



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0120436
(43) 공개일자 2019년10월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/426 (2006.01) *A61K 31/215* (2006.01)
A61K 31/351 (2006.01) *A61K 31/454* (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01) *A61K 31/675* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *H01L 31/12* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/426 (2013.01)
A61K 31/215 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7030422(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년06월23일
 심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2018-7008142
 원출원일자(국제) 2010년06월23일
 심사청구일자 2018년03월22일
- (85) 번역문제출일자 2019년10월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/039638
- (87) 국제공개번호 WO 2010/151577
 국제공개일자 2010년12월29일
- (30) 우선권주장
 61/220,891 2009년06월26일 미국(US)
- (71) 출원인
 로마크 레버리토리즈, 엘.씨.
 미합중국 플로리다주 33607-8416 탐파 스위트 200
 베이포트 드라이브 3000
- (72) 발명자
 로시그놀, 진-프랑코이스
 미국 33710 플로리다주 세인트 피터스버그 파크
 스트리트 510
 샘플, 제이., 에드워드
 미국 33624 플로리다주 탐파 애틀리 플레이스
 13715
- (74) 대리인
 양영준, 김영

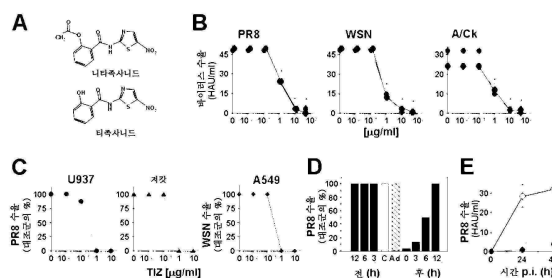
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 인플루엔자를 치료하기 위한 화합물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 화학식 I의 화합물을 사용하여 인플루엔자 바이러스 HA 성숙 과정을 억제함으로써 인플루엔자 감염을 치료 및 예방하는 방법에 관한 것이다. 이것은 또한 화학식 I의 화합물 및 기타 작용제를 포함하는, 인플루엔자 감염을 치료 및 예방하기 위한 조합물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/351 (2013.01)

A61K 31/454 (2013.01)

A61K 31/496 (2013.01)

A61K 31/675 (2013.01)

A61K 31/7105 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 48/005 (2013.01)

H01L 31/125 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

바이러스 감염의 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 본원에 개시된 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 바이러스 감염을 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2009년 6월 26일 출원된 미국 가출원 제61/220,891호로부터의 우선권을 주장하며, 그의 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 본 발명은 티아졸리드를 사용하여 인플루엔자 감염을 치료 및 예방하는 방법 및 생성물에 관한 것이다.

[0004] 모든 연령 집단에 영향을 미치는 고도로 전염성인 급성 호흡기 질병인 인플루엔자는 미국에서 단독으로 해마다 약 36,000건의 사망 및 226,000건을 초과하는 입원을 유발한다. 그의 핵단백질 및 매트릭스 단백질의 항원 차이 (유형 A, B 및 C로) 분류되는 인플루엔자 바이러스는 외피로 둘러싸인 음성-가닥 RNA 바이러스이고; A 유형이 임상적으로 가장 중요하다. 인플루엔자 A 바이러스의 수많은 아형은 그의 2종의 표면 당단백질인 헤마글루티닌 ("HA") 및 뉴라미니다제 ("NA")에서 차이가 있으며, 이는 보호 면역 반응의 주요 표적이고, 헤마글루티닌 (H 숫자로 표시됨) 및 뉴라미니다제 (N 숫자로 표시됨)의 유형에 따라 라벨링된다. HA 및 NA는 항원 소변이 및 항원 대변이의 결과로서 계속적으로 변한다. 16종의 H 아형 (또는 "혈청형") 및 9종의 N 아형이 알려져 있다.

[0005] 고도로 병원성인 인플루엔자 A 바이러스주, 예컨대 새로운 H1N1 돼지 인플루엔자의 발생은 전지구적 인간 건강에 특히 심각한 위협을 나타낸다. 감시 및 조기 진단에 더하여, 발생하는 인플루엔자 바이러스주를 제어하기 위한 노력은 효과적인 백신 및 신규 항바이러스 약물 둘 다의 개발을 강조하여 왔다.

[0006] 인플루엔자 A 바이러스 헤마글루티닌은 바이러스주에 따라 서브유닛당 3 내지 9개의 N-연결 글리코실화 시퀀 (sequon)을 함유하는 삼량체 당단백질이다. HA는 처음에 소포체에서 75-79 kDa 전구체 (HA0)로서 합성 및 코어-글리코실화되고, 이는 비공유적으로 연결된 동중-삼량체로 조립된다. 삼량체는 신속하게 골지 복합체로 수송되고 원형질 막에 도달하며, 여기서 HA 삽입은 새롭게 형성된 바이러스 입자의 조립 및 성숙 과정을 개시한다. 원형질 막으로의 삽입 직전에 또는 그와 동시에, 각각의 삼량체 서브유닛은 단백질분해적으로 2종의 당단백질 HA1 및 HA2로 절단되며, 이들은 디설피드 결합에 의해 연결된 채로 남아 있다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 엔도글리코시다제 소화에 대한 내성에 선행하는 단계에서 바이러스 헤마글루티닌의 성숙을 차단함으로써 바이러스 감염을 치료 및 예방하는 방법에 관한 것이다. 치료 및 예방은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 단독으로 또는 기타 작용제와 조합하여 투여함으로써 수행된다. 화학식 I의 화합물은 바이러스 표면 단백질 HA의 성숙을 선택적으로 차단하고 그에 의해 세포내 트래픽킹 및 숙주 세포 원형질 막으로의 삽입을 약화시키는 신규 메카니즘을 통해 항바이러스 활성을 나타낸다. 예비 결과는 화학식 I의 화합물이 인플루엔자 A 감염에 대해 효과적인 새로운 항바이러스 약물 클래스를 구성함을 시사한다. 본 발명은 또한 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 유효량의 추가 항바이러스제 또는 면역자극제 또는 백신을 함유하는, 항바이러스 요법에서의 개별적, 동시적 또는 순차적 사용을 위한 조합 제제로서의 생성물을 제공한다.

[0008] 간단한 설명

[0009] 본 발명은 인플루엔자 바이러스 HA 성숙을 억제함으로써 인플루엔자 감염을 치료 및 예방하기 위해 화학식 I의

티아졸리드를 사용하는 방법, 제약 조성물 및 조합 제제에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 조합 제제, 제약 조성물 및 치료 방법에서 항바이러스제는 1 내지 4종의 화합물 또는 제제를 포함할 수 있고, 또한 백신 및/또는 면역자극제를 포함할 수 있다.

- [0010] 한 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 에스테르 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공하거나 고려한다.
- [0011] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 또 다른 항바이러스제를 포함하는, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물을 제공하거나 고려한다.
- [0012] 보다 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 뉴라미니다제 억제제를 포함하는, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물을 제공하거나 고려한다.
- [0013] 또 다른 보다 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 면역자극제를 포함하는, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물을 제공하거나 고려한다.
- [0014] 또 다른 보다 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 PEG화 인터페론을 포함하는, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물을 제공하거나 고려한다.
- [0015] 또 다른 보다 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 제조합 시알리다제 융합 단백질을 포함하는, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물을 제공하거나 고려한다.
- [0016] 또 다른 보다 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 백신을 포함하는, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물을 제공하거나 고려한다.
- [0017] 또 다른 보다 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물을 제공하거나 고려한다.
- [0018] 또 다른 보다 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 또 다른 항바이러스제를 포함하며 상기 2종의 작용제가 실질적으로 동시에 투여되는 것인, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물을 제공하거나 고려한다.
- [0019] 또 다른 보다 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 또 다른 항바이러스제를 포함하며 상기 2종의 작용제가 순차적으로 투여되는 것인, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물을 제공하거나 고려한다.
- [0020] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여함으로써 바이러스 감염을 치료 및 예방하는 방법을 제공한다.
- [0021] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 면역자극제와 조합하여 투여함으로써 바이러스 감염을 치료 및 예방하는 방법을 제공한다.
- [0022] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 뉴라미니다제 억제제와 조합하여 투여함으로써 바이러스 감염을 치료 및 예방하는 방법을 제공한다.
- [0023] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 백신과 조합하여 투여함으로써 바이러스 감염을 치료 및 예방하는 방법을 제공한다.
- [0024] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 안티센스 올리고뉴클레오티드와 조합하여 투여함으로써 바이러스 감염을 치료 및 예방하는 방법을 제공한다.
- [0025] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 아다만틴 유사체와 조합하여 투여함으로써 바이러스 감염을 치료 및 예방하는 방법을 제공한다.
- [0026] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 뉴라미니다제 억제제를 포함하는, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물 팩 또는 키트를 제공한다.
- [0027] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 면역자극제를 포함하는, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물 팩 또는 키트를 제공한다.
- [0028] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 아다만틴 유사체를 포함하는, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물 팩 또는 키트를 제공한다.

[0029] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 제조합 시알리다제 융합 단백질을 포함하는, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물 팩 또는 키트를 제공한다.

[0030] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 인플루엔자를 치료하기에 유용한 조합물 팩 또는 키트를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도면 범례

도 1. 티아졸리드는 침입-후 수준에서 작용하는 인플루엔자 A 바이러스 복제를 억제한다. A, 니타족사니드 (NTZ) 및 티족사니드 (TIZ)의 구조. B, NTZ (청색 ●) 및 TIZ (적색 ●)는 MDCK 세포에서의 인간 (PR8, WSN) 및 조류 (A/Ck) 인플루엔자 A 바이러스주의 복제를 억제한다. 바이러스 수율은 p.i. 24시간째에 결정하였다. C, 인간 단핵구성 U937 (●) 및 T-림프모구양 저켓 (▲) 세포에서 인플루엔자 A PR8 바이러스, 및 인간 폐 상피 A549 세포 (■)에서 WSN 바이러스에 대한 TIZ의 항바이러스 활성. D, MDCK 세포를 감염 전 지시된 시간에 (전), 흡착 기간 직후에 (후), 또는 단지 흡착 기간 동안에만 (Ad, ☒) 10 µg/ml TIZ (■)로 처리하였다. □는 처리되지 않은 감염된 대조군 (C)을 나타낸다. E, 바이러스 흡착 후에 10 µg/ml TIZ (●) 또는 비히클 (○)로 처리된 PR8-감염된 MDCK 세포에서 TIZ의 장기 항바이러스 활성. B-E, 유사한 결과를 갖는 3회의 대표적인 실험으로부터의 중복 샘플의 평균±SD를 나타내는, HAU/ml로 (B 및 E) 또는 처리되지 않은 대조군의 백분율로서 (C 및 D) 나타낸 바이러스 수율. * = P < 0.01; ** = P < 0.05.

도 2. 티족사니드는 인플루엔자 헤마글루티닌 성숙을 선택적으로 변경한다. A, PR8 바이러스 단백질 합성의 동역학에 대한 TIZ의 효과. 바이러스 흡착 후에 10 µg/ml TIZ로 처리된 모의-감염 (U) 또는 PR8-감염된 세포로부터의, p.i. 다양한 시간에서의 [³⁵S]-Met/Cys-표지된 단백질 (1.5시간-펄스)의 오토라디오그래피 (상단). 바이러스 단백질을 표시하였다. 동일한 실험에서, 단백질 합성은 TIZ (●) 또는 비히클 (○)로 처리된 세포의 단백질로의 [³⁵S]-Met/Cys-혼입에 의해 결정하였고 (하단), 포스포-eIF-2α 단백질 수준은 항포스포Ser-51-eIF2α (p-eIF2α) 또는 eIF2α 범특이적 항체를 이용하는 면역블롯 분석에 의해 결정하였다 (중앙). B, p.i. 5시간째에 [³⁵S]-Met/Cys-표지 (4시간-펄스) 후, 항-HA 항체를 사용한 면역침전에 의한 헤마글루티닌 확인. 항체 첨가 전 (-αHA)의 동일한 샘플로부터의 면역침전된 단백질 (+αHA, IP) 및 방사성표지된 단백질을 나타내었다. HA 미절단된 전구체 (HA0)의 위치를 표시하였다. C, 바이러스 흡착 후에 10 µg/ml TIZ, 5 µg/ml 투니카마이신 (TM) 또는 비히클 (C)로 처리된 모의-감염 (U) 또는 PR8-감염된 세포로부터의 [³⁵S]-Met/Cys-표지된 단백질 (15시간-펄스)의 오토라디오그래피. ▷ 및 ◁는 각각 TM-유도된 GRP78/BiP 및 글리코실화되지 않은 HA0 [면역블롯에 의해 확인함 (제시되지 않음)]을 표시한다. D, A에서와 같이 처리된 PR8-감염된 세포로부터의 [³⁵S]-Met/Cys-표지된 단백질 (p.i. 5시간째에 15분-펄스, 이어서 지시된 시간 동안 추적)의 오토라디오그래피. A-D, 처리되지 않거나 TIZ-처리된 세포 내의 더 느리게-이동하는 HA0 형태 및 더 빠르게-이동하는 HA0 형태는 각각 * 및 ▶에 의해 확인된다.

도 3. 티아졸리드는 바이러스 헤마글루티닌 N-글리코실화를 방해한다. A, 모의-감염 (U) 또는 PR8-감염된 (PR8) MDCK 세포를 바이러스 흡착 후에 10 µg/ml TIZ, 5 µg/ml TM 또는 비히클 (C)로 처리하였다. p.i. 6시간째에, 세포를 [³⁵S]-Met/Cys (상단), [³H]-글루코사민 (중앙) 또는 [³H]-만노스 (하단)로 4시간 동안 표지하였다. 방사성표지된 샘플을 SDS-PAGE 및 오토라디오그래피를 위해 가공하였다. SDS/PAGE 겔로부터의 플루오로그래프의 단편을 나타내었다. ◁는 TM-유도된 Grp78/BiP를 표시한다. B, 모의-감염 (U) 또는 PR8-감염된 MDCK 세포를 바이러스 흡착 후에 10 µg/ml TIZ, 10 µg/ml 스와인소닌 (SW), 15 µg/ml 1-데옥시만노지리미신 (DMJ) 또는 비히클 (C)로 처리하였다. p.i. 6시간째에, 세포를 [³⁵S]-Met/Cys로 표지하고 (4시간-펄스), 방사성표지된 샘플을 SDS-PAGE 및 오토라디오그래피를 위해 가공하였다. C-D, 바이러스 흡착 후에 5 µg/ml TIZ, 5 µg/ml 투니카마이신 (TM) 또는 비히클 (C)로 처리된, 모의-감염 (U) 또는 WSN-감염된 (WSN) A549 세포 (C) 및 모의-감염 또는 조류 인플루엔자 A 바이러스-감염된 (A/Ck) MDCK 세포 (D)로부터의 방사성표지된 단백질의 오토라디오그래피. p.i. 3시간 (WSN) 또는 6시간 (A/Ck)째에, 세포를 [³⁵S]-Met/Cys로 15시간 (WSN) 또는 4시간 (A/Ck) 동안 표지하였다. E-F, 바이러스 흡착 후에 10 µg/ml TIZ, 10 µg/ml 니타족사니드 (NTZ) 또는 비히클 (C)로 처리된, 모의-감염 (U), PR8-감염 (PR8) (E) 또는 조류 인플루엔자 A 바이러스-감염된 (A/Ck) (F) MDCK 세포로부터의 방사성표지된 단백질의 오토라디오그래피. p.i. 6시간째에, 세포를 [³⁵S]-Met/Cys로 4시간 동안

표시하였다. A-F, 바이러스 단백질 HA0, NP, M1 및 NS1을 표시하였다. 처리되지 않거나 티아졸리드-처리된 세포 내의 더 느리게-이동하는 HA0 형태 및 더 빠르게-이동하는 HA0 형태는 각각 * 및 ►에 의해 확인된다.

도 4. 티록사니드는 HA 성숙을 Endo-H-민감성 단계에서 차단한다. A, 바이러스 흡착 후에 10 µg/ml TIZ (+) 또는 비히클 (-)로 처리된 모의-감염 (U) 또는 PR8-감염된 (PR8) MDCK 세포를 p.i. 5시간째에 [³⁵S]-Met/Cys로 표시하였다 (4시간-펄스). 방사성표지된 단백질을 PNGase-F 또는 Endo-H로 소화시키거나 (+) 또는 소화시키지 않고 (-), SDS-PAGE 및 오토라디오그래피를 위해 가공하였다. 미절단된 글리코실화 (HA0) 및 비글리코실화 (HAp) 헤마글루티닌 전구체 형태를 표시하였다. B, A에서와 같이 처리된 MDCK 세포를 p.i. 6시간째에 [³⁵S]-Met/Cys로 표시하였다 (4시간-펄스). 방사성표지된 단백질을 항-HA 항체 (α-HA)로 면역침전시키고, Endo-H로 소화시키거나 (+) 또는 소화시키지 않고 (-), SDS-PAGE를 위해 가공하였다. 플루오로그래프의 단편을 나타내었다. C, TIZ (+) 또는 비히클 (-)로 처리된 모의-감염된 (U) MDCK 세포 및 PR8-감염된 (PR8) MDCK 세포로부터의 전세포 추출물을 가교제 EGS (0.2 mM)와 함께 (+) 또는 이것 없이 (-) 인큐베이션하고, 항-HA 항체를 이용하는 웨스턴 블롯을 위해 가공하였다. HA 단량체 (1), 이량체 (2) 및 삼량체 (3)를 표시하였다. A-C, 처리되지 않거나 TIZ-처리된 세포 내의 더 느리게-이동하는 HA0 형태 및 더 빠르게-이동하는 HA0 형태는 각각 * 및 ►에 의해 확인된다. D, 항-p230 트랜스-글리코실화 (적색) 및 항-HA (녹색) 항체로 표시된, 24시간 동안 TIZ (5 µg/ml) 또는 비히클로 처리된 모의-감염된 (U) A549 세포 및 WSN-감염된 A549 세포의 면역형광. 핵은 DAPI (청색)로 염색하였다. 3종의 형광색소의 오버레이를 나타내었다 (병합). 확대된 영역 (삽입도)은 처리되지 않은 세포 및 TIZ-처리된 세포에서 HA의 위치결정을 강조한다. 영상을 SoftWoRx-2.50 소프트웨어를 사용하는 델타비전 현미경으로 캡처 및 디콘볼루션하였다. 막대=5 µm.

도 5. 티록사니드는 세포 표면으로의 인플루엔자 헤마글루티닌의 수송을 억제한다. A, 총 헤마글루티닌 (녹색) 및 α-튜불린 (적색) 수준을 p.i. 16시간째에 모의-감염된 (U) MDCK 세포 및 처리되지 않거나 TIZ-처리된 (10 µg/ml) PR8-감염된 MDCK 세포에서 간접 면역형광에 의해 검출하였다 (막대=10 µm). 핵은 DAPI (청색)로 염색하였다. 3종의 형광색소의 오버레이를 나타내었다 (병합). 영상을 SoftWoRx-2.50 소프트웨어를 사용하는 델타비전 현미경으로 캡처 및 디콘볼루션하였다. B, 원형질-막 헤마글루티닌 수준 (녹색)을 p.i. 16시간째에 10 µg/ml TIZ 또는 5 µg/ml TM으로 처리된 모의-감염 또는 PR8-감염된 세포에서 간접 면역형광 (상단)에 의해 검출하였다. 핵은 핵스트 33342 (청색)로 염색하였다. 영상을 A에서와 같이 가공하였다 (막대=10 µm). 2종의 형광색소의 오버레이를 나타내었다. p.i. 5시간째에 원형질-막 상에서의 적혈구 혈구흡착을 병행 샘플에서 나타내었다 (하단) (막대=35 µm). 결합된 적혈구의 헤모글로빈 수준을 분광광도측정법으로 정량화하였다 (λ=540 nm). 광학 밀도 (O.D.)로 표현된 데이터는, 유사한 결과를 갖는 2회의 대표적인 실험으로부터의 중복 샘플의 평균±SD를 나타낸다. *=감염-대조군과 대비하여 P<0.05. C, B에서와 같이 처리된 모의-감염 또는 PR8-감염된 세포의 상청액으로부터 p.i. 24시간째에 정제된 바이러스 입자에 혼입된 [³⁵S]-Met/Cys-표지된 단백질의 오토라디오그래피. 바이러스 단백질 (HA, NP, M1)을 표시하였다. D, 병행하여, 바이러스 수율을 p.i. 24시간째에 처리되지 않거나 (□) TIZ-처리된 (■) PR8-감염된 세포에서 감염력 검정 (상단) 및 적혈구응집 검정 (하단)에 의해 결정하였다. 각각 TCID50/ml 및 HAU/ml로 표현된 데이터는, 유사한 결과를 갖는 2회의 대표적인 실험으로부터의 중복 샘플의 평균±SD를 나타낸다. *=감염-대조군과 대비하여 P<0.05.

도 6. 3가지 농도의 자나미비르, 및 0.1 µg/ml의 니타록사니드와 조합된 자나미비르의 인플루엔자 A에 대한 항바이러스 활성. 자나미비르를 단독으로 0.01, 0.1 및 1.0 µM의 용량으로, 및 0.1 µg/ml의 NTZ의 존재 하에 인플루엔자 A (MDCK/PR8)에 대해 시험하였다.

도 7. 3가지 농도의 자나미비르, 및 1.0 µg/ml의 니타록사니드와 조합된 자나미비르의 인플루엔자 A에 대한 항바이러스 활성. 자나미비르를 단독으로 0.01, 0.1 및 1.0 µM의 용량으로, 및 1.0 µg/ml의 NTZ의 존재 하에 인플루엔자 A (MDCK/PR8)에 대해 시험하였다.

도 8. 3가지 농도의 오셀타미비르, 및 0.1 µg/ml의 니타록사니드와 조합된 오셀타미비르의 인플루엔자 A에 대한 항바이러스 활성. 오셀타미비르를 단독으로 0.01, 0.1 및 1.0 µM의 용량으로, 및 0.1 µg/ml의 NTZ의 존재 하에 인플루엔자 A (MDCK/PR8)에 대해 시험하였다.

도 9. 3가지 농도의 오셀타미비르, 및 1.0 µg/ml의 니타록사니드와 조합된 오셀타미비르의 인플루엔자 A에 대한 항바이러스 활성. 오셀타미비르를 단독으로 0.01, 0.1 및 1.0 µM의 용량으로, 및 1.0 µg/ml의 NTZ의 존재 하에 인플루엔자 A (MDCK/PR8)에 대해 시험하였다.

도 10. 인플루엔자 A 및 B 바이러스에 대한 티록사니드의 항바이러스 활성. A, MDCK 세포를 4종의 상이한 인

플루엔자 A 바이러스주인 포유동물 H1N1 PR8 및 WSN, 및 H3N2 A/FI, 및 H5N9 조류 바이러스주 A/Ck로 10 HAU/10⁵개 세포의 m.o.i.로 감염시키고, 흡착 기간 직후에 10 µg/ml TIZ (■) 또는 비히클 (□)로 처리하였다. 바이러스 수율을 p.i. 24시간째에 결정하였다. B, 인플루엔자 B 바이러스 (B/파르마/3/04)로 감염되고 바이러스 흡착 후에 10 µg/ml TIZ (●) 또는 비히클 (★)로 처리된 MDCK 세포에서 TIZ의 장기 항바이러스 활성. C-D, 단일-단계 (C) 및 다단계 (D) PR8 바이러스 성장 곡선을 A에서와 같이 10 (C) 또는 0.001 (D) ffu/세포의 m.o.i.로 감염되고 10 µg/ml TIZ (●) 또는 비히클 (★)로 처리된 MDCK 세포에 대해 수행하였다. 바이러스 수율은 p.i. 지시된 시간에 결정하였다. (A-D) 처리되지 않은 대조군의 백분율 (A)로서 또는 HAU/ml (B-D)로 표현된 바이러스 수율은, 유사한 결과를 갖는 3회의 대표적인 실험으로부터의 중복 샘플의 평균±SD를 나타낸다. **=P<0.01; ***=P<0.05.

도 11. 티족사니드는 인간 저-밀도 지단백질 수용체 (LDLR) 원형질 막 표적화에 영향을 미치지 않는다. MDCK 세포를 녹색 형광 단백질 (GFP)-태깅된 내재화-결여 인간 저-밀도 지단백질 수용체 돌연변이체 (LDLR-A18-GFP 플라스미드) (40)로 일시적으로 형질감염시키고, 8시간 후, 다음 16시간 동안 TIZ (10 µg/ml) 또는 비히클로 처리하였다. 단백질 합성을 시클로헥시미드로 1시간 동안 차단한 후, 원형질 막을 셀마스크™ 오렌지색 원형질 막 (PM) 색소를 사용하여 염색하고, UV 여기 필터가 장착된 라이카 DM-IL 형광 현미경을 이용하여 영상화하였다. 영상을 라이카 이미지-매니저500 소프트웨어를 사용하는 라이카 DC-300 카메라로 캡처하였다. LDLR-GFP (녹색) 및 PM (적색) 수준을, 처리되지 않거나 (상부 패널) TIZ 처리된 (하단 패널) 형질감염된 MDCK 세포에서 검출하였다. 2종의 형광색소의 오버레이를 나타내었다 (병합). 대표적인 실험의 동일한 영상의 단편 (막대=10 µm)을 나타내었다.

도 12. 니타족사니드는 인플루엔자-유사 질병과 관련된 증상을 해결할 수 있다.

도 13. 제7일 진찰 데이터- 니타족사니드는 후에 인플루엔자-유사 질병과 관련된 호흡기 증상을 감소시킨다.

도 14. 연구-후 항생제 사용.

도 15. 매일의 조직 수집물의 중량.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 본원에 사용된 하기 용어는 나타낸 의미를 갖는다.
- [0033] 달리 나타내지 않는 한, 부정관사는 "하나 이상"을 의미한다.
- [0034] 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 용어 "1개 이상의 치환기"는 1개 내지 이용가능한 결합 부위의 수에 기반하여 가능한 최대 개수의 치환기를 지칭한다.
- [0035] 본원에 사용된 용어 "치료"는 이러한 용어가 적용되는 장애 또는 상태, 또는 이러한 상태 또는 장애의 하나 이상의 증상을 예방하거나, 또는 그의 진행을 반전시키거나, 완화하거나, 억제하는 것을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "치료"는 치료하는 행위를 지칭한다 ("치료하는"은 바로 위에 정의되어 있는 바와 같음).
- [0036] 용어 "조합물", "조합 요법" 및 "병용 요법"은, 화학식 I의 화합물 및 또 다른 작용제의 통합된 작용으로부터 유익한 효과를 제공하도록 의도된 특정 치료 요법의 일부로서의, 이들 치료제의 투여를 포괄한다. 조합물의 유익한 효과는 치료제의 조합물로부터 초래되는 약동학적 또는 약력학적 공동-작용을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이들 치료제를 조합하여 투여하는 것은 전형적으로 규정된 기간 (선택된 조합물에 따라 보통 수분, 수 시간, 수일 또는 수주)에 걸쳐 수행된다.
- [0037] "조합 요법"은 일반적으로는 별도의 단일치료 요법의 일부로서 2종 이상의 이들 치료제를 투여하여 본 발명의 조합물이 우연적으로 및 인위적으로 생성되는 것을 포함하도록 의도되지 않는다. "조합 요법"은 실질적으로 동시적 방식으로의 또는 순차적 방식으로의 치료제의 투여를 포함하도록 의도된다. 실질적으로 동시적 투여는, 예를 들어 고정 비율의 치료제를 함유하는 단일 캡슐을 투여함으로써, 또는 각각의 치료제를 위한 단일 캡슐들을 투여함으로써 수행될 수 있다. 치료제의 순차적 투여 및 실질적으로 동시적 투여 둘 다는 경구 경로, 정맥 내 경로, 근육내 경로, 및 점막 조직을 통한 직접적인 흡수를 비롯한 (이에 제한되지는 않음) 임의의 적절한 경로에 의해 시행될 수 있다. 치료제는 동일한 경로에 의해 또는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 선택된 조합물의 제1 치료제는 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있는 반면, 조합물의 다른 치료제는 경구 투여될 수 있다. 대안적으로, 예를 들어 모든 치료제는 경구 투여될 수 있거나, 또는 모든 치료제는 정맥내 주사에 의해 투여될 수 있다. 치료제가 투여되는 순서는 결정적일 수 있거나, 또는 이것은 비-결정적일 수 있다.

"조합 요법"은 또한 다른 생물학적 활성 성분 (예컨대, 상이한 항바이러스제, 백신 또는 면역자극제 (이에 제한되는 않음)), 뿐만 아니라 영양 보충제를 비롯한 비-약물 요법과 추가로 조합된, 상기 기재된 바와 같은 치료제의 투여를 포괄할 수 있다.

[0038] 용어 "염"은 그의 가장 넓은 의미로 사용된다. 예를 들어, 용어 염은 본 발명의 화합물의 이온과의 수소 염 및 히드록시드 염을 포함한다. 일부 실시양태에서, 용어 염은 제약상 허용되는 염으로 지칭되는 하위클래스일 수 있고, 이는 약리 활성을 갖는 본 발명의 화합물의 염이고, 이는 생물학적으로도 또는 그외로도 바람직하다. 모든 실시양태에서, 염은 산과 형성될 수 있다 (예컨대, 비제한적으로 수소, 할라이드, 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠술포네이트, 비술페이트, 부티레이트, 시트레이트, 캄포레이트, 캄포르술포네이트, 시클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실술포에이트, 에탄술포네이트, 푸마레이트, 글루코헵타노에이트, 글리세로-포스페이트, 헤미술포에이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 히드로요오다이드, 2-히드록시에탄술포네이트, 락테이트, 말레에이트, 메탄술포네이트, 2-나프탈렌술포네이트, 니코티네이트, 옥살레이트, 티오시아네이트, 토실레이트 및 운데카노에이트). 모든 실시양태에서, 염은 염기와 형성될 수 있다 (예컨대, 비제한적으로 히드록시드, 암모늄 염, 알칼리 금속 염, 예컨대 리튬, 나트륨 및 칼륨 염, 알칼리 토금속 염, 예컨대 칼슘, 마그네슘 염, 알루미늄 염, 유기 염기, 예컨대 암모니아, 메틸아민, 디에틸아민, 에탄올아민, 디시클로헥실아민, N-메틸모르폴린, N-메틸-D-글루카민과의 염, 및 아미노산, 예컨대 아르기닌 및 리신과의 염). 염기성 질소-함유 기는 저급 알킬 할라이드, 예컨대 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 클로라이드, 브로마이드 및 요오다이드; 디알킬 술포에이트, 예컨대 디메틸, 디에틸, 디부틸 및 디아밀 술포에이트; 장쇄 할라이드, 예컨대 데실, 라우릴, 미리스틸 및 스테아릴 클로라이드, 브로마이드 및 요오다이드; 및 아르알킬 할라이드, 예컨대 벤질 및 페넬릴 브로마이드를 비롯한 작용제를 사용하여 4급화될 수 있다.

[0039] 본원에 사용된 용어 "치료상 허용되는 염" 및 "제약상 허용되는 염"은, 수용성 또는 유용성 또는 수분산성 또는 유분산성이고, 과도한 독성, 자극 및 알레르기 반응 없이 질환을 치료하기에 적합하고, 합리적인 이익/위험 비율에 상응하고, 그의 의도된 용도에 효과적인 본 발명의 화합물의 염 및 쓰비터이온 형태 둘 다를 나타낸다. 염은 화합물의 최종 단리 및 정제 동안 제조할 수 있거나, 또는 유리 염기 형태의 적절한 화합물을 적합한 산과 반응시킴으로써 별도로 제조할 수 있다. 대표적인 산 부가염은 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, L-아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠술포네이트 (베실레이트), 비술페이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르술포네이트, 시트레이트, 디글루코네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 겐티세이트, 글루타레이트, 글리세로포스페이트, 글리콜레이트, 헤미술포에이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 히푸레이트, 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 히드로요오다이드, 2-히드록시에탄술포네이트 (이세티오네이트), 락테이트, 말레에이트, 말로네이트, DL-만델레이트, 메시틸렌술포네이트, 메탄술포네이트, 나프틸렌술포네이트, 니코티네이트, 2-나프탈렌술포네이트, 옥살레이트, 파모에이트, 펙티네이트, 피술페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스포네이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 피로글루타메이트, 숙시네이트, 술포네이트, 타르트레이트, L-타르트레이트, 트리클로로아세테이트, 트리플루오로아세테이트, 포스페이트, 글루타메이트, 비카르보네이트, 파라-톨루엔술포네이트 (p-토실레이트) 및 운데카노에이트를 포함한다. 또한, 본 발명의 화합물 내의 염기성 기는 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 클로라이드, 브로마이드 및 요오다이드; 디메틸, 디에틸, 디부틸 및 디아밀 술포에이트; 데실, 라우릴, 미리스틸 및 스테릴 클로라이드, 브로마이드 및 요오다이드; 및 벤질 및 페넬릴 브로마이드를 사용하여 4급화될 수 있다. 치료상 허용되는 부가염을 형성하는 데 사용될 수 있는 산의 예는 무기산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 황산 및 인산, 및 유기산, 예컨대 옥살산, 말레산, 숙신산 및 시트르산을 포함한다. 염은 또한 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 이온과 화합물의 배위결합에 의해 형성될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 화합물의 나트륨, 칼륨, 마그네슘 및 칼슘 염 등을 고려한다.

[0040] 염기성 부가염은 화합물의 최종 단리 및 정제 동안 카르복실, 페놀 또는 유사한 기를 적합한 염기, 예컨대 금속 수산화물, 카르보네이트 또는 비카르보네이트와 반응시키거나, 또는 암모니아 또는 1급, 2급 또는 3급 유기 아민과 반응시킴으로써 제조할 수 있다. 치료상 허용되는 염의 양이온은 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 및 알루미늄, 뿐만 아니라 비독성 4급 아민 양이온, 예컨대 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 디에틸아민, 에틸아민, 트리부틸아민, 피리딘, N,N-디메틸아닐린, N-메틸피페리딘, N-메틸모르폴린, 디시클로헥실아민, 프로카인, 디벤질아민, N,N-디벤질페넬아민, 1-에페나민 및 N,N'-디벤질에틸렌디아민을 포함한다. 염기 부가염의 형성에 유용한 다른 대표적인 유기 아민은 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페리딘 및 피페라진을 포함한다.

[0041] 용어 "용매화물"은 그의 가장 넓은 의미로 사용된다. 예를 들어, 용어 용매화물은 본 발명의 화합물이 1개 이

상의 결합된 물 분자를 함유하는 경우에 형성되는 수화물을 포함한다.

- [0042] 본원에 사용된 용어 "알킬카르보닐" 및 "알카노일"은 카르보닐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 알킬 기를 지칭한다. 이러한 기의 예는 메틸카르보닐 (또한 아세틸로도 공지됨); 에틸카르보닐 (또한 프로피오닐로도 공지됨); 및 2-메틸-시클로펜틸카르보닐 등을 포함한다.
- [0043] 본원에 사용된 용어 "아실"은 알킬, 알케닐, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로시클로알킬 또는 임의의 다른 잔기에 부착된 카르보닐을 지칭하고, 여기서 카르보닐에 부착된 원자는 탄소이다. "아세틸" 기는 $-C(O)CH_3$ 기를 지칭한다. 아실 기의 예는 알카노일 기, 예컨대 포름일, 아세틸 및 프로피오닐, 아로일 기, 예컨대 벤조일, 및 혼합된 알킬-아릴 기, 예컨대 신나모일을 포함한다.
- [0044] 용어 "아실아미노"는 아실 기로 치환된 아미노 라디칼을 지칭한다. "아실아미노" 라디칼의 한 예는 아세틸아미노 ($CH_3C(O)NH-$)이고; 또 다른 것은 벤조일 아미노이다.
- [0045] 본원에 사용된 용어 "알케닐"은 1개 이상의 이중 결합을 갖고 2 내지 20개의 탄소 원자를 함유하는 (시클릭 잔기의 경우에는 3 내지 20개의 고리원을 가짐) 직쇄, 분지쇄 또는 시클릭 불포화 탄화수소 라디칼, 또는 직쇄 또는 분지쇄 및 시클릭 잔기의 임의의 조합을 함유하는 라디칼을 지칭한다. 다수 실시양태에서, 알케닐 기는 2 내지 6개의 탄소 원자를 포함한다. 용어 "알케닐 기"는 그의 가장 넓은 의미로 사용된다. 예를 들어, 용어 " (C_2-C_8) 알케닐 기"는 1개 이상의 이중 결합을 갖는 2 내지 8개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄형, 분지형 및 시클릭 탄화수소 라디칼을 포괄한다. 적합한 알케닐 라디칼의 예는 에테닐 (또한 비닐로도 공지됨), 프로페닐, 이소-프로페닐, 부테닐, 이소-부테닐, sec-부테닐, tert-부테닐, 1,3-부타디에닐, n-펜테닐, n-헥세닐, 시클로알케닐 라디칼, 예컨대 시클로헥세닐 및 1,3-시클로펜타디에닐, 시클로알케닐알킬 라디칼, 예컨대 시클로헥세닐 메틸, 알케닐시클로알킬 라디칼, 예컨대 메틸렌시클로헥실 등을 포함한다.
- [0046] 알케닐렌은 둘 이상의 위치에서 부착되는 탄소-탄소 이중 결합계, 예컨대 에테닐렌 $[(-CH=CH-), (-C::C-)]$ 을 지칭한다.
- [0047] 본원에 사용된 용어 "알콕시"는 알킬 에테르 라디칼을 지칭하고, 여기서 용어 알킬은 본원에 정의된 바와 같다. 적합한 알킬 에테르 라디칼의 예는 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소프로폭시, n-부톡시, 이소-부톡시, sec-부톡시, tert-부톡시, 시클로펜톡시 등을 포함한다.
- [0048] 본원에 사용된 용어 "알콕시알콕시"는 또 다른 알콕시 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 1개 이상의 알콕시 기를 지칭한다. 예는 에톡시에톡시, 메톡시프로폭시에톡시, 에톡시펜톡시에톡시에톡시 등을 포함한다.
- [0049] 본원에 사용된 용어 "알콕시알킬"은 알킬 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 알콕시 기를 지칭한다. 용어 "알콕시알킬"은 또한 알킬 기에 부착된 1개 이상의 알콕시 기를 갖는 알콕시알킬 기, 즉, 모노알콕시알킬 및 디알콕시알킬 기를 형성하는 것을 포괄한다.
- [0050] 본원에 사용된 용어 "알콕시카르보닐"은 카르보닐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 알콕시 기를 지칭한다. 이러한 "알콕시카르보닐" 기의 예는 메톡시카르보닐, 에톡시카르보닐, 프로폭시카르보닐, 부톡시카르보닐 및 헥실 옥시카르보닐을 포함한다.
- [0051] 용어 "알콕시카르보닐알킬"은 알킬 라디칼로 치환된 상기 정의된 바와 같은 "알콕시카르보닐"을 갖는 라디칼을 지칭한다. 보다 바람직한 알콕시카르보닐알킬 라디칼은 1 내지 6개의 탄소 원자에 부착된 상기 정의된 바와 같은 저급 알콕시카르보닐 라디칼을 갖는 "저급 알콕시카르보닐알킬"이다. 이러한 저급 알콕시카르보닐알킬 라디칼의 예는 메톡시카르보닐메틸을 포함한다.
- [0052] 본원에 사용된 용어 "알킬"은 직쇄, 분지형 또는 시클릭 알킬 라디칼, 또는 직쇄형, 분지형 및/또는 시클릭 라디칼의 임의의 조합으로 구성된 라디칼을 지칭하고, 이는 1 내지 20개의 탄소 원자를 함유하는 포화 지방족 탄화수소 기이다. 다수 실시양태에서, 알킬 기는 1 내지 10개의 탄소 원자를 포함한다. 다수의 다른 실시양태에서, 알킬 기는 1 내지 6개의 탄소 원자를 포함한다. 용어 "알킬 기"는 그의 가장 넓은 의미로 사용된다. 알킬 기는 본원에 정의된 바와 같이 임의로 치환될 수 있다. 알킬 라디칼의 예는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, 시클로프로필, 시클로프로필메틸, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, 시클로부틸, 펜틸, 네오펜틸, 이소-아밀, 헥실, 시클로헥실, 트랜스-1,2-디-에틸시클로헥실, 옥틸, 노닐 등을 포함한다. 예를 들어, 약어 " (C_1-C_6) -알킬 기"는 (C_3-C_6) -시클로알킬 기뿐만 아니라 직쇄형 및 분지형 알킬 기를 포함하고, " $O(C_1-C_8)$ -알킬 기"는 직쇄 $O(C_1-C_8)$ -알킬 기, 분지형 $O(C_1-C_6)$ -알킬 기 및 시클릭 $O(C_1-C_6)$ -알킬 기를 포함한다.

- [0053] 본원에 사용된 용어 "알킬렌"은 둘 이상의 위치에서 부착된 직쇄 또는 분지쇄 포화 탄화수소로부터 유도된 포화 지방족 기, 예컨대 메틸렌 (-CH₂-), 에틸렌 및 1,3-시클로부틸렌을 지칭한다.
- [0054] 본원에 사용된 용어 "알킬아미노"는 알킬 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아미노 기를 지칭한다.
- [0055] 본원에 사용된 용어 "알킬아미노카르보닐"은 카르보닐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 알킬아미노 기를 지칭한다. 이러한 라디칼의 예는 N-메틸아미노카르보닐 및 N,N-디메틸카르보닐을 포함한다.
- [0056] 본원에 사용된 용어 "알킬리덴"은 탄소-탄소 이중 결합의 1개의 탄소 원자가 알케닐 기가 부착된 잔기에 속하는 것인 알케닐 기를 지칭한다.
- [0057] 본원에 사용된 용어 "알킬술피닐"은 술피닐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 알킬 기를 지칭한다. 알킬술피닐 기의 예는 메틸술피닐, 에틸술피닐, 부틸술피닐 및 헥실술피닐을 포함한다.
- [0058] 본원에 사용된 용어 "알킬술포닐"은 술포닐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 알킬 기를 지칭한다. 알킬술포닐 기의 예는 메탄술포닐, 에탄술포닐, tert-부탄술포닐 등을 포함한다.
- [0059] 본원에 사용된 용어 "알킬티오"는 알킬 티오에테르 (R-S-) 라디칼을 지칭하고, 여기서 용어 알킬은 상기 정의된 바와 같다. 적합한 알킬 티오에테르 라디칼의 예는 메틸티오, 에틸티오, n-프로필티오, 이소프로필티오, n-부틸티오, 이소-부틸티오, sec-부틸티오, tert-부틸티오, 에톡시에틸티오, 메톡시프로폭시에틸티오, 에톡시헥톡시에틸티오 등을 포함한다.
- [0060] 용어 "알킬티오알킬"은 알킬 라디칼에 부착된 알킬티오 라디칼을 포괄한다. 알킬티오알킬 라디칼은 1 내지 6개의 탄소 원자의 알킬 라디칼 및 상기 기재된 바와 같은 알킬티오 라디칼을 갖는 "저급 알킬티오알킬" 라디칼을 포함한다. 이러한 라디칼의 예는 메틸티오메틸을 포함한다.
- [0061] 본원에 사용된 용어 "알킬닐"은 그의 가장 넓은 의미로, 1개 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖고 2 내지 20개의 탄소 원자를 함유하는, 직쇄, 분지쇄 또는 시클릭 불포화 탄화수소 라디칼, 뿐만 아니라 직쇄형, 분지형 및/또는 시클릭 라디칼의 임의의 조합을 함유하는 라디칼을 지칭한다. 다수 실시양태에서, 알킬닐 기는 2 내지 6개의 탄소 원자를 함유한다. 다수의 다른 실시양태에서, 알킬닐 기는 2 내지 4개의 탄소 원자를 함유한다. "알킬닐렌"은 두 위치에서 부착된 탄소-탄소 삼중 결합, 예컨대 에티닐렌 (-C:::C-, -C≡C-)을 지칭한다. 예를 들어, (C₂-C₈) 알킬닐 기는 1개 이상의 삼중 결합을 갖는 2 내지 8개의 탄소 원자를 함유하는 직쇄형, 분지형 및 시클릭 탄화수소 쇄를 포괄하고, 상기 용어는 달리 언급하지 않는 한 에티닐, 프로피닐, 히드록시프로피닐, 부틴-1-일, 부틴-2-일, 펜틴-1-일, 펜틴-2-일, 4-메톡시펜틴-2-일, 3-메틸부틴-1-일, 헥신-1-일, 헥신-2-일, 헥신-3-일, 3,3-디메틸부틴-1-일 등과 같은 치환기를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0062] 본원에 사용된 용어 "아미도"는 카르보닐 또는 술포닐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 하기 기재된 바와 같은 아미노 기를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "C-아미도"는 -C(=O)-NR₂ 기 (여기서, R은 본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "N-아미도"는 RC(=O)NH- 기 (여기서, R은 본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0063] 본원에 사용된 용어 "아미노"는 -NRR'을 지칭하고, 여기서 R 및 R'는 수소, 알케닐, 알콕시, 알콕시알킬, 알콕시카르보닐, 알킬, 알킬카르보닐, 아릴, 아릴알케닐, 아릴알킬, 시클로알킬, 할로알킬카르보닐, 헤테로아릴, 헤테로아릴알케닐, 헤테로아릴알킬, 헤테로사이클, 헤테로시클로알케닐 및 헤테로시클로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 아릴, 아릴알케닐의 아릴 부분, 아릴알킬, 헤테로아릴, 헤테로아릴알케닐 및 헤테로아릴알킬의 헤테로아릴 부분, 헤테로사이클, 및 헤테로시클로알케닐 및 헤테로시클로알킬의 헤테로사이클 부분은 알케닐, 알콕시, 알콕시알킬, 알킬, 시아노, 할로, 할로알콕시, 할로알킬, 히드록시, 히드록시-알킬, 니트로 및 옥소로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 임의로 치환될 수 있다.
- [0064] 본원에 사용된 용어 "아미노알킬"은 알킬 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아미노 기를 지칭한다. 예는 아미노메틸, 아미노에틸 및 아미노부틸을 포함한다. 용어 "알킬아미노"는 1 또는 2개의 알킬 라디칼로 치환된 아미노 기를 표시한다. 적합한 "알킬아미노" 기는 모노- 또는 디알킬화되어, 예를 들어 N-메틸아미노, N-에틸아미노, N,N-디메틸아미노, N,N-디에틸아미노 등과 같은 기를 형성할 수 있다.
- [0065] 본원에 사용된 용어 "아미노카르보닐" 및 "카르바모일"은 아미노-치환된 카르보닐 기를 지칭하고, 여기서 아미노 기는 알킬, 아릴, 아르알킬, 시클로알킬, 시클로알킬알킬 라디칼 등으로부터 선택된 치환기를 함유하는 1급

또는 2급 아미노 기일 수 있다.

- [0066] 본원에 사용된 용어 "아미노카르보닐알킬"은 상기 기재된 바와 같은 알킬 라디칼에 부착된 아미노카르보닐 라디칼을 지칭한다. 이러한 라디칼의 예는 아미노카르보닐메틸이다. 용어 "아미디노"는 $-C(NH)NH_2$ 라디칼을 표시한다. 용어 "시아노아미디노"는 $-C(N-CN)NH_2$ 라디칼을 표시한다.
- [0067] 본원에 사용된 용어 "아르알케닐" 또는 "아릴알케닐"은 알케닐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아릴 기를 지칭한다.
- [0068] 본원에 사용된 용어 "아르알콕시" 또는 "아릴알콕시"는 알콕시 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아릴 기를 지칭한다.
- [0069] 본원에 사용된 용어 "아르알킬" 또는 "아릴알킬"은 알킬 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아릴 기를 지칭한다.
- [0070] 본원에 사용된 용어 "아르알킬아미노" 또는 "아릴알킬아미노"는 질소 원자를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아릴 알킬 기를 지칭하고, 여기서 질소 원자는 수소로 치환된다.
- [0071] 본원에 사용된 용어 "아르알킬리텐" 또는 "아릴알킬리텐"은 알킬리텐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아릴 기를 지칭한다.
- [0072] 본원에 사용된 용어 "아르알킬티오" 또는 "아릴알킬티오"는 황 원자를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아릴알킬 기를 지칭한다.
- [0073] 본원에 사용된 용어 "아르알키닐" 또는 "아릴알키닐"은 알키닐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아릴 기를 지칭한다.
- [0074] 본원에 사용된 용어 "아르알콕시카르보닐"은 화학식 아르알킬- $O-C(=O)$ -의 라디칼을 지칭하고, 여기서 용어 "아르알킬"은 상기 주어진 의미를 갖는다. 아르알콕시카르보닐 라디칼의 예는 벤질옥시카르보닐 ("Z" 또는 "Cbz") 및 4-메톡시페닐메톡시카르보닐 ("MOS")이다.
- [0075] 본원에 사용된 용어 "아르알카노일"은 아릴-치환된 알칸카르복실산으로부터 유도된 아실 라디칼, 예컨대 벤조일, 페닐아세틸, 3-페닐프로피오닐 (히드로신나모일), 4-페닐부티릴, (2-나프틸)아세틸, 4-클로로히드로신나모일, 4-아미노히드로신나모일, 4-메톡시히드로신나모일 등을 지칭한다. 용어 "아로일"은 아릴카르복실산으로부터 유도된 아실 라디칼을 지칭하고, "아릴"은 하기 주어진 의미를 갖는다. 이러한 아로일 라디칼의 예는 치환 및 비치환된 벤조일 또는 나프토일, 예컨대 벤조일, 4-클로로벤조일, 4-카르복시벤조일, 4-(벤질옥시카르보닐)벤조일, 1-나프토일, 2-나프토일, 6-카르복시-2-나프토일, 6-(벤질옥시카르보닐)-2-나프토일, 3-벤질옥시-2-나프토일, 3-히드록시-2-나프토일, 3-(벤질옥시포름아미도)-2-나프토일 등을 포함한다.
- [0076] 본원에 사용된 용어 "아릴"은 1, 2 또는 3개의 고리를 함유하는 카르보시클릭 방향족계를 의미하고, 여기서 이러한 고리는 펜던트 방식으로 함께 부착될 수 있거나 또는 융합될 수 있다. 용어 "아릴"은 방향족 라디칼, 예컨대 페닐, 나프틸, 안트라세닐, 페난트릴 및 비페닐을 포괄한다. 본 발명의 아릴 기는 본원에 정의된 바와 같은 기로부터 독립적으로 선택된 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 임의로 치환될 수 있다.
- [0077] 본원에 사용된 용어 "아릴아미노"는 아미노 기를 통해 모 잔기에 부착된 아릴 기, 예컨대 N-페닐아미노 등을 지칭한다.
- [0078] 본원에 사용된 용어 "아릴카르보닐" 및 "아로일"은 카르보닐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아릴 기를 지칭한다.
- [0079] 본원에 사용된 용어 "아릴옥시"는 산소 원자를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아릴 기를 지칭한다.
- [0080] 본원에 사용된 용어 "아릴술포닐"은 술포닐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아릴 기를 지칭한다.
- [0081] 본원에 사용된 용어 "아릴티오"는 황 원자를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아릴 기를 지칭한다.
- [0082] 용어 "카르복시" 또는 "카르복실"은 단독으로 사용되든 "카르복시알킬"과 같이 다른 용어와 함께 사용되든 간에 $-CO_2H$ 를 표시한다.
- [0083] 본원에 사용된 용어 "벤조" 및 "벤즈"는 벤젠으로부터 유도된 2가 라디칼 $C_6H_4=$ 를 지칭한다. 예는 벤조티오펜 및 벤즈이미다졸을 포함한다.

- [0084] 본원에 사용된 용어 "카르바모일옥시"는 산소 원자를 통해 모 분자 잔기에 부착된 아미노-치환된 카르보닐 기 (예를 들어, RR'NC(=O)O-)를 지칭하고, 여기서 아미노 기는 알킬, 아릴, 아르알킬, 시클로알킬, 시클로알킬알킬 라디칼 등으로부터 선택된 치환기를 함유하는 1급 또는 2급 아미노 기일 수 있다.
- [0085] 본원에 사용된 용어 "O-카르바밀"은 -OC(O)NR 기 (여기서, R은 본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0086] 본원에 사용된 용어 "C-연결"은 탄소-탄소 결합을 통해 모 분자 잔기에 부착된 임의의 치환기를 지칭한다.
- [0087] 본원에 사용된 용어 "N-카르바밀"은 ROC(O)NH- 기 (여기서, R은 본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0088] 본원에 사용된 용어 "카르보네이트"는 -O-C(=O)OR 기 (여기서, R은 본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0089] 본원에 사용된 용어 "카르보닐"은 단독인 경우에는 포르밀 [-C(O)H]을 포함하고, 조합에서는 -C(O)- 기이다.
- [0090] 본원에 사용된 용어 "카르복시"는 -C(O)OH 또는 상응하는 "카르복실레이트", 예컨대 카르복실산 염 유도체 또는 에스테르 유도체를 지칭한다. "O-카르복시" 기는 RC(O)O- 기를 지칭하고, 여기서 R은 본원에 정의된 바와 같다. "C-카르복시" 기는 -C(O)OR 기를 지칭하고, 여기서 R은 본원에 정의된 바와 같다.
- [0091] 본원에 사용된 용어 "시아노"는 -CN 기를 지칭한다.
- [0092] 본원에 사용된 용어 "시클로알킬"은 포화 또는 부분 포화 모노시클릭, 비시클릭 또는 트리시클릭 알킬 라디칼을 지칭하고, 여기서 각각의 시클릭 잔기는 3 내지 12개, 바람직하게는 3 내지 7개의 탄소 원자 고리원을 함유하며, 임의로 본원에 정의된 바와 같이 임의로 치환된 벤조 융합된 고리계일 수 있다. 이러한 시클로알킬 라디칼의 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 옥타히드로나프틸, 2,3-디히드로-1H-인데닐, 아다만틸 등을 포함한다. 본원에 사용된 "비시클릭" 및 "트리시클릭"은 융합된 고리계, 예컨대 데카히드로나프탈렌, 옥타히드로나프탈렌뿐만 아니라 멀티시클릭 (멀티센터화) 포화 또는 부분 불포화 유형 둘 다를 포함하도록 의도된다. 후자의 유형의 이성질체는 일반적으로 비시클로[2.2.2]옥탄, 비시클로[2.2.2]옥탄, 비시클로[1.1.1]펜탄, 캄포르 및 비시클로[3.2.1]옥탄에 의해 예시된다.
- [0093] 본원에 사용된 용어 "시클로알케닐"은 부분 불포화 모노시클릭, 비시클릭 또는 트리시클릭 라디칼을 지칭하고, 여기서 각각의 시클릭 잔기는 3 내지 12개, 바람직하게는 5 내지 8개의 탄소 원자 고리원을 함유하며, 임의로 본원에 정의된 바와 같이 임의로 치환된 벤조 융합된 고리계일 수 있다. 이러한 시클로알케닐 라디칼의 예는 시클로펜테닐, 시클로헥세닐, 시클로헥사디에닐, 시클로헵테닐, 시클로옥타디에닐, -1H-인데닐 등을 포함한다.
- [0094] 본원에 사용된 용어 "시클로알킬알킬"은 상기 정의된 바와 같은 시클로알킬 라디칼에 의해 치환된 상기 정의된 바와 같은 알킬 라디칼을 지칭한다. 이러한 시클로알킬알킬 라디칼의 예는 시클로프로필메틸, 시클로부틸메틸, 시클로펜틸메틸, 시클로헥실메틸, 1-시클로펜틸에틸, 1-시클로헥실에틸, 2-시클로펜틸에틸, 2-시클로헥실에틸, 시클로부틸프로필, 시클로펜틸프로필, 시클로헥실부틸 등을 포함한다.
- [0095] 본원에 사용된 용어 "시클로알케닐알킬"은 상기 정의된 바와 같은 시클로알케닐 라디칼에 의해 치환된 상기 정의된 바와 같은 알킬 라디칼을 지칭한다. 이러한 시클로알케닐알킬 라디칼의 예는 1-메틸시클로헥스-1-에닐-, 4-에틸시클로헥스-1-에닐-, 1-부틸시클로펜트-1-에닐-, 3-메틸시클로펜트-1-에닐- 등을 포함한다.
- [0096] 본원에 사용된 용어 "에스테르"는 탄소 원자에서 연결된 두 잔기를 가교하는 카르보닐옥시 -(C=O)O- 기를 지칭한다. 예는 에틸 벤조에이트, n-부틸 신나메이트, 페닐 아세테이트 등을 포함한다.
- [0097] 본원에 사용된 용어 "에테르"는 탄소 원자에서 연결된 두 잔기를 가교하는 옥시 기를 지칭한다.
- [0098] 본원에 사용된 용어 "할로" 또는 "할로겐"은 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 지칭한다.
- [0099] 본원에 사용된 용어 "할로알콕시"는 산소 원자를 통해 모 분자 잔기에 부착된 할로알킬 기를 지칭한다.
- [0100] 본원에 사용된 용어 "할로알킬"은 1개 이상의 수소가 할로겐으로 대체된 상기 정의된 바와 같은 의미를 갖는 알킬 라디칼을 지칭한다. 특히, 모노할로알킬, 디할로알킬, 퍼할로알킬 및 폴리할로알킬 라디칼이 포함된다. 한 예로, 모노할로알킬 라디칼은 라디칼 내에 요오도, 브로모, 클로로 또는 플루오로 원자를 가질 수 있다. 디할로 및 폴리할로알킬 라디칼은 2개 이상의 동일한 할로 원자 또는 상이한 할로 라디칼의 조합일 수 있다. 할로알킬 라디칼의 예는 플루오로메틸, 디플루오로메틸, 트리플루오로메틸, 클로로메틸, 디클로로메틸, 트리클로로메틸, 트리클로로에틸, 펜타플루오로에틸, 헵타플루오로프로필, 디플루오로클로로메틸, 디클로로플루오로메틸, 디플루오로에틸, 디플루오로프로필, 디클로로에틸 및 디클로로프로필을 포함한다. "할로알킬렌"은 둘 이상의 위치에 부착된 할로히드록카르빌 기를 지칭한다. 예는 플루오로메틸렌 (-CHF-), 디플루오로메틸렌 (-CF₂-), 클

로로메틸렌 (-CHCl-) 등을 포함한다. 이러한 할로알킬 라디칼의 예는 클로로메틸, 1-브로모에틸, 플루오로메틸, 디플루오로메틸, 트리플루오로메틸, 1,1,1-트리플루오로에틸, 퍼플루오로데실 등을 포함한다.

- [0101] 본원에 사용된 용어 "헤테로알킬"은 명시된 수의 탄소 원자, 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자로 구성된, 완전 포화 또는 1 내지 3의 불포화도를 함유하는 안정한 직쇄 또는 분지쇄 또는 시클릭 탄화수소 라디칼 또는 그의 조합을 지칭하고, 여기서 질소 및 황 원자는 임의로 산화될 수 있고, 질소 헤테로원자는 임의로 4급화될 수 있다. 헤테로원자(들) O, N 및 S는 헤테로알킬 기의 임의의 내부 위치에 위치할 수 있다. 2개 이하의 헤테로원자는 연속적일 수 있다 (예컨대 예를 들어, -CH₂-NH-OCH₃).
- [0102] 본원에 사용된 용어 "헤테로아릴"은 1개 이상의 원자가 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되고, 남은 고리 원자가 탄소인 방향족 5- 또는 6-원 고리를 지칭한다. 5-원 고리는 2개의 이중 결합을 갖고, 6-원 고리는 3개의 이중 결합을 갖는다. 헤테로아릴 기는 고리에서 치환가능한 탄소 또는 질소 원자를 통해 모 분자 기에 연결된다. 용어 "헤테로아릴"은 또한 헤테로아릴 고리가 본원에 정의된 바와 같은 아릴 기, 본원에 정의된 바와 같은 헤테로사이클 기, 또는 추가의 헤테로아릴 기에 융합되는 계를 포함한다. 헤테로아릴은 벤조티에닐, 벤조사졸릴, 벤조푸라닐, 벤즈이미다졸릴, 벤즈티아졸릴, 벤조트리아졸릴, 신놀리닐, 푸릴, 이미다졸릴, 트리아졸릴 [예를 들어, 4H-1,2,4-트리아졸릴, 1H-1,2,3-트리아졸릴, 2H-1,2,3-트리아졸릴 등], 테트라졸릴 [예를 들어, 1H-테트라졸릴, 2H-테트라졸릴 등], 인다졸릴, 인돌릴, 이속사졸릴, 이소퀴놀리닐, 이소티아졸릴, 나프티리디닐, 옥사디아졸릴 [예를 들어, 1,2,4-옥사디아졸릴, 1,3,4-옥사디아졸릴, 1,2,5-옥사디아졸릴 등], 옥사졸릴, 이속사졸릴, 퓨리닐, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 티에노피리디닐, 티에닐, 티아디아졸릴 [예를 들어, 1,2,4-티아디아졸릴, 1,3,4-티아디아졸릴, 1,2,5-티아디아졸릴 등], 피리디닐, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 피라졸릴, 피롤릴, 피리도[2,3-d]피리미디닐, 피롤로[2,3-b]피리디닐, 퀴나졸리닐, 퀴놀리닐, 티에노[2,3-c]피리디닐, 테트라졸릴, 트리아지닐 등에 의해 예시된다. 본 발명의 헤테로아릴 기는 본원에 정의된 바와 같은 기로부터 독립적으로 선택된 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 임의로 치환될 수 있다.
- [0103] 헤테로아릴 기의 예는 비제한적으로 티에닐, 벤조티에닐, 푸릴, 벤조푸릴, 디벤조푸릴, 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 피리디닐, 피라지닐, 피리미디닐, 인돌릴, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 퀴녹살리닐, 테트라졸릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 트리아졸릴 및 이속사졸릴을 포함한다.
- [0104] 본원에 사용된 용어 "헤테로아르알킬" 또는 "헤테로아릴알킬"은 알킬 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 헤테로아릴 기를 지칭한다.
- [0105] 본원에 사용된 용어 "헤테로아르알케닐" 또는 "헤테로아릴알케닐"은 알케닐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 헤테로아릴 기를 지칭한다.
- [0106] 본원에 사용된 용어 "헤테로아르알콕시" 또는 "헤테로아릴알콕시"는 알콕시 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 헤테로아릴 기를 지칭한다.
- [0107] 본원에 사용된 용어 "헤테로아르알킬리덴" 또는 "헤테로아릴알킬리덴"은 알킬리덴 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 헤테로아릴 기를 지칭한다.
- [0108] 본원에 사용된 용어 "헤테로아릴옥시"는 산소 원자를 통해 모 분자 잔기에 부착된 헤테로아릴 기를 지칭한다.
- [0109] 본원에 사용된 용어 "헤테로아릴술포닐"은 술포닐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 헤테로아릴 기를 지칭한다.
- [0110] 본원에 사용된 용어 "헤테로시클로알킬" 및, 호환가능한 "헤테로시클릴"은 고리원으로서 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 포화, 부분 불포화 또는 완전 불포화 모노시클릭, 비시클릭 또는 트리시클릭 헤테로시클릭 라디칼을 각각 지칭하고, 여기서 각각의 상기 헤테로원자는 질소, 산소 및 황으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택될 수 있으며, 각각의 고리에는 전형적으로 3 내지 8개의 고리원이 있다. 가장 통상적으로는, 헤테로시클릭 고리는 5 내지 6개의 고리원을 함유한다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 헤테로시클릭 고리는 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유하고; 다른 실시양태에서, 헤테로시클릭 고리는 1 내지 2개의 헤테로원자를 함유한다. "헤테로시클로알킬" 및 "헤테로사이클"은 술포, 술폭시드, 3급 질소 고리원의 N-옥시드, 및 카르보시클릭 융합된 고리계 및 벤조 융합된 고리계를 포함하도록 의도되고; 추가로, 두 용어 모두는 또한 헤테로사이클 고리가 본원에 정의된 바와 같은 아릴 기, 또는 추가의 헤테로사이클 기로 융합되는 계를 포함한다. 본 발명의 헤테로사이클 기는 아지리디닐, 아제티디닐, 1,3-벤조디옥솔릴, 디히드로이소인돌릴, 디히드로이소퀴놀리닐, 디히드로신놀리닐, 디히드로벤조디옥시닐, 디히드로[1,3]옥사졸로[4,5-b]피리디닐, 벤조티아졸릴, 디히드로인돌릴, 디히드로피리디닐, 1,3-디옥사닐, 1,4-디옥사닐, 1,3-디옥솔라닐, 이소인돌리닐, 모르폴리닐, 피페라지닐, 피롤리디닐, 테

트라히드로피리디닐, 피페리디닐, 티오모르폴리닐 등에 의해 예시된다. 헤테로사이클 기는 명확하게 금지되지 않는 한 임의로 치환될 수 있다.

- [0111] 본원에 사용된 용어 "헤테로시클로알케닐"은 알케닐 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 헤테로사이클 기를 지칭한다.
- [0112] 본원에 사용된 용어 "헤테로시클로알콕시"는 산소 원자를 통해 모 분자 기에 부착된 헤테로사이클 기를 지칭한다.
- [0113] 본원에 사용된 용어 "헤테로시클로알킬알킬"은 1개 이상의 수소 원자가 상기 정의된 바와 같은 헤테로시클로알킬 라디칼, 예컨대 피롤리디닐메틸, 테트라히드로티에닐메틸, 피리딜메틸 등에 의해 대체된 상기 정의된 바와 같은 알킬 라디칼을 지칭한다.
- [0114] 본원에 사용된 용어 "헤테로시클로알킬리덴"은 알킬리덴 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 헤테로사이클 기를 지칭한다.
- [0115] 본원에 사용된 용어 "히드라지닐"은 단일 결합에 의해 연결된 2개의 아미노 기, 즉 -N-N-를 지칭한다.
- [0116] 본원에 사용된 용어 "히드록시" 및 "히드록실"은 -OH 기를 지칭한다.
- [0117] 본원에 사용된 용어 "히드록시알킬"은 1 내지 약 10개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬 기를 지칭하고, 이들 중 임의의 하나는 1개 이상의 히드록실 라디칼로 치환될 수 있다. 이러한 라디칼의 예는 히드록시메틸, 히드록시에틸, 히드록시프로필, 히드록시부틸 및 히드록시헥실을 포함한다.
- [0118] 본원에 사용된 용어 "히드록시알킬"은 알킬 기를 통해 모 분자 잔기에 부착된 히드록시 기를 지칭한다.
- [0119] 본원에 사용된 용어 "이미노"는 =N-을 지칭한다.
- [0120] 본원에 사용된 용어 "이미노히드록시"는 =N(OH) 및 =N-O-를 지칭한다.
- [0121] 어구 "주쇄에서"는 본 발명의 화합물에 대한 기의 부착 지점에서 출발하는 탄소 원자의 가장 긴 근접 또는 인접쇄를 지칭한다.
- [0122] 용어 "이소시아네이토"는 -NCO 기를 지칭한다.
- [0123] 용어 "이소티오시아네이토"는 -NCS 기를 지칭한다.
- [0124] 어구 "원자의 선형 쇠"는 탄소, 질소, 산소 및 황으로부터 독립적으로 선택된 원자의 가장 긴 직쇄를 지칭한다.
- [0125] 본원에 사용된, 예컨대 "저급 알킬"과 같은 용어에서의 용어 "저급"은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 탄소 원자를 갖는 것을 의미한다.
- [0126] 본원에 사용된 용어 "메르캅토알킬"은 R'SR- 기 (여기서, R 및 R'는 본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0127] 본원에 사용된 용어 "메르캅토메르캅틸"은 RSR'S- 기 (여기서, R은 본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0128] 본원에 사용된 용어 "메르캅틸"은 RS- 기 (여기서, R은 본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0129] 용어 "널(null)"은 단리 전자 쌍을 지칭한다.
- [0130] 본원에 사용된 용어 "니트로"는 -NO₂를 지칭한다.
- [0131] 용어 "임의로 치환된"은 선행 기가 치환 또는 비치환될 수 있다는 것을 의미한다. "치환된"은 탄소에 결합된 1개 이상의 수소 원자가 "치환기"에 의해 대체되는 것을 의미한다. 용어 "임의로 치환된" 내에 포함되거나 또는 그에 의해 고려되는 치환기는 다음과 같다: C₁₋₃ 알킬, C₃₋₆ 시클로알킬, C₁₋₃ 알콕시, 히드록시, C₁₋₃ 알카노일, C₁₋₃ 알콕시 카르보닐, 할로, 페닐, 벤질, 페녹시, 벤조일, 피리딜, 아미노, C₁₋₃ 알킬 아미노, 아미도, C₁₋₃ 알킬 아미도, 시아노, C₁₋₃ 할로알킬 및 C₁₋₃ 퍼할로알킬. 2개의 치환기는 서로 연결되어, 0 내지 3개의 헤테로원자로 구성된 융합된 4-, 5-, 6- 또는 7-원 카르보시클릭 또는 헤테로시클릭 고리, 예컨대 메틸렌디옥시 또는 에틸렌디옥시를 형성할 수 있다. 임의로 치환된 기는 비치환되거나 (예를 들어, -CH₂CH₃), 완전히 치환되거나 (예를 들어, -CF₂CF₃), 일치환되거나 (예를 들어, -CH₂CHF₂), 또는 완전히 치환되는 것과 일치하는 것 사이의 어느 수준으로 치환될 수 있다 (예를 들어, -CH₂CF₃). 치환기가 치환에 대하여 한정 없이 인용되는 경우, 치환된 형

태 및 비치환된 형태 둘 다가 포함된다. 치환기가 "치환된"과 같이 한정되는 경우에, 치환된 형태가 특히 의도된다. 모든 펜던트 아릴, 헤테로아릴 및 헤테로시클로 잔기는 또한 상기 나열된 기로부터 독립적으로 선택된 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 임의로 치환될 수 있다.

- [0132] 본원에 사용된 용어 "옥시" 또는 "옥사"는 -O-를 지칭한다.
- [0133] 본원에 사용된 용어 "옥소"는 이중 결합된 산소 =O를 지칭한다.
- [0134] 용어 "퍼할로알콕시"는 모든 수소 원자가 할로젠 원자에 의해 대체된 알콕시 기를 지칭한다.
- [0135] 본원에 사용된 용어 "퍼할로알킬"은 모든 수소 원자가 할로젠 원자에 의해 대체된 알킬 기를 지칭한다.
- [0136] 본원에 사용된 용어 "포스포네이트"는 -P(=O)(OG)(OG1) 기 (여기서, G 및 G1은 H, 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴 등으로부터 선택됨)를 지칭한다.
- [0137] 본원에 사용된 용어 "포스포네이트"는 -P(=O)(G)(OG1) 기 (여기서, G 및 G1은 H, 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴 등으로부터 선택됨)를 지칭한다.
- [0138] 본원에 사용된 용어 "술포네이트", "술포산(sulfonic acid)" 및 "술포산(sulfonic)"은 -SO₃H 기, 및 술포산이 염 형성에 사용될 시에는 그의 음이온을 지칭한다.
- [0139] 본원에 사용된 용어 "술폜닐"은 -S 및 -S-를 지칭한다.
- [0140] 본원에 사용된 용어 "술폜닐"은 -S(O)-를 지칭한다.
- [0141] 본원에 사용된 용어 "술폜닐"은 -SO₂-를 지칭한다.
- [0142] 용어 "N-술폜아미도"는 RS(=O)₂NH- 기 (여기서, R은 본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0143] 용어 "S-술폜아미도"는 -S(=O)₂NR₂ 기 (여기서, R은 본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0144] 본원에 사용된 용어 "티아" 및 "티오"는 -S- 기, 또는 산소가 황으로 대체된 에테르를 지칭한다. 티오 기의 산화된 유도체, 즉 술폜닐 및 술폜닐은 티아 및 티오의 정의에 포함된다.
- [0145] 본원에 사용된 용어 "티오에테르"는 탄소 원자에서 연결된 두 잔기를 가교하는 티오 기를 지칭한다.
- [0146] 본원에 사용된 용어 "티올"은 -SH 기를 지칭한다.
- [0147] 본원에 사용된 용어 "티오카르보닐"은 단독인 경우에는 티오포르밀 -C(S)H를 포함하고, 조합에서는 -C(S)- 기이다.
- [0148] 용어 "N-티오카르바미"는 ROC(S)NH- 기 (여기서, R은 본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0149] 용어 "O-티오카르바미"는 -OC(S)NR 기 (여기서, R은 본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0150] 용어 "티오시아네이트"는 -CNS 기를 지칭한다.
- [0151] 용어 "트리할로메탄술폜아미도"는 X₃CS(O)₂NR- 기 (여기서, X는 할로젠이고, R은 본원에 정의된 바와 같음)를 지칭한다.
- [0152] 용어 "트리할로메탄술폜닐"은 X₃CS(O)₂- 기 (여기서, X는 할로젠임)를 지칭한다.
- [0153] 용어 "트리할로메톡시"는 X₃CO- 기 (여기서, X는 할로젠임)를 지칭한다.
- [0154] 본원에 사용된 용어 "삼치환된 실릴"은 치환된 아미노의 정의 하에 본원에 나열된 바와 같은 기로 그의 3개의 자유 원자가에서 치환된 실리콘 기를 지칭한다. 예는 트리메틸실릴, tert-부틸디메틸실릴, 트리페닐실릴 등을 포함한다.
- [0155] 본원에 사용된 용어 "우레아"는 -N(R)C(=O)N(R)(R) (여기서, R은 본원에 정의된 바와 같음)을 지칭한다.
- [0156] 용어 "담체"는 그의 가장 넓은 의미로 사용된다. 예를 들어, 용어 담체는 임의의 담체, 희석제, 부형제, 습윤제, 완충제, 현탁화제, 운환제, 아주반트, 비히클, 전달 시스템, 유화제, 붕해제, 흡수제, 보존제, 계면활성제, 착색제, 향미제 및 감미제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 용어 "제약상 허용되는 담체"가 제약 조성물에 사

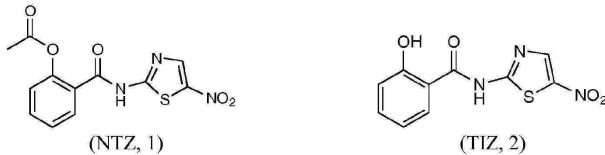
용하기에 적합할 비독성을 의미하기 때문에, 담체는 담체보다 더 협의의 용어인 제약상 허용되는 담체일 수 있다.

[0157] 본 발명은 또한 제약상 허용되는 담체에 유효량의 본 발명의 하나 이상의 화합물을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0158] 용어 유효량은 그의 가장 넓은 의미로 사용된다. 예를 들어, 상기 용어는 목적 효과를 생성하는 데 필요한 양을 지칭한다.

[0159] 상세한 설명

[0160] 한 실시양태에서, 본 발명은 바이러스 헤마글루티닌의 성숙을 표적으로 하고, 현재 이용가능한 항-인플루엔자 약물에 의해 제공되는 것과 상이한 단계에서 감염성 바이러스 입자의 생성을 교란시킬 기회를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 유효량의 화학식 I의 화합물을 투여하는 것에 의해 인간 및 다른 포유동물에서 바이러스 감염을 치료 및 예방하는 방법을 제공 또는 고려한다. 한 이러한 화합물은, 감염성 위장염의 치료를 위해 미국에서 허가된 제품인 니타족사니드 (1)이고, 이것은 현재 만성 C형 간염의 치료를 위해 미국 및 외국에서 II상 임상 시험의 진행 중에 있다. 약물은 심지어 1년에 걸쳐 제공되는 경우에도 안전하고 효과적인 것으로 나타났다, II상 임상 연구는 미래에 어느 시점에서든지 인플루엔자의 치료에 입문시킬 수 있다. 임상 시험은 최근에 로타바이러스 위장염 및 만성 B 및 C형 간염을 치료함에 있어 니타족사니드의 상업적으로 이용 가능한 제약 제제의 활성을 입증하였다.



[0161]

[0162] 실험 절차

[0163] 물질 및 방법

[0164] 물질.

[0165] 니타족사니드 (NTZ, 1), 티족사니드 (TIZ, 2), 및 티아졸리드 유사체 및 기준 화합물 스와인소닌 (SW) (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))을 디메틸설폭사이드 (DMSO)에 용해시켰다. 투니카마이신 (TM) 및 1-데옥시만노지리미신 (DMJ) (시그마-알드리치)을 수용액에 용해시켰다.

[0166] 인플루엔자 연구를 위한 방법

[0167] 세포 배양, 처리 및 형질감염- 마딘-다르비(Madin-Darby) 개 신장 (MDCK) 세포, 및 인간 A549 폐포 유형 II-유사 상피, 저칼 T 림프모구양 및 U397 단핵구성 백혈병 세포를 10% 소 태아 혈청 (FCS), 2 mM 글루타민 및 항생제로 보충된 RPMI 1640 (인비트로젠(Invitrogen)) 중에서 37°C에서 5% CO₂ 분위기 중에서 성장시켰다. 달리 명시되지 않는 한, 시험 화합물을 1시간의 흡착 기간 직후에 첨가하고, 전체 실험 시간 동안 배양 배지 중에 유지시켰다. 대조군은 동등한 양의 비히클을 제공받았고, 이는 세포 생존을 또는 바이러스 복제에 영향을 미치지 않았다. 세포 생존율을, 앞서 기재된 바와 같은 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT)에서 MTT 포르마잔으로의 전환 검정 (시그마-알드리치)에 의해 결정하였다. 모의-감염 또는 바이러스-감염된 세포의 현미경 검사를 라이카(Leica) DM-IL 현미경을 이용하여 수행하고, 영상을 라이카 이미지-매니저 500(Image-Manager500) 소프트웨어를 사용하는 라이카 DC 300 카메라 상에서 캡처하였다.

[0168] 형질감염 실험을 위해, LabTekII 커버글라스 챔버 (넉치-써모 피셔 사이언티픽 인크.(Nunch-Thermo Fisher Scientific Inc.))에 플레이팅된 MDCK 세포를, 제조업체의 사용설명서에 따라 리포펙타민 2000(Lipofectamine 2000) (인비트로젠)을 사용하여 녹색 형광 단백질 (GFP)-태깅된 내재화-결여 인간 저-밀도 지단백질 수용체 (hLDLR) 돌연변이체 (LDLR-A18-GFP 플라스미드, 뉴욕주 뉴욕 코넬 대학교의 이. 로드리게즈-볼란(E. Rodriguez-Boulan)에 의해 선의로 제공됨)로 일시적으로 형질감염시켰다.

[0169] 바이러스 제조, 감염 및 적정- 4종의 다양한 인플루엔자 A 바이러스인 포유동물 H1N1 A/PR/8/34 (PR8) 및 A/WSN/33 (WSN), 및 H3N2 A/피렌체(Firenze)/7/03 (A/FI), 및 H5N9 저-병원성 조류 바이러스주 A/Ck/It/9097/97 (A/Ck), 뿐만 아니라 인플루엔자 B 바이러스인 B/파르마(Parma)/3/04 임상 분리주를 본 연구

에 활용하였다. A/피렌체/7/03, A/Ck/It/9097/97 및 B/파르마/3/04 인플루엔자 바이러스는 이탈리아 로마 국가 보건기구(Istituto Superiore di Sanita')의 이사벨라 도나텔리 박사(Dr. Isabella Donatelli)로부터의 선의의 선물이었다. 조류 바이러스주 A/Ck/It/9097/97은 10일령의 특정-병원체-부재 (SPF) 닭 발육란 내로 닭 기관 균 질물의 최초 계대배양 후에 단리하였다. 인플루엔자 A 바이러스를 8일령의 발육란의 요막강에서 성장시켰다. 37°C에서 48시간 후, 요막강액을 수확하고, 30분 동안 5000 rpm에서 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거하고, 바이러스 역가를 표준 절차에 따라 헤마글루티닌 적정 및 플라크 검정에 의해 결정하였다. 달리 명시되지 않는 한, 융합성 세포 단층을 인플루엔자 바이러스로 37°C에서 1시간 동안 5 HAU/10⁵개 세포의 감염다중도 (m.o.i.) 로 감염시켰다. 흡착 기간 후 (시점 0), 바이러스 접종원을 제거하고, 세포 단층을 인산염-완충 염수 (PBS)로 3회 세척하였다. 세포를 2% 소 태아 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배양 배지 중에서 37°C에서 유지시켰다. 다 단계 바이러스 성장 곡선을 위해, 감염된 세포를 1 µg/ml 트립신 IX (시그마-알드리치)를 함유하는 동일한 배지 중에서 인큐베이션하였다. 바이러스 수율을 감염후 (p.i.) 24 또는 48시간째에 헤마글루티닌 적정에 의해 결정 하였다. PR8 바이러스 감염력 검정을 위해, 37°C에서 48시간 동안 1 µg/ml 트립신의 존재 하에, 96-웰 플레이트 상에서 성장시킨 MDCK 세포에 바이러스 현탁액의 연속 희석액을 접종하고, TCID50 (50% 조직 배양 감염 용 량)을 기재된 바와 같이 결정하였다. 대안적으로, 바이러스 역가를 MDCK 세포 상에서 감염, 및 항인플루엔자 A/PR/8/34 항체 (항-PR8, 뉴욕주 뉴욕 코넬 대학교의 이. 로드리게즈-볼란으로부터의 선의의 선물)를 사용한 간 접 면역형광 염색 후에 형광 세포의 수를 계수함으로써 결정하였다. 역가를 상응하게 ffu (형광-형성 단위)/ml 로 나타내었다.

[0170] 대사적 표지, 단백질 합성의 분석 및 웨스턴 블롯- 모의-감염 또는 인플루엔자 바이러스-감염된 세포를 메티오 닌/시스테인-비함유 배지 중에서 30분 동안 굵긴 후에 지시된 시간 동안 10 µCi/ml의 [³⁵S]-메티오닌-시스테인 ([³⁵S]-Met/Cys, 레디부 프로-믹스(Redivue Pro-Mix) ³⁵S 시험관내 세포-표지 믹스; GE 헬스케어(GE Healthcare))으로 표지하였다. 펄스/추적 실험을 위해, 세포를 메티오닌/시스테인-비함유 배지 중에서 30분 동 안 굵긴 후에 15분 동안 [³⁵S]-Met/Cys (100 µCi/ml)로 표지하였다. 펄스의 끝무렵에, 세포를 TIZ의 존재 또 는 부재 하에 다양한 시간 동안 10 mM 콜드(cold) 메티오닌 및 1 mM 시클로헥시미드를 함유하는 완전 배지 중 에서 추적하였다. 세포를 얼음 상에 위치시킴으로써 펄스/추적을 종결시켰다. 기재된 바와 같이, 1 mM 페닐메틸 술폰일 플루오라이드 (PMSF) 및 프로테아제 억제제 콕테일 (PIC; 로슈 디아그노스틱스 게엠베하(Roche Diagnostics GmbH))을 함유하는 RIPA 완충제 (150 mM NaCl, 10 mM 트리스-HCl pH 7.5, 4 mM EDTA, 1% 트리톤 X-100(Triton X-100), 600 mM KCl) 중에서의 세포 용해 후, 동일한 양의 방사능을 함유하는 샘플을 SDS/PAGE (3% 농축 겔, 10% 분리 겔)로 분리하고, 오토라디오그래피를 위해 가공하였다. 오토라디오그래피 패턴을 타 이폰-8600(Typhoon-8600) 영상기 (몰레큘라 다이내믹스(Molecular Dynamics), 아머삼 파마시아 바이오테크 (Amersham Pharmacia Biotech))에서 시각화 및 정량화하고, 영상을 이미지퀀트(ImageQuant) 소프트웨어 (아머 삼 파마시아 바이오테크)를 이용하여 획득하였다 (MDP 분석).

[0171] 바이러스 입자에 혼입된 단백질의 분석을 위해, 바이러스 흡착 후에 TIZ, TM 또는 비히클로 처리된 PR8-감염 또 는 모의-감염된 MDCK 세포를 p.i. 3시간째에 약물의 존재 하에 [³⁵S]-Met/Cys (25 µCi/ml, 21시간-펄스)로 표 지하였다. p.i. 24시간째에, 세포 배양 상층액을 수확하고, 10분 동안 13,000 rpm에서 원심분리에 적용시켜 세 포 찌꺼기를 제거하고, 이어서 2시간 동안 45,000 rpm에서 초원심분리하였다 (베크만(Beckman) XL-100K 초원심 분리기, 로터 70.1Ti; 베크만 쿨터 인크.(Beckman Coulter Inc.)). 바이러스 입자를 함유하는 펠릿을 램리 (Laemmli) 샘플 완충제에 재현탁시키고, 방사성표지된 바이러스 단백질을 앰플리파이(Amplify)TM 플루오로그래 피 시약 (GE 헬스케어)에 노출시킨 후에 10% SDS-PAGE에 의해 분리하고 오토라디오그래피에 의해 검사하였다. 오토라디오그래피 패턴을 상기 기재된 바와 같이 시각화하였다.

[0172] 웨스턴 블롯 분석을 위해, 세포를 2 mM 디티오프레이트톨 (DTT), 1 mM PMSF, 1 mM 오르토바나데이트, 20 mM β-글 리세로포스페이트, 1 mM p-니트로페닐 포스페이트 (pNPP) 및 PIC를 함유하는 콜드 고염 추출 (HSB) 완충제로, 또는 1 mM PMSF 및 PIC를 함유하는 RIPA 완충제로 용해시켰다. 전세포 추출물 (30 µg)을 SDS-PAGE로 분리하고, 니트로셀룰로스로 블롯팅하고, 필터를 폴리클로날 항-포스포Ser51-eIF2α (p-eIF2α, 칼바이오펀(Calbiochem)), 항-eIF2α (FL-315, 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology)), 및 항-인플루엔자 A/PR/8/34 항체 또는 모노클로날 항-HA (IVC102; 바이오디자인 인크.(Bioscience Inc.)) 및 항-Grp78/BiP (스트레스젠 (Stressgene)) 항체와 함께 인큐베이션하고, 이어서 퍼옥시다제-표지된 항-토끼 IgG 또는 항-마우스 IgG (슈퍼 시그널(Super Signal) 검출 키트; 피어스(Pierce))로 장식하였다. 단백질의 정량적 평가치를, 바이오-라드 래 보러토리즈(BIO-RAD Laboratories)를 통해 입수가 가능한 퀀티티 원(Quantity One) 소프트웨어 프로그램을 사용하

는 베르사독-1000(Versadoc-1000) 분석에 의해 결정하였다.

[0173] 바이러스 흡착 후에 10 µg/ml TIZ 또는 대조군 희석제로 처리된 HAO PR8-감염 또는 모의-감염된 MDCK 세포의 면역침전물을, 메티오닌/시스테인-비함유 배지 중에서 30분 동안 굵긴 후에 p.i. 5 또는 6시간째에 [³⁵S]-Met/Cys (70 µCi/ml, 4시간-펄스)로 표지하였다. PIC 및 1 mM PMSF의 존재 하에 RIPA 완충제에 용해시킨 후, 세포 찌꺼기를 10분 동안 13,000 rpm에서 콜드 원심분리에 의해 제거하였다. 방사성표지된 용해물 (50 µl)을 16시간 동안 4°C에서 1 mM PMSF, PIC 및 단백질-A-세파로스 (시그마-알드리치)를 함유하는 RIPA 완충제 중에서 항-HA 모노클로날 항체 (IVC102; 바이오디자인 인크.)와 함께 인큐베이션하였다. 원심분리한 후, 펠릿을 RIPA 완충제로 3회 세척하고, 5분 동안 95°C에서 램프 샘플 완충제 (20) 중에서 용리하였다. 면역침전된 샘플을 (하기 기재된 바와 같이) Endo-H 소화에 적용시키고/거나, 앰플리파이™ 플루오로그래피 시약에 노출시킨 후에 SDS/PAGE (3% 농축 겔, 10% 분리 겔) 및 오토라디오그래피를 위해 가공하였다. 오토라디오그래피 패턴을 타이폰-8600 영상기에서 가시화하고, 영상을 상기 기재된 바와 같이 획득하였다.

[0174] 헤마글루티닌 글리코실화, 삼량체화 및 가공의 분석- 모의-감염 또는 인플루엔자 바이러스-감염된 세포를 p.i. 6시간째에 4시간 동안 20 µCi/ml의 [³H]-만노스 또는 [³H]-글루코사민 히드로클로라이드 (GE 헬스케어)로 표지하고, 이어서 상기 기재된 바와 같이 SDS/PAGE (3% 농축 겔, 10% 분리 겔) 및 오토라디오그래피를 위해 가공하였다. 엔도글리코시다제 소화 실험을 위해, MDCK 세포를 PR8 인플루엔자 바이러스로 감염시키고, 미결합 바이러스가 없도록 세척하고, 10 µg/ml TIZ의 존재 또는 부재 하에 인큐베이션하였다. p.i. 5시간째에, 세포를 메티오닌/시스테인-비함유 배지 중에서 30분 동안 굵긴 후에 [³⁵S]-Met/Cys (50 µCi/ml, 4시간-펄스)로 표지하였다. 펄스의 끝무렵에, 방사성 배지를 제거하고, 세포를 얼음 상에 위치시켰다. PIC 및 1 mM PMSF의 존재 하에 L 완충제 (100 mM NaCl, 10 mM 트리스-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 1% 트리톤 X-100, 0.1% SDS)에 용해시키고, 10분 동안 13,000 rpm에서 콜드 원심분리한 후, 동일한 양의 방사능을 함유하는 샘플을 엔도글리코시다제 H (Endo-H) 또는 펩티드 N-글리코시다제 F (PNGase-F) 소화를 위해 가공하였다. Endo-H 소화를 위해, (상기 기재된 바와 같이) 항-HA 모노클로날 항체로 면역침전된 샘플 또는 비-면역침전된 샘플을 100 mM 시트르산나트륨 중 0.1% SDS 및 140 mM β-메르캅토에탄올 (pH 5.5) 100 µl 중에서 인큐베이션하고, 95°C에서 5분 동안 가열하였다. 1 mM PMSF 및 PIC를 첨가한 후, 샘플을 2개의 동등한 분취액으로 분할하고, 한 분취액을 37°C에서 16시간 동안 5 mU Endo-H (로슈 디아그노스틱스 게엠베하)와 함께 인큐베이션하였다. 펩티드 N-글리코시다제 소화를 제조업체의 프로토콜 (뉴 잉글랜드 바이오랩스 인크.(New England BioLabs Inc.))에 따라 500 U의 PNGase-F를 사용하여 수행하였다. 소화를 램프 샘플 완충제를 첨가하여 종결시켰다. 샘플을 5분 동안 95°C에서 가열한 후, 10% SDS-PAGE 겔 상에 로딩하였다. 삼량체 형성의 분석을 위해, 모의-감염된 MDCK 세포 및 PR8-감염된 MDCK 세포로부터의 전세포 추출물에 1:10 부피의 0.2 mM EGS [에틸렌 글리콜 비스(숙신이미딜숙시네이트); 피어스]를 함유하는 DMSO를 첨가함으로써 HA의 가교를 수행하였다. 22°C에서 15분 후, 글리신을 75 mM의 최종 농도로 첨가하여 반응을 쉼시키고, 샘플을 SDS-PAGE (6% 분리 겔)에 적용시켰다. HA-가교된 생성물을 모노클로날 항-HA 항체 또는 폴리클로날 항-PR8로 프로브 조사함으로써 시각화하였다.

[0175] 면역형광 현미경검사- 커버슬립 상에서 성장시킨 PR8-감염된 MDCK 및 WSN-감염된 A549 세포를 각각 p.i. 16 또는 24시간째에 실온에서 20분 동안 인산염-완충 염수 중 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 모의-감염 세포를 유사하게 가공하였다. 고정된 세포를 원형질 막 염색을 위해 37°C에서 1시간 동안 항-HA 모노클로날 항체 (IVC102; 바이오디자인 인크.)와 함께 인큐베이션하거나, 또는 실온에서 10분 동안 0.1% 트리톤X100-PBS를 사용하여 투과성으로 만들고, 이어서 37°C에서 1시간 동안 모노클로날 항-HA 및 항-p230 트랜스-골지 (클론 15; BD 바이오사이언스(BD Biosciences)) 또는 폴리클로날 항-α-튜불린 (11H10; 셀 시그널링, 테크놀로지 인크.(Cell Signaling Technology Inc.)) 항체와 함께 인큐베이션하고, 이어서 알렉사 플루오르488(Alexa Fluor488)-접합된 (몰레큘라 프로브즈(Molecular Probes)-인비트로젠) 또는 로다민-접합된 (피어스) 염소 항-마우스 IgG, 및 로다민-접합된 염소 항-토끼 IgG (피어스)로 장식하였다. 핵을 4',6-디아미디노-2-페닐 인돌 (DAPI) 또는 핵스트(Hoechst) 33342 (몰레큘라 프로브즈, 인비트로젠)로 염색하였다. 영상을 SoftWoRx-2.50 소프트웨어 (어플라이드-프리시전(Applied-Precision))를 이용하는 델타비전(DeltaVision) 현미경 (어플라이드-프리시전)으로 캡처 및 디콘볼루션하였다. 대조군 인큐베이션은 항-이뮤노글로불린 접합체 사이, 또는 항-이뮤노글로불린 접합체와 관계없는 1차 항체 사이의 비(non) 교차-반응성을 입증하였다. 유사한 결과를 갖는 3회의 대표적인 실험의 영상을 나타내었다.

[0176] 인간 저-밀도 지단백질 수용체 (hLDLR)의 원형질 막 표적화의 검출을 위해, 커버글라스 챔버에 플레이팅된 MDCK 세포를 GFP-태깅된 내재화-결여 hLDLR 돌연변이체 (LDLR-A18-GFP 플라스미드)로 일시적으로 감염시키고, 8시간

후, 이어지는 16시간 동안 TIZ (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 비히클로 처리하였다. 단백질 합성을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 시클로헥시미드 (시그마-알드리치)를 사용하여 1시간 동안 차단한 후, 원형질 막을 셀마스크(CellMask)TM 오렌지색 원형질 막 색소 (몰레큘라 프로브스, 인비트로젠)를 사용하여 염색하였다. 염색한 후, 세포를 UV 여기 필터가 장착된 라이카 DM-IL 형광 현미경을 사용하여 검사하였다. 영상을 라이카 이미지-매니저500 소프트웨어를 사용하는 라이카 DC-300 카메라로 캡처하였다.

[0177] 혈구흡착 검정- 모의- 또는 PR8-감염된 MDCK 세포 단층을 바이러스 흡착 후에 TIZ, TM 또는 비히클로 처리하였다. p.i. 5시간째에, 세포를 PBS로 3회 세척하고, 4°C에서 20분 동안 PBS 중 0.1%의 인간 적혈구 (RBC)와 함께 인큐베이션하여 뉴라미니다제 활성을 억제하였다. PBS로 3회 세척하여 미결합 적혈구를 제거한 후, MDCK 세포 표면 상에 흡착된 RBC를 위상 대조 현미경검사에 의해 검출하였다. 라이카 이미지-매니저500 소프트웨어를 사용하는, 라이카 DC300 카메라가 장착된 라이카 DMLB 현미경으로 영상을 캡처하였다. 부착 적혈구를 실온에서 2시간 동안 150 mM NH_4Cl 완충제 중에서 용해시키고, 헤모글로빈 흡광도를 $\lambda=540$ nm에서 측정함으로써 정량화하였다.

[0178] 통계적 분석- 통계적 분석은 독립 데이터를 위한 스튜던트(Student) t 검정을 이용하여 수행하였다. 데이터는 중복 샘플의 평균 + S.D.로 나타내었다. < 0.05의 P 값을 유의한 것으로 간주하였다.

[0179] 결과

[0180] 인플루엔자 A 바이러스의 다양한 바이러스주에 대한 티아졸리드의 항바이러스 활성. 티아졸리드 처리의 효과를, 인간 및 개 세포에서 인플루엔자 A 바이러스의 다음 4종의 다양한 바이러스주로 감염시킨 후에 조사하였다: 포유동물 H1N1 A/PR/8/34 (PR8) 및 A/WSN/33 (WSN), 및 H3N2 A/피렌체/7/03 (A/FI) 바이러스, 및 H5N9 저-병원성 조류 바이러스주 A/Ck/It/9097/97 (A/Ck). PR8, WSN 또는 A/Ck 인플루엔자 바이러스로 감염된 마딘-다르비 개 신장 (MDCK) 세포를 바이러스 흡착 기간 직후에 다양한 농도의 NTZ, TIZ 또는 비히클로 처리하고, 바이러스 수율을 감염-후 (p.i.) 24시간째에 결정하였다. NTZ 처리는 바이러스 복제의 용량-의존성 억제를 유발하였다 (각각 PR8, WSN 및 A/Ck 바이러스에 대해 1, 0.5 및 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 EC50) (도 1B). TIZ는 모든 인플루엔자 A 바이러스주에 대해 동등하게 활성이었다 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (PR8) 및 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (WSN 및 A/Ck)의 EC50) (도 1B). TIZ는 또한 H3N2 A/FI 인플루엔자 A 및 B/파르마/3/04 인플루엔자 B 바이러스의 복제를 억제하는 데 있어서 매우 효과적이었다 (도 10 및 11). NTZ도 TIZ도 미감염된 세포를 위한 효과적인 항바이러스 농도 ($\text{CC}_{50}>50$ $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 세포독성이지 않았다. 인플루엔자 바이러스 연구에 전형적으로 이용되는 개 MDCK 세포 이외에도, TIZ는 단핵구성 U937, T-림프구성 저켓 및 폐포 유형 II-유사 A549 세포를 비롯한 다양한 유형의 인간 세포에서 마이크로몰 이하 ($\text{EC}_{50} = 0.3$ $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 비-독성 농도에서 인플루엔자 A 바이러스 복제를 억제하는 데 있어서 효과적이었다 (도 1C). TIZ의 항-인플루엔자 활성은 감염의 m.o.i.와 관계가 없었고, H1N1 PR8 바이러스 복제의 극적인 차단은 다중- 및 단일-단계 바이러스 성장의 조건 하에 동등하게 검출되었다 (도 10 C,D). PR8 인플루엔자 A 바이러스에 대한 몇몇 티아졸리드의 항바이러스 활성을 표 1에 모아두었다. 시험된 티아졸리드 중에서, NTZ (1), TIZ (2), 티족사니드 나트륨 염 (3), 화합물 14-16, 27, 28, 36 및 37은 강력하고 선택성인 것으로 밝혀졌다. 화합물 27 및 28은 고도로 선택성이었고, NTZ 및 TIZ보다 10배 더 강력하였다 (각각 $\text{EC}_{50} = 0.1$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $\text{CC}_{50} > 50$ $\mu\text{g}/\text{ml}$).

[0181] 표 1은 티아졸리드에 대한 인플루엔자 A 세포 검정으로부터의 데이터를 제공한다.

표 1

인플루엔자 A 세포 검정 결과(PR8, MDCK 세포)

번호	바이러스 수율		독성	S. I.
	EC ₅₀	EC ₉₀	LD ₅₀ (MTT)	LD ₅₀ /EC ₅₀
	µg/ml	µg/ml	µg/ml	
1	1	7	>50	>50
2	1	9	>50	>50
3	0.4	2.5	>50	>125
14	1	8	20	20
15	1	7	30	30
16	1	8	20	20
17	3	9	>50	>16.7
27	0.1	0.8	>50	>500
28	0.1	0.7	>50	>500
29	10	>50	>50	>5
30	10	>50	>50	>5
31	>50	>50	>50	ND
32	>50	>50	>50	ND
33	>50	>50	>50	ND
34	>50	>50	>50	ND
35	>50	>50	>50	ND
36	1	8	>50	>50
37	0.6	15	>50	>83.3
38	25	>50	>50	>2
39	10	30	>50	>5
51	3.5	9	30	9
52	30	>50	>50	>1.6
53	10	>50	>50	>5
54	10	>50	>50	>5
59	5	30	>50	>10
63	10	>50	>50	>5
64	>50	>50	>50	ND
65	>50	>50	>50	ND
66	>50	>50	>50	ND

[0182]

[0183]

티아졸리드는 침입-후 수준에서 작용한다. 바이러스 흡착 전의 티아졸리드-처리가 숙주 세포를 바이러스 감염으로부터 보호할 수 있는지 아닌지 조사하기 위해, MDCK 세포를 12, 6 또는 3시간 동안 10 µg/ml TIZ로 처리하였다. 지시된 시간에 약물을 제거하고, 세포 단층을 3회 세척한 후에 PR8 바이러스로 감염시켰다. 도 1D(전)에 나타난 바와 같이, 바이러스 감염 12시간 전까지의 세포의 티록사니드 (2) 전-처리는 인플루엔자 바이러스 복제에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 더욱이, 바이러스 접종원의 처리 (데이터는 제시되지 않음) 또는 단지 흡착 기간 동안만의 세포 처리는 바이러스 복제를 억제하지 않았고 (도 1D), 이는 약물이 바이러스 감염력에도 그의 표적 세포로의 결합 또는 침입에도 직접적으로 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다. p.i. 0 내지 3 시간 사이에 개시된 TIZ 처리가, 바이러스 복제를 억제하는 데 있어서 가장 효과적이었다 (도 1D, 후). p.i. 6 시간째에 시작된 처리는 덜 효과적이지만 여전히 바이러스 복제를 억제할 수 있었던 반면에, p.i. 12시간째에 투여되었을 때는 약물은 효과가 없었다. 바이러스 흡착 후 약물의 단일 투여는, 감염 후 48시간 이상 동안 바이러스 복제를 억제하는 데 있어서 효과적이었다 (도 1E).

[0184]

티아졸리드는 바이러스 헤마글루티닌 성숙을 선택적으로 변경한다. 티아졸리드의 항-인플루엔자 활성이 단백질 합성 변경에 기인한 것인지 아닌지 조사하기 위해, 바이러스 흡착 후에 곧 TIZ로 처리된 모의감염 또는 PR8-감염된 세포를 p.i. 다양한 시간째에 [³⁵S]-메티오닌-시스테인 ([³⁵S]-Met/Cys)으로 표지하고, 단백질을 SDS/PAGE 및 오토라디오그래피, 또는 웨스턴 블롯 분석에 의해 분석하였다. 도 2A에 나타난 바와 같이, 미감염된 세포

또는 PR8-감염된 세포에서, TIZ는 숙주 단백질 합성을 억제하지도 않았고 (하단), 합성된 폴리펩티드의 전기영동 패턴에서의 검출가능한 변형을 유발하지도 않았고 (상단); 또한, TIZ는 진행 개시 인자 2a (eIF2- α)의 인산화에 영향을 미치지도 않았다 (중양). 주요 인플루엔자 바이러스 단백질은 처리되지 않은 세포에서 p.i. 4시간째를 시작으로 다량으로 합성되는 것으로 밝혀졌고; 처리된 세포에서는 대략 79 kDa 분자량 밴드의 소멸 (후속적으로 헤마글루티닌 전구체의 성숙 이소형으로 확인됨) 및 동시에 더 빠르게 이동하는 74 kDa 밴드의 출현을 제외하고는 인플루엔자 바이러스 단백질 합성에서 어떠한 주요 변경도 검출되지 않았다 (도 2A).

[0185] TIZ-처리가 HA 합성을 선택적으로 변경하는지 아닌지 결정하기 위해, TIZ (10 μ g/ml)로 처리된 모의-감염 또는 PR8-감염된 MDCK 세포를 p.i. 5시간째에 대사적으로 표지하고 (4시간-펄스), 방사성표지된 단백질을 항-헤마글루티닌 모노클로날 항체로 면역침전시키고, 이어서 SDS-PAGE 및 오토라디오그래피를 위해 가공하였다. 도 2B에 나타난 데이터는, TIZ에 의해 전기영동 이동성이 변경된 단백질이 바이러스 HAO 전구체임을 확인시켜준다. TIZ-유도된 HAO 변형이 일시적인지 아닌지 결정하기 위해, TIZ (10 μ g/ml) 또는 N-글리코실화 억제제 투니카마이신 (TM, 5 μ g/ml)으로 처리된 모의-감염 또는 PR8-감염된 MDCK 세포를 p.i. 3시간째에 다음 15시간 동안 대사적으로 표지하고, 단백질을 SDS/PAGE 및 오토라디오그래피에 의해 분석하였다. 대안적으로, PR8-감염된 세포를 p.i. 5시간째에 표지하고, 이어서 다음 3시간 동안 10 mM 쿨드 메티오닌 및 1 mM 시클로헥시미드의 존재 하에 추적하였다. 도 2C에 나타난 바와 같이, TIZ-유도된 HAO 변형 후 변형은 p.i. 18시간째에도 여전히 분명하였고, 2종의 HAO 형태의 상이한 전기영동 이동성 패턴에 의해 나타난 바와 같이 TM-유도된 변경과는 상이한 것으로 나타났다; 또한, 감염된 세포에서 TM이 앞서 기재된 바와 같이 HAO 축적의 감소를 유발하는 반면에, 장기간의 TIZ-처리하는 세포내 HAO 수준을 감소시키지 않았다. TM과 상이하게, TIZ는 MDCK 세포에서 폴딩되지 않은 단백질 반응의 마커인 글루코스-조절되는 스트레스 단백질 Grp78/BiP의 발현을 유도하지 않았다 (도 2C). 추적 실험으로부터의 결과는, 처리되지 않은 세포에서 HAO는 합성 10 내지 20분 후에 성숙 79 kDa 형태에 도달하였고, 반면에 TIZ의 존재 하에서는 더 느리게 이동하는 74 kDa HAO 형태가 합성 후 더 늦게 (30분) 나타나기 시작하였고 (도 2D), 다음 2.5시간 이내에 전기영동 이동성에서의 어떠한 추가적 변화도 검출가능하지 않았다 (데이터는 제시되지 않음).

[0186] TIZ가 HAO 글리코실화를 억제하는지 아닌지 결정하기 위해, PR8-감염된 세포를 바이러스 흡착 후에 TIZ 또는 투니카마이신으로 처리하고, p.i. 6시간째에 [³⁵S]-Met/Cys, [³H]-글루코사민 또는 [³H]-만노스로 표지하였다. 도 3A에 나타난 바와 같이, TM이 HAO 글리코실화를 완전히 방지한 반면에, TIZ로 처리하는 것은 글루코사민을 감소시키지 않고, 실제로는 미성숙 HAO 형태로의 만노스 혼입을 증가시켰다. 그러나, 두 억제제로 처리된 세포에 존재하는 HAO 형태와 비교시 TIZ-유도된 미성숙 HAO의 상이한 전기영동 이동성에 의해 나타난 바와 같이, 티아졸리드는 α -만노시다제 I, 1-데옥시만노지리미신 및 α -만노시다제 II, 스와인소닌의 억제제와 상이하게 작용하는 것으로 보인다 (도 3B).

[0187] HA 성숙은 숙주 세포 글리코실화 기구 및 바이러스주 둘 다에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 기재된 HAO 변경이 PR8 바이러스에 대해 특이적이었는지 세포-의존성이었는지 결정하기 위해, 인간 폐 상피 A549 세포를 인플루엔자 A 인간 WSN 바이러스주로 감염시키고, 반면에 MDCK 세포는 조류 A/Ck 바이러스주로 감염시켰다. 두 경우 모두에서, PR8 바이러스주에 대해 기재된 것과 유사한 HAO 성숙에서의 변경이 검출되었고 (도 3, C 및 D), 이는 TIZ가 숙주 세포와 인플루엔자 A 바이러스주의 유형에 관계없이 HAO 성숙을 억제할 수 있다는 것을 나타낸다. 최종적으로, 도 3, E 및 F에 나타난 바와 같이, 니타족사니드는 인간 (E) 및 조류 (F) 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌에서 유사한 변형을 유발하였다.

[0188] 티족사니드는 세포 밖으로의 HA 수송을 억제하고, 숙주 세포로부터의 바이러스 이탈을 방지한다. 다른 세포 표면 당단백질과 같이, HA의 글리코실화는 ER에서 "고-만노스" 올리고사카라이드를 첨가하면서 개시된다. 만노스-풍부 당 성분은 세포 표면으로의 수송 도중 골지체에서 가공되고, 말단 글리코실화가 골지체의 트랜스 시스템에서 일어난다. TIZ가 골지를 통한 HAO 통행에 영향을 미칠 수 있는지 아닌지 조사하기 위해, 본 발명자들은 방사성표지된 단백질 및 HAO 면역침전된 샘플의 분취액을, 말단에서 글리코실화되지 않은 N-연결 탄수화물 채를 제거하는 효소인 엔도- β -N-아세틸글루코사미니다제 H (Endo-H)를 사용한 소화 또는 모든 N-글리칸을 제거하는 효소인 펩티드 N-글리코시다제 F (PNGase-F)를 사용한 소화에 적용시켰다. 예상된 바와 같이, 단백질의 두 형태 모두는 PNGase-F 소화에 민감했으나; 반면에 대조군 세포로부터의 HAO는 말단에서 글리코실화되어 Endo-H 저항성이 되었고, TIZ-처리된 세포로부터의 HAO는 합성 4시간 후까지 프로테아제를 사용한 소화에 민감성인 채로 남아있었다 (도 4, A 및 B). 도 4C에 나타난 바와 같이, TIZ-유도된 변경은 삼량체를 형성하는 HAO 능력을 방지하지 않았다.

- [0189] Endo-H 내성의 획득이 시스 및 중앙 골지 구획 내로의 수송에 대한 마커이므로, 상기 결과는 TIZ-유도된 변경이 ER과 골지 복합체 사이의 HAO 트래픽킹을 차단하여 그의 원형질 막으로의 수송을 방지할 수 있다는 것을 나타낸다. 트랜스-골지 구획으로의 수송의 억제가 특정 트랜스-골지 항체를 이용한 면역형광에 의해 실제로 검출되었다 (도 4D). TIZ-처리가 숙주-세포 원형질 막으로의 HA 수송을 억제하여 성숙한 바이러스 입자의 이탈을 방지한다는 것을 확인하기 위해, 모의-감염된 MDCK 세포 및 PR8-감염된 MDCK 세포를 바이러스 흡착 후에 TIZ (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 투니카마이신 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 처리하고, 세포질 (도 5A) 및 원형질 막 (도 5B)의 바이러스 헤마글루티닌 수준을 p.i. 16시간째에 면역형광법에 의해 검출하였다. 상기 연구는, TIZ-처리된 세포에서 HAO 세포질 수준이 대조군과 유사한 반면에 (도 5A), TIZ-처리된 세포에서 바이러스 단백질의 원형질 막 수준은 극적으로 감소된 것을 확인하였다 (도 5B, 상단). TIZ 처리 후 HA 원형질 막 수준의 실질적 감소는, 수용체-결합 (적혈구의 혈구흡착) 검정에 의해 원형질 막-혼입된 HA의 생물학적 기능을 결정함으로써 추가로 확인되었다 (도 5B, 하단). 병행 연구에서, MDCK 세포를 GFP-태깅된 내재화-결여 인간 저-밀도 지단백질 수용체 돌연변이체 (LDLR-A18-GFP 플라스미드)로 일시적으로 형질감염시킨 후에, TIZ가 LDLR의 원형질 막 표적화를 억제하지 않았다는 것이 밝혀졌고, 이는 티아졸리드의 선택적 효과를 시사한다 (도 11). MDCK 세포 및 HEK-293 세포를 상이한 원형질 막 세포 당단백질인 인간 톨(Toll)-유사 수용체-4로 일시적으로 형질감염시킨 후에 유사한 결과가 얻어졌다 (데이터는 제시되지 않음).
- [0190] 병행 샘플에서, 모의-감염된 세포 및 PR8-감염된 세포를 p.i. 3시간째에 [^{35}S]-Met/Cys로 다음 21시간 동안 대사적으로 표지하고, 방사성표지된 비리온을 감염된 세포의 상청액으로부터 정제하였다. 바이러스 입자에 혼입된 단백질을 SDS-PAGE 및 오토라디오그래피에 의해 분석하였다. 도 5C에 나타난 바와 같이, 바이러스 단백질은 TIZ-처리된 세포의 상청액에서는 검출할 수 없었다. 바이러스 입자의 극적인 감소가, p.i. 24시간째에 TCID50 감염력 검정 (도 5D, 상단) 또는 HAU 검정 (도 5D, 하단)에 의해 병행, 비-표지된 샘플로부터의 바이러스 수율을 결정함으로써 확인되었다.
- [0191] PR8 인플루엔자 A 바이러스에 대한 니타족사나이드와 뉴라미니다제 억제제 자나미비르 및 오셀타미비르를 사용한 조합 연구는 상승작용적 활성을 입증하였다. 임상 인플루엔자 억제제와 조합된 NTZ의 항바이러스 활성을 결정하기 위해, 본 발명자들은 NTZ와 자나미비르의 조합물 및 NTZ와 오셀타미비르의 조합물을 다양한 농도에서 시험하였다. 자나미비르 및 오셀타미비르는, 감염된 숙주 세포로부터의 바이러스의 효과적인 방출을 약화시키고 티아졸리드의 메카니즘과 명백하게 상이한 메카니즘에 의해 작용하는 뉴라미니다제 (NA) 억제제이다.
- [0192] NTZ와 자나미비르 조합물 처리의 효과를, 개 세포에서 포유동물 H1N1 A/PR/8/34 (PR8) 바이러스로 감염시킨 후에 조사하였다. PR8 인플루엔자 바이러스로 감염된 마딘-다르비 개 신장 (MDCK) 세포를 바이러스 흡착 기간 직후에 다양한 농도의 NTZ, 자나미비르 또는 비히클로 처리하고, 바이러스 수율을 감염-후 (p.i.) 24시간째에 결정하였다.
- [0193] 별도의 연구에서, NTZ 처리는 PR8 바이러스에 대해 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (3.3 μM)의 EC50으로 바이러스 복제의 용량-의존성 억제를 유발하였다 (도 1B). 하기 표 2는 조합 실험으로부터의 항바이러스 데이터를 요약한다. 활성은 처리되지 않은 대조군에 비교하여 HAU/ml의 감소로 나타내었다. 자나미비르를 사용한 실험에서, NTZ는 이전 연구에서 보다 약간 더 강력한 것으로 보였고, 약 0.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (약 2.2 μM)의 EC50을 가졌다. 자나미비르는 단독으로 단지 1 μM 의 가장 높은 시험 농도에서만 바이러스 수율의 50% 감소 (억제)를 제공하였고, 따라서 본 발명자들은 자나미비르가 상기 실험 조건 하에 1 μM 의 EC50을 가진 것으로 결정하였다 (도 6 및 7, 좌측). 1 μM 의 자나미비르와 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0.33 μM)의 NTZ의 조합물은 처리되지 않은 대조군에 비교하여 바이러스 복제의 83% 감소를 일으켰고, 이는 자나미비르를 단독으로 처리하는 것에 비교하여 대략 3배의 효능 증가에 해당한다 (도 6, 우측).

표 2

NTZ와 자나미비르 조합물의 항-인플루엔자 활성

PR8 수율 : HAU/ml

니타족사나이드 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	대조군	자나미비르 (μM)		
		0.01	0.1	1
0	48	48	48	24
0.1	48	48	48	8
1	16	16	8	1

[0194]

- [0195] 0.1 μM 의 자나미비르를 단독으로 처리하는 것은 바이러스 복제에 어떠한 영향도 미치지 않았다 (도 7, 좌측). 그러나, 0.1 μM 의 자나미비르와 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (3.3 μM)의 NTZ의 조합물은 NTZ를 단독으로 처리하는 것에 비하여 바이러스 복제의 50% 더 큰 감소를 초래하였다 (도 7, 우측). 상기 결과는 자나미비르를 단독으로 처리하는 것에 비하여 대략 6배의 효능 증가, 및 NTZ를 단독으로 처리하는 것에 비하여 2배의 효능 증가에 해당한다. 1.0 μM 의 자나미비르와 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (3.3 μM)의 NTZ의 조합물은 NTZ를 단독으로 처리하는 것에 비하여 바이러스 복제의 94% 감소를 초래하였다 (도 7, 우측). 상기 결과는 자나미비르를 단독으로 처리하는 것에 비하여 대략 24배의 효능 증가, 및 NTZ를 단독으로 처리하는 것에 비하여 16배의 효능 증가에 해당한다. 종합하면, 상기 결과는 자나미비르와 NTZ 조합물의 항바이러스 활성이 PR8 인플루엔자 A 바이러스에 대하여 상승작용적임을 시사한다.
- [0196] 유사한 방식으로, NTZ와 오셀타미비르 조합물 처리의 효과를 포유동물 H1N1 A/PR/8/34 (PR8) 바이러스로 감염된 후의 개 세포에서 조사하였다. PR8 인플루엔자 바이러스로 감염된 마딘-다르비 개 신장 (MDCK) 세포를 바이러스 흡착 기간 직후에 다양한 농도의 NTZ, 오셀타미비르 또는 비히클로 처리하고, 바이러스 수율을 감염-후 (p.i.) 24시간째에 결정하였다.
- [0197] 상기 실험에서, NTZ는 1 $\mu\text{g/ml}$ (3.3 μM)의 EC50을 보여주었다. 본 발명자들은 1 μM 까지의 시험 농도의 오셀타미비르를 단독으로 사용함으로써 바이러스 수율의 감소 (억제)를 관찰하지 못했고, 따라서 EC50은 오셀타미비르에 대해서는 결정되지 않았다 (도 8 및 9, 좌측). 1 μM 의 오셀타미비르와 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (0.33 μM)의 NTZ의 조합물은, 오셀타미비르 또는 NTZ를 단독으로 처리하는 것에 비하여 대략 1.5배의 효능 증가에 해당하는 바이러스 복제의 33% 증가된 감소를 초래하였다 (도 8, 우측). NTZ 용량이 그의 확립된 EC50의 1/10이었음에 주목한다.
- [0198] 1.0 μM 의 오셀타미비르와 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (3.3 μM)의 NTZ의 조합물은 오셀타미비르를 단독으로 처리하는 것에 비하여 바이러스 복제의 67% 증가된 감소, 및 NTZ를 단독으로 처리하는 것에 비하여 바이러스 복제의 33% 증가된 감소를 초래하였다 (도 9, 우측). 상기 결과는 오셀타미비르를 단독으로 처리하는 것에 비하여 대략 3배의 효능 증가, 및 NTZ를 단독으로 처리하는 것에 비하여 1.5배의 효능 증가에 해당한다. 종합하면, 상기 결과는 오셀타미비르와 NTZ 조합물의 항바이러스 활성이 PR8 인플루엔자 A 바이러스에 대하여 상승작용과 상승작용 사이 어딘가에 있음을 시사한다.
- [0199] 여러 생화학적 접근으로부터의 결과는, TIZ가 시스 및 중앙 골지 구획 내로의 수송에 대한 마커인 엔도글리코시다제-H 소화에 대한 내성에 선행하는 단계에서 HA 말단 글리코실화를 차단한다는 것을 입증하였다. 감염된 세포에 의해 생성된 바이러스 입자의 면역현미경검사 연구 및 분석은, TIZ-유도된 변형이 ER과 골지 복합체 사이의 HAO 트래픽킹을 악화시켜 그의 숙주 세포 원형질 막으로의 수송 및 삽입을 방지하고, 성숙 비리온의 숙주 세포로부터의 이탈을 차단한다는 것을 확인시켰다. HA 성숙의 변형이 TIZ의 바이러스 당단백질의 직접 결합에 기인하는지, 아니면 세포-매개 효과로 인한 것인지는 아직 확립되지 않은 채로 남아 있다.
- [0200] 티아졸리드는 앞서, 2종의 상이한 RNA 바이러스인 C형 간염 (HCV), 양성 가닥 RNA 바이러스 및 이중-가닥 RNA 바이러스인 로타바이러스, 및 DNA 바이러스인 B형 간염 (HBV) 바이러스에 대해 항바이러스 활성을 소유한다는 것을 보여주었다. 광범위한 항바이러스 활성은 특정 바이러스 표적보다는 세포-매개 효과를 시사한다. 바이러스 당단백질의 성숙이 HBV 및 HCV에 대한 항바이러스 활성에 관련될 수 있는 가능성이 현재 연구 하에 있다. 로타바이러스의 경우에, 구조 바이러스 당단백질 VP7의 TIZ-유도된 변형이 최근 보여졌고 ([Santoro MG and Rossignol JF], 미발표된 결과), 이는 핵심 바이러스 당단백질의 성숙 및 수송이 상기 새로운 약물 클래스의 항바이러스 활성의 일반적 메카니즘일 수 있다는 가설을 보강한다. 티아졸리드가, 그의 성숙이 세포막으로의 바이러스 당단백질 트래픽킹을 요구하지 않는 피코르나바이러스인 인간 리노바이러스의 복제에는 유의하게 영향을 미치지 않는다는 발견은 상기 가설을 추가로 지지한다.
- [0201] 사용된 약어는 다음과 같다: NTZ, 니타족사니드; TIZ, 티족사니드; EC50, 유효 농도 50%; CC50, 세포독성 농도 50%; HA, 헤마글루티닌; TM, 투니카마이신; Endo-H, 엔도- β -N-아세틸글루코사미니다제 H; PNG-ase F, 펩티드 N-글리코시다제 F; TCID50, 조직 배양 감염 용량 50%; SW, 스와인소닌; DMJ, 1-테옥시만노지리미신; HAU/ml, 혈구응집 단위/ml; EGS, 에틸렌 글리콜 비스(숙신이미딜숙시네이트).
- [0202] 바이러스 감염을 치료하기 위한 티아졸리드, 예컨대 NTZ의 저용량 투여. NTZ는 인플루엔자의 치료로서 5일 동안 1일 2회 300 mg 또는 600 mg의 용량으로 경구로 투여될 수 있다. 임상 시험은 상기 투여 요법이 인플루엔자를 치료하는 능력을 갖는다는 것을 보여주었다. 바람직하게는, 니타족사니드의 투여량은 5일 동안 1일 2회 300 mg이고, 이는 장 감염을 치료하는 데 필요한 NTZ의 투여량보다 더 적고, 그로 인해 더 높은 투여량과 관련된 부작용의 감소를 가능하게 한다. 티아졸리드는 또한 변형 방출 이중-층 정제로서 투여될 수 있다. 그와 같이,

티아졸리드는 바이러스 감염을 치료하기 위해 5일 동안 1일 2회 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg 또는 600 mg 용량으로 투여될 수 있다.

[0203] 티아졸리드, 예컨대 니타족사니드는 또한 다른 호흡기 바이러스에 대해 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 생체내 데이터를 표 3에 나타내었다.

표 3

다른 호흡기 바이러스에 대한 활성

바이러스	EC ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)
파라인플루엔자	0.5	>50
코로나바이러스	1.0	>50
아데노바이러스	0.2	>50
호흡기 세포융합 바이러스	0.5	>50
리노바이러스	>10	>50

[0204]

[0205] 흥미롭게도, 티아졸리드, 예컨대 NTZ는 또한 인플루엔자-유사 질병 (ILI)에 걸린 환자를 치료하는 능력을 갖는다. 인플루엔자-유사 질병은 인플루엔자의 증상을 나타내며, 이는 또 다른 바이러스 또는 병원체에 기인한 것일 수 있다.

[0206] 인플루엔자-유사 질병에 걸린 소아과 환자 및 성인에서 증상의 지속기간에 대한, 5일 동안 1일 2회의 니타족사니드의 효과의 평가를 수행하였다. 2회의 이중-맹검 위약 대조 시험을 수행하였다. 12개월 - 11세의 소아는 NTZ 현탁액 (n=100, 군당 50)을 제공받았고, 12세 이상의 환자는 NTZ 500 mg 정제 (n=86, 군당 43)를 제공받았다. 단일 기관 시험을 수행하였다. 연구는 타미플루(TAMIFLU)® 시험을 기반으로 하였다. 시험은 특정 포함 / 제외 기준을 따랐다. 포함은 100°F 초과 열이 있고 1개 이상의 호흡기 증상 (기침, 비루, 재채기, 인후통 등 포함)을 갖고/거나 1개 이상의 전신 증상 (근육통, 권태감, 피로, 두통, 오한/발한 등)을 갖는 1-11세의 소아 및 12세 이상의 환자를 요구하였다. 주요 제외는 72시간 초과 증상 지속기간, 임신 또는 모유수유, 동반되는 항생제/항바이러스 약, 또는 천식 또는 다른 폐 질환의 병력을 포함하였다.

[0207] 환자를 5일 동안 1일 2회 NTZ 또는 위약을 제공받도록 무작위배정하였다. 비인두 면봉채취표본을 7종의 바이러스 (RSV, 인플루엔자 A & B, 파라인플루엔자 1-3 및 아데노바이러스)에 대한 신속 직접 면역형광 검정 (시뮬플루오르(SimulFluor) 호흡 스크리닝)을 위한 기준선에 수집하였다. 각각의 증상을 0 내지 3의 척도: 부재, 경도, 중등도, 중증으로 등급화하여 환자 (또는 부모)에 의해 일지에 증상을 기록하였다. 조직을 지플록식 플라스틱 백에 보관하고, 검량을 위한 연구 인원에 의해 매일 수집하였다. 추적 신체 검사를 제7일에 수행하였다. 1차 종점은 기준선으로부터 각각의 증상이 부재 또는 경도 (<2)로 돌아간 시간이었다. 2차 종점은 항생제 사용, 제7일 호흡기 증상, 매일의 조직/점액 검량을 포함한다.

[0208] 추가의 생화학적 접근으로부터의 결과는 니타족사니드가 추가의 호흡기 바이러스에 영향을 미친다는 것을 입증하였다. 환자 구성에 대해서는 표 4를, 바이러스 검출에 대해서는 표 5를 참조한다. 표 5는 대부분의 환자가 아데노바이러스, RSV, 인플루엔자 A, 파라인플루엔자 1의 존재에 대해 양성 반응이 아니었다는 것을 보여준다. 그러나, 도 12-15는 NTZ가 인플루엔자 유사 질병에 걸린 환자를 치료하는 능력을 갖는다는 것을 보여준다. 상기 데이터는 놀랍게도, 인플루엔자의 증상을 나타내지만 아데노바이러스, RSV, 인플루엔자 A, 파라인플루엔자 1에 양성 반응이 아닌 환자가 티아졸리드, 예컨대 NTZ로 치료될 수 있다는 것을 보여준다.

표 4

환자

	소아 (<12세)		성인 (≥12세)	
	NTZ	위약	NTZ	위약
성별 (M/F)	24/26	29	10/33	17/26
연령, 세 (평균 ± S.D.)	4.0 ± 2.8	3.5 ± 2.3	28.9 ± 13.3	31.4 ± 12.7
연령, 세 (범위)	1-9	1-11	12-61	12-61
체중, kg (평균 ± S.D.)	15.4 ± 6.0	14.8 ± 4.8	56.2 ± 11.2	58.9 ± 10.5
증상 (%)				
비좁	100%	100%	100%	98%
비폐색	80%	76%	79%	86%
재채기	92%	96%	91%	98%
인후통	84%	80%	93%	81%
열	84%	80%	86%	81%
기침	94%	92%	94%	86%
권태감	92%	88%	91%	88%
두통	70%	66%	70%	79%
오한	60%	50%	65%	60%

[0209]

표 5

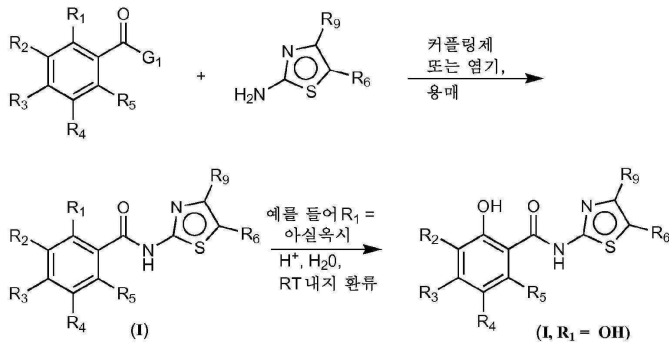
신속 검정에 의해 검출된 바이러스

	소아 (<12세)		성인 (≥12세)	
	NTZ	위약	NTZ	위약
아데노바이러스 (n,%)	4 (8%)	8 (16%)	2 (5%)	2 (5%)
RSV (n, %)	-	1 (2%)	1 (2%)	3 (7%)
인플루엔자 A (n, %)	2 (4%)	-	1 (2%)	-
파라인플루엔자 1 (n, %)	1 (2%)	-	-	-
없음 (n, %)	43 (86%)	41 (82%)	39 (91%)	38 (88%)

[0210]

[0211]

본 발명의 화합물 (I)은 하기 반응식 (식 중, R₆ 및 R₉는 니트로 (NO₂) 및 SO₂R₁₂로부터 선택될 수 있음)에 따라, 적합한 반응 조건 하에 본원에 정의된 바와 같이 아로일 유도체 (식 중, G₁은 히드록시, 클로로, 플루오로, 브로모, 알콕시 등임)를 아미노티아졸 유도체와 반응시킴으로써 합성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 반응은 일반적으로 하기와 같이 나타낼 수 있다:



[0212]

[0213] 본 발명의 화합물 (I)은 또한 공개된 절차 US3950351, US6020353, PCT W02006042195A1 및 US2009/0036467A에 따라 합성할 수 있다.

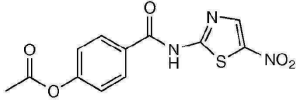
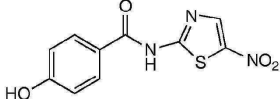
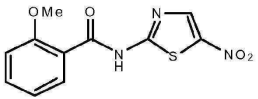
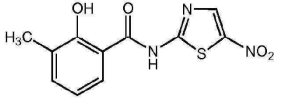
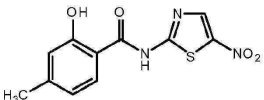
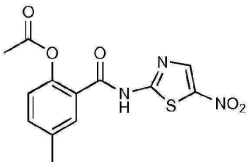
[0214] 본 발명의 화합물의 실시예는 표 6에 나열된 하기 화합물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 실시예의 세트는 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다.

표 6

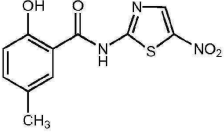
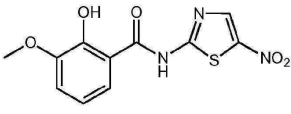
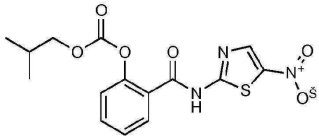
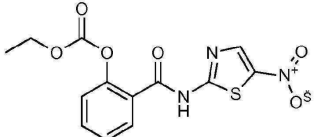
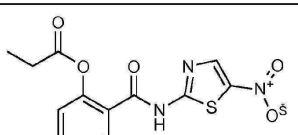
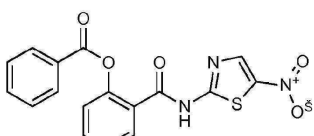
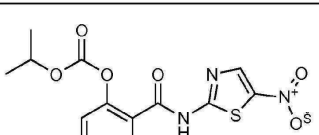
본 발명의 실시예

번호	화합물	m.p. (°C)
1		202
2		254
3		>300
4		203-205
5		259-260

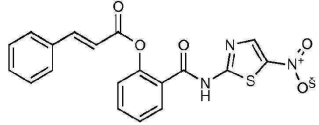
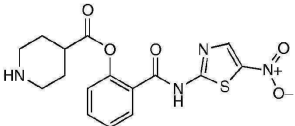
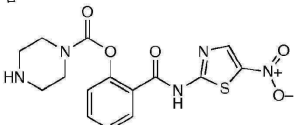
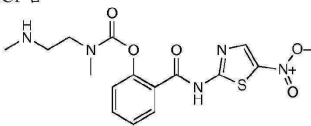
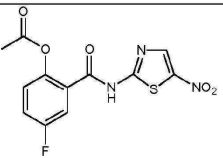

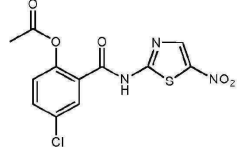
[0215]

<p>6</p>		<p>246-248 (분해)</p>
<p>7</p>		<p>263-265</p>
<p>8</p>		<p>230-232 (분해)</p>
<p>9</p>		<p>208-210</p>
<p>10</p>		<p>246-248 (분해)</p>
<p>11</p>		<p>187.5- 189.5</p>

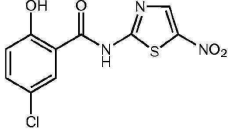
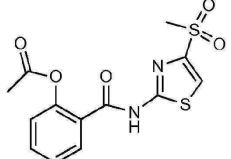
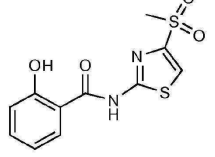
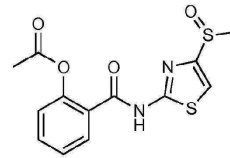
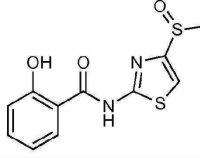
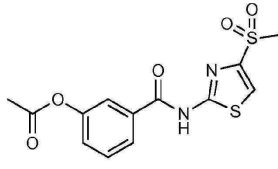
[0216]

12		237.5-238.0
13		측정되지 않음
14		125.3-132.3
15		159.4-161.4
16		158.5-160.5
17		229.4-230.4
18		180.3-182.3

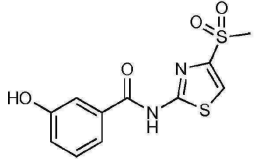

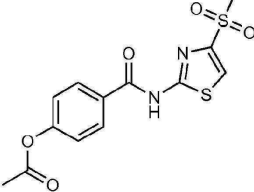
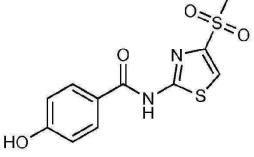
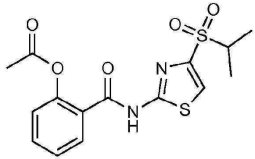
[0217]

19		166.2-167.0
20	.HCl 염 	230 (분해)
21	.HCl 염 	244-245
22	.HCl 염 	138.5-140
23		168-172 (분해)
24		233-235 (분해)
25		177-180

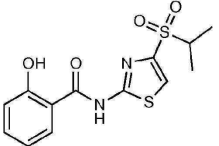
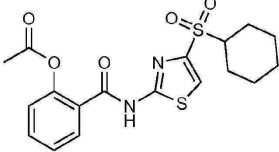
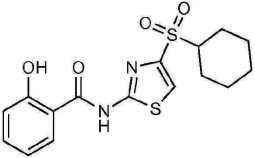
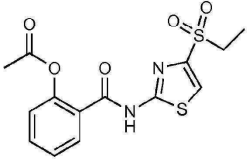
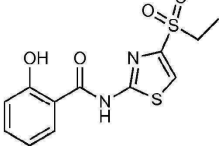
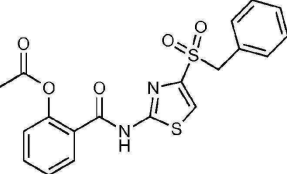
[0218]

26		236-240 (분해)
27		175.6- 178.8
28		231-235
29		167.3- 169.3
30		260-261
31		209.0- 212.0

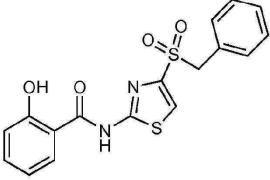
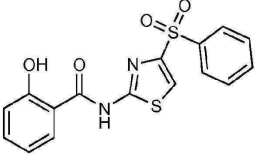
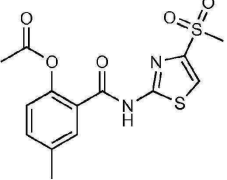
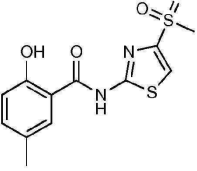
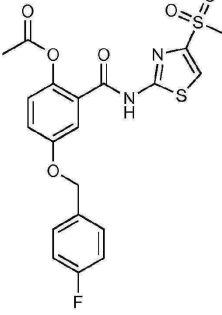
[0219]

32		258.0-259.0 (분해)
33		185.7-188.7
34		242.0-246.0 (분해)
35		253.0-255.0 (분해)
36		141-145

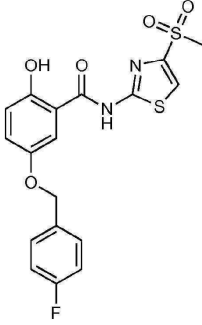
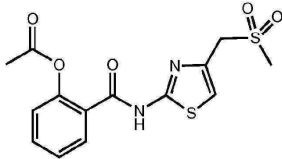
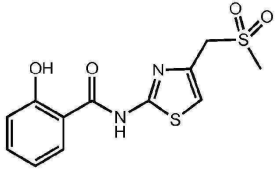
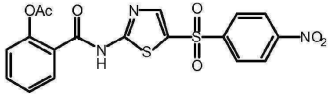
[0220]

37		201-203 (
38		152-155
39		247-250
40		181.0- 186.5
41		234.7- 240.0
42		158.7- 160.8

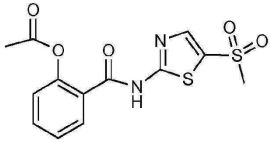
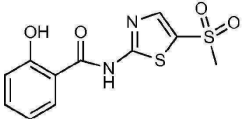
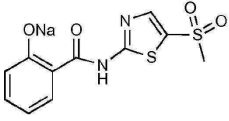
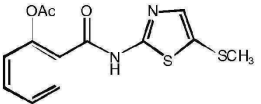
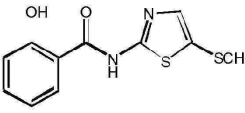
[0221]

43		192-197
44		235-238
45		190-192
46		216-221 (분해)
47		211-215

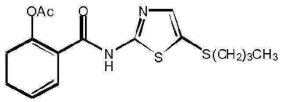
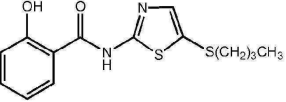
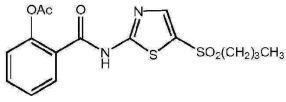
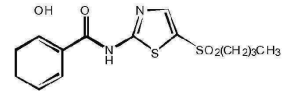
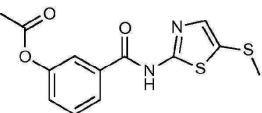
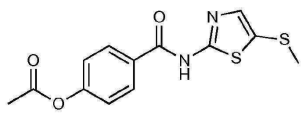
[0222]

48		231-232 (분해)
49		166.9- 169.0
50		229-230
51		측정되지 않음

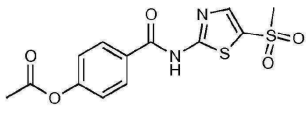
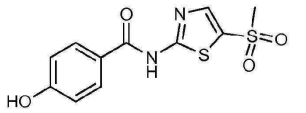
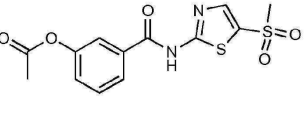
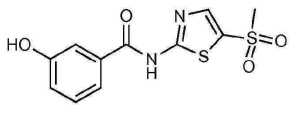
[0223]

52		173-175
53		282-283
54		측정되지 않음
55		145-147
56		225-226

[0224]

57		100-101
58		180-181
59		138-140
60		235-236
61		135.2-136.2
62		193.5-195.5

[0225]

63		279.6-280.6
64		252.5-255.5
65		186.5 (dec)
66		271.1-272.3

[0226]

[0227]

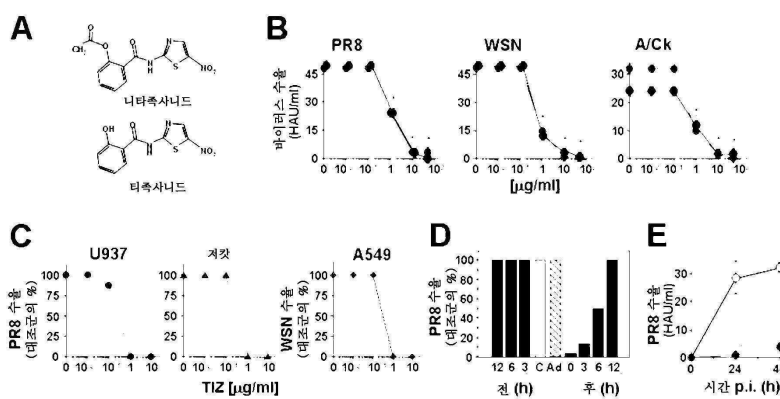
상기가 특정 바람직한 실시양태에 관한 것일지라도, 본 발명이 이로써 제한되지는 않는다는 것이 이해될 것이다. 다양한 변형이 개시된 실시양태에 대해 이루어질 수 있으며, 이러한 변형은 본 발명의 범주 내에 있도록 의도된다는 것을 당업자는 알 것이다.

[0228]

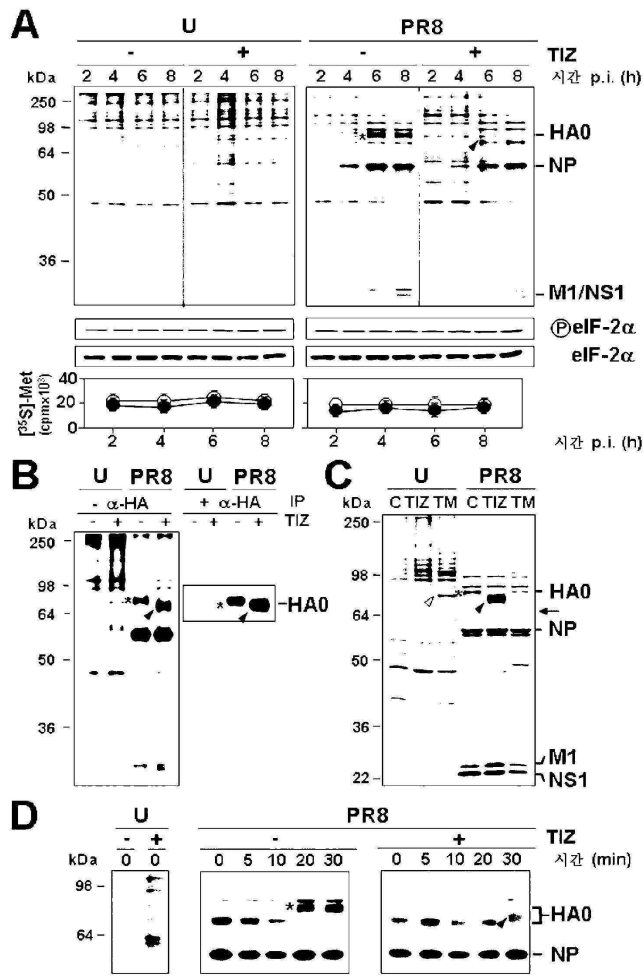
본 명세서에 인용된 모든 공보, 특허 출원 및 특허는 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

도면

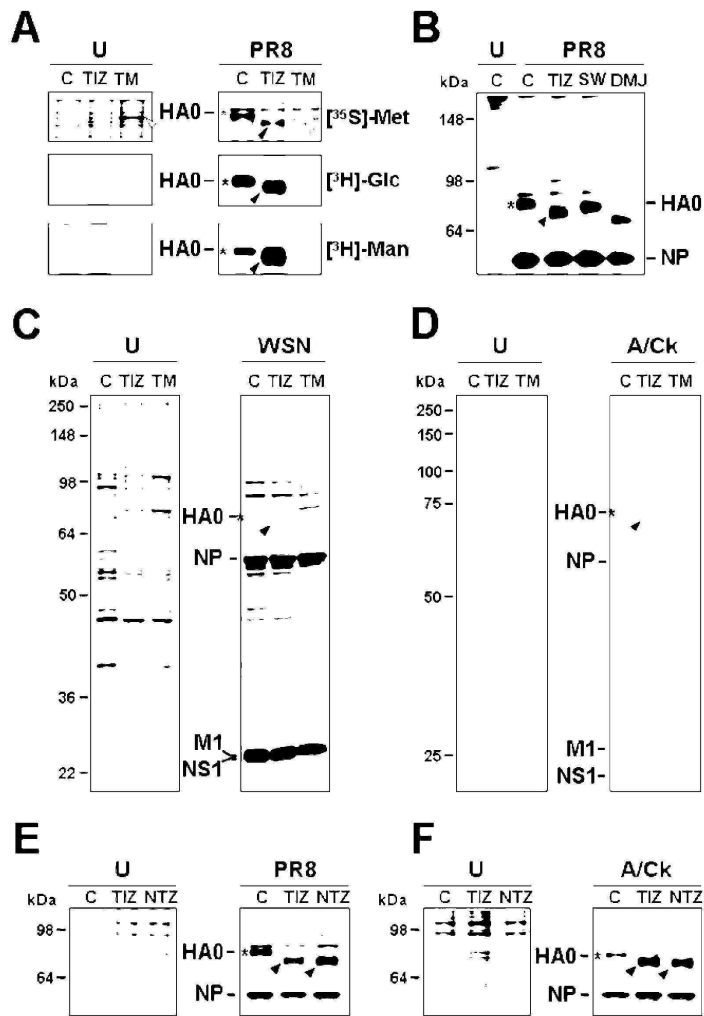
도면1



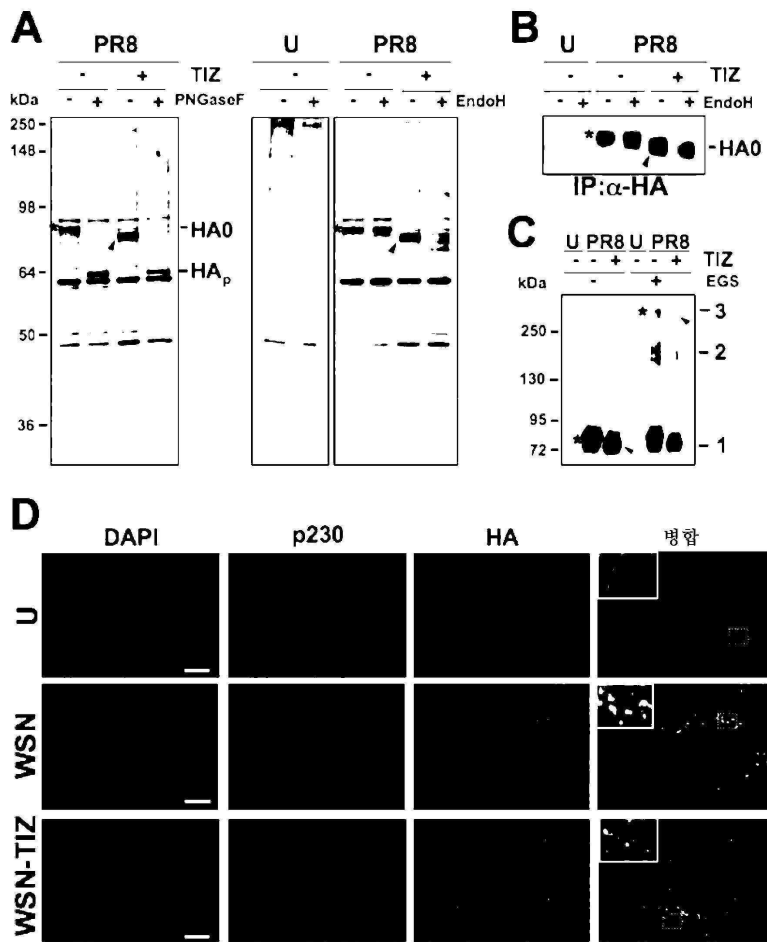
도면2



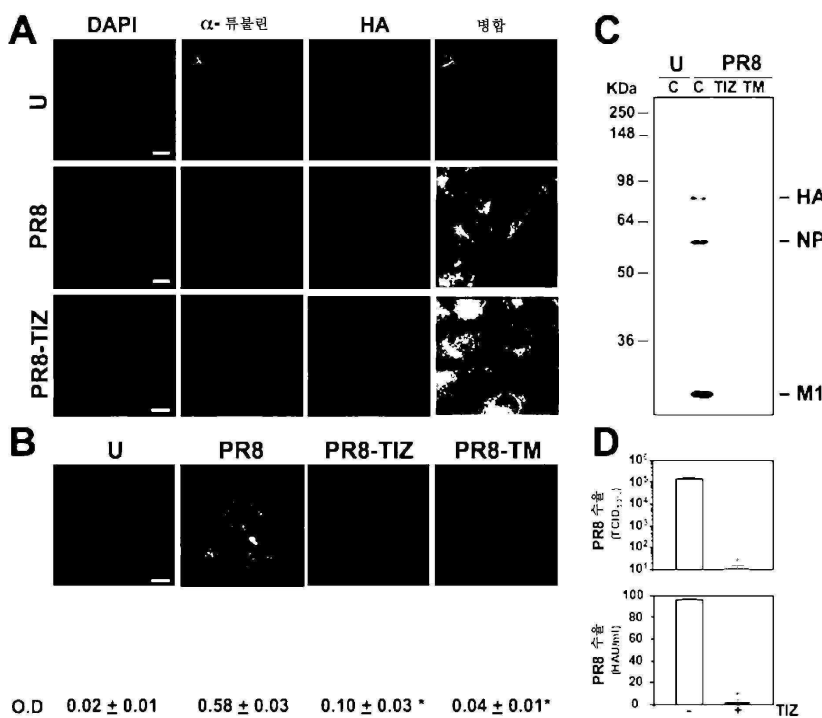
도면3



도면4

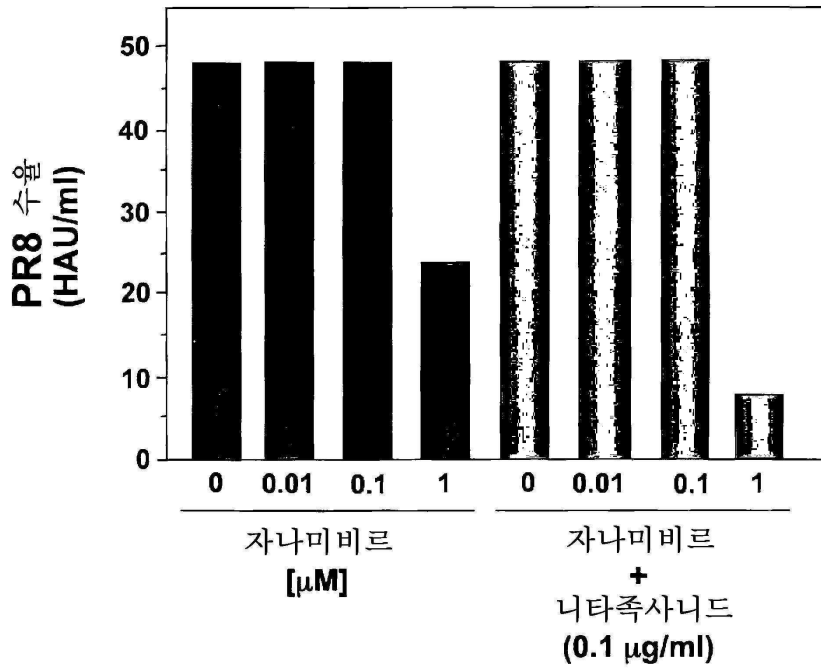


도면5



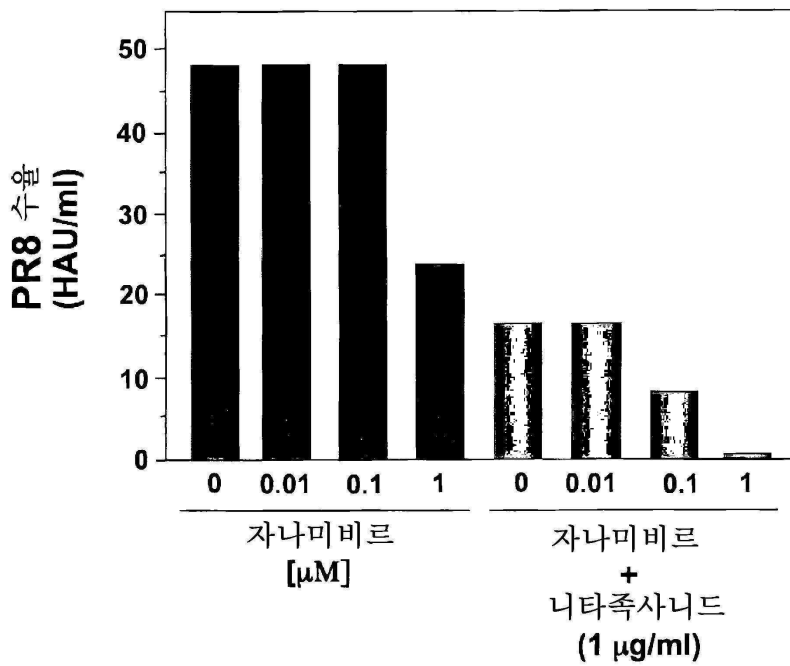
도면6

MDCK/PR8

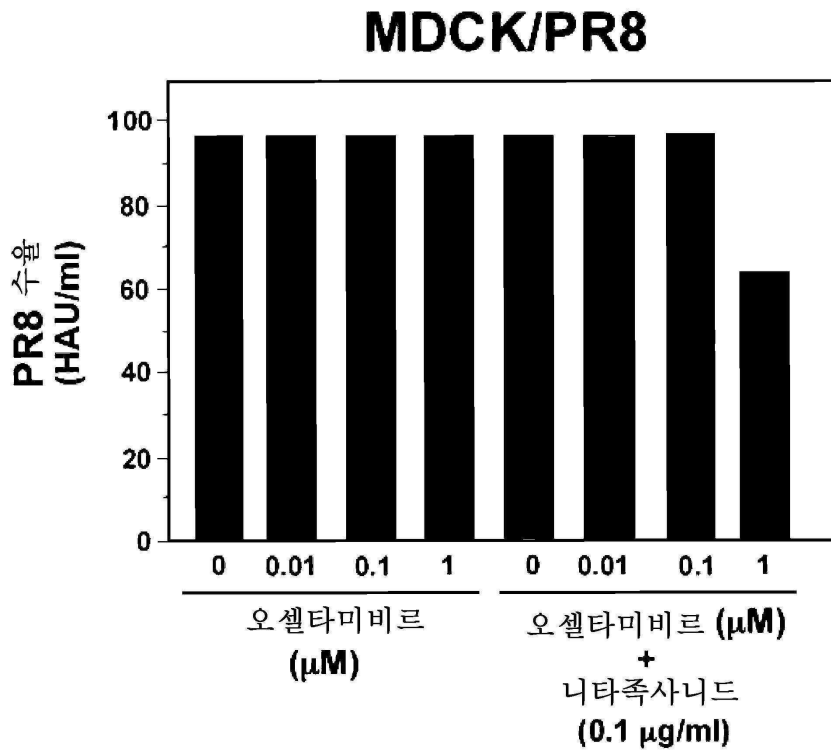


도면7

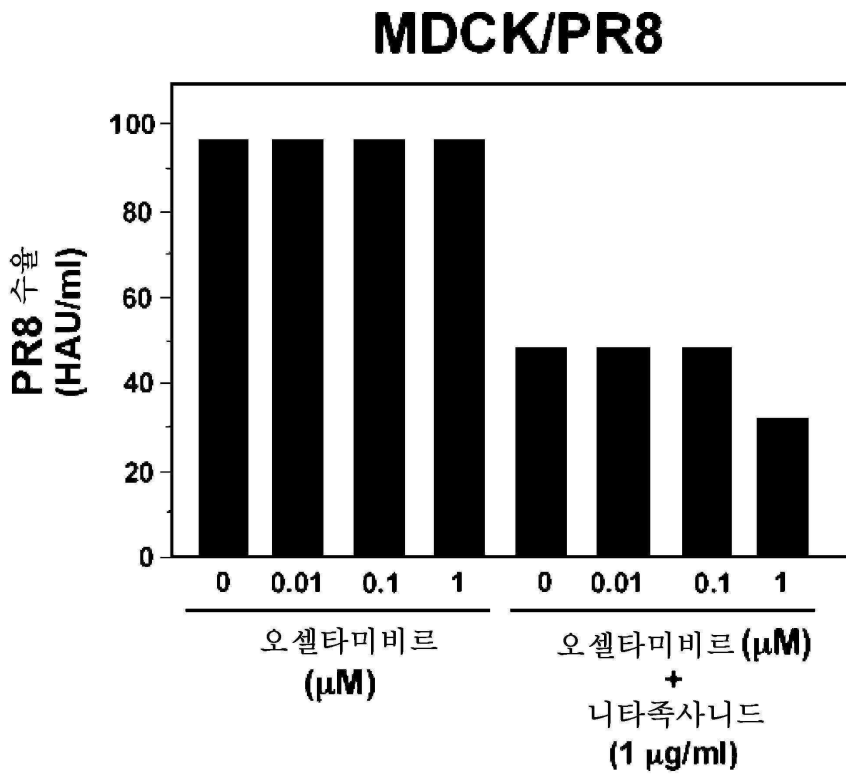
MDCK/PR8



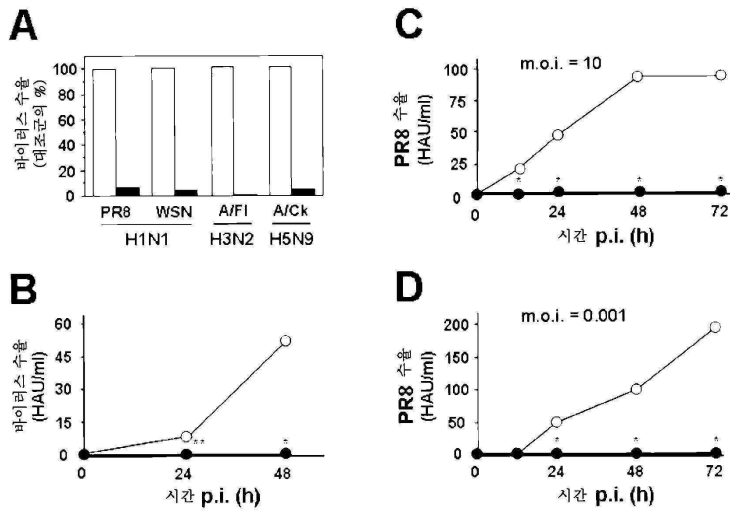
도면8



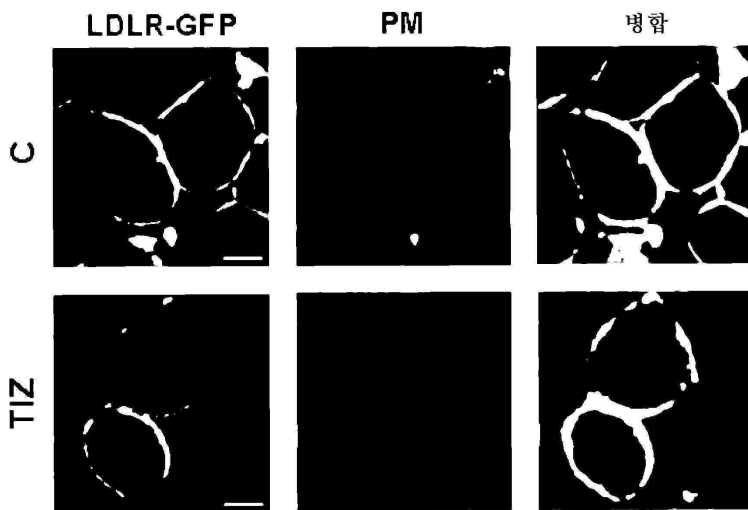
도면9



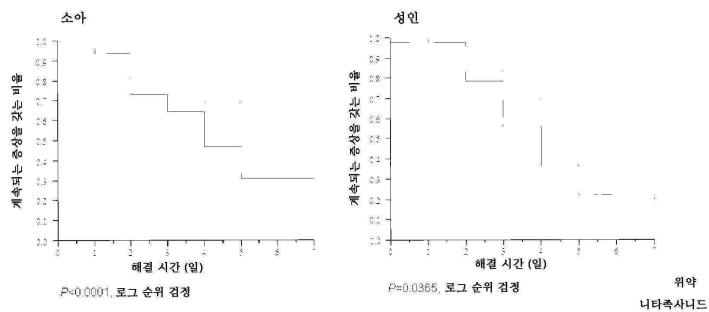
도면10



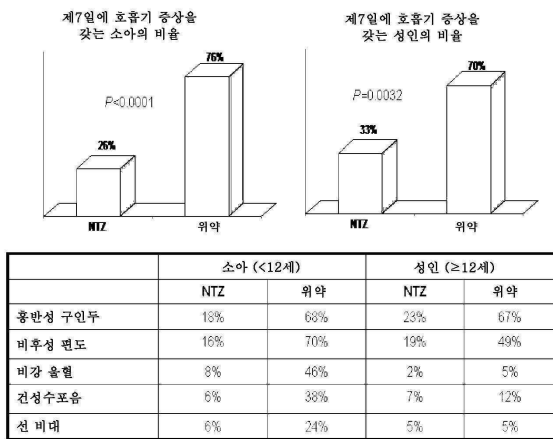
도면11



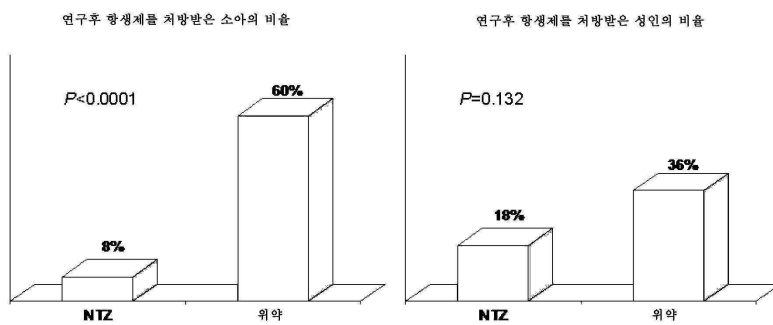
도면12



도면13



도면14



도면15

