



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0049121
(43) 공개일자 2020년05월08일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/428</i> (2006.01) <i>A23K 20/137</i> (2016.01)
 <i>A61P 31/12</i> (2006.01)
 (52) CPC특허분류
 <i>A61K 31/428</i> (2013.01)
 <i>A23K 20/137</i> (2016.05)
 (21) 출원번호 10-2018-0132013
 (22) 출원일자 2018년10월31일
 심사청구일자 2018년10월31일</p> | <p>(71) 출원인
 계명대학교 산학협력단
 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
 전북대학교 산학협력단
 전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567 (덕진동1가)
 (72) 발명자
 서영호
 대구광역시 수성구 청수로 261, 1410동 1301호 (황금동, 캐슬골드파크 4단지)
 김원일
 전라북도 전주시 덕진구 호성로 170, 308동 403호 (호성동2가, 진흥더블파크3단지아파트)
 탁동섭
 전라북도 익산시 고봉로5길 23, 카카오빌 404호
 (74) 대리인
 특허법인태백</p> |
|--|---|

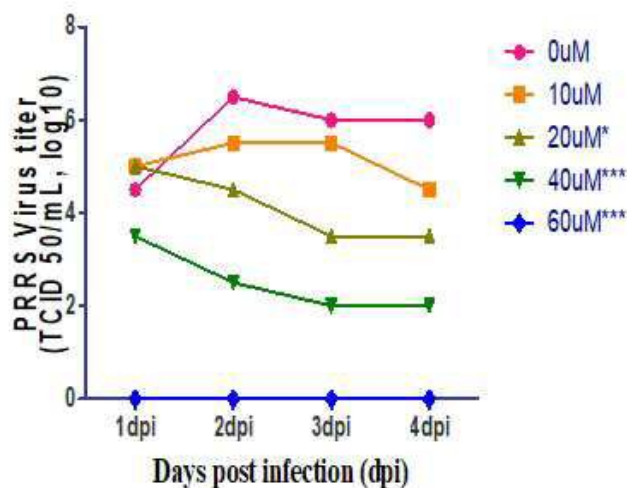
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **항바이러스 조성물**

(57) 요약

본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학 조성물을 제공한다. 또한, 상기 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 동물 의약품 조성물 및 사료 첨가제 조성물을 제공한다. 상기 화합물은 세포 독성을 나타내지 않으면서 돼지생식기호흡기증후군 바이러스와 돼지유행성설사증 바이러스 등의 증식 및 감염을 억제할 수 있어, 상기 바이러스에 의한 질병의 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/12 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545015678

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 가축질병대응개발사업

연구과제명 항바이러스 제제 합성 및 라이브러리 구축

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2017.09.05 ~ 2018.09.04

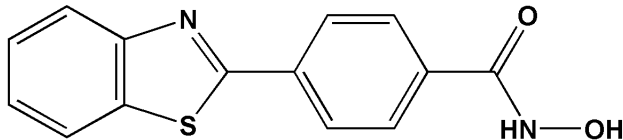
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

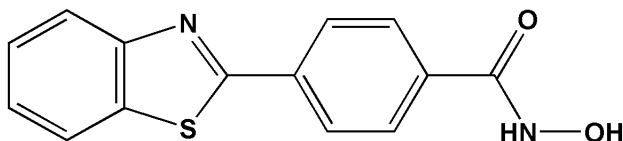
제 1 항에 있어서,

상기 바이러스는 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus; PRRSV), 돼지유행성설사증 바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus; PEDV), 돼지전염성위장염 바이러스(Transmissible Gastroenteritis Virus; TGEV), 돼지 쉰코 바이러스 2형(Porcine circovirus type 2; PCV-2), 소 바이러스성설사증 바이러스(Bovine Viral Diarrhea Virus; BVDV), 다양한 종의 로타바이러스(Rotavirus), 코로나바이러스(Coronavirus), 파보바이러스(Parvovirus), 칼리시바이러스(Calicivirus), 램도바이러스(Rhabdovirus), 인플루엔자바이러스(Influenza virus), 플라비바이러스(Flavivirus), 피코르나바이러스(Picornavirus), 페스티바이러스(Pestivirus), 버나바이러스(Birnavirus), 레트로바이러스(Retrovirus) 및 헤르페스바이러스(Herpesvirus)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 약학 조성물.

청구항 3

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 동물 의약품 조성물.

[화학식 1]



청구항 4

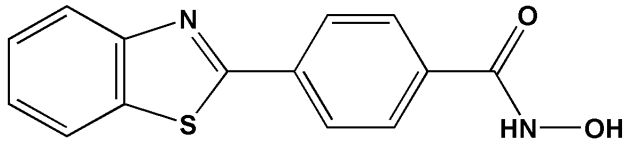
제 3 항에 있어서,

상기 바이러스는 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus; PRRSV), 돼지유행성설사증 바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus; PEDV), 돼지전염성위장염 바이러스(Transmissible Gastroenteritis Virus; TGEV), 돼지 쉰코 바이러스 2형(Porcine circovirus type 2; PCV-2), 소 바이러스성설사증 바이러스(Bovine Viral Diarrhea Virus; BVDV), 다양한 종의 로타바이러스(Rotavirus), 코로나바이러스(Coronavirus), 파보바이러스(Parvovirus), 칼리시바이러스(Calicivirus), 램도바이러스(Rhabdovirus), 인플루엔자바이러스(Influenza virus), 플라비바이러스(Flavivirus), 피코르나바이러스(Picornavirus), 페스티바이러스(Pestivirus), 버나바이러스(Birnavirus), 레트로바이러스(Retrovirus) 및 헤르페스바이러스(Herpesvirus)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 동물 의약품 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 사료 첨가제 조성물.

[화학식 1]



청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 조성물은 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus; PRRSV), 돼지유행성설사증 바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus; PEDV), 돼지전염성위장염 바이러스(Transmissible Gastroenteritis Virus; TGEV), 돼지 쉰개 바이러스 2형(Porcine circovirus type 2; PCV-2), 소 바이러스성설사증 바이러스(Bovine Viral Diarrhea Virus; BVDV), 다양한 종의 로타바이러스(Rotavirus), 코로나바이러스(Coronavirus), 파보바이러스(Parvovirus), 칼리시바이러스(Calicivirus), 램도바이러스(Rhabdovirus), 인플루엔자바이러스(Influenza virus), 플라비바이러스(Flavivirus), 피코르나바이러스(Picornavirus), 페스티바이러스(Pestivirus), 버나바이러스(Birnavirus), 레트로바이러스(Retrovirus) 및 헤르페스바이러스(Herpesvirus)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 바이러스의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 사료 첨가제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항바이러스 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 바이러스(virus)란 라틴어로 독성물질을 의미하며, 세균여과지(0.22 μ m)를 통과하는 일군의 감염형 병원성 입자를 의미한다. 바이러스는 숙주 세포의 종류에 따라 박테리오파지, 식물 바이러스 또는 동물 바이러스로 분류되기도 하며, 핵산의 종류에 따라 DNA 바이러스 또는 RNA 바이러스로 분류되기도 한다.

[0003] 돼지생식기호흡기증후군(Porcine reproductive and respiratory syndrom; 이하, PRRS)은 PRRS 바이러스에 의한 질병으로, 자돈이나 육성돈이 PRRS 바이러스에 감염되면 기침, 호흡곤란, 폐렴 등 호흡기 증상을 보이고, 모돈의 경우 임신 말기에 유산 및 조산을 나타내거나 허약자돈을 분만하며, 수컷의 경우 정액성상의 이상을 일으키는 등, 호흡기 증상으로 인한 성장 부진과 번식 장애를 일으킨다.

[0004] 돼지유행성설사병(Porcine epidemic diarrhea; 이하, PED)은 PED 바이러스의 감염에 의하여 연령에 관계없이 발생하는 돼지의 전염병으로, 구토, 거식증, 탈수, 및 체중 감소 등 돼지전염성위장염(transmissible gastroenteritis; 이하 TGE)과 매우 유사한 증상을 야기하는 심각한 소화기 질환이다. PED 바이러스는 어느 연령의 돼지에게나 감염될 수 있지만, TGE와 더불어 포유자돈(sucker) 설사병 중 가장 피해가 심한 질병이다.

[0005] 다양한 형태의 예방 백신, 항생제가 개발되어 세균(박테리아)에 의해 야기되는 질병은 어느 정도 예방되고 있으나, 바이러스가 일으키는 각종 질병에 대한 치료 및 예방에 대한 효과적인 치료제는 아직까지 없고, 오히려 환경오염 등으로 인하여 바이러스 질병은 더욱 늘어나고 있다. 최근 들어, 신종 플루, AI, 구제역 등 다양한 바이러스 질병이 사회적으로 큰 문제를 일으키고 있고, 동물만을 감염시켰던 일부 병원체가 돌연변이나 어떤 유전적 변화를 통해 새로운 바이러스로 태어나 이전에는 감염시키지 못했던 인간을 감염시키는 문제도 발생하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1671376호 (2016.10.26. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해, 본 발명은 항바이러스용 약학 조성물을 제공한다.

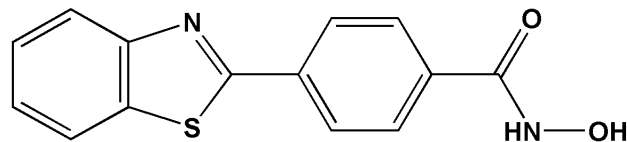
[0008] 본 발명은 항바이러스용 동물 의약품 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명에 따른 항바이러스용 약학 조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] 본 발명에 따른 항바이러스용 동물 의약품 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[0014] 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 화합물은 세포 독성을 나타내지 않으면서 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(PRRSV)와 돼지유행성설사증 바이러스(PEDV) 등의 증식 및 감염을 억제할 수 있어, 상기 바이러스에 의한 질병의 치료제로 유용하게 사용될 수 있다. 상기 화합물을 포함하는 약학 조성물, 동물 의약품 조성물 및 사료 첨가제 조성물을 이용함으로써, 이러한 바이러스에 의한 질병 등을 효과적으로 예방하거나 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 실험예 1에 따른 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(PRRSV)에 대한 화합물 9b의 항바이러스 효과를 나타낸다.

도 2는 본 발명의 실험예 1에 따른 돼지유행성설사증 바이러스(PEDV)에 대한 화합물 9b의 항바이러스 효과를 나타낸다.

도 3은 본 발명의 실험예 2에 따른 MARC-145 세포에서 화합물 9b의 세포독성 분석 결과이다.

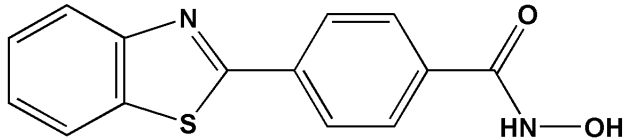
도 4는 본 발명의 실험예 2에 따른 배로 세포에서 화합물 9b의 세포독성 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학 조성물 또는 항바이러스용 동물 의약품 조성물을 제공한다.

[0020] [화학식 1]



[0021]

[0022] 본 발명에 따른 상기 화합물은 4-(벤조[d]티아졸-2-일)-N-하이드록시벤즈아미드[4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-N-hydroxybenzamide]로, 하기 실시예에 따르면, 상기 화합물이 10 내지 60 μ M, 바람직하게는 40 내지 60 μ M 포함된 배지에서 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(Porcine reproductive and respiratory syndrom virus; 이하, PRRSV)의 VR2332와 돼지유행성설사증 바이러스(Porcine epidemic diarrhea virus; 이하, PEDV)의 DR13의 복제 및 증식이 억제되는 동시에 세포 독성은 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 이를 통해, 상기 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 함유하는 조성물이 항바이러스 효과를 가짐을 알 수 있다. 보다 상세한 내용은 하기 실시예에서 후술한다.

[0024] 본 발명에 따른 항바이러스용 약학 조성물 또는 동물 의약품 조성물에서, 상기 바이러스는 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus; PRRSV), 돼지유행성설사증 바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus; PEDV), 돼지전염성위장염 바이러스(Transmissible Gastroenteritis Virus; TGEV), 돼지 쉼코 바이러스 2형(Porcine circovirus type 2; PCV-2), 소 바이러스성설사증 바이러스(Bovine Viral Diarrhea Virus; BVDV), 다양한 종의 로타바이러스(Rotavirus), 코로나바이러스(Coronavirus), 파보바이러스(Parvovirus), 칼리시바이러스(Calicivirus), 램도바이러스(Rhabdovirus), 인플루엔자바이러스(Influenza virus), 플라비바이러스(Flavivirus), 피코르나바이러스(Picornavirus), 페스티바이러스(Pestivirus), 버나바이러스(Birnavirus), 레트로바이러스(Retrovirus) 및 헤르페스바이러스(Herpesvirus)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0025] 본 발명에 따른 항바이러스용 약학 조성물에서, 상기 바이러스는 기존에는 동물만을 감염시켰으나 변형에 의해 이전에는 감염시키지 못했던 인간을 감염시키는 바이러스, 사람과 동물이 함께 감염되는 인수공통의 변종 바이러스를 포함할 수 있다. 예를 들어, 포유류와 조류에서 호흡기 질환을 일으키는 RNA 바이러스인 코로나 바이러스는 현재까지의 연구에 따르면 중증급성호흡기증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS)인 사스의 원인 병원체로, 사람에게 감염되어 발열과 기침, 호흡곤란, 비정형 폐렴 등 증상을 보이며 전 세계로 확산되고 있다. 또한, 과거 사람에게서는 발견되지 않은 새로운 유형의 코로나바이러스 감염으로 인한 중증 급성 호흡기 질환 중 하나인 메르스(Middle East Respiratory Syndrome; MERS)는 최근 중동지역의 아라비아 반도를 중심으로 감염환자가 발생하고 있다. 그 외에도 인플루엔자 바이러스, 헤르페스 바이러스 등이 있고, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에 따른 항바이러스용 동물 의약품 조성물에서, 상기 바이러스는 바람직하게는, 돼지생식기호흡기증후군 바이러스, 돼지유행성설사증 바이러스일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에 따른 조성물은 상기 약제학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있고, 상기 염은 그것이 투여되는 유기체에 대해 상당한 자극을 야기하지 않는 화합물의 염으로, 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 소실시키지 않는다.

[0029] 상기 염은 약제학적으로 허용 가능한 염기성 염 또는 산성 염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있다. 예를 들어, 염기성 염은 유기염기염, 무기염기염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있으며, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아미늄(aminium)염, 암모늄염, 트리에틸아미늄염 및 피리디늄염으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 산성 염은 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 푸마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캄페르산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 무기산으로는 염산, 유기산으로는 메탄설폰산을 사용할 수 있다.

- [0031] 또한, 본 발명에 따른 상기 화합물은 약제학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 화합물에서, 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물을 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세트론, 메탄올, 에탄올, 또는 아세트니트릴 등에 녹이고 과량의 유기염기를 가하거나 무기염기의 염기 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 또는, 이 혼합물에서 용매나 과량의 염기를 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 약학 조성물 또는 동물 의약품 조성물은 상기 제형에 따라 약제학적으로 허용가능한 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하여 제조할 수 있다. 상기 "약제학적으로 허용가능한"이란, 상기 약학 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.
- [0035] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 약학 조성물 또는 동물 의약품 조성물의 제형은 사용 방법에 따른 바람직한 형태일 수 있고, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화 할 수 있다. 예를 들어, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 약학 조성물 또는 동물 의약품 조성물을 상기 형태로 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다.
- [0038] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0039] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 약학 조성물 또는 동물 의약품 조성물에 있어서, 상기 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 상기 "약제학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 건강상태, 폐양의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 "환자"는 바이러스의 직접적 또는 간접적 원인에 의해 유발된 질환을 가지고, 본 발명에 따른 조성물 투여에 의하여 증상이 호전될 수 있는 인간을 비롯하여, 돼지, 소, 닭, 염소, 양, 말, 어류, 개, 고양이 등의 동물을 포함한다. 본 발명에 따른 조성물을 환자에게 투여함으로써, 상기 바이러스에 의한 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 본 발명에 따른 조성물을 기존의 치료제와 병행하여 투여할 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 약학 조성물 또는 동물 의약품 조성물의 유효성분인 화합물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중, 질환에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 0.001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 화합물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0043] 상기 약학 조성물 또는 동물 의약품 조성물은 상기 동물 및 인간에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모

든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 기관지내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

[0046] 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물에서, 상기 조성물은 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(Porcine Respiratory Reproductive Syndrome Virus; PRRSV), 돼지유행성설사증 바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus; PEDV), 돼지전염성위장염 바이러스(Transmissible Gastroenteritis Virus; TGEV), 돼지 썩코 바이러스 2형(Porcine circovirus type 2; PCV-2), 소 바이러스성설사증 바이러스(Bovine Viral Diarrhea Virus; BVDV), 다양한 종의 로타바이러스(Rotavirus), 코로나바이러스(Coronavirus), 파보바이러스(Parvovirus), 칼리시바이러스(Calicivirus), 램도바이러스(Rhabdovirus), 인플루엔자바이러스(Influenza virus), 플라비바이러스(Flavivirus), 피코르나바이러스(Picornavirus), 페스티바이러스(Pestivirus), 버나바이러스(Birnavirus), 레트로바이러스(Retrovirus) 및 헤르페스바이러스(Herpesvirus)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 바이러스의 활성을 억제할 수 있다.

[0048] 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물에서, 상기 사료는 일반적으로 가축 사육에 사용되는 공지된 구성의 사료로, 시판되고 있는 일반 사료를 모두 포함할 수 있다. 상기 사료는 곡물, 식물성 단백질 사료, 동물성 단백질 사료, 당분 및 유제품을 포함할 수 있다. 예를 들어, 미강, 옥수수, 대두박, 콩, 수수, 쌀, 보리, 밀, 귀리, 호밀, 좁쌀, 메밀, 티리티게일, 고구마, 타피오카, 밀기울, 맥강, 대두피, 옥수수겨, 맥아근, 전분박, 커피박, 잠분, 잠사, 해조분, 면실박, 채종박, 캐놀라밀, 임자박, 호마박, 아마박, 해바라기씨박, 낙화생박, 야자박, 옥수수 글루텐, 주정박, 옥수수 배아박, 고추씨박, 루핀종실, 어분, 우모분 및 육분을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0049] 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물에서, 상기 사료 첨가제는 일반적인 사료 첨가제, 예를 들면, 소금, 골분, 인산 칼슘제, 무기물 혼합제, 비타민제, 아미노산제, 향생물질, 호르몬제 등의 특수목적에 위한 사료 첨가제를 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물은 돼지, 소, 닭, 염소, 양, 말, 어류, 개 및 고양이로 이루어진 군에서 선택되는 동물의 사료에 첨가될 수 있고, 바람직하게는 돼지의 사료에 첨가될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 조성물의 투여량은 투여대상이 되는 동물의 종류, 동물의 나이, 동물의 체중, 동물의 예방하고자 하는 질병, 원하는 효과 등에 따라 당해 분야의 전문가가 적절히 조절할 수 있다.

[0052] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0054] [합성 준비]

[0055] 모든 시약과 용매는 상업적 공급자로부터 구매하여, 추가 정제 없이 사용되었다. 습기에 민감한 화합물을 다루는 실험은 아르곤 대기하에서 수행되었다. 감압 농축 또는 용매 제거는 회전 농축기(Rotary evaporator)를 이용하여 수행되었다. 분석용 박층 크로마토그래피(Analytical thin layer chromatography)는 UV 광하에서의 가시화 또는 요오드 가스를 이용한 염색에 의해 프리코팅(precoat)된 실리카 겔 F₂₅₄ TLC 플레이트(E, Merck) 상에서 수행되었다. 컬럼 크로마토그래피(Column chromatography)는 중압 하의 실리카(Merck Silica Gel 40-63m) 상에서 수행되거나 미리 충전된 실리카 겔 카트리지(Biotage)와 함께 바이오타지(Biotage) SP1 플래시 정제 시스템을 이용함으로써 수행되었다. NMR 분석은 조엘 공명(Jeol resonance)에 의해 제작된 JNM-ECZ500R(500 MHz)을 이용하여 수행되었다.

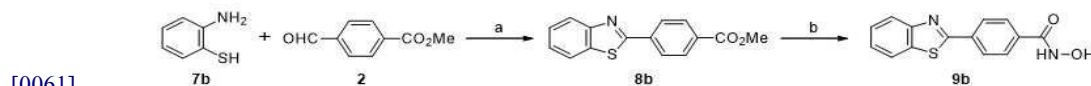
[0056] 화학적 이동(Chemical shifts, δ)은 백만분율로 보고되었다. 시료 용매의 중수소 락 시그널(deuterium lock signal)은 기준 물질로서 사용되었고, 결합 상수(Coupling constants, J)는 헤르츠(Hz) 단위로 나타내었다. 본

할 패턴의 약어는 다음과 같다: s, 싱글렛(singlet); d, 더블렛(doublet); t, 트리플렛(triplet); q, 쿼텟(quartet); dd, 더블렛 오브 더블렛(doublet of doublets); td, 트리플렛 오브 더블렛(triplet of doublet); m, 멀티플렛(multiplet).

[0057] 모든 최종 화합물의 순도는 VP-ODS C18 칼럼이 장착된 이중 펌프 시마즈(Shimadzu) LC-6AD 시스템으로 수행된 분석 HPLC에 의해 95% 이상인 것으로 확인되었다.

[0059] [실시예 1] 화합물 합성

[0060] [반응식 1]



[0062] 상기 반응식 1은 본 발명에 따른 조성물에 함유되는 화합물(9b)에 대한 합성 과정을 나타낸다. 상기 반응식 1을 참조하면, 화합물 8b는 2의 알데히드와 함께 해당 출발 물질인 7b의 2-아미노티오펜올(2-aminothiophenol)의 요오드-매개 고리화에 의해 35% 수율로 합성되었다. 메탄올에서 수산화암모늄 및 수산화칼륨과의 에스터 8b의 순차적 처리는 성공적으로 42% 수율로 화합물 9b를 수득하였다. 보다 상세하게는 하기와 같다.

[0064] 1) 화합물 8b : 메틸 4-(벤조[d]티아졸-2-일)벤조에이트 [Methyl 4-(benzo[d]thiazol-2-yl)benzoate]

[0065] 2-아미노티오펜올(1.71 mL, 15.98 mmol)과 메틸 4-포르밀벤조에이트(methyl 4-formylbenzoate, 2.62 g, 15.98 mmol)가 디클로로메탄(dichloromethane, 100ml)에 용해되고, 실온의 아르곤 대기하에서 4시간 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 요오드(iodine, 1.01 g, 7.99 mmol)에 첨가되고 실온의 오픈 플라스크에서 45분 동안 교반되었다. 혼합물은 감압 농축 및 컬럼에 의해 정제되어 35% 수율의 화합물 8b를 수득하였다. $R_f = 0.31$ (1:9 = 에틸 아세테이트:헥산).

[0066] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.15-8.14 (m, 4H), 8.09 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.51 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.41 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.95 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 166.5, 154.2, 137.6, 135.4, 132.2, 130.4, 129.7, 127.6, 126.7, 125.8, 123.7, 121.9, 52.5.

[0068] 2) 화합물 9b : 4-(벤조[d]티아졸-2-일)-N-하이드록시벤즈아미드 [4-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-N-hydroxybenzamide]

[0069] 0℃에서 메탄올(5 mL)에 용해된 염산 하이드록실아민(Hydroxylamine hydrochloride, 43.44 g, 3.02 mmol)이 메탄올(5 mL)에 용해된 수산화칼륨(potassium hydroxide, 43.44 g, 2.24 mmol) 용액에 첨가되었다. 혼합물은 0℃에서 15분 동안 교반되고, 침전된 염화칼륨(potassium chloride)이 제거된 후 여액은 그대로 사용되었다; 0℃에서 테트라하이드로푸란(tetrahydrofuran, 10 mL)에 용해된 화합물 8b(0.26 g, 0.79 mmol) 용액이 새로 제조된 하이드록실아민(hydroxylamine)에 첨가되고 동일 온도에서 2시간 동안 교반되었다. 혼합물은 3N HCl에 의해 pH 7로 중화되었고, 에틸 아세테이트로 추출되었다. 유기층은 황산나트륨(Na_2SO_4)에 의해 건조되고, 감압 농축되었으며, MPLC로 정제하여 42% 수율의 화합물 9b를 수득하였다. $R_f = 0.30$ (7:3 = 에틸아세테이트:헥산).

[0070] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.41 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.19-8.17 (m, 3H), 8.10 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.57 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.49 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 166.4, 163.2, 153.5, 135.1, 135.0, 134.7, 127.9, 127.2, 126.9, 125.9, 123.1, 122.5. ESI MS (m/e) 271.05 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0072] [실험예 1] 항바이러스 분석(Antiviral assay)

[0073] 1. 실험 방법

[0074] MARC-145 세포는 6-웰(well) 세포 배양 플레이트(BD, Falcon)에 실험 시작 24시간 내지 48시간 전에 준비되었다. 그리고 나서, 세포 단층은 감염 2시간 전에 5개의 다른 농도(0, 10, 20, 40 및 60 μ M)의 화합물 9b를 포함한 성장 배지로 전처리되었다. 전처리 배양 후, 그 세포 단층은 0.001의 감염 다중도(multiplicity of infection; MOI)로 VR2332(PRRSV의 프로토타입)를 접종한 성장 배지로 세척되고, 1시간 더 배양되었다. 마지막 1시간 배양 후, 바이러스 접종물(virus inoculum)은 폐기되고, 세포 단층은 처리로서 동일 농도의 화합물 9b를 포함한 성장 배지가 공급되었고, 동일 배양 조건에서 4일 더 배양되었다. 세포 배양 상등액은 매일 24시간 수집되어 원심분리되고, 분석할 때까지 -80°C 에서 저장되었다. 자손 바이러스 역가(progeny virus titers)를 미세 적정 감염성 분석(microtitration infectivity assay)을 이용하여 측정하였다. 바이러스 역가 분석(virus titration assay)은 세포 변성 효과(cytopathic effect; CPE)를 기초로 계산되고, 50% 조직배양 감염량(TCID₅₀)을 산출하여 나타낸다. 동일 과정은 베로 세포(Vero cell) 및 DR13(PEDV의 프로토타입 변형)을 이용한 PEDV에 대한 화합물 9b의 항바이러스 효과 평가에도 적용되었다.

[0076] 2. 실험 결과

[0077] 도 1은 본 발명의 실험예 1에 따른 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(이하, PRRSV)에 대한 화합물 9b의 항바이러스 효과를 나타낸다. 도 1을 참조하면, 화합물 9b는 농도 의존적으로 MARC-145 세포에서 VR2332 복제를 감소시켰다.

[0078] PRRSV 복제에서 화합물 9b의 항바이러스성 효과는 PRRSV 복제에 대한 MARC-145 세포에서 평가되었다. PRRSV는 돼지폐포대식세포, MA104 세포주, MARC-145 세포주 등 특정 세포에서 특이적으로 증식하기 때문에, 상기 실험예 1은 MARC-145 세포를 이용하여 진행하였다.

[0079] MARC-145 세포에서, 화합물 9b의 농도가 0, 10, 20, 40, 60 μ M로 증가할수록 PRRSV의 역가가 감소하여 VR2332 복제가 대체적으로 감소하는 것으로 나타났다. 특히, 화합물 9b가 20 μ M 또는 40 μ M 농도일 때, 각각 대략 100 또는 1000배 정도 감소되었고, 화합물 9b의 농도가 60 μ M 일 때, 바이러스의 성장이 완전히 억제되었다.

[0081] 도 2는 본 발명의 실험예 1에 따른 돼지유행성설사증 바이러스(이하, PEDV)에 대한 화합물 9b의 항바이러스 효과를 나타낸다. 도 2를 참조하면, 화합물 9b는 농도 의존적으로 베로 세포에서 DR13 복제를 감소시켰다.

[0082] PEDV 복제에서 화합물 9b의 항바이러스성 효과는 PEDV 복제에 대한 베로 세포에서 평가되었다. 베로 세포는 아프리카 초록 원숭이의 신장 상피 세포로부터 유래된 세포로, 연속 계대 세포주(Continuous cell line)로서 광견병 백신, 소아마비 백신, 일본뇌염 백신 등 광범위한 바이러스 백신 생산에 사용된다.

[0083] 베로 세포에서, 감염 2일 이후부터 화합물 9b의 농도가 0, 10, 20, 40, 60 μ M로 증가할수록 대체적으로 DR13 복제가 감소하는 것으로 나타났다. 특히, 화합물 9b의 농도가 40 μ M 일때는 감염 후 4일에 바이러스 성장이 완전히 억제되었고, 화합물 9b의 농도가 60 μ M 일때는 감염 후 3일에 완전히 억제되었다.

[0085] [실험예 2] 세포 독성 분석(Cell cytotoxicity assay)

[0086] 1. 실험 방법

[0087] 화합물 9b의 세포독성 효과는 MTT[3(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드, 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide](MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 MARC-145 세포에서 평가되었다. 간략하게, MARC-145 세포 및 PAMs는 96-웰 세포 배양 플레이트(BD, Falcon)에 준비되었고 화합물 9b(0, 10, 20, 40 및 60 μ M)를 포함하는 성장 배지로 24시간 및 48시간 동안 처리되었다. 배양 이후, 세포 상등액은 버리고, 새로 제조된 MTT(5 mg/ml) 용액 20 μ l이 성장 배지와 함께 각 웰에 첨가되었다. 그리고 나서, 세포는 동일 조건에서 3시간 더 배양되었다. 배양 후, MTT 용액은 제거되고, 플레이트는 65°C 에서 밤새 건조되었다. 그 후, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO, Hybri-Max®, Sigma-Aldrich) 200 μ l는 포르마잔 크리스탈(formazan crystals)을 용해시키기 위해 각 웰에 첨가되었다. 플레이트는

540 nm의 흡광도에서 효소 결합 면역 흡착 분석(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 MTT 신호를 측정하기 전에 5-10분 동안 37°C에서 더 배양하여 기포를 용해시켰다. 동일 과정은 PEDV에 대한 평가와 관련된 배로 세포를 이용한 화합물 9b의 세포독성 평가에도 적용되었다.

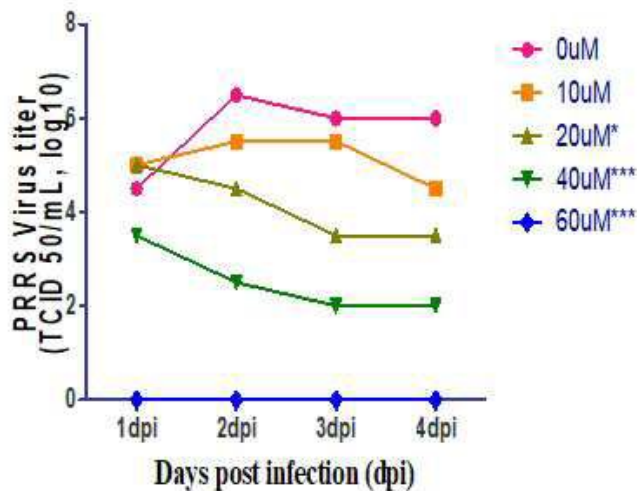
[0089] 2. 실험 결과

[0090] 도 3 및 도 4는 본 발명의 실험예 2에 따른 MARC-145세포 또는 배로 세포에서 화합물 9b의 세포독성 분석 결과이다. 도 3 및 도 4를 참조하면, 기초하여, 화합물 9b는 MARC-145세포 또는 배로 세포에 처리 후 48 시간까지 60 μ M의 농도에서도 주요한 독성을 더 이상 보이지 않았다.

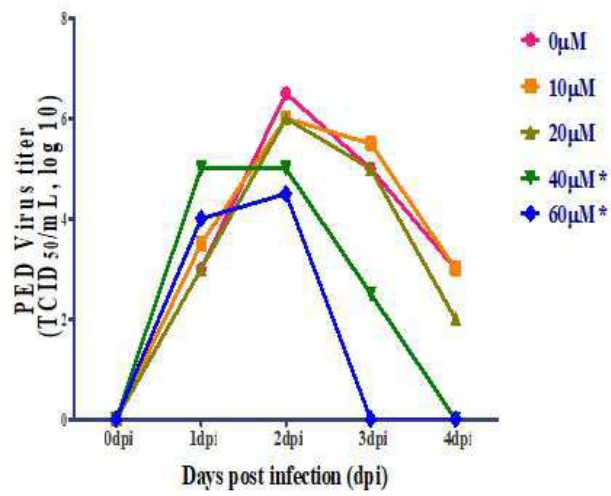
[0092] 이제까지 본 발명에 대한 구체적인 실시예들을 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

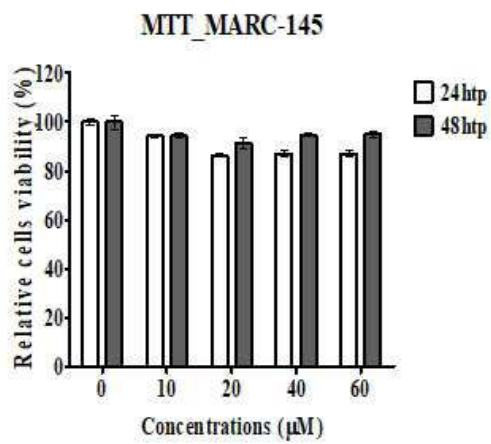
도면1



도면2



도면3



도면4

