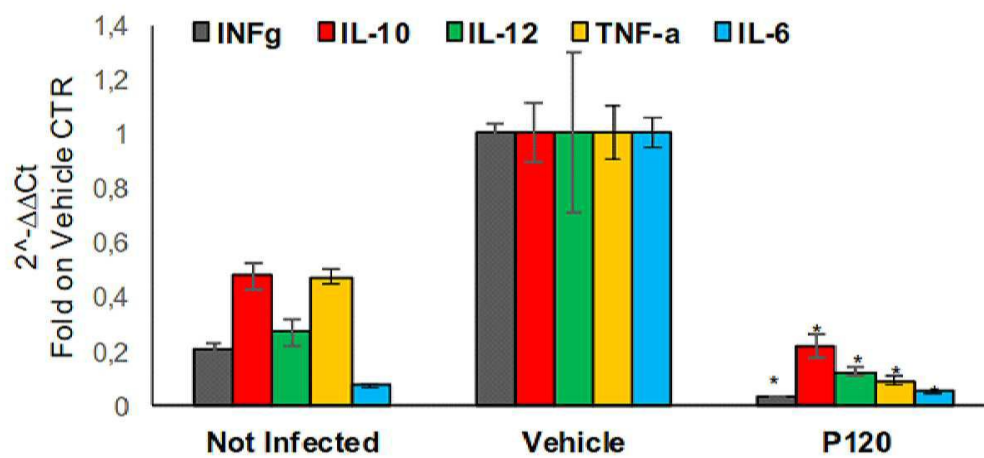
도면16



도면17



도면18



서열 목록

<110> KIM, Hong Yeoul

Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> Composition for treating coronavirus infection or disease caused by coronavirus infection comprising polyphosphate

<130> PDPB204009k01d01

<150> KR 10-2020-0050184

<151> 2020-04-24

<160> 25

<170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ACE2 forward primer
 <400> 1
 gaaattccca aagaccagtg ga 22

<210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ACE2 reverse primer
 <400> 2
 cccaactat ctctctcgct tcat 24

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RdRp forward primer
 <400> 3
 gtgaaatggt catgtgtggc gg 22

<210> 4
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RdRp reverse primer
 <400>
 > 4
 caaatgttaa aaacactatt agcata 26

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> N1 forward primer

<400> 5

gaccccaaaa tcagcgaaat

20

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N1 reverse primer

<400> 6

tctggttact gccagttgaa tctg

24

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> spike gene forward primer

<400> 7

attgccacta gtctctagt

19

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> spike gene reverse primer

<400> 8

aggatctgaa aactttgtca

20

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> envelope forward primer

<400> 9

acaggtacgt taatagttaa tagcgt

26

<210> 10

<211> 22

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	envelope reverse primer	
<400>	10	
	atattgcagc agtacgcaca ca	22
<210>	11	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	sg forward primer	
<400>	11	
	caaaccaacc aactttcgat ctcttgta	28
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	sgS reverse primer	
<400>	12	
	tgaaagaatt agtgtatgca	20
<210>	13	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	sgE reverse primer	
<400>	13	
	agaagtacgc tattaactat t	21
<210>	14	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	sgM reverse primer	
<400>	14	
	tattactagg ttccattgtt caa	23

<210>	15	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	sgN reverse primer	
<400>	15	
tctgggttact gccagttgaa tc		22
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Interleukin-6 forward primer	
<400>	16	
gccactcacc tcttcagaac		20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Interleukin-6 reverse primer	
<400>	17	
agcatccatc tttttcagcc		20
<210>	18	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Interleukin-10 forward primer	
<400>	18	
cctgcctaac atgcttcgag a		21
<210>	19	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Interleukin-10 reverse primer	
<400>	19	

tgtccagctg atccttcatt tg	22
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Interleukin-12 forward primer	
<400> 20	
tgatggccct gtgccttagt	20
<210> 21	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Interleukin-12 reverse primer	
<400> 21	
ggatccatca gaagctttgc a	21
<210> 22	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Interferon- gamma forward primer	
<400> 22	
aggcatTTTg aagaattgga aaga	24
<210> 23	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Interferon- gamma reverse primer	
<400> 23	
agtaaaagga gacaatttgg ctct	24
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Tumour necrosis factor- alpha forward primer

<400> 24

tctctctaata cagccctctg g

21

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tumour necrosis factor- alpha reverse primer

<400> 25

gctacatggg ctacaggc

18