



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0111620
(43) 공개일자 2022년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/01 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/012 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0042181
(22) 출원일자 2021년03월31일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020210014470 2021년02월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인
삼익제약주식회사
인천광역시 부평구 청안로 13 (청천동)
(72) 발명자
권영이
서울특별시 용산구 원효로 216 용산e편한세상아파트 109동 1403호
이충환
서울특별시 강남구 역삼로 314 개나리푸르지오아파트 303동 1003호
이세영
서울특별시 강남구 남부순환로373길 21, 이니그마빌 3차 601호
(74) 대리인
특허법인에이아이피

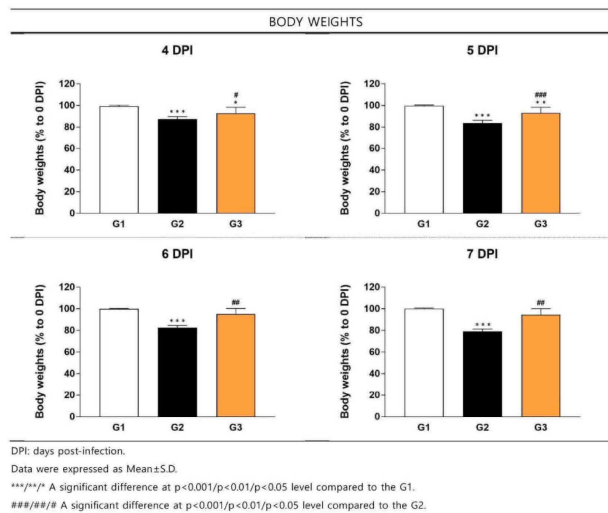
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **코로나-19 감염증의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 치모모듈린 및 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하며, 코로나-19를 예방하거나 치료할 수 있는 억제학적 조성물을 제공한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 9/0053 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

치모모듈린 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 코로나 19 바이러스(코비드-19) 감염증의 예방 또는 치료 용도의, 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 치모모듈린은 약제학적 조성물의 총 중량을 기준으로, 5 중량% 내지 35 중량%로 포함되는, 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서 상기 치모모듈린이 코로나 19 바이러스 증식을 억제하는, 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 경구 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 정제, 캡슐제 또는 액제인, 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용되는 담체가 락토즈, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이 트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록 시벤조에이트, 탈크, 마그네슘스테아레이트 및 광물유로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 약제학적 조 성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 치모모듈린의 하루 투여량 80mg 내지 800mg을, 1일 1회 또는 1 일 2회, 1주 내지 24주 동안 투여하는, 약제학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 코로나 19 바이러스(코비드-19) 감염증의 예방을 위해 건강한 사람, 고령자 또는 기저질환자에게 치모모듈린의 하루 투여량 80mg 내지 800mg을, 1일 1회 또는 1일 2회, 4주 내지 24 주 동안 투여하는, 약제학적 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 코로나 19 바이러스(코비드-19) 감염증의 치료를 위해 코로나 19 바이 러스 감염자에게 치모모듈린의 하루 투여량 80mg 내지 800mg을, 1일 1회 또는 1일 2회, 1주 내지 24주 동안 투 여하는, 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이, 코비드-19 예방, 치료 또는 증상 완화 에 효과가 있는 다른 치료제, 백신 또는 감염 증상 완화제와 함께 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 치료제가 바이러스에 감염된 환자의 혈장을 이용한 혈장치료, 단클론 항체 치료제, 리바

비린, 펜시클로비르, 니타코사니드, 나파모스테트, 렘데시비르, 파비피라비르, 클로로퀸, 칼레트라, 아비간, 아르비달, 갈리데시비르, 또는 다루나비르인, 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 코비드-19 감염증을 예방하거나 치료할 수 있는 약제학적 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 신종 코로나 바이러스(2019 novel Corona virus; severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SARS-CoV-2)는 2019년 12월에 중국 우한에서 발생한 신종 코로나 바이러스 감염증의 원인 바이러스(2019-nCoV)이다. 이 신종 바이러스는 2019년 말 처음 인체 감염이 확인되었다는 의미에서 '코로나-19' 또는 '코비드-19'로 명명된다. 신종 코로나바이러스에 의한 유행성 질환은 호흡기를 통해 감염되며, 감염 초기에 전염성이 강한 특징을 보인다. 감염 후에는 인후통, 고열, 기침, 호흡곤란 등의 증상을 거쳐 폐렴으로 발전하여 사망까지도 발생할 수 있는 중대 호흡기 질환으로, 승인되거나 정립된 치료제가 없이 증상에 따른 약제나 위중 환자의 경우 산소 마스크 또는 인공호흡기 등의 보존적 치료에 의지하고 있다.

[0003] 한편, 치모모듈린(Thymomodulin)은 간염, 호흡기 질환 등 세균 및 바이러스성 감염질환의 보조치료제로 시판되고 있으며, 송아지 흉선에서 추출한 단백질의 분해 정제물이다. 분자량은 1kD 내지 10kD이며, 치모신(Thymosin) 알파1과 치모신 베타4를 포함하는 것으로 알려져 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 특허 출원 공개 제10-2020-0063275호
(특허문헌 0002) 대한민국 특허 출원 공개 제10-2007-0072919호

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) *Pediatr Med Chir.* 1988; 10(6): 603-7
(비특허문헌 0002) *Pediatr Med Chir.* 1990; 12(3): 229-32
(비특허문헌 0003) *Drugs Exp Clin Res.* 1985, 11(9), 665-9
(비특허문헌 0004) *Minerva Med.* 1987 Sep15: 78(17): 1281-9

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명의 하나의 목적은, 안전하고 유효하게 코비드-19를 예방하거나 치료할 수 있는 약제학적 조성물 및 그 제조 방법을 제공하는 것에 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은, 치모모듈린의 코비드-19 치료제 또는 예방제로서의 신규 용도를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 코비드-19 바이러스의 증식을 억제할 수 있는 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 양태는, 치모모듈린 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 코로나 19 바이러스 (COVID-19, 코비드-19) 감염증의 예방 또는 치료 용도의, 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0012] 활성 물질인 치모모듈린(thymomodulin)은 송아지 흉선에서 추출한 단백질의 산 또는 효소 분해 정제물로, 치모신 단편 5에 해당하는 여러 펩타이드의 혼합물이다. 치모모듈린의 분자량은 1kD 내지 10kD이며, 이의 CAS 넘버는 90803-92-2이다. 치모신(Thymosin) 알파1, 치모신 베타4 및 치모신 감마 등을 포함하며 현재 간염, 호흡기 질환 등 세균 및 바이러스성 감염질환의 보조치료제로 시판되고 있다. 본 발명의 발명자들은 치모모듈린이 코비드-19 증식을 억제할 뿐만 아니라, 코비드-19 감염으로 인한 체중 감소를 예방 또는 완화하고, 염증, 울혈, 출혈, 조직 상해 등의 제반 병리학적 결과를 경감 내지 완화시킬 수 있음을 밝혀내었다.
- [0013] 치모모듈린은 부작용이 거의 없는 것으로 알려져 있으므로 본 발명에서 제공하는 치모모듈린의 코비드-19 감염증 치료 또는 예방의 신규 용도는, 코비드-19를 안전하고 유효하게 치료 또는 예방할 수 있음을 의미한다.
- [0014] 약제학적 조성물의 총 중량을 기준으로, 치모모듈린은 5 내지 35 중량%, 구체적으로는 10 내지 30 중량%, 보다 구체적으로는 20 내지 30 중량%의 양으로 포함될 수 있다.
- [0015] 코비드-19 바이러스 감염증의 예방 또는 치료를 위한 치모모듈린의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중, 및 감염증의 중등도에 따라 달라질 수 있으나, 1일 40mg 내지 800mg의 범위이다. 보다 구체적으로 치모모듈린의 1일 투여량은 80mg, 160mg 또는 240mg이다. 코비드-19 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물의 투여 방법은 1일 1회 또는 1일 2회, 치모모듈린의 하루 투여량 80mg 내지 800mg을 1주 내지 24주 동안 투여하는 것이다. 구체적으로는 1일 1회 또는 2회 치모모듈린의 하루 투여량 80mg 내지 240mg을 4주 내지 20주 동안 투여하는 것이다. 보다 구체적으로, 1일 1회 또는 2회 치모모듈린의 하루 투여량 80mg 내지 160mg을 4주 내지 12주 동안 투여하는 것이다. 특히, 코로나 19 바이러스(코비드-19) 감염증의 예방을 위해서 건강한 사람, 고령자, 또는 기저질환자에게 치모모듈린의 하루 투여량 80mg 내지 800mg을, 1일 1회 또는 1일 2회, 4주 내지 24주 동안 투여할 수 있고, 구체적으로는 1일 1회 또는 2회 치모모듈린의 하루 투여량 80mg 내지 240mg을 4주 내지 20주 동안 투여할 수 있다. 특히 코로나 19 바이러스(코비드-19) 감염증의 치료를 위해 코로나 19 바이러스 감염자에게 치모모듈린의 하루 투여량 80mg 내지 800mg을, 1일 1회 또는 1일 2회, 1주 내지 24주 동안 투여할 수 있고, 구체적으로는 1일 1회 또는 2회 치모모듈린의 하루 투여량 80mg 내지 240mg을 2주 내지 20주 동안 투여할 수 있다.
- [0016] 상기 약제학적 조성물은 경구 투여용일 수 있다. 이에 약제학적 조성물은 환제, 산제, 액제, 정제 또는 캡슐제 형태로 제형화될 수 있으며, 구체예에서 액제, 캡슐제 또는 정제로 제형화될 수 있다.
- [0017] 상기 약제학적으로 허용되는 담체로는 예를 들어, 락토즈, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘스테아레이트 또는 광물유를 들 수 있다.
- [0018] 상기 약제학적 조성물은 추가로 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0019] 상기 약제학적 조성물은 코비드-19의 증식 억제 또는 이의 감염증의 예방 또는 치료에 효과적이다. 코비드-19 감염 증상은, 발열, 권태감, 기침, 호흡곤란, 폐렴, 인후통, 두통, 설사, 오심, 체중 감소 등이며, 본 발명의 약제학적 조성물을 반복 투여시, 상기 하나 이상의 증상이 경감되거나 없어질 수 있다.
- [0020] 상기 약제학적 조성물은 코비드-19 예방, 치료 또는 증상 완화에 효과가 있는 다른 치료제, 백신 또는 감염증 증상 완화제와 함께 사용될 수 있다. 이러한 치료제 또는 감염증 증상 완화제로는, 바이러스에 감염된 환자의 혈장을 이용한 혈장치료, 단클론 항체 치료제, 리바비린, 펜시클로비르, 니타코사니드, 나파모스태트, 램테시비르, 파비피라비르, 클로로퀸, 칼레트라, 아비간, 아르비들, 갈리데시비르, 다루나비르 등을 들 수 있다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명의 약제학적 조성물은 안전하고 유효하게 코비드-19 감염증 또는 감염에 따른 증상을 완화, 예방하거나 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 코비드-19 접종 후 3 일째부터 7 일째까지 G1(정상군: 미처리 대조군), G2(감염군: 코비드-19 감염 및 치료제 미투여), G3(치모모듈린 투여군: 코비드-19 감염 및 치모모듈린 투여)의 육안상 출혈 및 손상 수준을 비교하기 위한, hamster의 폐 사진이다.
- 도 2는 코비드-19 접종 후 4일째, 5일째, 6일째, 및 7일째의 G1, G2, G3의 바이러스 접종 전 체중 기준 변화율을 도시한 그래프이다.
- 도 3은 코비드-19 접종 후 3일째, 5일째, 및 7일째의 G1, G2, G3의 폐포의 염증세포 침윤 수준을 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 코비드-19 접종 후 3일째, 5일째, 및 7일째의 G1, G2, G3의 간질의 염증세포 침윤 수준을 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 코비드-19 접종 후 3일째, 5일째, 및 7일째의 G2 및 G3의 부검한 폐조직에서 분리한 FAM(E gene)의 RNA 유전자 상대 발현율을 나타내는 그래프이다.
- 도 6는 코비드-19 접종 후 3일째, 5일째, 및 7일째의 G2 및 G3의 부검한 폐조직에서 분리한 RED(RdRP gene)의 RNA 유전자 상대 발현율을 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 코비드-19 접종 후 3일째, 5일째, 및 7일째의 G2 및 G3의 부검한 폐조직에서 분리한 Cy5(N gene)의 RNA 유전자 상대 발현율을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나, 이들 실시 예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 국한되는 것은 아니다.

[0027] 실험예 1

- [0028] Syrian hamster(생산자 및 공급원: JANVIRER LABS (프랑스)/새론바이오)의 4주령의 수컷 33마리(체중 80-100g)를 온도 23±3 °C, 상대습도 55±15 %, 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12 시간 (오전 8 시 점등 ~ 오후 8 시 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정한 주식회사 노터스 설치류 사육구역에서 사육하였다. 사육기간 중 동물실의 온/습도, 환기횟수 및 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정하였다. 환경측정 결과, 시험의 결과에 나쁜 영향을 끼칠만한 이상은 관찰되지 않았다. 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 물은 정수된 물을 폴리카보네이트제 음수병을 이용하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

- [0030] 상기 햄스터를 아래 표와 같이 G1(정상군: 미처리 대조군), G2(감염군: 코비드-19 감염 및 치료제 미투여), G3(치모모듈린 투여군: 코비드-19 감염 및 치모모듈린 투여)으로 무작위로 나누었다:

[0031] [표 1]

[0032] 시험군의 구성

군	동물수 (마리)	감염 유무	시험물질	투여경로	투여량 (mg/kg)	투여역량 (mL/kg)
G1	9	-	정상군	-	-	2
G2	9	+	감염군	-	-	2
G3	15	+	치모모듈린 투여군	경구투여	100	2

- [0033]
- [0034] G3군에 투여되는 치모모듈린은 다음 방법으로 제조되었다: 치모모듈린 분말 가루 5 g(공급처: 삼익제약(주))을 칭량한 후 증류수 100 mL을 넣고 10 분간 교반하여 제조하였다.

- [0035] 바이러스 감염은 공시 바이러스인 SARS-CoV-2 (NCCP43326)를 계대 배양하여 10⁴ TCID50/mL의 바이러스를 PBS 용액에 준비하여 사용하였으며, 이 바이러스 용액 200 μL를 햄스터의 좌측 비강으로 투여하여 감염시켰다(G2군

및 G3군).

[0036] G3군은 총 8주간 치모모듈린을 상기 용량으로 1일 1회 경구 투여하였고, 코비드-19로 감염시킨 후 동일 용량으로 추가 1주간 투여를 지속하여 총 9주간 치모모듈린을 투여하였다.

[0037] G2군은 상기 G3군과 동일한 시기에 동일한 방법으로 코비드-19로 감염시켰다.

[0039] **실험예 2 : 관찰항목 및 시험방법 및 그 결과**

[0041] **1. 일반증상 관찰**

[0042] 바이러스 접종 직후부터 7 일 동안 매일 일반증상으로서 생존율과 체중 변화를 관찰하였다. 이상이 있을 경우에만 임상증상 관찰기록지에 이상증상, 정도 및 관찰시간 등을 기록하였다. 일반증상 관찰 결과, 전 실험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았으며, 시험물질 투여에 의한 특이증상은 관찰되지 않았다.

[0044] **2. 체중측정**

[0046] 바이러스 접종 당일부터 7 일 동안 매일 전자저울을 이용하여 개체별 체중을 측정하여 기록하고, DPI 0 대비 체중의 변화율을 아래 표 2에 나타내었다:

[0047] [표 2]

BODY WEIGHTS				UNIT: % to 0 DPI
DPI	GROUPS			
	G1	G2	G3	
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	
1	100.33 ± 0.87	95.52 ± 2.61***	96.28 ± 0.72***	
2	100.17 ± 0.97	93.76 ± 2.67***	94.57 ± 1.00***	
3	100.04 ± 0.51	91.40 ± 2.59***	92.31 ± 1.32***	
4	99.36 ± 0.84	87.21 ± 2.55***	92.70 ± 5.61 ^{*,#}	
5	99.76 ± 0.64	83.67 ± 2.73***	93.03 ± 5.33 ^{*,###}	
6	99.98 ± 0.60	82.56 ± 2.02***	95.11 ± 5.31 ^{##}	
7	100.01 ± 0.76	79.08 ± 2.16***	94.48 ± 5.72 ^{##}	
N	9	9	15	

DPI: days post-infection.

Data were expressed as Mean±S.D.

G1: Normal control, G2: Vehicle control, G3: SI-TM200508

***/**/* A significant difference at p<0.001/p<0.01/p<0.05 level compared to the G1.

###/##/# A significant difference at p<0.001/p<0.01/p<0.05 level compared to the G2.

() : Survived animal

[0048]

[0049] 체중 측정 결과, 바이러스 접종 후 1 일째부터 5 일째까지 감염군 (G2) 및 SI-TM200508 (치모모듈린) 투여군 (G3)의 체중 수준은 정상군 (G1)에 비하여 유의하게 낮았으며 (p<0.001, p<0.01 또는 p<0.05), 바이러스 접종 후 6 일째부터 7 일째까지 G2의 체중 수준은 G1에 비하여 유의하게 낮았다 (p<0.05). 바이러스 접종 후 4 일째부터 7 일째까지 G3의 체중 수준은 G2에 비하여 유의하게 높았다 (p<0.001, p<0.01 또는 p<0.05)(도 2 참조).

[0050] 상기 결과는 코비드-19 감염으로 인한 체중 감소를 치모모듈린 투여로 유의하게 완화시킬 수 있음을 의미한다.

[0052] **3. 부검 및 조직병리**

[0053] 바이러스 접종 직후부터 지정된 일별로 부검하였다. 바이러스 접종 후 3 일째 G1 군과 G2 군에서 각 군당 3 마리, 5 일째에 3 마리, 7 일째에 3 마리 부검하여 폐조직에서 보이는 병변 부위 일부를 NBF에 고정하여 H&E 염색

후 검경하였다. G3 군의 경우 바이러스 접종 후 3 일째 5 마리, 5 일째에 5 마리, 7 일째에 5 마리를 부검하여 폐조직에서 보이는 병변 부위 일부를 NBF에 고정하여 H&E 염색 후 검경하였다. 상기 폐포 및 간질의 염증성 세포 침윤 정도를 관찰하고 그 결과를 아래 표 3 내지 표 4에 나타내었다(도 3 내지 도 4 참조) :

[표 3]

HISTOPATHOLOGICAL EXAMINATION				UNIT: score	
INFLAMMATORY CELL INFILTRATION, ALVEOLAR SPACE					
DPI	GROUPS				
	G1	G2		G3	
3	0.0 ± 0.0	2.0 ± 1.7		2.4 ± 1.3	
5	0.0 ± 0.0	2.0 ± 1.7		1.6 ± 1.5	
7	0.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0*		1.0 ± 0.7*	
N	9	9		15	

DPI: days post-infection.

Data were expressed as Mean±S.D.

** A significant difference at p<0.01 level compared to the G1.

A significant difference at p<0.05 level compared to the G2.

[표 4]

HISTOPATHOLOGICAL EXAMINATION				UNIT: score	
INFLAMMATORY CELL INFILTRATION, INTERSTITIAL					
DPI	GROUPS				
	G1	G2		G3	
3	0.0 ± 0.0	2.0 ± 1.0		2.0 ± 0.7*	
5	0.0 ± 0.0	1.7 ± 1.5		2.0 ± 1.0	
7	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.6*		0.2 ± 0.4*	
N	9	9		15	

DPI: days post-infection.

Data were expressed as Mean±S.D.

* A significant difference at p<0.05 level compared to the G1.

A significant difference at p<0.05 level compared to the G2.

G1은 전체 부검 기간 동안 조직병리 결과에서 이상병변이 관찰되지 않았으며, 바이러스 접종 후 7 일째에 G2의 폐포의 염증세포 침윤 수준은 G1에 비하여 유의하게 높았으며 (p<0.01), G3의 폐포 염증세포 침윤 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮았다 (p<0.05)[표 3 참조]. 바이러스 접종 후 7일째의 G2의 간질 염증세포 침윤 수준은 G1에 비하여 유의하게 높았으며 (p<0.05), G3의 간질 염증세포 침윤 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮았다 (p<0.05) [표 4 참조]. 또한 G3는 G2에 비하여 폐조직의 울혈 및 출혈 수준이 낮았다.

상기 결과는 코비드-19 감염으로 야기되는 폐포 및 간질의 염증세포 침윤, 울혈 및 출혈 등의 병리학적인 결과들이 치모모듈린 처리에 의해 감소되거나 완화될 수 있음을 의미한다.

추가로 바이러스 접종 후 3 일째, 5 일째 및 7 일째에서 부검한 폐 조직의 육안 소견을 평가하였다. G1은 전체 부검 기간 동안 육안 소견에서 이상병변이 관찰되지 않았다. 바이러스 접종 후 3 일째부터 7 일째까지 G3의 육안상 출혈 및 손상 수준은 G2 대비 적게 관찰되었음을 도 1a 내지 도 1c의 폐 사진을 통해 확인할 수 있다. 도 1a는 바이러스 접종 후 3 일째의 G1, G2, G3군의 폐 사진이고, 도 1b는 바이러스 접종 후 5일째의 G1, G2, G3군의 폐 사진이며 도 1c는 바이러스 접종 후 7일째의 G1, G2, G3군의 폐 사진이다.

4. Real time RT-PCR

[0064] 부검시 채취한 폐 조직에서 보이는 병변 부위 일부를 RNA extraction 하여 Seegene Allplex 2019-nCoV assay kit (Cat no. RP10243X)를 통해 바이러스 잔존량을 평가하였다. 평가 방법은 다음과 같다:

[0065] 병변 부위 일부 (약 1 g)를 EP-TUBE에 넣고, RNA prep 하였다. GeneAll 사의 키트를 사용하였으며 방법은 제조사의 방법을 따라 진행하였다 (GeneAll hybrid-R RNA purification kit; GeneAll, 3033522).

[0066] 분리한 RNA를 nanodrop (Take3 Multi-Volume plate, BioTeK, Instruments, VT, USA)을 이용하여 정량한 뒤, 각 실험군별로 동일한 농도 (100 ng/ μ L)로 희석하였다.

[0067] 동량으로 희석된 RNA template를 Seegene Allplex 2019-nCoV assay kit (Cat no. RP10243X)를 사용하여 FAM, HEX, RED, Cy5 파장에서 각각의 유전자 발현을 확인하였다. Real time RT-PCR 조건은 키트에 동봉된 제조사의 방법을 따라 진행하였다. 이중 바이러스 관련된 유전자 확인을 위하여 FAM (E gene), RED (RdRP gene) 및 Cy5 (N gene) 이용하였고, HEX를 이용한 Internal control gene의 발현 유무를 확인함으로써 Real time PCR 수행의 신뢰성을 확보하였다. 또한 이후 결과 확인 부분에서 internal control gene의 ct value 값을 이용하여, 해당 virus gene ct value 값들을 normalization 시켜서 유전자 발현 정도를 확인하여 비교하였다.

[0068] 상기 FAM, RED, 및 Cy5는 코비드-19를 구성하는 단백질 유전자로 코비드-19 감염 여부를 확인하는 진단 검사에 이용되고 있으며, 이들 각각 또는 모두의 존재를 확인하면 감염 양성으로 진단하고 있다.

[0069] 바이러스 접종 후 3 일째, 5 일째 및 7 일째에서 부검한 폐조직에서 분리한 RNA의 바이러스 유전자 발현량을 확인하고 (FAM: E gene, RED: RdRP gene, Cy5: N gene), 그 결과를 표 5 내지 표 7에 나타내었다(도 5 내지 도 7 결과 참조).

[0070] [표 5]

REAL TIME RT-PCR		UNIT: Relative Fold to G2	
FAM (E gene)			
DPI	GROUPS		
	G1	G2	G3
3	- ± -	1.00	1.238 ± 0.584
5	- ± -	1.00	0.685 ± 0.220*
7	- ± -	1.00	0.221 ± 0.275**
N	9	9	15

:- Not applicable.

DPI: days post-infection.

Data were expressed as Mean \pm S.D.

##/# significant difference at p<0.01/p<0.05 level compared to the G2.

[0071]

[0072] [표 6]

REAL TIME RT-PCR		UNIT: Relative Fold to G2	
RED (RdRP gene)			
DPI	GROUPS		
	G1	G2	G3
3	- ± -	1.00	0.272 ± 0.329**
5	- ± -	1.00	0.512 ± 0.724
7	- ± -	1.00	0.000 ± 0.000***
N	9	9	15

:- Not applicable.

DPI: days post-infection.

Data were expressed as Mean \pm S.D.

###/## significant difference at p<0.001/p<0.01 level compared to the G2.

[0073]

[0074] [표 7]

REAL TIME RT-PCR		UNIT: Relative Fold to G2	
Cy5 (N gene)			
DPI	GROUPS		
	G1	G2	G3
3	- ± -	1.00	0.038 ± 0.057###
5	- ± -	1.00	0.358 ± 0.450#
7	- ± -	1.00	0.009 ± 0.017###
N	9	9	15

-: Not applicable.

DPI: days post-infection.

Data were expressed as Mean±S.D.

###/# A significant difference at p<0.001/p<0.05 level compared to the G2.

[0075]

[0077]

Real time RT-PCR 결과, 바이러스 접종 후 5 일째 및 7 일째 G3의 FAM 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮았다. (p<0.01/p<0.05). 그리고 바이러스 접종 후 3 일째, 5 일째 및 7 일째 G3의 Cy5의 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮았다 (p<0.001/p<0.01/p<0.05). 또한 바이러스 접종 후 3 일째 및 7 일째 G3의 RED의 수준은 G2에 비하여 유의하게 낮았다(p<0.001/p<0.01). 상기 결과로부터 코비드-19 바이러스 증식이 치모모듈린 투여에 의해 효과적으로 억제되고 있음을 알 수 있다.

[0079]

상기 결과들의 통계 처리는, 자료의 정규성을 가정하였고, 모수적인 다중비교 (parametric multiple comparison procedures) 또는 비모수적인 다중비교 (non-parametric multiple comparison procedures)를 이용하여 분석하였다. 모수적 일원분산분석 (One-way ANOVA) 결과가 유의하였을 경우, Dunnett's multiple comparison test를 이용하여 사후검정을 실시하였고, 비모수적 Kruskal-Wallis'H-test 분석 결과가 유의하였을 경우, Mann Whitney U test를 이용하여 사후검정을 실시하였다.

[0081]

제조실시예 1 :치모모듈린 함유 캡슐제의 제조

[0082]

본 실시예에 따른 정제의 제조는 유효물질과 부형제를 1차적으로 혼합한 후, 활택제인 스테아르산마그네슘으로 2차 혼합을 진행하여 캡슐 충전하는 것을 기본으로 하였다.

[0083]

약리학적 활성성분인 치모모듈린 (전염성 해면상뇌증감염을 방지하기 위하여 대한민국산, 뉴질랜드산, 중국산, 브라질산 등의 건강한 소에서 흉선을 채취하여 처리공정 후 제조) 80mg에 부형제로써 이산화규소 5mg, 미결정셀룰로오스 30mg, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘 120mg, 인산수소칼슘수화물 10mg을 드립형 또는 브이형 혼합기에 투입하여 25±1분 동안 균질하게 혼합하였다. 이후 활택제로써 스테아르산마그네슘 5mg 을 첨가하여 5±1분 동안 균질하게 2차 혼합하였다.

[0084]

상기 혼합된 혼합분말을 캡슐체에 충전하여 치모모듈린 함유 캡슐제를 제조하였다.

[0086]

제조실시예 2 :치모모듈린 함유 정제의 제조

[0087]

본 실시예에 따른 정제의 제조는 유효물질과 부형제를 1차적으로 혼합한 후, 활택제인 스테아르산마그네슘으로 2차 혼합을 진행하여 직접 타정하는 것을 기본으로 하였다.

[0088]

약리학적 활성성분인 치모모듈린 (전염성 해면상뇌증감염을 방지하기 위하여 대한민국산, 뉴질랜드산, 중국산, 브라질산 등의 건강한 소에서 흉선을 채취하여 처리공정 후 제조) 80mg에 부형제로써 이산화규소 5mg, 미결정셀룰로오스 52mg, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘 120mg, 인산수소칼슘수화물 10mg을 드립형 또는 브이형 혼합기에

투입하여 25±1분 동안 균질하게 혼합하였다. 이후 활택제로서 스테아르산마그네슘 3mg 을 첨가하여 5±1분 동안 균질하게 혼합하였다.

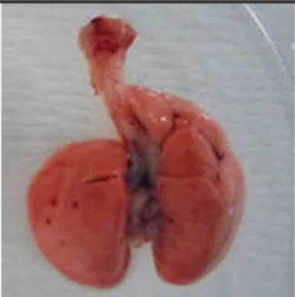
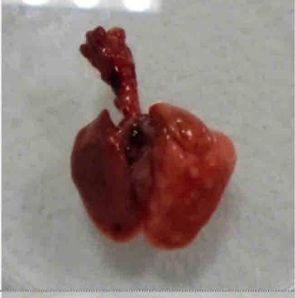
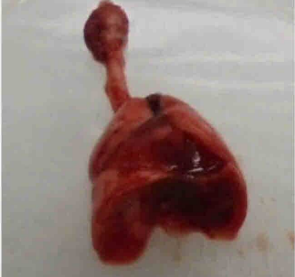
[0089] 상기 혼합된 혼합분말을 로터리타정기를 이용하여 총 중량 270밀리그램, 평균 경도 10±5 Kp으로 타정하여 정제를 제조하였다.

[0091] **제조실시예 3 :치모모듈린 함유 내용 액제의 제조**

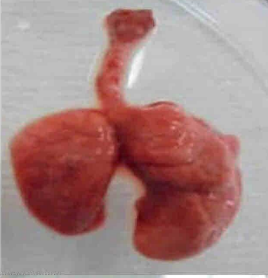

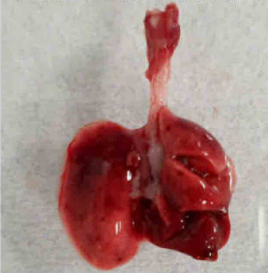
[0092] 약리학적 활성성분인 치모모듈린 (전염성 해면상뇌증감염을 방지하기 위하여 대한민국산, 뉴질랜드산, 중국산, 브라질산 등의 건강한 소에서 흉선을 채취하여 처리공정 후 제조) 400mg에 정제수 80mL, 농글리세린 10mL 및 에탄올 적량을 가하여 약 1시간 교반하여 녹이고, 70% D-소르비톨액, 시트르산수화물을 적량씩 첨가하고, 미생물 번식 방지를 위하여 보존제로 벤조산나트륨 또는 파라옥시벤조산메틸 또는 파라옥시벤조산프로틸을 적량씩 첨가 후 약 30분 교반 후 정제수로 100mL로 맞추어 액제를 제조하였다.

도면

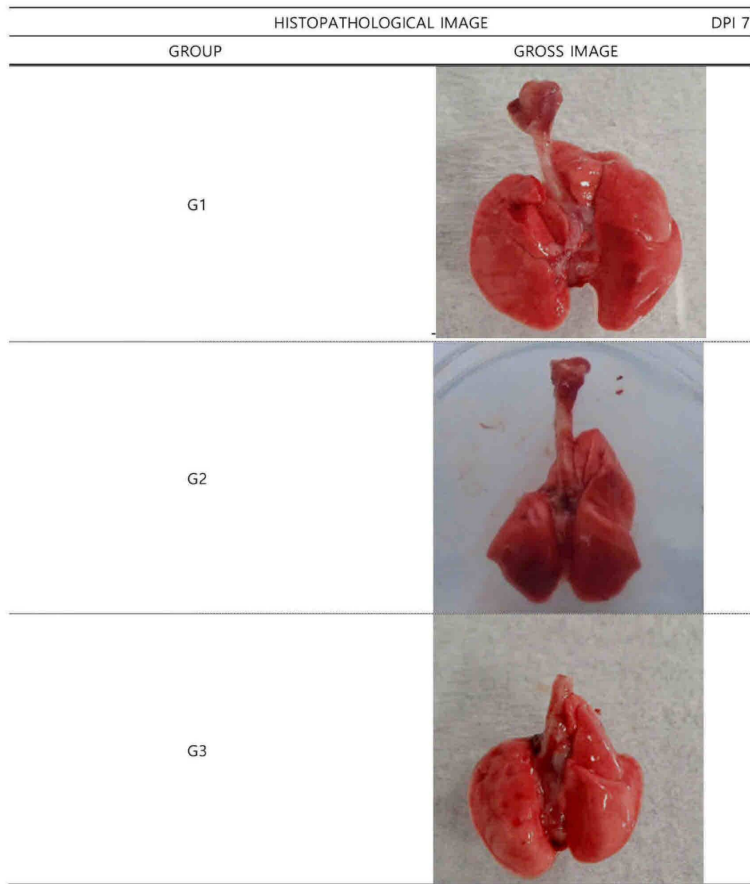
도면1a

HISTOPATHOLOGICAL IMAGE		DPI 3
GROUP	GROSS IMAGE	
G1		
G2		
G3		

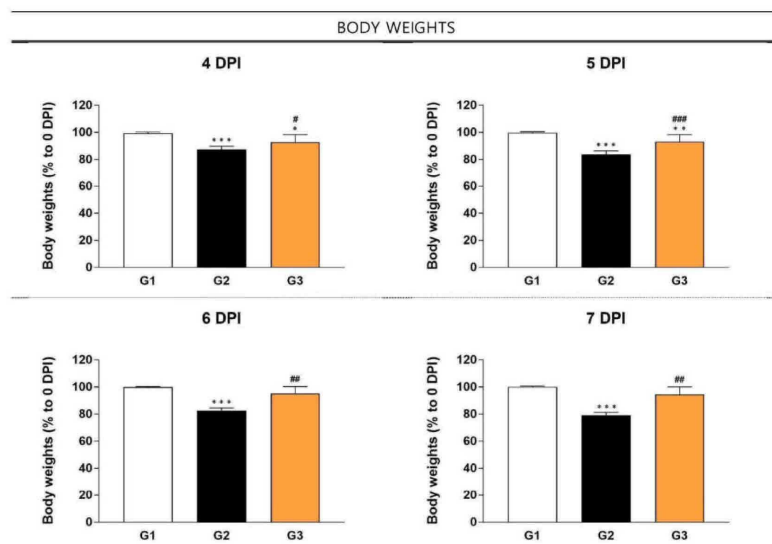
도면1b

GROUP	GROSS IMAGE	DPI 5
G1		
G2		
G3		

도면1c



도면2



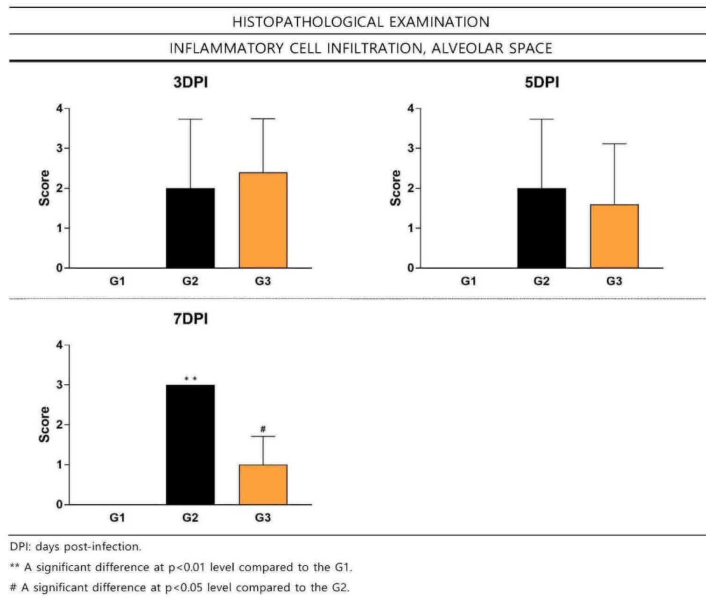
DPI: days post-infection.

Data were expressed as Mean±S.D.

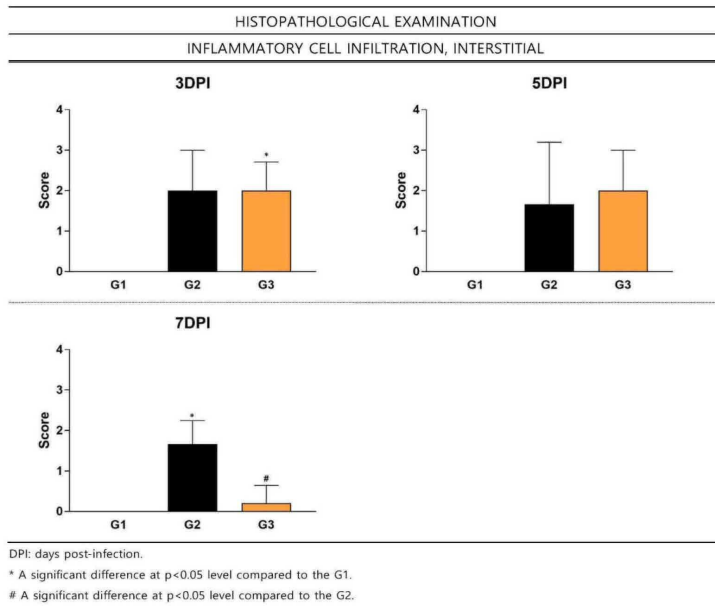
***/**/ A significant difference at p<0.001/p<0.01/p<0.05 level compared to the G1.

###/##/# A significant difference at p<0.001/p<0.01/p<0.05 level compared to the G2.

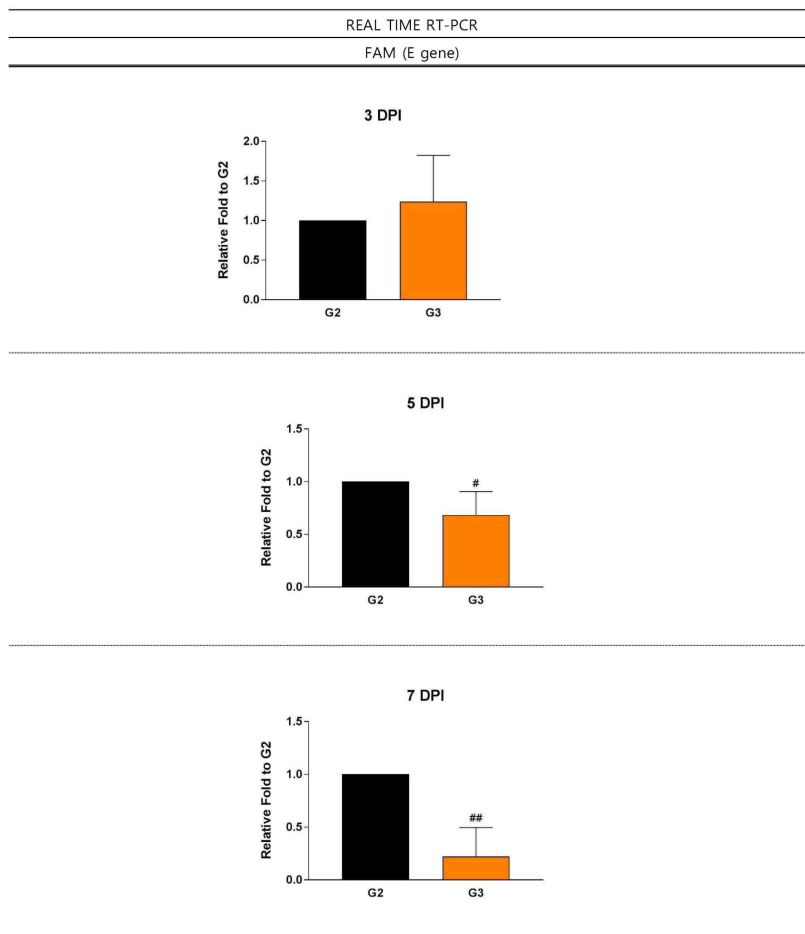
도면3



도면4



도면5

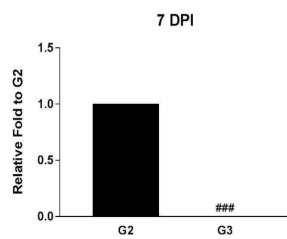
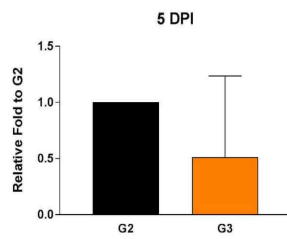
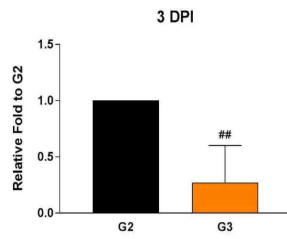


DPI: days post-infection.
Data were expressed as Mean±S.D.
##/# A significant difference at $p<0.01/p<0.05$ level compared to the G2.

도면6

REAL TIME RT-PCR

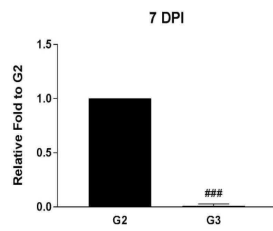
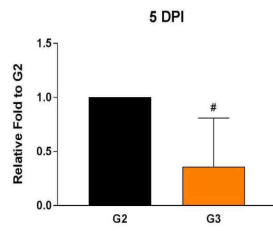
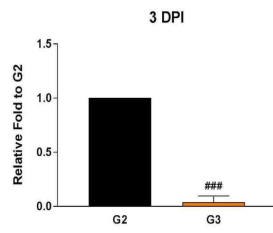
RED (RdRP gene)



DPI: days post-infection.
 Data were expressed as Mean±S.D.
 ###/## A significant difference at p<0.001/p<0.01level compared to the G2.

도면7

REAL TIME RT-PCR
Cy5



DPI: days post-infection.

Data were expressed as Mean±S.D.

###/# A significant difference at $p < 0.001/p < 0.05$ level compared to the G2.