

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0092154  
(43) 공개일자 2020년08월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/4439 (2006.01) A23K 20/137 (2016.01)

A23K 50/30 (2016.01) A61P 31/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/4439 (2013.01)

A23K 20/137 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2019-0009346

(22) 출원일자 2019년01월24일

심사청구일자 2019년01월24일

(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)

탁동섭

전라북도 익산시 고봉로5길 23, 카카오빌 404호

김원일

전라북도 전주시 덕진구 호성로 170, 308동 403호 (호성동2가, 진흥더블파크3단지아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 6 항

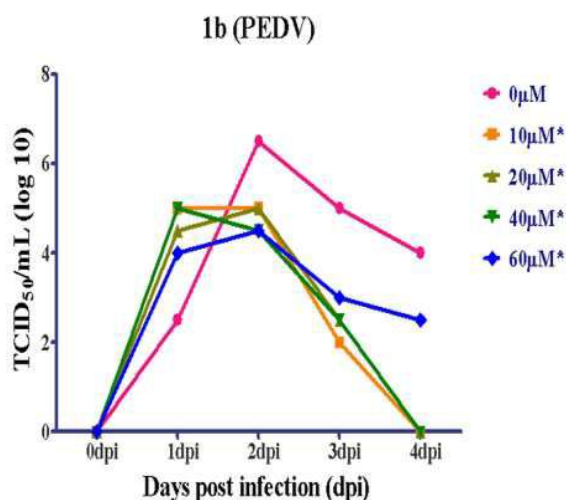
(54) 발명의 명칭 동물의 바이러스 질환 예방 또는 치료용 조성물

## (57) 요약

본 발명은 동물의 바이러스 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 바이러스 질환 예방 또는 치료용 동물 의약품 조성물 및 바이러스 질환 예방 또는 개선용 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 조성물은 세포 독성없이 돼지유행성 설사바이러스(PEDV)에 대한 항바이러스가 효과가 뛰어나므로, 상기 바이러스의 감염으로 유발되는 질환의 예방 또는 치료에 유용한 동물 의약품 및 사료 첨가제로 활용되어, 돼지유행성 설사바이러스에 의해 유발되는 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

## 대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

**A23K 50/30** (2016.05)

**A61P 31/14** (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545018125

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 가축질병대응개발사업(R&D)

연구과제명 항바이러스 제제 합성 및 라이브러리 구축

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2018.09.05 ~ 2019.09.04

---

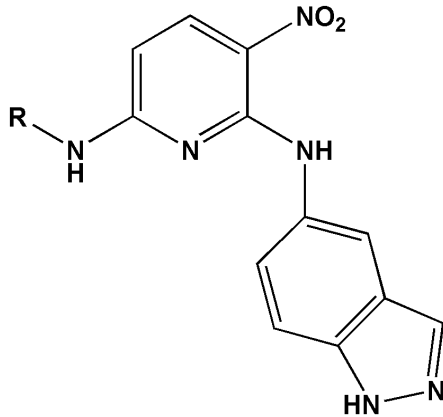
## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 바이러스 질환 예방 또는 치료용 동물 의약품 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 상기 R은 수소, 하나 이상의 (C1~C4)알킬, (C1~C4)알콕시, 할로겐, 또는 니트로에서 선택됨.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 화학식 1에서 상기 R은 (C2~C4)알킬인 것을 특징으로 하는, 바이러스 질환 예방 또는 치료용 동물 의약품 조성물.

#### 청구항 3

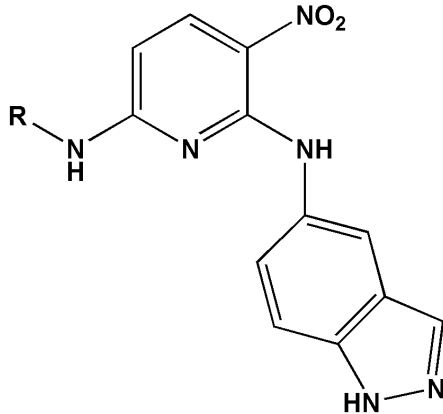
제 1 항에 있어서,

상기 바이러스는 돼지유행성설사 바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus; PEDV)인 것을 특징으로 하는, 바이러스 질환 예방 또는 치료용 동물 의약품 조성물.

#### 청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 바이러스 질환 예방 또는 개선용 사료 첨가제 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 상기 R은 수소, 하나 이상의 (C1~C4)알킬, (C1~C4)알콕시, 할로젠, 또는 니트로에서 선택됨.

#### 청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 화학식 1에서 상기 R은 (C2~C4)알킬인 것을 특징으로 하는, 바이러스 질환 예방 또는 개선용 사료 첨가제 조성물.

#### 청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 바이러스는 돼지유행성설사병 바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus; PEDV)인 것을 특징으로 하는, 바이러스 질환 예방 또는 개선용 사료 첨가제 조성물.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 동물의 바이러스 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 돼지유행성설사병(Porcine Epidemic Diarrhea, PED)은 돼지유행성 설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)의 감염에 의하여 연령에 관계없이 발생하는 돼지의 전염병으로, 현재 우리나라를 비롯한 아시아 국가의 양돈 산업에 막대한 피해를 끼치는 중요한 바이러스성 질환 중 하나이다. 돼지유행성 설사바이러스는 돼지전염성위장염(Transmissible Gastroenteritis; TGE)의 원인 바이러스와 형태가 같은 코로나바이러스과(Coronaviridae)에 속하며, 생물학적·물리화학적 성상은 돼지전염성위장염 바이러스와 비슷하지만 항원적으로는 관련성이 없는 코로나바이러스이다.

[0003] 돼지유행성설사병은 구토와 수양성 설사가 특징으로 돼지전염성위장염과 매우 유사한 증상을 일으키나, 돼지전염성위장염에 비해 일령에 관계없이 연중 발생하는 편이고 특히, 겨울철과 이른 봄에 더 많이 발생하는 계절적 특성을 가지고 있다. 통상적으로 돼지유행성설사병은 해마다 10월 말부터 11월 초부터 발생하여 이듬해 2-3월까지 피해를 입히는데, 1차 발생 시 적절한 방어 전략을 수립하지 못한 농장은 지속적으로 만성화되어 피해가 커지게 된다.

[0004] 돼지유행성설사병은 1992년 처음으로 국내에서 발생보고 된 후 전국적으로 확산되어 최근 발생이 증가되고 있고, 겨울철 이외의 다른 계절에도 발병하는 등 그 발병 양상도 훨씬 다양해져가고 있다. 하지만, 돼지유행성설사병은 바이러스에 의한 질환이기 때문에 근본적인 치료법이 없고, 백신 등과 같은 현재의 의학적 기술로는 완벽히 방어할 수 없어, 상기 바이러스에 의한 질환을 효과적으로 예방 또는 치료하기 위한 제제의 개발이 절실히 필요한 상황이다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1140582호 (2012.04.27. 등록)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

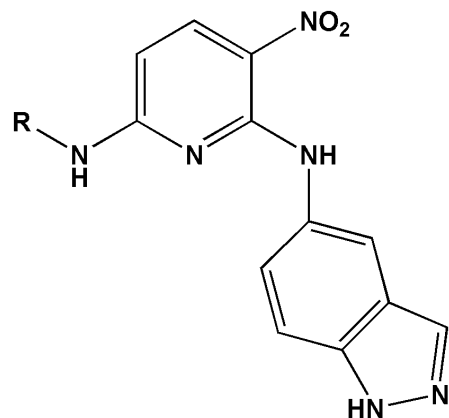
[0006] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해, 본 발명은 바이러스 질환 예방 또는 치료용 동물 의약품 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 바이러스 질환 예방 또는 개선용 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 본 발명에 따른 바이러스 질환 예방 또는 치료용 동물 의약품 조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[0009] [화학식 1]

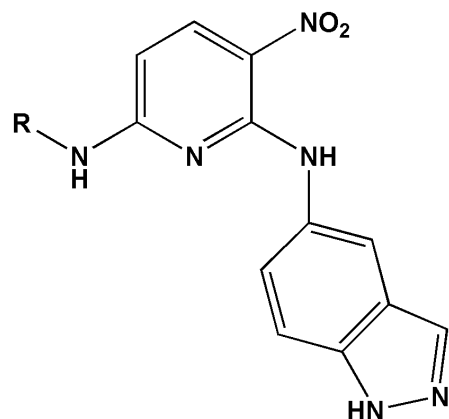


[0010]

[0011] 상기 화학식 1에서 상기 R은 수소, 하나 이상의 (C1~C4)알킬, (C1~C4)알콕시, 할로젠, 또는 니트로에서 선택될 수 있다.

[0012] 본 발명에 따른 바이러스 질환 예방 또는 개선용 사료 첨가제 조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[0013] [화학식 1]



[0014]

[0015] 상기 화학식 1에서 상기 R은 수소, 하나 이상의 (C1~C4)알킬, (C1~C4)알콕시, 할로젠, 또는 니트로에서 선택될

수 있다.

### 발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 조성물은 세포 독성없이 돼지유행성 설사바이러스(PEDV)에 대한 항바이러스가 효과가 뛰어나므로, 상기 바이러스의 감염으로 유발되는 질환의 예방 또는 치료에 유용한 동물 의약품 및 사료 첨가제로 활용될 수 있다.

[0017] 본 발명에 따른 조성물을 동물 의약품 및 사료 첨가제로 이용함으로써 돼지유행성 설사바이러스에 의해 유발되는 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 실험예 1에 따른 돼지유행성설사병 바이러스(PEDV)에 대한 화합물 1a의 항바이러스 효과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명의 실험예 1에 따른 돼지유행성설사병 바이러스(PEDV)에 대한 화합물 1b의 항바이러스 효과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명의 실험예 2에 따른 화합물 1a에 대한 세포독성 분석 결과 그래프이다.

도 4는 본 발명의 실험예 2에 따른 화합물 1b에 대한 세포독성 분석 결과 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명자들은 돼지유행성설사병의 원인체인 돼지유행성 설사바이러스에 대해 항바이러스 효과를 가지는 화합물에서 유의성 있는 결과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0022] 본 명세서에서 "예방"이란, 본 발명에 따른 동물 의약품 조성물 또는 사료 첨가제 조성물의 투여에 의해 바이러스에 의해 유발된 질환, 또는 상기 질환의 적어도 하나 이상의 증상의 발생을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 재발을 예방하거나 방지하기 위해 상기 질환에 차도가 있는 대상의 치료를 포함한다.

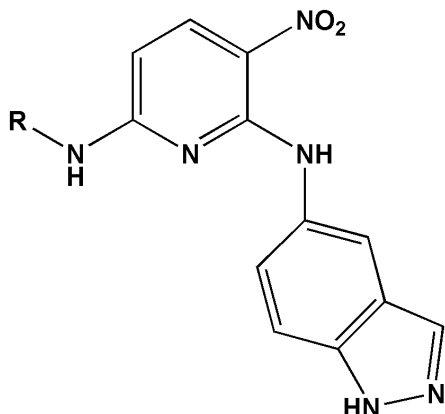
[0023] 본 명세서에서 "치료"란, 본 발명에 따른 동물 의약품 조성물의 투여에 의해 바이러스에 의해 유발된 질환, 또는 상기 질환의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0024] 본 명세서에서 "개선"이란, 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물의 섭취에 의해 바이러스에 의해 유발된 질환, 또는 상기 질환의 적어도 하나 이상의 증상이 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0026] 본 발명은 바이러스 질환 예방 또는 치료용 동물 의약품 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명에 따른 바이러스 질환 예방 또는 치료용 동물 의약품 조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[0028] [화학식 1]



[0029]

[0030] 상기 화학식 1에서 상기 R은 수소, 하나 이상의 (C1~C4)알킬, (C1~C4)알콕시, 할로젠, 또는 니트로에서 선택될 수 있고, 바람직하게는 상기 화학식 1에서 상기 R은 (C2~C4)알킬일 수 있다.

[0031]

보다 구체적으로, 상기 화합물은 N6-에틸-N2-(1H-인다졸-5-일)-3-니트로피리딘-2,6-디아민[N6-Ethyl-N2-(1H-indazol-5-yl)-3-nitropyridine-2,6-diamine], N2-(1H-인다졸-5-일)-3-니트로-N6-프로필피리딘-2,6-디아민[N2-(1H-Indazol-5-yl)-3-nitro-N6-propylpyridine-2,6-diamine], 및 N6-부틸-N2-(1H-인다졸-5-일)-3-니트로피리딘-2,6-디아민[N6-Butyl-N2-(1H-indazol-5-yl)-3-nitropyridine-2,6-diamine]으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0033]

본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 화합물은 약제학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용될 수 있고, 상기 염은 그것이 투여되는 유기체에 대해 상당한 자극을 야기하지 않는 화합물의 염으로, 상기 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 소실시키지 않는다.

[0034]

본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 염은 약제학적으로 허용 가능한 염기성 염 또는 산성염 중 어느 하나의 형태로 사용될 수 있다. 예를 들어, 염기성 염은 유기염기염, 무기염기염 중 어느 하나의 형태를 포함할 수 있으며, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아미늄(aminium)염, 암모늄염, 트리에틸아미늄염 및 피리디늄염으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035]

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

[0036]

본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 염은 약제학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함할 수 있고, 부가염은 통상의 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물을 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 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.

[0038]

본 발명에 따른 동물 의약품 조성물에서, 상기 바이러스는 돼지유행성 설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus; PEDV)를 포함할 수 있고, 상기 바이러스 질환은 상기 돼지유행성 설사바이러스에 의해 유발된 질환, 예를 들어 돼지유행성설사병(PED)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

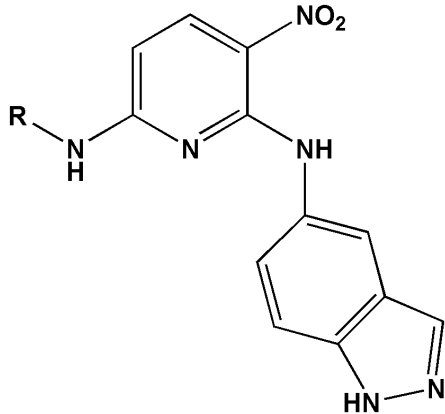
[0039]

본 발명에 따른 동물 의약품 조성물에서, 상기 바이러스는 본 발명의 일 실험예에 따르면 상기 화합물에 의해 복제 및 증식이 억제되는 동시에 세포 독성은 나타나지 않았다. 즉, 상기 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 함유하는 조성물은 상기 바이러스에 대해 항바이러스 효과를 가진다. 보다 상세한 내용은 하기 실

시에에서 후술될 것이다.

- [0041] 본 발명에 따른 동물 의약품 조성물은 상기 제형에 따라 약제학적으로 허용가능한 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하여 제조할 수 있다. 상기 "약제학적으로 허용가능한"이란, 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.
- [0042] 본 발명에 따른 동물 의약품 조성물에서 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 있으나, 이제 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명에 따른 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.
- [0044] 본 발명에 따른 동물 의약품 조성물을 상기 형태로 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제가 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있고, 상기 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다.
- [0045] 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 포함되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0046] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제 또는 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 동물 의약품 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 의미하고, 유효 용량 수준은 환자의 건강상태, 제양의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0048] 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 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 조성물을 환자에게 투여함으로써, 상기 바이러스에 의한 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 동물 의약품 조성물에서, 유효성분인 상기 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, 상기 화합물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명에 따른 동물 의약품 조성물은 상기 동물 또는 인간에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 기관지내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명은 바이러스 질환 예방 또는 개선용 사료 첨가제 조성물을 제공한다.
- [0053] 본 발명에 따른 바이러스 질환 예방 또는 개선용 사료 첨가제 조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[0054] [화학식 1]



[0055]

[0056] 상기 화학식 1에서 상기 R은 수소, 하나 이상의 (C1~C4)알킬, (C1~C4)알콕시, 할로젠, 또는 니트로에서 선택될 수 있고, 바람직하게는 상기 화학식 1에서 상기 R은 (C2~C4)알킬일 수 있다.

[0057] 보다 구체적으로, 상기 화합물은 N6-에틸-N2-(1H-인다졸-5-일)-3-니트로피리딘-2,6-디아민[N6-Ethyl-N2-(1H-indazol-5-yl)-3-nitropyridine-2,6-diamine], N2-(1H-인다졸-5-일)-3-니트로-N6-프로필피리딘-2,6-디아민[N2-(1H-Indazol-5-yl)-3-nitro-N6-propylpyridine-2,6-diamine], 및 N6-부틸-N2-(1H-인다졸-5-일)-3-니트로피리딘-2,6-디아민[N6-Butyl-N2-(1H-indazol-5-yl)-3-nitropyridine-2,6-diamine]으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0059] 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물에서, 상기 바이러스는 돼지유행성 설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus; PEDV)를 포함할 수 있고, 상기 바이러스 질환은 상기 돼지유행성 설사바이러스에 의해 유발된 질환, 예를 들어 돼지유행성설사병(PED)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물에서, 상기 바이러스는 본 발명의 일 실험예에 따르면 상기 화합물에 의해 복제 및 증식이 억제되는 동시에 세포 독성은 나타나지 않았다. 즉, 상기 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 함유하는 조성물은 상기 바이러스에 대해 항바이러스 효과를 가진다. 보다 상세한 내용은 하기 실시예에서 후술될 것이다.

[0062] 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 유제품등을 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, 참사, 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 제한되는 것은 아니다.

[0063] 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 특수목적용을 위한 사료 첨가제를 포함할 수 있다.

[0064] 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 제한되는 것은 아니다.

[0065] 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물에서, 상기 화합물의 유효용량은 상기 동물 의약품 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0066] 본 발명에 따른 사료 첨가제 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.

[0068] 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.

# [0070] <시약 및 기기>

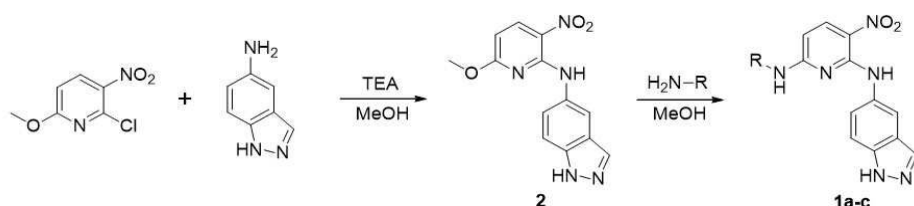
[0071] 본 합성 실험에서 사용한 시약은 sigma-aldrich(Sigma, St. Louis, Mo, USA)사, acros organics(Thermo Fisher Scientific In., Gell, Belgium)사, alfa aesar(Johnson Matthey Company, Karlsruhe, Germany)사 등의 제품을 사용하였다. 대부분 별도의 정제 과정을 거치지 않고 사용하였다. 합성 실험은 아르곤 또는 대기 하에서 진행하였으며 합성 후 생성물의 정제를 위해 재결정법을 이용하였다.

[0072] 박막 크로마토그래피(thin layer chromatography; TLC) 실리카 겔 플레이트(silica gel plate, Silica gel 6 F254, 25 mm)는 Merck사에서 구입하여 사용하였다.

[0073] 화합물의 구조 분석에 JEOL(Tokyo, Japan)사의 JNM-ECZR 500으로 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼을 측정하였다. NMR 용매는 eurisotop에서 구입한 (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO를 사용하였으며, 화학적 이동값은(δ)은 ppm으로 나타내었고 피크는 s(single), d(doublet), t(triplet), m(multiplet), dd(doublet of doublet)로 표시하였다.

# [0075] <실시예 1> 화합물 합성

[0076] [반응식1]



[0077]

[0078] 상기 반응식 1은 본 발명에 따른 조성물에 함유되는 화합물 1a-c의 합성 과정을 나타낸다. 상기 반응식 1을 참조하면, 아민 부분을 변경하기 위해 2-클로로-6-메톡시-3-니트로피리딘(2-chloro-6-methoxy-3-nitropyridine)을 출발 물질로 하여 다음과 같이 2단계 반응을 통해 합성하였다. 출발 물질과 5-아미노-1H-인다졸(5-amino-1H-indazole)을 염기 조건에서 화합물 2의 N-(6-메톡시-3-니트로피리딘-2-일)-1H-인다졸-5-아민(N-(6-methoxy-3-nitropyridin-2-yl)-1H-indazol-5-amine)을 합성하였다. 합성된 화합물 2와 에틸(ethyl), 프로필(propyl), 부틸(butyl)을 가진 아민을 각각 반응시킨 뒤, 재결정으로 정제하여 76~91%의 수율로 최종 화합물 1a-c를 얻었다.

표 1

[0079]

|   | R      | yield(%) | product |
|---|--------|----------|---------|
| 1 | Ethyl  | 76       | 1a      |
| 2 | Propyl | 91       | 1b      |
| 3 | Butyl  | 87       | 1c      |

[0080] 상기 표 1은 상기 반응식 1에 의해 수득한 화합물 1a-c의 치환기 및 수율을 나타낸다. 보다 상세하게는 하기와 같다.

[0082] 1. 화합물 2 : N-(6-메톡시-3-니트로피리딘-2-일)-1H-인다졸-5-아민[N-(6-Methoxy-3-nitropyridin-2-yl)-1H-

**indazol-5-amine]**

[0083] 2-클로로-6-메톡시-3-니트로피리딘(2-Chloro-6-methoxy-3-nitropyridine, 0.10g, 0.53 mmol), 5-아미노-1H-인다졸(5-amino-1H-indazole, 0.07g, 0.53 mmol), 트리에틸아민(triethylamine, 0.08 mL, 0.58 mmol)을 메탄올에 녹인 후, 30℃에서 12시간 동안 교반시켰다. 대기 하에서 식힌 후, 물을 천천히 첨가하여 30분 동안 교반시켰다. 생성된 고체 생성물을 필터하여 얻은 후, 메탄올로 씻고 건조시켜 86% 수율의 화합물 2를 얻었다.

[0084]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.50 (s, 1H), 8.40 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 8.10 (s, 2H), 7.60 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 6.30 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  166.1, 150.6, 138.4, 137.6, 133.6, 130.4, 123.9, 122.8, 121.9, 114.3, 109.8, 102.0, 54.5.

[0086] **2. 화합물 1a : N6-에틸-N2-(1H-인다졸-5-일)-3-니트로피리딘-2,6-디아민[N6-Ethyl-N2-(1H-indazol-5-yl)-3-nitropyridine-2,6-diamine]**

[0087] 화합물 2(0.10g, 0.35 mmol), 에틸아민(ethylamine) 70% 수용액(1.87 mL, 23.14 mmol)을 메탄올에 녹인 후, 30℃에서 12시간 동안 교반시켰다. 대기 하에서 식힌 후, 물을 천천히 첨가하여 1시간 동안 교반시켰다. 생성된 고체 생성물을 필터하여 얻은 후, 메탄올로 씻고 건조시켜 화합물 1a를 76% 수율로 얻었다.

[0088]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.93 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.07 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.56-7.51 (m, 2H), 6.09 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 1H), 1.14 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  160.1, 152.1, 137.3, 134.8, 133.5, 131.1, 123.2, 122.8, 117.6, 113.0, 109.9, 103.2, 32.9, 14.2.

[0090] **3. 화합물 1b : N2-(1H-인다졸-5-일)-3-니트로-N6-프로필피리딘-2,6-디아민[N2-(1H-Indazol-5-yl)-3-nitro-N6-propylpyridine-2,6-diamine]**

[0091] 화합물 2(0.10g, 0.35 mmol), 프로필아민(propylamine, 1.91 mL, 23.14 mmol)을 메탄올에 녹인 후, 50℃에서 12시간 동안 교반시켰다. 대기 하에서 식힌 후, 물을 천천히 첨가하여 1시간 동안 교반시켰다. 생성된 고체 생성물을 필터하여 얻은 후, 메탄올로 씻고 건조시켰다. 화합물 1b를 91% 수율로 얻었다.

[0092]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.93 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.07 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.51 (t,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 6.09 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 1H), 3.26 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 2H), 1.53 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 0.85 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  160.3, 152.1, 137.3, 134.8, 133.4, 131.1, 123.3, 122.8, 117.6, 113.0, 109.9, 103.2, 42.9, 22.0, 11.5.

[0094] **4. 화합물 1c : N6-부틸-N2-(1H-인다졸-5-일)-3-니트로피리딘-2,6-디아민[N6-Butyl-N2-(1H-indazol-5-yl)-3-nitropyridine-2,6-diamine]**

[0095] 화합물 2(0.10g, 0.35 mmol), n-부틸아민(n-butylamine, 2.29 mL, 23.14 mmol)을 메탄올에 녹인 후, 30℃에서 12시간 동안 교반시켰다. 대기 하에서 식힌 후, 물을 천천히 첨가하여 1 시간 동안 교반시켰다. 생성된 고체 생성물을 필터하여 얻은 후, 메탄올로 씻고 건조시켰다. 화합물 1c를 87% 수율로 얻었다.

[0096]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.92 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.07 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 8.0 (s, 1H), 7.54-7.50 (m, 2H), 6.09 (d,  $J$  = 9.5 Hz, 1H), 3.30-3.28 (m, 2H), 1.52-1.46 (m, 2H), 1.30-1.26 (m, 2H), 0.83 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  160.3, 152.2, 137.4, 134.8, 133.3, 131.1, 123.3, 122.8, 117.6, 113.1, 110.1, 103.3, 40.8, 30.8, 19.8, 13.6.

[0098] **<실험예 1> 항바이러스 분석(Antiviral assay)**

[0099] 1. 실험방법

[0100] 베로 세포(Vero cells, 이하 Vero 세포)는 실험 시작 24시간 내지 48 시간 전에 6-웰(well) 세포 배양 플레이트(BD, Falcon)에 준비되었다. 그리고 나서, 세포 단층(monolayers)은 0, 10, 20, 40 및 60  $\mu$ M의 5가지 상이한 농도의 화합물 1a 또는 1b를 포함하는 성장 배지로 감염 전 2시간 동안 전처리 되었다. 전처리 배양 후, 상기 세포 단층은 0.001의 감염 다중도(multiplicity of infection; MOI)로 DR13(돼지유행성설사병 바이러스(PEDV)의 프로토타입 변형)이 접종된 성장 배지로 세척되었고 1시간 더 배양되었다. 마지막 1시간 배양 후, 바이러스 접종물(virus inoculum)은 폐기되고, 세포 단층은 동일한 농도의 처리 화합물 1a 또는 1b를 포함하는 성장 배지로 보충되었고, 동일한 배양 조건에서 4일간 더 배양되었다. 세포 배양 상등액은 매일 24시간 수집되어 원심분리되고, 분석할 때까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 저장되었다. 자손 바이러스 역가(progeny virus titers)는 미세 적정 감염성 분석(microtitration infectivity assay)을 이용하여 측정되었다. 바이러스 역가 (virus titers)는 세포 변성 효과(cytopathic effect; CPE)를 기초로 계산되고, 50% 조직배양 감염량(TCID<sub>50</sub>)을 산출하여 나타내었다.

[0101] 2. 실험결과

[0102] 돼지유행성설사병 바이러스(PEDV) 복제에 대한 화합물 1a 또는 1b의 항바이러스성 효과는 Vero 세포에서 평가되었다. Vero 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.

[0103] 도 1은 본 발명의 실험예 1에 따른 돼지유행성설사병 바이러스(PEDV)에 대한 화합물 1a의 항바이러스 효과를 나타내는 그래프이고, 도 2는 본 발명의 실험예 1에 따른 돼지유행성설사병 바이러스(PEDV)에 대한 화합물 1b의 항바이러스 효과를 나타내는 그래프이다.

[0104] 도 1 및 도 2를 참조하면, 화합물 1a 및 1b는 Vero 세포에서 농도 의존적으로 DR13 복제를 감소시켰다. 화합물 1a의 경우, 감염 후 2일부터 대체적으로 DR13의 복제가 감소하는 것으로 나타났고, 화합물 1a의 농도가 높아질수록 DR13의 복제 감소가 더 빨리 나타나거나 더 급격하게 감소함을 확인할 수 있다. 즉, 화합물 1a의 농도가 40  $\mu$ M인 경우에는 감염 후 1일부터 TCID<sub>50</sub> 값이 더 이상 증가하지 않았고, 60  $\mu$ M인 경우에는 감염 후 1일부터 급격하게 감소하는 양상을 나타냈다. 그러다가 화합물 1a의 농도가 40  $\mu$ M 이상일 때는 감염 후 4일에 바이러스 성장이 완전히 억제되었다.

[0105] 화합물 1b의 경우에도 대체적으로 감염 후 2일부터 DR13의 복제가 감소하는 것으로 나타났다. 화합물 1b의 농도가 10, 20, 및 40  $\mu$ M인 경우, 감염 후 1일 또는 2일부터 DR13의 복제가 감소하여 감염 후 4일에 바이러스의 성장이 완전히 억제되는 유사한 그래프가 나타났다. 즉, 화합물 1a에 비해 화합물 1b는 10  $\mu$ M의 더 낮은 농도에서도 바이러스 성장이 억제되는 것으로 나타났다.

[0107] <실험예 2> 세포 독성 분석(Cell cytotoxicity assay)

[0108] 1. 실험방법

[0109] 화합물 1a 또는 화합물 1b의 세포독성 효과는 3(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움브로미드(3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide; 이하, MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 Vero 세포에서 평가되었다. 간략하게, Vero 세포는 96-웰 세포 배양 플레이트(BD, Falcon)에 준비되었고, 0, 10, 20, 40 및 60  $\mu$ M의 5가지 상이한 농도의 화합물 1a 또는 1b를 포함하는 성장 배지로 24시간 및 48시간 동안 처리되었다. 배양 이후, 세포 상등액은 버리고, 새로 제조된 MTT(5 mg/ml) 용액 20  $\mu$ l가 성장 배지와 함께 각 웰에 첨가되었다. 그리고 나서, 세포는 동일 조건에서 3시간 더 배양되었다. 배양 후, MTT 용액은 제거되고, 플레이트는 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 건조되었다. 그 후, 디메틸설폭시드(dimethyl sulfoxide; DMSO, Hybri-Max®, Sigma-Aldrich) 200  $\mu$ l는 포르마잔 크리스탈(formazan crystals)을 용해시키기 위해 각 웰에 첨가되었다. 플레이트는 540nm의 흡광도에서 효소 결합 면역 흡착 분석(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 MTT 신호를 측정하기 전에 5-10분 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 더 배양하여 기포를 용해시켰다.

[0110] 2. 실험결과

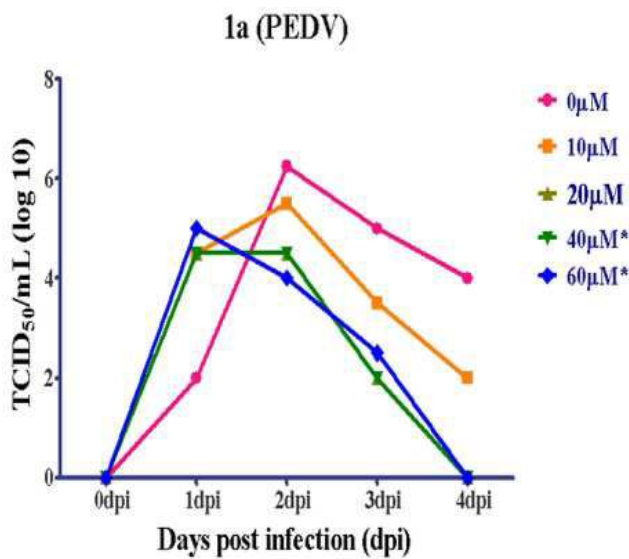
[0111] 도 3은 본 발명의 실험예 2에 따른 화합물 1a에 대한 세포독성 분석 결과 그래프이고, 도 4는 본 발명의 실험예 2에 따른 화합물 1b에 대한 세포독성 분석 결과 그래프이다.

[0112] 도 3 및 도 4를 참조하면, Vero 세포에 처리한 화합물 1a 또는 1b의 농도가 높아질수록 화합물 1a 또는 1b를 처리하지 않았을 때, 즉 농도가 0  $\mu$ M일 때보다 상대적으로 세포 생존능이 감소하는 것으로 나타났지만, 화합물 1a 또는 1b 처리 후 48시간까지 60  $\mu$ M 농도에서도 Vero 세포에서 유의한 독성을 나타내지는 않았다.

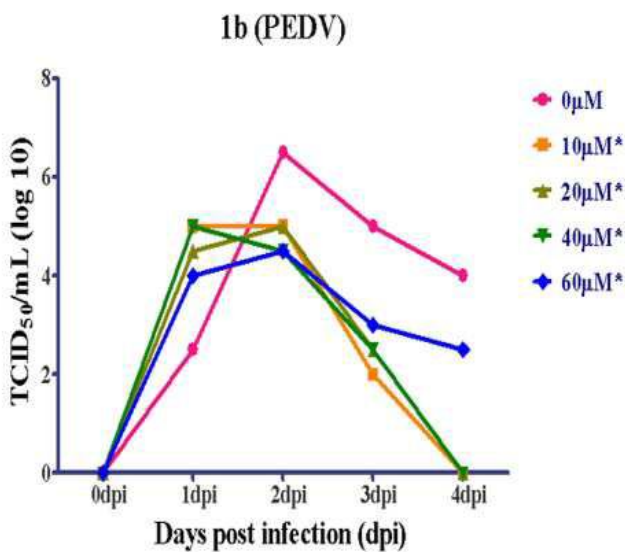
[0114] 이제까지 본 발명에 대한 구체적인 실시예들을 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에 서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 도면

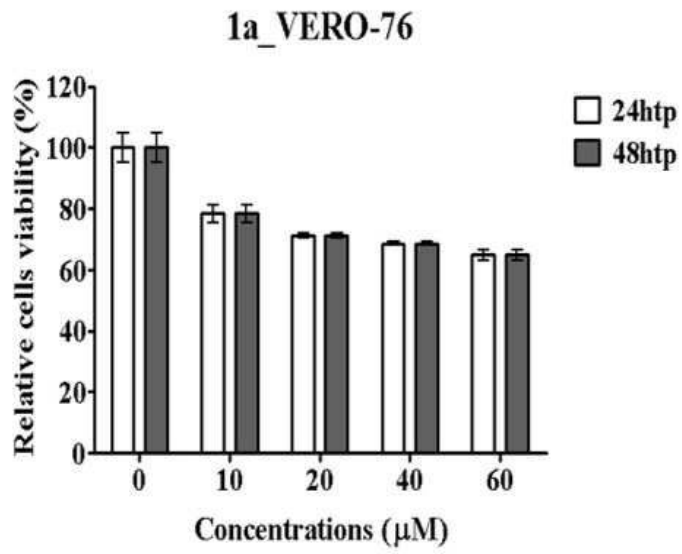
### 도면1



### 도면2



도면3



도면4

