



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월15일

(11) 등록번호 10-2191497

(24) 등록일자 2020년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/423 (2006.01) A23K 20/121 (2016.01)

A23L 33/10 (2016.01) A61K 31/428 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/423 (2013.01)

A23K 20/121 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2019-0110375

(22) 출원일자 2019년09월05일

심사청구일자 2019년09월05일

(56) 선행기술조사문헌

CN102070549 A

Scientific Reports, 4, 4877, 2014.

(73) 특허권자

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

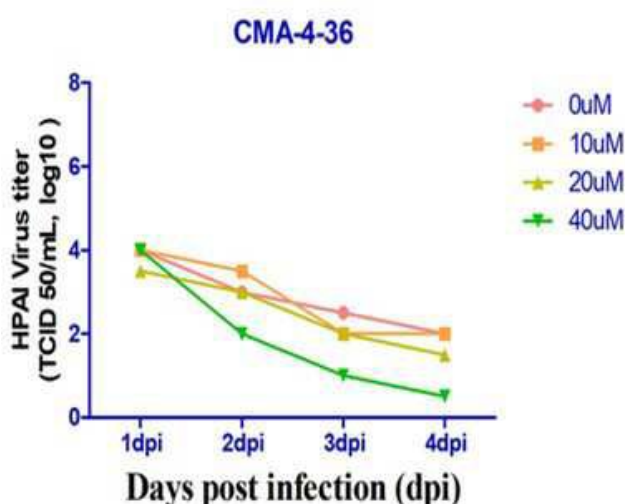
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 헤테로사이클 화합물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 헤테로사이클 화합물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스용 조성물에 관한 것으로, 상기 헤테로사이클 CMA-4-36 및 CMA-4-37 화합물은 고병원성 조류인플루엔자 바이러스인 H5N6를 감염시킨 세포에서 농도의존적으로 바이러스 감염 억제 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 화합물들을 유효성분으로 함유하는 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염 예방 및 바이러스 감염에 따른 질환을 치료하기 위한 조성물 또는 가축 사료첨가제로 제공될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2016.08)

A61K 31/428 (2013.01)

A61P 31/16 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	116102-03
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	가축질병대응개발사업
연구과제명	항바이러스 제제 합성 및 라이브러리 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)동방
연구기간	2016.09.05 ~ 2019.09.04

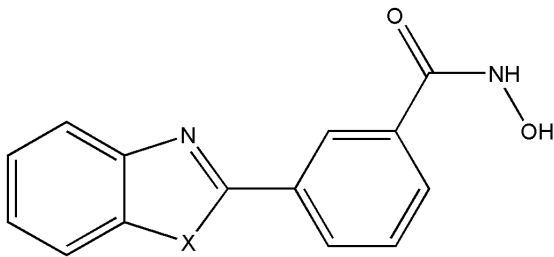
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 헤테로사이클 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 약학조성물.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, X는 O 또는 S 임.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스는 H5N6 인플루엔자 바이러스, H1N1 인플루엔자 바이러스, H9N2 인플루엔자 바이러스, H5N1 인플루엔자 바이러스 및 H3N2 인플루엔자 바이러스로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 약학조성물.

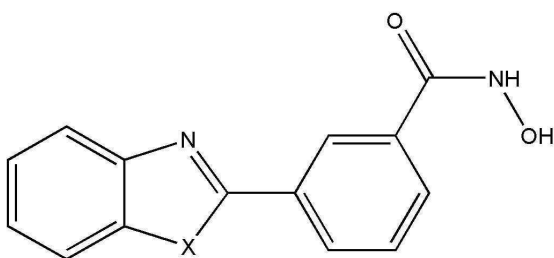
청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스 감염에 따른 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴 또는 조류독감인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 헤테로사이클 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 개선용 건강식품.

[화학식 1]

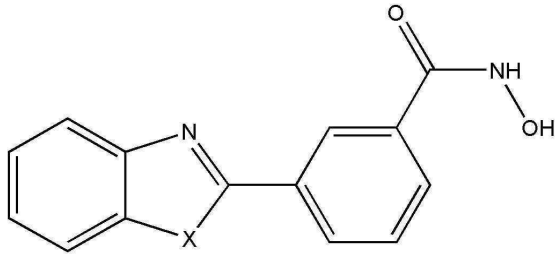


상기 화학식 1에서, X는 O 또는 S 임.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 헤테로사이클 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 가축 사료첨가제.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, X는 O 또는 S 임.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 가축은 가금류, 돼지, 소, 염소, 양, 말, 개 및 고양이로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 가축 사료첨가제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 헤테로사이클 화합물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 바이러스(virus)란 라틴어로 독성물질을 의미하며, 세균여과지(0.22 μ m)를 통과하는 일군의 감염형 병원성 입자를 의미한다. 바이러스는 숙주세포의 종류에 따라 박테리오파지, 식물 바이러스, 동물 바이러스로 분류하기도 하며, 핵산의 종류에 따라 DNA 바이러스, RNA 바이러스로 분류할 수 있다. 최근 신종플루, AI 및 구제역 등 다양한 바이러스 질병이 사회적으로 큰 문제를 일으켰으며, 이에 따라 바이러스 질병의 효과적인 대책에 대한 고민이 사회적으로 큰 관심을 불러일으키고 있다.

[0003] 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)는 오르토믹소비리데 계통(Family Orthomyxoviridae)에 속하는 RNA 바이러스인데, A형, B형 또는 C형의 3가지로 구분된다. 이 중 A형은 사람, 돼지 등의 포유류 및 다양한 종류의 가금과 야생조류에서 감염성이 확인되고 있다. A형 인플루엔자 바이러스의 정상적인 자연 숙주는 오리 등의 야생물새로 알려져 있는데, 야생조류에 대한 인플루엔자 감염 역학 조사 결과, 16종의 HA형과 9종의 NA형 인플루엔자 바이러스가 야생조류에서 감염되고 있는 것으로 확인되었다.

[0004] A형으로 분류되는 조류인플루엔자 바이러스는 인수(人獸) 공통 바이러스로, 병원성에 따라 닭에 감염시 가벼운 호흡기 증상을 유발하는 비병원성 조류 인플루엔자, 1~30% 내외의 폐사와 산란 저하를 유발하는 저병원성 조류 인플루엔자(Low pathogenic avian influenza, LPAI) 그리고 95% 이상의 높은 치사율을 보이는 고병원성 조류 인플루엔자(Highly pathogenic avian influenza, HPAI)의 3가지 병형으로 크게 구분하고 있다. 이중 고병원성 조류 인플루엔자는 세계동물보건기구(OIE)에서 A등급으로 그리고 국내에서는 제1종 가축전염병으로 분류하고 있는 실정이다.

[0005] 고병원성 조류 인플루엔자(HPAI)는 1980년도 이후 미국 등 전 세계적으로 발생이 확인되고 있다. 특히 2003~2004년에 걸쳐 한국, 베트남, 일본 또는 태국 등 동남아시아와 극동아시아 전 지역에서 거의 동시 다발적으로 혈청형 A/H5N1 고병원성 조류 인플루엔자가 발생하였는데, 베트남과 태국 등지에서 발생한 고병원성 조류 인플루엔자는 인체에 감염이 안 되는 전통적인 고병원성 조류 인플루엔자와는 달리 감염조류와 접촉 시 인체 감염이 가능한 변이형 조류인플루엔자(변이형 A/H5N1 HPAI) 바이러스로 확인되었다.

[0006] 인플루엔자 바이러스는 호흡기에 감염되어 전신증상을 일으키고, 주기적으로 모습을 바꿀 뿐 아니라, 숙주를 죽이지 않고 숙주가 죽기 전에 다른 숙주로 이동하는데, 예방백신이 개발되어 있기는 하지만 바이러스의 변이를 따라 잡지는 못하고 있는 실정이며, 아직까지 근본적인 바이러스 치료는 이루어지지 않고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2015-0141329호 (2015.12.18. 공개)

발명의 내용

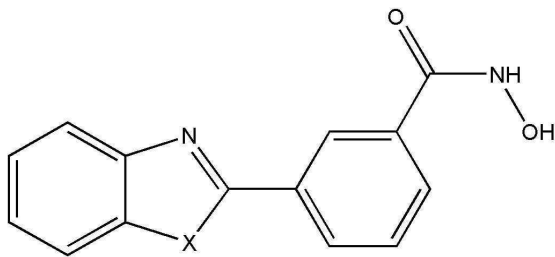
해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 나타내는 헤테로사이클 화합물을 제공하여, 인플루엔자 바이러스의 감염을 예방하거나 치료하기 위한 조성물 또는 가축 사료 첨가제로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 헤테로사이클 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 상기 화학식 1에서, X는 O 또는 S 임.

[0013] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 헤테로사이클 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 헤테로사이클 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 가축 사료첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 헤테로사이클 CMA-4-36 및 CMA-4-37 화합물은 고병원성 조류인플루엔자 바이러스인 H5N6를 감염시킨 세포에서 농도의존적으로 바이러스 감염을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 확인됨에 따라, 상기 화합물들을 유효성분으로 함유하는 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염 예방 및 바이러스 감염에 따른 질환을 치료하기 위한 조성물 또는 가축 사료첨가제로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 CMA-4-36 화합물의 항바이러스 활성을 확인한 결과이다.

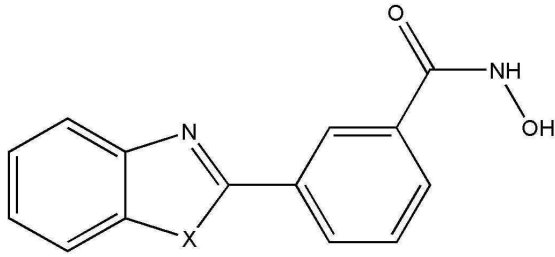
도 2는 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 CMA-4-37 화합물의 항바이러스 활성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 헤테로사이클 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0019] [화학식 1]



[0020]

[0021] 상기 화학식 1에서, X는 O 또는 S 일 수 있다.

[0022]

상기 인플루엔자 바이러스는 고병원성 조류인플루엔자 A 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023]

상기 인플루엔자 바이러스는 H5N6 인플루엔자 바이러스, H1N1 인플루엔자 바이러스, H9N2 인플루엔자 바이러스, H5N1 인플루엔자 바이러스 및 H3N2 인플루엔자 바이러스로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0024]

상기 인플루엔자 바이러스 감염에 따른 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴 또는 조류독감일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025]

본 발명의 한 구체예에서, 상기 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0026]

본 발명의 다른 구체예에서, 상기 화학식 1로 표시되는 헤테로사이클 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 조류인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 봉해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0027]

구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 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 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0028]

본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0029]

상기 화학식 1로 표시되는 헤테로사이클 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0030]

본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0031]

본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 헤테로사이클 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.

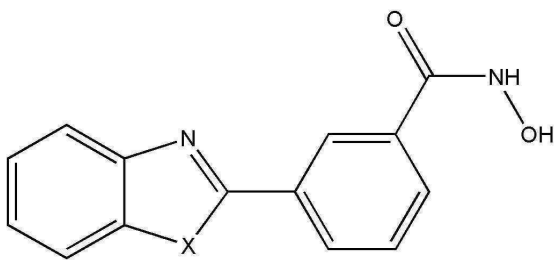
[0032] 상기 건강식품은 상기 화학식 1로 표시되는 헤테로사이클 화합물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0033] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 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 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0034] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제등을 들 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 헤테로사이클 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 가축 사료첨가제를 제공할 수 있다.

[0036] [화학식 1]



[0037]

[0038] 상기 화학식 1에서, X는 O 또는 S일 수 있다.

[0039] 상기 가축은 가금류, 돼지, 소, 염소, 양, 말, 개 및 고양이로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0040] 상기 사료는 일반적으로 가축 사육에 사용되는 공지된 구성의 사료에 본 발명의 사료 첨가용 조성물을 추가하여 구성될 수 있다.

[0041] 상기 공지된 구성의 사료는 시판되고 있는 일반사료를 모두 포함할 수 있으며, 이에 한정되지는 않으나, 미강, 옥수수, 대두박, 콩, 수수, 쌀, 보리, 밀, 귀리, 호밀, 좁쌀, 메밀, 티리티게일, 고구마, 타피오카, 밀기울, 맥강, 대두피, 옥수수겨, 맥아근, 전분박, 커피박, 잠분, 잠사, 해조분, 면실박, 채종박, 캐놀라밀, 임자박, 호마박, 아마박, 해바라기씨박, 낙화생박, 야자박, 옥수수 글루텐, 주정박, 옥수수 배아박, 고추씨박, 루핀종실, 어분, 우도분 및 육분일 수 있다.

[0042] 또한 상기 조성물에는 일반적인 사료 첨가제, 예를 들면, 소금, 골분, 인산칼슘제, 무기물 혼합제, 비타민제, 아미노산제, 향생물질, 호르몬제 등의 특수목적에 위한 사료 첨가제가 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 사료 첨가용 조성물은 가축 또는 가금류에게 1 일 0.5 내지 1.0g/kg의 양으로 투여할 수 있으며, 이러한 투여량은 투여대상이 되는 동물의 종류, 동물의 나이, 동물의 체중, 동물의 예방하고자 하는 질병, 원하는 효과 등에 따라 당해 분야의 전문가가 적절히 조절할 수 있다.

[0045] 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.

[0047] <참고예>

[0048] 1. 실험물질

[0049] 시험 물질은 인산완충생리식염수 (Phosphate Buffered Saline, PBS; HyClone, GE Healthcare, USA)과 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM; WELGENE, South Korea)을 이용해 농도별로 희석하여 시험에 사용하였다.

[0051] 2. 사용장비 및 시약

[0052] 세포 배양을 위한 배지는 DMEM를 사용하였고, 태아소혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 0.5% 트립신-EDTA (10

×), L-글루타민(Glutamine) 200Mm (100×)과 Antibiotics-Antimycotic (100×)는 Gibco® 제품(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA)을 사용하였다. D-Plus™ CCK (동인LS, South Korea), Trypsin TPCK-Treated (Sigma-Aldrich, Netherlands), Alsever's solution (Sigma-Aldrich, Netherlands)과 기타 시약 및 용매는 특급 또는 1급 시약을 모든 실험에 사용하였다.

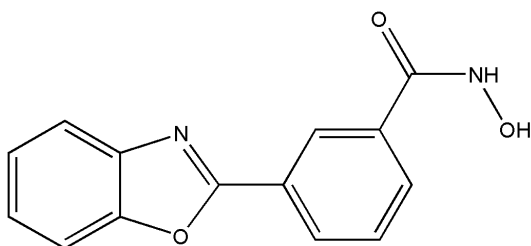
[0053] 기기는 Biosafety Cabinet (Labculture), CO₂ incubator (Vision, Scientific Co., LTD), Egg digital incubator (Rcom MARU pro), Waterbath (DAIHAN), Centrifuge (LABOGENE), Voltex mixer (Scientific Industries), Pipet Aid (FALCON, Croning, USA), PH meter (Mettler-Toledo GmbH), Microscope (Nikon), ELASA Reader (Molecular Device), Real-time PCR (Bio-Rad, CFX96), Syringe filter (Croning, USA), 1mL Disposable Syringe (SIRMedical(주)), 검란기, Premium Hotplate Stirrer (DAIHAN Scientific Co., Ltd.)를 사용하였다.

[0054] Conical tube, Reservoir, Cell Culture Flask, 12well 및 96well Cell Culture Flask, 5ml Round-Bottom Tube, Serological Pipette등의 플라스틱 소모품은 SPL Life Sciences(Korea)의 제품을 사용하였다.

[0056] <실시예 1> 헤테로사이클 화합물 합성

[0057] 1. 3-(벤조[d]옥사졸-2-일)-N-하이드록시벤즈아미드 [3-(Benzo[d]oxazol-2-yl)-N-hydroxybenzamide] (CMA-4-36)

[0058] [화학식 2]

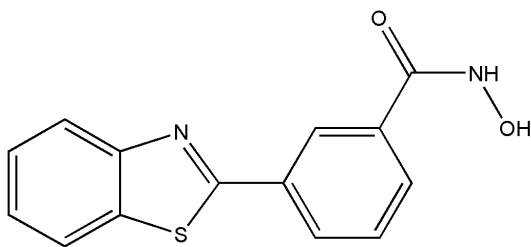


[0059] 0℃에서 메탄올(6 mL)에 용해된 염산 하이드록실아민(3.70 g, 53.31 mmol)이메탄올(6 mL)에 용해된 수산화칼륨(2.99 g, 53.31 mmol) 용액에 첨가되었다. 혼합물은 0℃에서 15분 동안 교반되고, 침전된 염화칼륨 제거된 후 여액은 그대로 사용되었다; 0℃에서 테트라하이드로푸란(12 mL)에 용해된 화합물 16a(0.30 g, 1.18 mmol) 용액이 새로 제조된 하이드록실아민에 첨가되고 동일 온도에서 3시간 동안 교반되었다. 혼합물은 3N HCl에 의해 pH 7로 중화되었고, 에틸 아세테이트로 추출되었다. 유기층은 Na₂SO₄ 상에서 건조되고, 감압 농축되었으며, MPLC로 정제하여 50% 수율로 화합물 CMA-4-36을 수득하였다.

[0062] ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ 11.52 (s, 1H), 9.24 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.33 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.0 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.83 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.71 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.46-7.43 (m, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D₆) δ 163.2, 161.7, 150.3, 141.4, 133.8, 130.1, 129.4, 129.7, 126.7, 125.9, 125.1, 120.0, 111.1. ESI MS (m/e) 255.08 [M+H]⁺.

[0064] 2. 3-(벤조[d]티아졸-2-일)-N-하이드록시벤즈아미드 [3-(Benzo[d]thiazol-2-yl)-N-hydroxybenzamide] (CMA-4-37)

[0065] [화학식 3]



[0066] 0℃에서 메탄올(6 mL)에 용해된 염산 하이드록실아민(2.32 g, 33.42 mmol)이메탄올(6 mL)에 용해된 수산화칼륨

(1.87 g, 33.42 mmol) 용액에 첨가되었다. 혼합물은 0℃에서 15분 동안 교반되고, 침전된 염화칼륨 제거된 후 여액은 그대로 사용되었다; 0℃에서 테트라하이드로푸란(12 mL)에 용해된 화합물 16b(0.20 g, 0.74 mmol) 용액이 새로 제조된 하이드록실아민에 첨가되고 동일 온도에서 3시간 동안 교반되었다. 혼합물은 3N HCl에 의해 pH 7로 중화되었고, 에틸 아세테이트로 추출되었다. 유기층은 Na₂SO₄ 상에서 건조되고, 감압 농축되었으며, MPLC로 정제하여 4% 수율로 화합물 CMA-4-37을 수득하였다.

[0069] ¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ 11.51 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.67 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.58 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.50 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-D₆) δ 166.6, 163.3, 153.5, 134.6, 133.9, 133.1, 129.8, 129.7, 129.6, 126.9, 125.8, 125.6, 123.1, 122.6. ESI MS (*m/e*) 271.05 [M+H]⁺.

[0071] <실시예 2> 헤테로사이클 화합물의 항바이러스 효과 확인

[0072] 앞서 합성된 화합물 CMA-4-36 및 CMA-4-37의 항바이러스 효능을 확인하였다.

[0074] 1. 세포 및 바이러스

[0075] 세포는 MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Cells, Kidney) (ATmL® PTA-6500)을 사용하였다. 바이러스는 국내 분리 고병원성 조류인플루엔자 A 바이러스 (High pathogenic avian influenza A virus, H5N6 subtype, avian)를 사용하였다.

[0077] 2. 세포배양

[0078] MDCK 세포는 5% 열 비활성화된 FBS (56℃, 30min), 1% Antibiotics-Antimycotic, 1% L-글루타민을 첨가한 DMEM을 사용하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포가 배양용기에 단층이 형성되면 0.5% 트립신-EDTA를 사용하여 계대배양하였다.

[0080] 3. 바이러스 배양 및 역가 산정

[0081] 시험바이러스 (H5N6)를 수정란을 통해 증폭한 후 세포에서 역가를 측정하였다. 바이러스 역가 측정을 위해, MDCK 세포 부유액 (1×10⁵ cells/well)을 96 웰 플레이트에 분주하고 5% CO₂, 37℃조건의 배양기에서 24시간 배양하였다. 수정란으로부터 증폭한 바이러스를 1μg TPCK-트립신이 첨가된 DMEM을 이용하여 10배 희석하였다(10⁻¹~10⁻¹⁰). MDCK가 배양된 96 웰 플레이트를 PBS로 3회 세척하고 바이러스 희석액을 8반복 접종하였다.

[0082] 37℃에서 1시간 반응한 후 희석액을 제거하고 1μg TPCK-트립신이 첨가된 DMEM을 200μL씩 첨가한 후 약 3-5일 동안 5% CO₂, 37℃ 조건의 배양기에서 배양하여 CPE (Cytopathic effect, 세포변성효과)를 확인하였다.

[0083] 바이러스 접종 5일째 세포배양 상청액을 이용하여 혈구응집반응을 실시하여 바이러스의 존재 여부를 확인하고 Kaber와 Reed-Muench의 방법으로 역가를 산정하였다.

[0085] 4. 바이러스 억제능 확인

[0086] 상기 화합물을 MDCK 세포에 먼저 반응시킨 후 바이러스를 감염시켜 화합물들의 조류인플루엔자 바이러스 증식 억제 효과를 확인하였다. MDCK 세포부유액 (1×10⁵ cells/well)을 12 웰 플레이트에 분주하고 5% CO₂, 37℃조건의 배양기에서 24시간 배양하여 세포 단층을 얻었다. 1μg TPCK-트립신이 첨가된 DMEM을 사용하여 화합물 CMA-4-36 및 CMA-4-37을 10 μM, 20 μM 및 40 μM로 희석하였다.

[0087] 희석된 화합물을 12 웰 플레이트에 1mL씩 분주한 다음 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응 시간 후 플레이트에 분주한 물질을 제거하고 H5N6 바이러스를 300μL씩 접종한 다음 37℃에서 1시간 반응시켰다.

[0088] 이후 플레이트에 분주한 바이러스를 제거하고 희석한 화합물을 2mL씩 접종하였다. 5% CO₂, 37℃ 조건의 배양기에서 24시간 배양 후 세포 상청액을 300μL 취해 eppendorf tube에 넣고 -80℃에 저장하였다. 동일한 방법으로 48시간, 72시간, 96시간 배양한 후 세포 상청액을 취해 저장하였다.

[0089] 시간별로 채취된 세포 상청액 내 바이러스의 역가를 평가하기 위해 MDCK 세포부유액 (1×10⁵ cells/well)을 96

웰 플레이트에 분주하고 5% CO₂, 37℃ 조건의 배양기에서 24시간 배양하여 세포 단층을 얻었다. -80℃에 저장해 둔 세포 상청액을 녹여 1μg TPCK-트립신이 첨가된 DMEM으로 10배 희석하였다.

[0090] MDCK 세포가 배양된 96 웰 플레이트를 PBS로 3회 세척하고 희석된 세포 상청액을 세포에 100μL씩 접종한 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응 시간 후 접종액을 제거한 뒤 1μg TPCK-트립신이 첨가된 DMEM을 200μL씩 분주하고, 5% CO₂ 및 37℃ 조건의 배양기에서 4일간 배양 후 바이러스에 의한 CPE를 확인하였다.

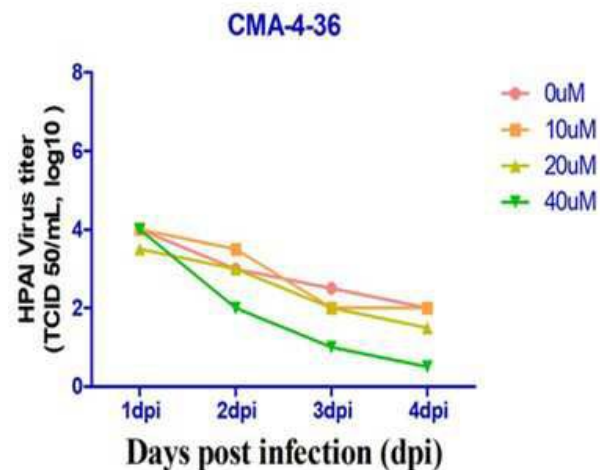
[0091] 그 결과, 도 1 및 도 2와 같이 CMA-4-36 및 CMA-4-37 농도의존적으로 고병원성 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효과가 나타났다.

[0092] 상기 결과로부터 화합물 CMA-4-36 및 CMA-4-37는 효과적인 항바이러스제로 제공될 수 있음이 확인되었다.

[0094] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2

