

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
C07H 19/06  
A61K 31/70  
C07H 19/04

(11) 공개번호 10-2005-0035194  
(43) 공개일자 2005년04월15일

(21) 출원번호 10-2004-7021073  
(22) 출원일자 2004년12월24일  
    번역문 제출일자 2004년12월24일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/020431  
    국제출원출원일자 2003년06월27일

(87) 국제공개번호 WO 2004/002422  
    국제공개일자 2004년01월08일

(30) 우선권주장 60/392,351 2002년06월28일 미국(US)  
                  60/466,194 2003년04월28일 미국(US)  
                  60/470,949 2003년05월14일 미국(US)

(71) 출원인 이데닉스(케이만) 리미티드  
                  케이만군도 그랜드 케이만 워커 하우스 워커 세크리테리즈  
                  유니베르시타 데글리 스투디 디 카글리아리  
                  이탈리아 아이-09042 몬세라토 케이엠. 4.500 시타델라 유니베르시타리아 에스에스 554 세  
(72) 발명자 지오네 디 마이크로바이올로지아 디아이피. 바이올로지아 스페리멘탈  
                  숨마도시장-피에르  
                  미국 매사추세츠 02138 캠프리지 로웰 스트리트 7  
                  라콜라파올로  
                  이탈리아 카글리아리 09012 카포테라 파기오 데이 피니 스트라다 넘버  
                  11 5

(74) 대리인 최규팔  
                  이은선

심사청구 : 없음

(54) 플라비비리다에 감염 치료용 2'-C-메틸-3'-O-L-발린에스테르 리보푸라노실 사이티딘

명세서

관련 출원

본 출원은 각각 그의 내용이 본 원에 참고로 인용되는 2002년 6월 28일 출원된 미국 가출원 제 60/392,351호; 2003년 4월 28일 출원된 미국 가출원 제 60/466,194호; 및 2003년 5월 14일 출원된 미국 가출원 제 60/470,949호{발명의 명칭: "코로나바이러스, 토가바이러스 및 피코나 바이러스에 의한 감염 치료용 뉴클레오사이드"}에 대한 우선권의 이점을 청구한다.

기술분야

본 발명은 약화학 분야에 관한 것으로, 특히 2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르 및 그의 약제학적으로 허용되는 염, 유도체 및 프로드럭, 그의 합성, 및 플라비비리다에 및 특히 C형 간염 바이러스로 감염된 숙주, 주로 인간을 치료하기 위한 항-플라비비리다에 제제로서의 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

플라비비리다에 바이러스

바이러스의 플라비비리다에 패밀리는 다음과 같은 적어도 세계의 상이한 속을 포함한다: 고양이 및 돼지의 질병을 야기하는 페스티바이러스; 뎅기열 및 황색 열과 같은 질병의 주요 요인인 플라비바이러스; 및 단독 구성원이 HCV인 헤파시바이러스. 플라비바이러스 속은 혈청학적 관계에 따라 각 그룹으로 분류되는 68 개 이상의 구성원을 포함한다(Calisher et al.,

*J. Gen. Virol.*, 1993, 70, 37-43). 임상학적 증상은 다양하며 열, 뇌염 및 출혈열을 포함한다(*Fields Virology*, Editors: Fields, B. N., Knipe, D. M., 및 Howley, P. M., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1996, Chapter 31, 931-959). 인간 질병과 연관된 세계적인 관심사의 플라비바이러스는 뎅기 출혈열 바이러스(DHF), 황색열 바이러스, 쇼크 증상 및 일본 뇌염 바이러스를 포함한다(Halstead, S. B., *Rev. Infect. Dis.*, 1984, 6, 251-264; Halstead, S. B., *Science*, 239: 476-481, 1988; Monath, T. P., *New Eng. J. Med.*, 1988, 319, 641-643).

페스티바이러스 속은 소의 바이러스성 설사 바이러스(BVDV), 전통적인 돼지 열 바이러스(CSFV, 또한 돼지 콜레라 바이러스로도 불리운다) 및 양의 경계질환 바이러스(BDV)를 포함한다(Moennig, V. et al. *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). 길들여진 가축(소, 돼지 및 양)의 페스티바이러스 감염은 전세계적으로 상당한 경제적 손실을 야기한다. BVDV는 소의 접막 질환을 야기하며 가축 산업에서 경제적으로 상당한 중요성을 갖고 있다(Meyers, G. and Thiel, H.-J., *Advances in Virus Research*, 1996, 47, 53-118; Moennig V., et al, *Adv. Vir. Res.* 1992, 41, 53-98). 인간 페스티바이러스는 동물 페스티바이러스와 같이 집중적으로 특정화되지 않았다. 그러나, 혈청학적 연구는 인간이 페스티바이러스에 상당히 노출되었음을 지적한다.

페스티바이러스 및 헤파시바이러스는 플라비비리다에 패밀리의 밀접한 관련이 있는 바이러스 그룹이다. 이 패밀리의 다른 밀접하게 관련된 바이러스는 GB 바이러스 A, GB 바이러스 A-류 제제, GB 바이러스-B 및 GB 바이러스-C(또한 G형 간염 바이러스로도 지칭된다, HGV)를 포함한다. 헤파시바이러스 그룹(C형 간염 바이러스; HCV)은 다수가 밀접한 관련이 있지만, 인간을 감염시키는 유전자형적으로 상이한 바이러스로 구성된다. 약 6개의 HCV 유전자형 및 50개 이상의 서브타입이 있다. 페스티바이러스와 헤파시바이러스 간에 유사성이 있고, 헤파시바이러스가 세포 배양액에서 효과적으로 성장하지 못하기 때문에, 소의 바이러스성 설사 바이러스(BVDV)가 종종 HCV 바이러스를 연구하는데 대용체로 사용되곤 한다.

페스티바이러스와 헤파시바이러스의 유전자 조직은 매우 유사하다. 이들 양성 스트랜드 RNA 바이러스는 바이러스 복제에 필요한 모든 바이러스성 단백질을 코딩하는 단일 대형 오픈 판독 프레임(ORF)을 함유한다. 이들 단백질은 세포성 및 바이러스-코딩된 프로테이나제에 의해 동시- 및 나중에 해독 프로세싱되는 폴리프로테인으로 발현되어 성숙한 바이러스 단백질을 생성한다. 바이러스 게놈 RNA 복제를 담당하고 있는 바이러스성 단백질은 거의 카복시-말단에 위치한다. ORF의 2/3가 비구조(NS) 단백질로 명명된다. 페스티바이러스 및 헤파시바이러스에 대한 ORF의 비구조 단백질 부분의 유전자 조직 및 폴리프로테인 프로세싱은 매우 유사하다. 페스티바이러스 및 헤파시바이러스 둘 모두에 있어서, 성숙 비구조(NS) 단백질은 비구조 단백질 코딩 영역의 아미노-말단에서부터 ORF의 카복시-말단 서열순으로 p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 및 NS5B로 구성된다.

페스티바이러스 및 헤파시바이러스의 NS 단백질은 특이적 단백질 기능의 특성적인 서열 도메인을 공유한다. 예를 들어, 두 그룹에서 바이러스의 NS3 단백질은 세린 프로테이나제와 헬리카제의 아미노산 서열 모티프 특성을 가진다(Gorbalenya et al. (1988) *Nature* 333: 22; Bazan and Fletterick (1989) *Virology* 171: 637-639; Gorbalenya et al. (1989) *Nucleic Acid Res.* 17, 3889-3897). 유사하게, 페스티바이러스 및 헤파시바이러스의 NS5B 단백질은 RNA-지향 RNA 폴리머라제의 모티프 특성을 가진다(Koonin, E. V. and Dolja, V. V. (1993) *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 28: 375-430).

바이러스 라이프 사이클에서 페스티바이러스 및 헤파시바이러스의 NS 단백질의 실질적인 역할 및 기능은 직접적으로 유사하다. 두 경우, NS3 세린 프로테이나제가 ORF에서 그의 위치에 있는 폴리프로테인 전구체 다운스트림의 모든 단백질분해 프로세싱에 관여한다(Wiskerchen and Collett (1991) *Virology* 184: 341-350; Bartenschlager et al. (1993) *J. Virol.* 67: 3835-3844; Eckart et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 192: 399-406; Grakoui et al. (1993) *J. Virol.* 67: 2832-2843; Grakoui et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10583-10587; Hijikata et al. (1993) *J. Virol.* 67: 4665-4675; Tome et al. (1993) *J. Virol.* 67: 4017-4026). 두 경우, NS4A 단백질이 NS3 세린 프로테아제와 함께 조효소로 작용한다(Bartenschlager et al. (1994) *J. Virol.* 68: 5045-5055; Failla et al. (1994) *J. Virol.* 68: 3753-3760; Lin et al. (1994) *J. Virol.* 68: 8147-8157; Xu et al. (1997) *J. Virol.* 71: 5312-5322). 두 바이러스의 NS3 단백질이 또한 헬리카제로 작용한다(Kim et al. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 215: 160-166; Jin and Peterson (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, 323: 47-53; Warrener and Collett (1995) *J. Virol.* 69: 1720-1726). 마지막으로, 페스티바이러스 및 헤파시바이러스의 NS5B 단백질은 예측 RNA-지향 RNA 폴리머라제 활성을 갖는다(Behrens et al. (1996) *EMBO J.* 15: 12-22; Lchmann et al. (1997) *J. Virol.* 71: 8416-8428; Yuan et al. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 232: 231-235; Hagedorn, PCT WO 97/12033; Zhong et al. (1998) *J. Virol.* 72:9365-9369).

## C형 간염 바이러스

C형 간염 바이러스(HCV)는 전세계적인 만성 간 질환의 일차적 요인이다(Boyer, N. et al. *J. Hepatol.* 32: 98-112, 2000). HCV는 서서히 성장하는 바이러스성 감염을 야기하며, 경화 및 간세포암종의 주요 원인이다(Di Besceglie, A. M. and Bacon, B. R., *Scientific American*, Oct.: 80-85, (1999); Boyer, N. et al. *J. Hepatol.* 32: 98-112, 2000). 전세계적으로 1억 7천만명이 HCV에 감염된 것으로 추정된다(Boyer, N. et al. *J. Hepatol.* 32: 98-112, 2000). 만성 C형 간염에 의해 야기된 경화에 의해 미국에서만 매년 8,000-12,000명이 사망하고 있으며, HCV 감염은 간 이식의 전조 증상이다.

HCV는 수혈후 감염의 적어도 80%를 야기하는 것으로 알려졌으며, 산발성 급성 감염의 상당 부분을 차지한다. 예비적 증거는 또한 HCV가 대부분의 경우의 특발성 만성 간염, 잠복성 경화, 및 아마도 B형 간염 바이러스(HBV)와 같은 다른 간염 바이러스에 관련되지 않은 간세포암종에 연루됨을 시사한다. 건강한 사람의 소수가 만성 HCV 보유자인 것으로 나타났으며, 이는 지리적 및 다른 역학적 요인에 따라 달라진다. 정보가 여전히 예비적인 것이라 할지라도, 그 수는 HBV에 대한 것을 실질적으로 능가할 수 있으며, 이들의 얼마나 많은 사람들이 무증상 만성 간 질환을 가지고 있는지는 명확치 않다(The Merck Manual, ch. 69, p. 901, 16th ed., (1992)).

HCV는 약 9.4kb의 포지티브-센스 단일 스트랜드 RNA 게놈을 함유하는 인벨롭(enveloped) 바이러스이다. 바이러스성 게놈은 5'-비해독 영역(UTR), 약 3011 아미노산의 폴리프로테인 전구체를 코딩하는 긴 오픈 판독 프레임 및 짧은 3'UTR로 구성된다. 5'UTR이 HCV 게놈의 가장 고도로 보존된 부분이며, 폴리프로테인 해독의 개시 및 조절에 중요하다. HCV 게놈 해독은 내부 리보솜 엔트리로서 알려진 cap-비의존성 메커니즘에 의해 개시된다. 이 메커니즘은 내부 리보솜 엔트리

부분(IRES)으로 알려진 RNA 서열에 리보솜을 결합하는 과정을 포함한다. RNA 매듭형 구조가 최근에 HCV IRES의 필수 구조 요소인 것으로 결정되었다. 바이러스성 구조의 단백질은 뉴클레오텐 코어 단백질(C) 및 두개의 인벨롭 당단백질, E1 및 E2를 포함한다. HCV는 또한 두개의 프로테이나제, NS2- NS3 영역에 의해 코딩된 아연-의존성 금속프로테이나제 및 NS3 영역에서 코딩된 세린 프로테이나제를 코딩한다. 이들 프로테이나제는 성숙 펩티드에 전구체 폴리프로테인의 특정 영역을 절단하기 위해 필요하다. 비구조 단백질 5, NS5B의 카복실 절반은 RNA-의존성 RNA 폴리머라제를 함유한다. 나머지 비구조 단백질, NS4A 및 NS4B, 및 NS5A(비구조 단백질 5의 아미노-말단 절반)의 기능은 알려지지 않았다.

현재의 항바이러스 조사는 인간의 만성 HCV 감염을 치료하는 개선된 방법을 개발하는데 상당한 초점이 모아지고 있다(Di Besceglie, A. M. and Bacon, B. R., *Scientific American*, Oct.: 80-85, (1999)).

### 인터페론을 이용한 HCV 감염의 치료

인터페론(IFN)은 거의 10년간 만성 감염을 치료하기 위해 시판되고 있는 물질이다. IFN는 바이러스성 감염에 응답하여 면역 세포에 의해 생성되는 당단백질이다. IFN는 HCV를 포함하여 다수의 바이러스 복제를 저해하며, C형 간염 감염 치료에 단독으로 사용되는 경우, IFN는 특성의 경우에 있어서 혈청 HCV-RNA를 검출되지 않는 수준으로 억제할 수 있다. 또한, IFN는 혈청 아미노 트랜스퍼라제 수준을 노말화할 수 있다. 불행히도, IFN의 효과는 일시적이며 지속적인 응답은 HCV로 만성 감염된 환자의 8-9%에서만 일어나고 있다(Gary L. Davis. *Gastroenterology* 118: S104-S114, 2000). 그러나, 대부분의 환자는 심각한 독감 유사 증상, 체중 감소 및 에너지 및 스테미나 결핍을 야기하여 인터페론 치료를 받아들이는데 어려움을 나타내고 있다.

다수의 특허는 HCV를 포함한 플라비비리다에, 인터페론에 기초한 요법을 이용한 치료법을 개시하였다. 예를 들어, Blatt 등에 의한 미국 특허 제 5,980,884호는 일련의 인터페론을 사용하여 HCV로 고통받는 환자의 재치료 방법을 개시하였다. Bazer 등에 의한 미국 특허 제 5,942,223호는 양 또는 소의 인터페론-타우를 이용한 항-HCV 요법을 개시하였다. Alber 등에 의한 미국 특허 제 5,928,636호는 HCV를 포함한 감염성 질환을 치료하기 위한 인터루킨-12 및 인터페론 알파의 병용 요법을 개시하였다. Chretien 등에 의한 미국 특허 제 5,849,696호는 HCV를 치료하기 위한 티모신 단독 또는 인터페론과의 병용 요법을 개시하였다. Valtuena 등에 의한 미국 특허 제 5,830,455호는 자유 래디칼 스캐빈저 및 인터페론을 사용한 병용 HCV 요법을 개시하였다. Imakawa에 의한 미국 특허 제 5,738,845호는 HCV 치료를 위한 인간 인터페론 타우 단백질의 용도를 개시하였다. 인터페론에 기초해 HCV를 치료하는 다른 치료법이 Testa 등에 의한 미국 특허 제 5,676,942호, Blatt 등에 의한 미국 특허 제 5,372,808호 및 미국 특허 제 5,849,696호에 개시되었다. 다수의 특허, 예를 들어 Hoffmann-La Roche Inc.에 의한 미국 특허 제 5,747,646호, 5,792,834호 및 5,834,594호; Enzon에 의한 PCT 공개 제 WO 99/32139호 및 WO 99/32140호; Schering에 의한 WO 95/13090 및 미국 특허 제 5,738,846호 및 5,711,944호; 및 Glue등에 의한 미국 특허 제 5,908,621호가 또한 폐길화 형의 인터페론을 개시하였다.

인터페론 알파-2a 및 인터페론 알파-2b는 현재 HCV 치료용 단일요법으로 승인된 상태다. ROFERON<sup>R</sup>-A(Roche)는 인터페론 알파-2a의 재조합형이다. PEGASYS<sup>R</sup>(Roche)는 인터페론 알파-2a의 폐길화(즉, 폴리에틸렌글리콜 변형된) 형태이다. INTRON<sup>RA</sup>(Schering Corporation)는 인터페론 알파-2b의 재조합형이고, PEG-INTRON<sup>R</sup>(Schering Corporation)는 인터페론 알파-2b의 폐길화된 형태이다.

다른 형태의 인터페론 알파뿐 아니라 인터페론 베타, 감마, 타우 및 오메가가 현재 HCV 치료용으로 임상 개발중에 있다. 예를 들어, InterMune에 의한 INFERGEN(인터페론 알파-1), Viragen에 의한 OMNIFERON(천연 인터페론), Human Genome Sciences에 의한 ALBUFERON, Ares-Serono에 의한 REBIF(인터페론 베타-1a), BioMedicine에 의한 오메가 인터페론, Amarillo Biosciences에 의한 경구형 인터페론 알파 및 InterMune에 의한 인터페론 감마, 인터페론 타우 및 인터페론 감마-1b가 개발중에 있다.

### 리바비린

리바비린(1-β-D-리보푸라노실-1-1,2,4-트리아졸-3-카복사미드)은 비라졸 상품명으로 시판되고 있는 비-인터페론-유도된 합성의 광범위 스펙트럼 항바이러스성 뉴클레오사이드 유사체이다(The Merck Index, 11th edition, Editor: Budavari, S., Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, pl304, 1989). 미국 특허 제 3,798,209호 및 RE29,835는 리바비린을 개시하고 청구하였다. 리바비린은 구아노신과 구조적으로 유사하며, 플라비비리다에를 포함하여 수개의 DNA 및 RNA 바이러스에 대해 시험관내에서 활성을 가진다(Gary L. Davis. *Gastroenterology* 118: S104-S114, 2000).

리바비린은 환자의 40%에서 혈청 아미노 트랜스퍼라제 수준을 정상 상태로 감소시키지만, HCV-RNA의 혈청 수준을 낮추지는 못한다(Gary L. Davis. *Gastroenterology* 118: S104-S114, 2000). 즉, 리바비린 단독으로는 바이러스성 RNA 수준을 감소시키는데 효과적이지 않다. 또한, 리바비린은 상당한 독성을 가지며 빈혈을 유도하는 것으로 알려졌다.

리바비린은 HCV에 대해 단일요법용으로 승인받지 못했다. HCV 치료용으로 인터페론 알파-2a 또는 인터페론 알파-2b와 병용하여 승인받았다.

### 인터페론 및 리바비린 병용

만성 C형 간염을 치료하는 현재의 표준은 알파 인터페론과 리바비린을 병용하여 사용하는 것이다. HCV 감염을 치료하기 위한 인터페론과 리바비린의 병용은 인터페론을 투여받지 않았던 환자를 치료(Battaglia, A. M. et al., *Ann. Pharmacother.* 34: 487-494, 2000)하는데 뿐 아니라 조직학적 질환이 존재하는 환자를 치료(Berenguer, M. et al. *Antivir. Ther.* 3 (Suppl. 3): 125-136, 1998)하는데 효과적인 것으로 보고되었다. 연구된 바에 의하면 C형 간염에 걸린 환자가 비폐길화된 인터페론 알파를 사용한 병용 요법에 비해 폐길화된 인터페론-알파/리바비린 병용 요법에 보다 많이 응답하는 것으로 나타났다. 그러나, 단일요법과 마찬가지로 자가용혈, 독감 유사 증상, 빈혈 및 피로 등을 포함하여 병용 요법동안 상당한 부작용이 뒤따랐다(Gary L. Davis. *Gastroenterology* 118:S 104-S 114, 2000).

PEG-INTRON<sup>®</sup>(페그인터페론 알파-2b) 및 REBETOL<sup>®</sup>(리바비린, USP) 캡슐을 이용한 병용 요법이 Schering Corporation으로부터 가능하다. REBETOL<sup>®</sup>(Schering Corporation)은 또한 INTRON<sup>®</sup> A(인터페론 알파-2b, 재조합, Schering Corporation)과 배합제로 승인되었다. Roche의 PEGASYS<sup>®</sup>(페길화 인터페론 알파-2a) 및 COPEGUS<sup>®</sup>(리바비린)이 또한 HCV 치료용으로 승인되었다.

Schering Corporation에 의한 PCT 공개 제 WO 99/59621호, WO 00/37110호, WO 01/81359호, WO 02/32414호 및 WO 03/024461호가 HCV를 치료하기 위한 페길화된 인터페론 알파 및 리바비린 병용 요법의 용도를 개시하였다. Hoffmann-La Roche Inc.에 의한 PCT 공개 제 WO 99/15194호, WO 99/64016호 및 WO 00/24355호는 HCV를 치료하기 위한 페길화된 인터페론 알파 및 리바비린 병용 요법의 용도를 개시하였다.

**플라비리다에 감염을 치료하기 위한 추가의 방법**

플라비리다에 감염, 특히 C형 간염용의 신규 항바이러스제 개발이 현재 진행중에 있다. 프로테아제, 헬리카제 및 폴리머라제 저해제와 같은 HCV-유래 효소의 특이적 저해제가 개발중에 있다. HCV 복제에서 다른 단계를 저해하는 약제, 예를 들어 RNA로부터 HCV 항원의 생산을 봉쇄하는 약제(IRES 저해제), HCV 단백질의 정상적인 진행을 방해하는 약제(글리코실화 저해제), HCV가 세포내로 유입되는 것을 봉쇄하는(그의 수용체를 봉쇄함으로써) 약제 및 바이러스 감염에 의해 야기된 세포 손상을 봉쇄하는 비특이적 세포보호제가 또한 개발중에 있다. 또한, 분자적 접근, 예를 들어 특이적 바이러스성 RNA 분자를 파괴하는 효소인 리보자임이 C형 간염을 치료하기 위해 개발중에 있으며, 바이러스 복제를 저해하고 바이러스성 RNA에 결합하는 DNA의 소형 상보 세그먼트인 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 연구되고 있다. 다수의 HCV 치료는 Bymock 등에 의해 *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 11: 2; 79-95 (2000) 및 De Francesco 등에 의해 *Antiviral Research*, 58 : 1-16 (2003)에 검토되었다.

플라비리다에 감염을 치료하기 위해 개발중인 약물 종류의 예는 다음 (1) 내지 (12)를 포함한다:

(1) 프로테아제 저해제

알파케토아미드 및 히드라지노우레아를 포함한 기질에 기초한 NS3 프로테아제 저해제(Attwood *et al.*, *Antiviral peptide derivatives*, PCT WO 98/22496,1998; Attwood *et al.*, *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 1999, 10, 259-273; Attwood *et al.*, *Preparation and use of amino acid derivatives as anti-viral agents*, German Patent Pub. DE 19914474; Tung *et al.* *Inhibitors of serine proteases, particularly hepatitis C virus NS3 protease*, PCT WO 98/17679), 및 보론산 또는 포스포네이트와 같은 친전자체로 중결된 저해제(Llinas-Brunet *et al.*, *hepatitis C inhibitor peptide analogues*, PCT WO 99/07734)가 연구중에 있다.

아미드가 14개의 탄소쇄로 치환된 RD3-4082 및 파라-페녹시페닐 그룹을 갖는 RD3-4078을 포함하는 2,4,6-트리하이드록시-3-니트로-벤즈아미드 유도체와 같은 비기질-기초 NS3 프로테아제 저해제(Sudo K. *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 238, 643-647; and Sudo K. *et al.* *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 1998, 9, 186)가 또한 연구중에 있다.

Sch 68631, 페난트렌퀴논은 HCV 프로테아제 저해제이다(Chu M. *et al.* *Tetrahedron Letters* 37:7229-7232, 1996). 동일한 저자에 의한 다른 예, 페니실리움 그리세옴풀룸(*Penicillium griseofulvum*) 진균으로부터 분리된 Sch 351633이 프로테아제 저해제로 동정되었다(Chu, M. *et al.* *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9, 1949-1952). 거대분자 엘긴 c.에 기초한 선택적인 저해제를 디자인하여 HCV NS3 프로테아제 효소에 대해 나노몰 효능을 이루었다. 거머리로 부터 분리된 엘긴 c.는 S. 그리세우스(*S. griseus*) 프로테아제 A 및 B, α-키모트립신 및 서브틸리신과 같은 수개의 세린 프로테아제의 유효한 저해제이다(Qasim M. A. *et al.*, *Biochemistry* 36: 1598-1607, 1997).

다수의 미국 특허가 HCV 치료용 프로테아제 저해제를 개시하였다. 예를 들어, Spruce 등에 의한 미국 특허 제 6,004,933호는 HCV 엔도펩티다제 2를 억제하기 위한 시스테인 프로테아제 저해제 종류를 개시하였다. Zhang 등에 의한 미국 특허 제 5,990,276호는 C형 간염 바이러스 NS3 프로테아제의 합성 저해제를 개시하였다. 저해제는 NS3 프로테아제의 기질 또는 NS4A 조효소의 기질의 서브시퀀스이다. HCV를 치료하기 위한 제한 효소의 용도가 Reyes 등에 의한 미국 특허 제 5,538,865호에 기재되어 있다. HCV의 NS3 세린 프로테아제 저해제로서의 펩티다제가 Corvas International, Inc.에 의한 WO 02/008251 및 Schering Corporation에 의한 WO 02/08187 및 WO 02/008256에 기재되어 있다. HCV 저해제 트리펩티드가 Boehringer Ingelheim에 의한 미국 특허 제 6,534,523호, 6,410,531호 및 6,420,380호 및 Bristol Myers Squibb에 의한 WO 02/060926에 기재되어 있다. HCV의 NS3 세린 프로테아제 저해제로서의 디아릴 펩티드가 Schering Corporation에 의한 WO 02/48172에 기재되어 있다. HCV의 NS3 세린 프로테아제 저해제로서의 이미다졸리딘이 Schering Corporation에 의한 WO 02/08198 및 Bristol Myers Squibb에 의한 WO 02/48157에 기재되어 있다. Vertex Pharmaceuticals에 의한 WO 98/17679 및 Bristol Myers Squibb에 의한 WO 02/48116이 또한 HCV 프로테아제 저해제를 개시하였다.

(2) NS3/4A 융합 단백질 및 NS5A/5B 기질을 사용한 역상 HPLC 분석에서 관련 저해성을 나타내는 티아졸리딘 유도체(Sudo K. *et al.* *Antiviral Research* 1996, 32, 9-18), 특히 장 알킬 쇠에 의해 치환된 융합 신나모일 부분을 가지는 화합물 RD-1-6250, RD4 6205 및 RD4 6193.

(3) [Kakiuchi N. *et al.* *J. EBS Letters* 421, 217-220 and Takeshita N. *et al.* *Analytical Biochemistry*, 1997, 247, 242-246]에서 확인된 티아졸리딘 및 벤즈아닐라이드.

(4) SDS-PAGE 및 자가방사선 분석에서 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces sp.*), Sch 68631의 발효 배양액으로부터 분리된 HCV 프로테아제(Chu M. *et al.* *Tetrahedron Letters* 1996, 37, 7229-7232) 및 섬광 근접 분석(scintillation

proximity assay)에서 활성이 입증된, 페니실리움 그리세오폴룸(*Penicillium griseofulvum*) 진균으로부터 분리된 Sch 351633(Chu, M. *et al Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9, 1949-1952)에 대하여 활성을 갖는 페난-트렌 퀴논.

(5) 헬리카제 저해제(Diana, G. D. *et al. Compounds, compositions and methods for treatment of hepatitis C*, 미국 특허 5,633,358 및 Diana, G. D. *et al. Piperidine derivatives, pharmaceutical compositions thereof and their use in the treatment of hepatitis C*, PCT WO 97/36554).

(6) 뉴클레오타이드 폴리머라제 저해제 및 글리오톡신 (Ferrari, R. *et al. Journal of Virology* 1999, 73, 1649-1654), 및 천연 산물인 세룰레닌(Lohmann, V. *et al. Virology* 1998, 249, 108-118).

(7) 바이러스의 5' 비-코딩 영역(NCR)에서 서열 스트레치에 상보적인 안티센스 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드(S-ODN)(Alt, M. *et al. Hepatology* 1995, 22, 707-717) 또는 NCR의 3' 말단을 포함하는 뉴클레오타이드 326-348 및 HCV RNA의 코어 코딩 영역에 위치하는 뉴클레오타이드 371-388(Alt, M. *et al. Archives of Virology* 1997, 142, 589-599 and Galderisi, U. *et al. Journal of Cellular Physiology* 1999, 181, 251-257).

(8) IRES-의존 해독 저해제(Ikeda, N *et al. Agent for the prevention and treatment of hepatitis C*, 일본 특허 공개 JP-08268890 ; Kai, Y. *et al Prevention and treatment of viral diseases*, 일본 특허 공개 JP 10101591).

(9) 리보자임, 예를 들어 뉴클레아제-내성 리보자임(Maccjak, D. J. *et al. Hepatology* 1999, 30, abstract 995) 및 Barber 등에 의한 미국 특허 제 6,043,077호, 및 Draper 등에 의한 미국 특허 제 5,869,253호 및 5,610,054호.

(10) 또한, 플라비비리다에 감염 치료용으로 뉴클레오사이드 유사체가 개발되었다.

Idenix Pharmaceuticals는 플라비바이러스(HCV 포함) 및 페스티바이러스 치료에 대한 측쇄 뉴클레오사이드의 용도를 국제 출원 공개 WO 01/90121호 및 WO 01/92282에 개시하였다. 구체적으로, 인간 및 다른 숙주 동물에서 C형 간염(및 플라비바이러스 및 페스티바이러스)의 치료방법이 Idenix의 특허공개문헌에 개시되어 있으며, 여기에서는 임의로 약제학적으로 허용되는 담체중의 유효량의 생물학적 활성인 1',2',3' 또는 4'-측쇄 β-D 또는 β-L 뉴클레오사이드 또는 약제학적으로 허용되는 그의 염 또는 프로드럭이 단독으로 또는 다른 항바이러스제와 조합하여 투여된다.

C형 간염 바이러스를 치료하기 위한 특정 뉴클레오사이드 유사체의 용도를 개시하고 있는 다른 특허 출원은 다음 특허들을 포함한다: PCT/CA00/01316(WO 01/32153; 2000, 11.3일 출원) 및 PCT/CA01/00197(WO 01/60315; 2001, 2.19일 출원)(BioChem Pharma, Inc.에 의해 출원)(현재 소유권자: Shire Biochem, Inc.); PCT/US02/01531(WO 02/057425; 2002, 1.18일 출원) 및 PCT/US02/03086(WO 02/057287; 2002, 1.18일 출원)(Merck & Co., Inc.에 의해 출원), PCT/EPO 1/09633(WO 02/18404; 2001, 8.21일 공개)(Roche에 의해 출원) 및 PCT 공개 제 WO 01/79246호(2001, 4.13일 출원), WO 02/32920(2001, 10.18일 출원) 및 WO 02/48165(Pharmasset, Ltd.에 의해 출원).

Emory University에 의한 PCT 공개 제 WO 99/43691호(출원 명칭: "2'-플루오로뉴클레오사이드")는 HCV를 치료하기 위한 특성의 2'-플루오로뉴클레오사이드의 용도를 개시하였다.

Eldrup 등(Oral Session V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae; 16<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research(April 27, 2003, Savannah, Ga.))은 HCV 저해용 2'-변형된 뉴클레오사이드의 구조 활성 관계를 개시하였다.

Bhat 등(Oral Session V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae, 2003(Oral Session V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae; 16<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research(April 27, 2003, Savannah, Ga.))은 HCV RNA 복제의 가능한 저해제로서의 뉴클레오사이드 유사체의 약동학적 성질 및 합성을 개시하였다. 이들은 2'-변형된 뉴클레오사이드가 세포에 기초한 레플리콘 어셈블리에서 유효한 저해제 활성을 나타냄을 보고하였다.

Olsen 등(Oral Session V, Hepatitis C Virus, Flaviviridae; 16<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research (April 27, 2003, Savannah, Ga. ) p A76)은 또한 HCV RNA 복제에 있어서의 2'-변형된 뉴클레오사이드의 효과를 개시하였다.

(11) 1-아미노-알킬사이클로헥산(Gold 등에 의한 미국 특허 제 6,034,134호), 알킬 리피드(Chojkier 등에 의한 미국 특허 제 5,922,757호), 비타민 E 및 기타 항산화제(Chojkier 등에 의한 미국 특허 제 5,922,757호), 스킴알렌, 아만타딘, 담즙산(Ozeki 등에 의한 미국 특허 제 5,846,964호), N-(포스포노아세틸)-L-아스파르트산(Diana 등에 의한 미국 특허 제 5,830,905호), 벤젠디카복사미드(Diana 등에 의한 미국 특허 제 5,633,388호), 폴리아데닐산 유도체(Wang 등에 의한 미국 특허 제 5,496,546호), 2',3'-디데옥시이노신(Yarchoan 등에 의한 미국 특허 제 5,026,687호), 및 벤즈이미다졸(Colacino 등에 의한 미국 특허 제 5,891,874호)을 포함한 기타 화합물, 식물 추출물(Tsai 등에 의한 미국 특허 제 5,837,257호, Omer 등에 의한 미국 특허 제 5,725,859호 및 미국 특허 제 6,056,961호) 및 피페리딘(Diana 등에 의한 미국 특허 제 5,830,905호).

(12) C형 간염 바이러스의 치료제로서 현재 임상적으로 개발중인 화합물은 다음과 같다: Schering-Plough의 인터루킨-10, Interneuron의 IP-501, Vertex의 Merimebodib (VX-497), Endo Labs Solvay의 AMANTADINE<sup>R</sup>(Symmetrel), RPI의 HEPTAZYME<sup>R</sup>, Idun Pharma.의 IDN-6556, XTL.의 XTL-002, Chiron의 HCV/MF59, NABI의 CIVACIR<sup>R</sup>(C형 간염 면역 글로불린), ICN/Ribapharm의 LEVOVIRIN<sup>R</sup>, ICN/Ribapharm의 VIRAMIDINE<sup>R</sup>, Sci Clone의 ZADAXIN<sup>R</sup>(티모신 알파-1), Sci Clone의 티모신 및 폐결핵 인터페론, Maxim의 CEPLENE<sup>R</sup>(히스타민 디하이드로클로라이드), Vertex/Eli Lilly의 VX 950/LY 570310, Isis Pharmaceutical/Elan의 ISIS 14803, Idun Pharmaceuticals, Inc.의 IDN-6556,

AKROS Pharma의 JTK 003, Boehringer Ingelheim의 BILN-2061, Roche의 CellCept (마이코페놀레이트 모페틸), Tularik의 T67,  $\beta$ -튜불린 저해제, Innogenetics의 E2 관련 치료 백신, Fujisawa Healthcare, Inc.의 FK788, IdB 1016(Siliphos, 경구용 실리빈-포스파티딜콜린 피토솜), ViroPharma/Wyeth의 RNA 복제 저해제(VP50406), Intercell의 치료 백신, Epimmune/Genencor의 치료 백신, Anadys의 IRES 저해제, Anadys의 ANA 245 및 ANA 246, Avant의 면역요법(Therapore), Corvas/Schering의 프로테아제 저해제, Vertex의 헬리카제 저해제, Trimeris의 융합 저해제, CellExSys의 T 세포 치료제, Biocryst의 폴리머라제 저해제, PTC Therapeutics의 표적 RNA 화학, Immtech, Int.의 디캐타이온, Agouron의 프로테아제 저해제, Chiron/Medivir의 프로테아제 저해제, AVI BioPharma의 안티센스 요법, Hybridon의 안티센스 요법, Aethlon Medical의 헤모퓨리화이어, Merix의 치료 백신, Bristol-Myers Squibb/Axys의 프로테아제 저해제, Tripep의 치료 백신, Chron-VacC, United Therapeutics의 UT 231B, Genelabs Technologies의 프로테아제, 헬리카제 및 폴리머라제 저해제, Immusol의 IRES 저해제, Rigel Pharmaceuticals의 R803, InterMune의 INFERGEN<sup>R</sup>(인터페론 알파콘-1), Viragen의 OMNIFERON<sup>R</sup>(천연 인터페론), Human Genome Sciences의 ALBUFERON<sup>R</sup>, AresSero의 REBIF(인터페론 베타-1a), BioMedicine의 오메가 인터페론, Amarillo Biosciences의 경구용 인터페론 알파, InterMune의 인터페론 감마, 인터페론 타우 및 인터페론 감마-1b.

뉴클레오사이드 프로드럭이 다른 형태의 간염을 치료용으로 이미 개시되었다. Idenix Pharmaceuticals에 의한 WO 01/96353(2001, 6.15일 출원)은 HBV 치료용 2'-데옥시- $\beta$ -L-뉴클레오사이드 및 그의 3'-프로드럭을 개시하였다. Beauchamp에 의한 미국 특허 제 4,957,924호는 아시클로비르의 각종 치료 에스테르를 개시하였다.

HCV 감염이 전세계적으로 유행병 수준이고, 감염 환자에 비극적인 결과를 초래하는 것에 비추어 볼때, 숙주에 저독성인 C형 간염을 치료하기에 효과적인 새로운 약제가 강력히 필요한 실정이다.

또한, 다른 플라비비리다에 감염을 치료하기 위해, 숙주에 저독성인 효과적인 새로운 약제가 강력히 요망된다.

따라서, 본 발명의 목적은 C형 간염 바이러스로 감염된 숙주를 치료하기 위한 화합물, 방법 및 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 페스티바이러스, 플라비비C 러스 또는 헤파시바이러스로 감염된 환자를 일반적으로 치료하는 방법 및 조성물을 제공하는 것이다.

### 발명의 요약

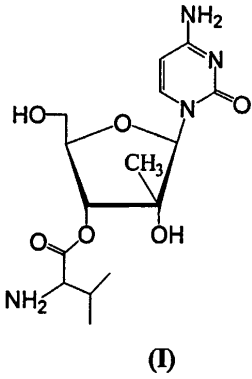
본 발명에 따라,  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 3'-L-발린 에스테르(이후 val-mCyd로도 지칭된다)가 C형 간염 바이러스를 포함하여 플라비바이러스 및 페스티바이러스에 뛰어난 결과를 제공함이 발견되었다. 이러한 발견에 기초하여, 임의로 그의 약제학적으로 허용되는 담체중의 유효량의 val-mCyd 또는 그의 염, 에스테르, 프로드럭 또는 유도체를 투여하는 것을 특징으로 하여, HCV를 포함한 플라비비리다에를 치료하기 위한 화합물, 조성물, 방법 및 용도가 제공된다. 다른 구체예로, val-mCyd가 RNA-의존성 RNA 폴리머라제를 통해 복제하는 임의의 바이러스를 치료하기 위해 사용된다.

따라서, 제 1 구체예는 화학식 (I)의 화합물,  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 및 HCV를 포함하여 플라비바이러스 또는 페스티바이러스로 감염된 숙주, 특히 인간을 치료하기 위한 의학적 치료 및 약제 제조용으로 그의 용도를 제공한다.

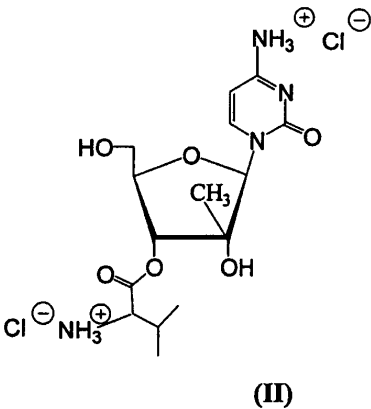
화합물 val-mCyd는 위장 접착, 혈액 또는 간에서 탈에스테르화를 통해 모 MCyd로 전환되며, 경구 전달후 위장관 접막에서 아미노산 트랜스포터 작용에 의해 위장강으로부터 혈류로 활발히 운반된다. 이는 뉴클레오사이드 트랜스포터 작용에 의해 주로 운반되는 모 2'-측쇄 뉴클레오사이드에 비해 경구적 생체이용성이 증가된 이유를 설명해 준다. 또한 아미노산 트랜스포터 작용이 아니고 뉴클레오사이드 트랜스포터 작용에 의해 운반되는 다른 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오사이드 유사체와의 경쟁이 감소된다. 완전 흡수전에 부분적인 탈에스테르화가 일어남으로써, 모노 또는 디발린 에스테르가 아미노산 트랜스포터 작용을 이용하여 지속적으로 흡수된다. 따라서, 혈류로 흡수시 보다 좋은 흡수율, 생체이용성, 및 다른 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오사이드 유사체와의 경쟁성 감소와 같은 뛰어난 결과가 이루어진다.

C형 간염 감염된 침팬지에서, val-mCyd는 평균 HCV RNA 수준을 7 일내에 0.83 log<sub>10</sub> copies/ml(8.3 mg/kg/day) 내지 1.05 log<sub>10</sub> copies/ml(16.6 mg/kg/day)로 감소시켰다. 침팬지는 약물-관련 안정성 문제를 나타내지 않았다.

모 뉴클레오사이드(mCyd) 구조는  $\beta$ -D 또는  $\beta$ -L 뉴클레오사이드로서 존재할 수 있다. 바람직한 구체예로, 약제학적으로 허용되는 화합물은 적어도 90%의  $\beta$ -D 에난티오머 형태로 투여된다. 다른 구체예로, val-mCyd는 적어도 95%의  $\beta$ -D 에난티오머 형태로 투여된다. 발린 에스테르는 또한 에난티오머 형태이다. 바람직한 구체예로, 발린 부분은 적어도 90%의 L-에난티오머이다. 다른 구체예로, 발린 부분은 적어도 95%의 L-에난티오머이다. 또 다른 구체예로, 화합물은 라세미 혼합물 또는  $\beta$ -D 또는  $\beta$ -L 모 뉴클레오사이드 및 L 또는 D 아미노산의 임의의 배합물로 사용된다.



특정 일례로, 화학식 (I)의 화합물은 β-D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르-HCl 염이다. 다른 특정 구체예로, 화학식 (II)의 화합물, β-D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘 디하이드로클로라이드 염이 플라비바이러스 또는 페스티바이러스로 감염된 숙주, 특히 인간에 투여되도록 제공된다. 다른 구체예로, 토실레이트, 메탄설포네이트, 아세테이트, 시트레이트, 말로네이트, 타르타레이트, 숙시네이트, 벤조에이트, 아스코르베이트, α-케토글루타레이트, 및 α-글리세로포스페이트, 포르메이트, 푸마레이트, 프로피오네이트, 글리콜레이트, 락테이트, 피루베이트, 옥살레이트, 말레에이트, 살리실레이트, 설페이트, 설포네이트, 나이트레이트, 바이카보네이트, 하이드로브로메이트, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 카보네이트 및 인산염이 제공된다. 특히 바람직한 구체예는 모노 또는 디하이드로클로라이드 염이다.



다른 구체예로, 2'-C-메틸-사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르 또는 모노 또는 디 HCl 염을 포함한 그의 약제학적으로 허용되는 염, 에스테르, 프로드럭 또는 유도체와 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

다른 구체예로, 5'-하이드록실 그룹은 5'-OR(여기에서, R은 포스페이트(모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 또는 안정화 포스페이트 프로드럭 포함); 아실(저급 아실 포함); 알킬(저급 알킬 포함); 알킬 또는 아릴알킬 설포닐(메탄설포닐 포함)을 포함하는 설포네이트 에스테르 및 벤질(여기에서, 페닐 그룹은 본원에 주어진 아릴의 정의에 기술된 하나 이상의 치환체 의해 임의로 치환된다); 포스포리피드를 포함한 리피드; 아미노산; 탄수화물; 펩티드; 콜레스테롤; 또는 생체 내에 투여시 R이 독립적으로 H 또는 포스페이트를 나타내는 화합물을 제공할 수 있는 다른 약제학적으로 허용되는 이탈 그룹을 나타낸다)로 대체된다.

본 발명의 활성 화합물은 HCV를 포함하여 플라비바이러스 또는 페스티바이러스에 활성적인 다른 제제(발명의 배경에서 기술되거나 언급된 임의의 것 포함), 또는 다른 유용한 생물학적 제제와 함께 또는 교대로 투여될 수 있다. 다른 주요 구체예는 하나 이상의 다른 유효 항바이러스제 및 임의로 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 함께, β-D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염(모노- 또는 디-HCl 염 포함), 에스테르, 프로드럭 또는 약제학적으로 허용되는 유도체를 포함하는 약제학적 조성물이다. 다른 구체예로, 임의로 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 함께, 하나 이상의 제 2 항바이러스제와 배합하여 또는 교대로 β-D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르 또는 그의 염, 에스테르, 프로드럭 또는 유도체를 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다.

목적하는 생물학적 효과를 부여하는 임의의 제 2 항바이러스제가 선택될 수 있다. 비한정적인 예에는 인터페론, 리바비린, 인터루킨, NS3 프로테아제 저해제, 시스테인 프로테아제 저해제, 페난트레퀴논, 티아졸리딘 유도체, 티아졸리딘, 벤즈아닐리드, 헬리카제 저해제, 폴리머라제 저해제, 뉴클레오타이드 유사체, 글리오독신, 세룰레닌, 안티센스 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드, IRES-의존성 해독 저해제 또는 리보자임이 포함된다. 다른 특정 구체예로, 제 2 항바이러스제는 천연 인터페론, 인터페론 알파(인터페론-알파-2a 및 인터페론-알파-2b 포함), 인터페론 베타(인터페론 베타-1a 포함), 오메가 인터페론, 인터페론 감마(인터페론 감마-1b 포함), 인터페론 타우 및 일련의 인터페론중에서 선택된다. 임의의 이들 인터페론은 안정화될 수 있거나, 달리는 수용성 및 생물학적 안정성 또는 다른 생물학적 성질을 개선시키기 위하여 변형될 수 있다. 통상적인 변형은 폐길화(폴리에틸렌 글리콜로 변형)이다. 한 특정 구체예로, 제 2 항바이러스제는 폐길화 또는 비폐길화 인터페론 2-알파이다.

또 다른 구체예로, 활성 화합물은  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘의 3'-아미노산 에스테르(여기에서, 아미노산은 천연 또는 합성일 수 있으며, D 또는 L 입체배열로 존재할 수 있다)이다. 다른 구체예로, 활성 화합물은  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘의 3'-아실 에스테르이다.

### 도면의 간단한 설명

도 1a 및 1b는 실시예 1에 예시된  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르 디하이드로클로라이드를 제조하는 두 과정을 나타낸다.

도 2는 실시예 9에 기술된 바와 같이, RNA 템플레이트의 특정 구아닌 잔기에서  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘 트리포스페이트에 의한 시험관내 RNA 합성의 부위-특정 사슬 종결을 나타내는 겔 포토카피이다.

도 3은 BVDV로 감염된 MDBK 세포의 계대수에 따른 소 바이러스성 설사 바이러스(BVDV)의 역가 그래프로, 실시예 10에 기술된  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘(16 $\mu$ M)으로 장기간 치료시 지속적인 BVDV 감염이 근절됨을 나타낸다. 화살표는 세포 부분이 약물 처치로부터 쇠퇴되는 지점을 나타낸다.

도 4a 및 4b는 실시예 11에 기술된 바와 같이, 바이러스로 지속적으로 감염된 MDBK 세포에서의 소 바이러스성 설사 바이러스(BVDV)의 농도 그래프이다. 이들 그래프는 바이러스 역가 감소에  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘과 인터페론 알파 2b(Intron A) 간에 상승효과가 있음을 나타낸다. 도 4a는 지속적으로 감염된 MDBK 세포에서 BVDV(NY-1 스트레인) 역가에 대한 Intron A 및  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 경시효과를 나타내는 그래프이다. 도 4b는 지속적으로 감염된 MDBK 세포에서 BVDV(I-N-dIns 스트레인) 역가에 대한 Intron A와 배합된  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 5a-d는 실시예 12에 기술된 바와 같이, 소 바이러스성 설사 바이러스(BVDV)로 감염된  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘 처리된 MDBK 세포의 내성 발달을 연구한 실험결과를 나타낸다. 도 5a는 지속적으로 감염된 MDBK 세포에서 BVDV(I-N-dIns 스트레인) 역가에 대한 Intron A 또는  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 28 일간에 대한 효과를 나타내는 실험 그래프이다. 도 5b는 감염된 MDBK 세포로 플레이팅된 디시(dish)의 포토카피로, 야생형 BVDV(I-N-dIns 스트레인)의 표현형으로 형성된 foci 크기를  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘-내성 BVDV(I-N-dIns 107R)와 대비하여 나타낸 것이다. 이 도면으로부터 내성 바이러스가 야생형 I-N-dIns 스트레인보다 훨씬 적은 foci를 형성함을 알 수 있다. 도 5c는 감염된 MDBK 세포에서 감염후 시간에 따른 BVDV 스트레인 I-N-dIns 또는 I-N-dIns-107R의 역가 그래프를 나타낸다. 도 5d는 Intron A로 처리된 데 노보(*de novo*)-감염된 MDBK 세포에서 BVDV 바이러스 역가에 대한 Intron A의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 실시예 13에 기술된 바와 같이,  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르로 처리후 시간(일)에 따른 개별 침팬지들의 C형 간염 바이러스(Log<sub>10</sub>) 농도 그래프이다.

도 7은 실시예 13에 기술된 바와 같이,  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르로 처리후 시간(일)에 따른 개별 침팬지들의 C형 간염 바이러스(Log<sub>10</sub>) 농도를 베이스라인과 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 8은 실시예 14에 기술된 바와 같이, 4, 21 및 36 °C에서 인간 혈장중 약제 배양후 샘플에 남아 있는  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르의 총 백분율을 경시적으로 나타낸 그래프이다.

도 9a는 실시예 14에 기술된 바와 같이, 10  $\mu$ M의  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘과 함께 HepG2 세포를 배양한 후,  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 유리딘(mUrd) 및  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘의 디- 및 트리-포스페이트 유도체의 상대 수준을 경시적으로 나타낸 그래프이다. 도 9b는 10  $\mu$ M의  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘과 함께 HepG2 세포를 배양한 후,  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘의 트리포스페이트 유도체의 붕괴를 경시적으로 나타낸 그래프이다. 도 9c는 10  $\mu$ M의  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘과 함께 HepG2 세포를 배양한 후,  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 유리딘(mUrd) 및  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘의 디- 및 트리-포스페이트 유도체의 농도를 약물 농도( $\mu$ M) 증가에 따라 나타낸 그래프이다.

도 10은 실시예 17에 기술된 바와 같이, 환자에  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르의 투여 후, 인간 혈청중  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 농도(ng/ml) 그래프이다.

도 11은 실시예 17에 기술된 바와 같이,  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르의 투여후, 인간 환자중 C형 간염 바이러스 역가의 중간값 변화 그래프이다. 그래프는 환자 방문에 의해 Log<sub>10</sub> HCV RNA에서 베이스라인으로부터 변화가 있음을 보여준다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명에 따라,  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 3'-L-발린 에스테르(이후 val-mCyd로도 지칭된다)가 C형 간염 바이러스를 포함하여 플라비바이러스 및 페스티바이러스에 뛰어난 결과를 제공함이 발견되었다. 이러한 발견에 기초하여, 임의로 그의 약제학적으로 허용되는 담체중의 유효량의 val-mCyd 또는 그의 염, 에스테르, 프로드럭 또는 유도체를 투여하는 것을 특징으로 하여, HCV를 포함한 플라비비리다에를 치료하기 위한 화합물, 조성물, 방법 및 용도가 제공된다. 다른 구체예로, val-mCyd가 RNA-의존성 RNA 폴리머라제를 통해 복제하는 임의의 바이러스를 치료하기 위해 사용된다.

개시된 화합물 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 유도체 또는 염 또는 이들 화합물을 함유하는 약제학적으로 허용되는 제제는 플라비비리다에(HCV 포함) 감염 및 항-HCV 항체 양성 및 HCV-양성 증상 및 C형 간염 관련 간염(예: 간세포 암종) 및 간종양과 같은 다른 관련 질환을 예방 및 치료하는데 유용하다. 또한, 이들 화합물 또는 제제는 항-HCV(또는 보다 일반적으로 항-플라비비리다에) 항체를 가지거나, HCV-항원 또는 플라비비리다에-항원 양성이거나, 또는 HCV 또는 다른 플라비비리다에 바이러스에 노출된 개체에서 임상적 질병의 진행을 예방적으로 방지 또는 저지하기 위해 사용될 수 있다.

요약하면, 본 발명은 다음 일면들을 포함한다:

- (a)  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 3'-L-발린 에스테르, 및 그의 약제학적으로 허용되는 프로드럭, 유도체 및 염(구체적으로 모노- 및 디-하이드로클로라이드 염 포함);
- (b) 의학적 치료용, 예를 들어 플라비비리다에(HCV 포함) 감염의 치료 또는 예방용으로 사용하기 위한  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 3'-L-발린 에스테르, 및 그의 약제학적으로 허용되는 프로드럭, 유도체 및 염;
- (c) 플라비비리다에(HCV 포함) 감염의 치료용 약제를 제조하기 위한  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 3'-L-발린 에스테르, 및 그의 약제학적으로 허용되는 프로드럭, 유도체 및 염의 용도;
- (d) 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 함께,  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 3'-L-발린 에스테르, 및 그의 약제학적으로 허용되는 프로드럭, 유도체 및 염을 포함하는 약제학적 제제;
- (e)  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 3'-L-발린 에스테르의 제조방법;
- (f) RNA 의존성 RNA 폴리머라제를 통해 복제되는 바이러스에 기인한 감염을 치료하기 위한  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 3'-L-발린 에스테르의 용도;
- (g) 다른 항바이러스제와 함께, 또는 교대로 투여하여 바이러스성 감염을 치료하기 위한  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 3'-L-발린 에스테르의 용도.

또 다른 구체예로, 활성 화합물은  $\beta$ -D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘의 3'-아미노산 에스테르(여기에서, 아미노산은 천연 또는 합성일 수 있으며, D 또는 L 입체배열로 존재할 수 있다)이다. 다른 구체예로, 활성 화합물은  $\beta$ -D 또는  $\beta$ -L-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘의 3'-아실 에스테르이다. 본 발명의 화합물은 항바이러스 활성을 가지거나, 이러한 활성을 나타내는 화합물로 대사된다.

이론적인 결부없이, 시험관내 작용 메커니즘은 mCyd가 게놈 RNA 복제의 특이적 저해제임을 제안한다. 또한, 세포내 5'-트리포스페이트 부분, mCyd-TP는 NS5B RNA-의존성-RNA 폴리머라제를 직접 저해하는 것으로 나타났다. mCyd-TP의 존재하에 RNA 합성 분석은 mCyd-TP가 미지의 메커니즘을 통해 바이러스성 RNA 합성의 특이적 사슬 종결제로 작용함을 제안한다. 항바이러스성 뉴클레오사이드 및 뉴클레오사이드 유사체는 일반적으로 세포내 키나제에 의해 활성 대사물, 5'-트리포스페이트(TP) 유도체로 전환된다. 그후, 뉴클레오사이드-TPs는 바이러스 복제동안 바이러스성 폴리머라제를 저해하여 이들의 항바이러스성 효과를 발휘한다. 배양 세포에서, 세포내 포스포릴화는 mCyd를 낮은 수준의 mCyd-디포스페이트와 함께, 주로 활성 중, mCyd-트리포스페이트(mCyd-TP)로 전환시킨다. 또한, 제 2의 TP 생성물인 2'-C-메틸-유리딘 TP(mUrd-TP)가 밝혀졌고, mCyd 또는 mCyd-5'-포스페이트 중의 세포내 탈아미드화를 통해 생겨나는 것으로 판단된다.

본 발명의 범주내에 포함되는 플라비바이러스는 *Fields Virology*, Editors: Fields, N., Knipe, D. M. 및 Howley, P. M.; Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA; Chapter 31 (1996)에 일반적으로 논의되었다. 특정 플라비바이러스는 앵세타르보(Absettarov); 알푸이(Alfuy); 아포이(Apoi); 아로아(Aroa); 바가자(Bagaza); 반지(Banzi); 보우오우이(Bououi); 부수쿠아라(Bussuquara); 카시파코어(Cacipacore); 캐리섬(Carey Island); 다카바트(Dakar bat); 뎅기 바이러스 1, 2, 3 및 4; 에지힐(Edge Hill); 엔테베 바트(Entebbe bat); 가제트 굴리(Gadgets Gully); 한잘로바(Hanzalova); 히피르(Hypr); 일헤우스(Ilheus); 이스라엘 터키 수뇌막염; 일본 뇌염; 주그라(Jugra); 주티아파(Jutiapa); 카담(Kadam); 카르쉬(Karshi); 케도우고우(Kedougou); 코코에라(Kokoera); 코우탕고(Koutango); 쿨링게(Kumlinge); 쿤진(Kunjin); 키아사누레 삼림병; 랑가트(Langat); 로우핑병(Louping ill); 메아반(Meaban); 모독(Modoc); 몬타나 미오티스 백색질뇌염(Montana myotis leukoencephalitis); 무레이 계곡 뇌염(Murray valley encephalitis); 나란잘(Naranjal); 네기시(Negishi); 엔타야(Ntaya); 움스크 출혈열; 프놈펜 바트(PhnomPenh bat); 포와산(Powassan); 리오브라보(Rio Bravo); 로치오(Rocio); 로얄 팜(Royal Farm); 러시아 봄-여름 뇌염; 소보야(Saboya); 세인트루이스 뇌염; 살 비에자(Sal Vieja); 산 펠리타(San Perlita); 사우마레즈 리프(Saumarez Reef); 세픽(Sepik); 소쿨룩(Sokuluk); 스포드웨니(Spondweni); 스트라트포드(Stratford); 테무수(Temusu); 툴레니(Tyuleniy); 우간다 에스(Uganda S), 우수투(Usutu), 웨셀스브론(Wesselsbron); 웨스트 닐(West Nile); 야오운데(Yaounde); 황색열 및 지카(Zika)를 포함하나, 이에만 한정되지 않는다.

본 발명의 범주내에 포함되는 페스티바이러스가 또한 *Fields Virology (Id.)*에 일반적으로 논의되었다. 특정 페스티바이러스는 소 바이러스성 설사 바이러스("VDV"); 고전적인 돼지 열 바이러스("CSFV")(또한 돼지 콜레라 바이러스로도 알려져 있다); 및 경계 질환 바이러스("BDV")를 포함하나, 이에만 한정되지 않는다.

**정의**

본 원에서 사용되는, 용어 "알킬"은, 다르게 특정되지 않는 한, 전형적으로 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>10</sub>의 포화된 직쇄, 측쇄 또는 사이클릭의 일차, 이차, 또는 삼차 탄화수소를 의미하고, 특히 CF<sub>3</sub>, CC<sub>13</sub>, CFC<sub>12</sub>, CF<sub>2</sub>Cl, CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, 메틸, 에틸, 프로필,

이소프로필, 사이클로프로필, 부틸, 이소부틸, sec-부틸, t-부틸, 펜틸, 사이클로펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, 헥실, 이소헥실, 사이클로헥실, 사이클로헥실메틸, 3-메틸펜틸, 2,2-디메틸부틸 및 2,3-디메틸부틸을 포함한다. 이들 용어는 치환 및 비치환 알킬 그룹 둘다를 포함하고, 특히 할로겐화된 알킬 그룹, 및 보다 특히 불소화 알킬 그룹을 포함한다. 알킬 그룹이 치환될 수 있는 부분의 비한정적인 예는 예를 들어 본 명세서에서 참고 문헌으로 인용되는 [Greene, et al., "Protective groups in Organic Synthesis" John Wiley and Sons, Second Edition, 1991]에 교시된 바와 같이 당업자들에게 공지된 바에 따라, 할로겐(플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도), 하이드록실, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아노, 설펜산, 설페이트, 인산, 포스페이트 및 포스포네이트(이들은 보호되지 않거나, 또는 필요에 따라 보호된다)로 구성된 그룹중에서 선택된다.

용어 저급 알킬이 본원에 사용되는 경우, 이 용어는 다르게 특정되지 않는 한, 치환 및 비치환 형태 둘다를 포함하여 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>의 포화된 직쇄, 측쇄 또는 사이클릭(예: 사이클로프로필) 알킬 그룹을 의미한다. 본 출원에서 다르게 특정되지 않는 한, 알킬이 적합한 부위인 경우, 저급 알킬이 바람직하다. 유사하게, 알킬 또는 저급 알킬 적합한 부분인 경우, 비치환 알킬 또는 저급 알킬이 바람직하다.

용어 알킬아미노 또는 아릴아미노는 각각 하나 또는 두개의 알킬 또는 아릴 치환체를 가지는 아미노 그룹을 의미한다.

본원에 사용된 용어 "보호된"은 다르게 특정되지 않는 한, 추가의 반응을 방지하거나 또는 다른 목적을 위하여 산소, 질소 또는 인 원자에 부가된 그룹을 의미한다. 다양한 산소 및 질소 보호 그룹이 유기합성 업계의 숙련자들에게 공지되었다.

본원에 사용된 용어 아릴은 다르게 특정되지 않는 한, 페닐, 비페닐 또는 나프틸 및 바람직하게는 페닐을 의미한다. 이 용어는 치환 및 비치환된 부분 둘다를 포함한다. 아릴 그룹은 예를 들어 본 명세서에서 참고 문헌으로 인용되는 [Greene, et al., "Protective groups in Organic Synthesis" John Wiley and Sons, Second Edition, 1991]에 교시된 바와 같이 당업자들에게 공지된 바에 따라, 할로겐(플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도), 하이드록실, 아미노, 알킬아미노, 아릴아미노, 알콕시, 아릴옥시, 니트로, 시아노, 설펜산, 설페이트, 포스폰산, 포스페이트 및 포스포네이트(이들은 보호되지 않거나, 또는 필요에 따라 보호된다)로 구성된 그룹중에서 선택되나, 이들에만 한정되지 않는 하나 이상의 부분에 의해 치환될 수 있다.

용어 알크아릴 또는 알킬아릴은 아릴 치환체를 가지는 알킬 그룹을 의미한다. 용어 아르알킬 또는 아릴알킬은 알킬 치환체를 가지는 아릴 그룹을 의미한다.

본원에 사용된 용어 할로는 개별적으로 클로로, 브로모, 요오도 및 플루오로의 특정 기술이다.

용어 퓨린 또는 피리미딘 염기는 아데닌, N<sup>6</sup>-알킬퓨린, N<sup>6</sup>-아실퓨린(여기에서, 아실은 C(O)(알킬, 아릴, 알킬아릴, 또는 아릴알킬이다), N<sup>6</sup>-벤질퓨린, N<sup>6</sup>-할로퓨린, N<sup>6</sup>-비닐퓨린, N<sup>6</sup>-아세틸렌성 퓨린, N<sup>6</sup>-아실 퓨린, N<sup>6</sup>-하이드록시알킬 퓨린, N<sup>6</sup>-알킬아미노퓨린, N<sup>6</sup>-티오알킬 퓨린, N<sup>2</sup>-알킬퓨린, N<sup>2</sup>-알킬-6-티오피린, 티민, 사이토신, 5-플루오로사이토신, 5-메틸사이토신, 6-아자피리미딘(6-아자사이토신 포함), 2- 및/또는 4-머캅토피리미딘, 우라실, 5-할로우라실(5-플루오로우라실 포함), C<sup>5</sup>-알킬피리미딘, 5-요오도-피리미딘, 6-요오도-피리미딘, 2-Br-비닐-5-피리미딘, 2-Br-비닐-6-피리미딘, C<sup>5</sup>-벤질피리미딘, C<sup>5</sup>-할로피리미딘, C<sup>5</sup>-비닐피리미딘, C<sup>5</sup>-아세틸렌성 피리미딘, C<sup>5</sup>-아실 피리미딘, C<sup>5</sup>-하이드록시알킬 퓨린, C<sup>5</sup>-아미도피리미딘, C<sup>5</sup>-시아노피리미딘, C<sup>5</sup>-니트로피리미딘, C<sup>5</sup>-아미노피리미딘, N<sup>2</sup>-알킬퓨린, N<sup>2</sup>-알킬-6-티오피린, 5-아자사이티디닐, 5-아자우라실릴, 트리아졸로피리디닐, 이미다졸로피리디닐, 피롤로피리디닐, 및 피라졸로피리디닐을 포함하나, 이에만 한정되지 않는다. 퓨린 염기는 구아닌, 아데닌, 히포크산틴, 2,6-디아미노퓨린 및 6-클로로퓨린을 포함하나, 이에만 한정되지 않는다. 염기상의 산소 및 질소 작용 그룹은 필요에 따라 또는 원한다면 보호될 수 있다. 적합한 보호 그룹은 당업자들에게 널리 알려져 있으며, 트리메틸실릴, 디메틸헥실실릴, t-부틸디메틸실릴 및 t-부틸디페닐실릴, 트리틸, 알킬 그룹, 및 아실 그룹, 예컨대 아세틸 및 프로피오닐, 메탄설폰닐, 및 p-톨루엔설폰닐을 포함한다.

용어 아실 또는 0-결합된 에스테르는 식 C(O)R'(여기에서, R'는 직쇄, 측쇄 또는 사이클릭알킬(저급 알킬 포함), 아미노산의 카복실레이트 잔기, 아릴(페닐 포함), 헤테로아릴, 알크아릴, 아르알킬(벤질 포함), 알콕시알킬(메톡시메틸 포함), 아릴옥시알킬, 예컨대 페녹시메틸; 또는 치환된 알킬(저급 알킬 포함), 클로로, 브로모, 플루오로, 요오도, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕시에 의해 임의로 치환된 아릴(페닐 포함), 설펜에이트 에스테르, 예컨대 알킬 또는 아르알킬 설폰닐(메탄설폰닐 포함), 모노, 디 또는 트리포스페이트 에스테르, 트리틸 또는 모노메톡시-트리틸, 치환된 벤질, 알크아릴, 아르알킬(벤질 포함), 알콕시알킬(메톡시메틸 포함), 아릴옥시알킬, 예컨대 페녹시메틸을 나타낸다)의 그룹을 의미한다. 에스테르내 아릴 그룹은 가장 좋게는 페닐 그룹을 포함한다. 비한정적인 구체예로, 아실 그룹은 아세틸, 트리플루오로아세틸, 메틸아세틸, 사이클로프로필아세틸, 사이클로프로필카복실, 프로피오닐, 부티릴, 이소부티릴, 헥사노일, 헵타노일, 옥타노일, 네오-헵타노일, 페닐아세틸, 2-아세톡시-2-페닐아세틸, 디페닐아세틸, α-메톡시-α-트리플루오로메틸페닐아세틸, 브로모아세틸, 2-니트로벤젠아세틸, 4-클로로벤젠아세틸, 2-클로로-2,2-디페닐아세틸, 2-클로로-2-페닐아세틸, 트리메틸아세틸, 클로로디플루오로아세틸, 퍼플루오로아세틸, 플루오로아세틸, 브로모디플루오로아세틸, 메톡시아세틸, 2-티오엔아세틸, 클로로설포닐아세틸, 3-메톡시페닐아세틸, 페녹시아세틸, t-부틸아세틸, 트리클로로아세틸, 모노클로로아세틸, 디클로로아세틸, 7H-도데카플루오로헵타노일, 퍼플루오로헵타노일, 7H-도데카플루오로헵타노일, 7-클로로도데카플루오로헵타노일, 7-클로로도데카플루오로헵타노일, 7H-도데카플루오로헵타노일, 7H-도데카플루오로헵타노일, 노나플루오로-3,6-디옥사헵타노일, 노나플루오로-3,6-디옥사헵타노일, 퍼플루오로헵타노일, 메톡시벤조일, 메틸 3-아미노-5-페닐티오엔-2-카복실, 3,6-디클로로-2-메톡시-벤조일, 4-(1,1,2,2-테트라플루오로에톡시)벤조일, 2-브로모프로피오닐, 오메가아미노카프릴, 데카노일, n-펜타데카노일, 스테아릴, 3-사이클로펜틸프로피오닐, 1-벤젠카복실, 0-아세틸만델릴, 피발로일 아세틸, 1-아다만탄카복실, 사이클로헥산카복실, 2,6-피리딘디카복실, 사이클로헥탄카복실, 사이클로부탄카복실, 퍼플루오로사이클로헥실 카복실, 4-메틸벤조일, 클로로메틸 이속사졸릴 카보닐, 퍼플루오로사이클로헥실 카복실, 크로토닐, 1-메틸-1H-인다졸-3-카보닐, 2-프로페닐, 이소발레릴, 1-피롤리딘카보닐, 4-페닐벤조일을 포함하나, 이들에만 한정되는 것은 아니다.

용어 아미노산은 자연 발생 및 합성  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  또는  $\delta$  아미노산을 포함하고, 단백질에서 발견되는 아미노산, 즉, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 프롤린, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파테이트, 글루탐메이트, 라이신, 아르기닌 및 히스티딘을 포함하나, 이들에만 한정되는 것은 아니다. 바람직한 구체예로, 아미노산은 L-배열로 존재하나, D-배열로도 사용될 수 있다. 또한, 아미노산은 알라닌, 발리닐, 류시닐, 이소류시닐, 프롤리닐, 페닐알라니닐, 트립토판닐, 메티오니닐, 글리시닐, 세리닐, 트레오니닐, 시스테인닐, 티로시닐, 아스파라기닐, 글루타미닐, 아스파토일, 글루타로일, 라이시닐, 아르기니닐, 히스티디닐,  $\beta$ -알라닐,  $\beta$ -발리닐,  $\beta$ -류시닐,  $\beta$ -이소류시닐,  $\beta$ -프롤리닐,  $\beta$ -페닐알라니닐,  $\beta$ -트립토판닐,  $\beta$ -메티오니닐,  $\beta$ -글리시닐,  $\beta$ -세리닐,  $\beta$ -트레오니닐,  $\beta$ -시스테인닐,  $\beta$ -티로시닐,  $\beta$ -아스파라기닐,  $\beta$ -글루타미닐,  $\beta$ -아스파토일,  $\beta$ -글루타로일,  $\beta$ -라이시닐,  $\beta$ -아르기니닐 또는  $\beta$ -히스티디닐의 유도체일 수 있다.

본 원에 사용된 용어 "실질적으로 함유하지 않는" 또는 "실질적으로 존재하지 않는"이란 뉴클레오사이드의 지정 예난티오머를 적어도 약 85 또는 90 중량%, 바람직하게는 95, 98, 99 또는 100 중량%를 포함하는 뉴클레오사이드 조성물을 의미한다.

유사하게, 용어 "분리된"이란 뉴클레오사이드를 적어도 약 85 또는 90 중량%, 바람직하게는 95, 98, 99 또는 100 중량%를 포함하는 뉴클레오사이드 조성물을 의미한다.

본 원에서 사용되는 용어 "숙주"는 세포주 및 동물, 및 바람직하게 인간을 포함하여 바이러스가 복제할 수 있는 단세포 또는 다세포 유기체를 의미한다. 또한, 숙주는 플라비비리다에 바이러스 게놈의 일부를 운반할 수 있고, 그의 복제 또는 작용은 본 발명의 화합물에 의해 변화될 수 있다. 용어 숙주는 특히 감염된 세포, 플라비비리다에 바이러스 게놈 전체 또는 일부에 의해 형질감염된 세포 및 동물, 특히, 영장류(침팬지 포함) 및 인간을 의미한다. 본 발명의 대부분의 동물 적용예에 있어, 숙주는 인간 환자이다. 그러나, 특별한 지시가 있는 경우 본 발명에 의해 수의학적 적용도 명확하게 기대된다(예: 침팬지).

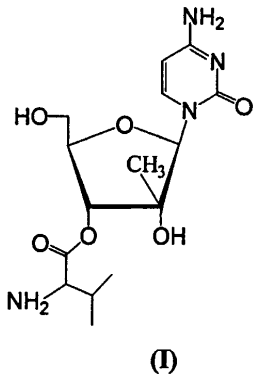
용어 "약제학적으로 허용되는 염 또는 프로드럭"은 본 명세서에서 환자에게 투여되는 경우 뉴클레오사이드 화합물을 제공하는 개시된 뉴클레오사이드의 모든 약제학적으로 허용되는 형태(예로서, 에스테르, 포스페이트 에스테르, 에스테르 염 또는 관련 그룹의 염)를 기술하기 위하여 사용된다. 약제학적으로 허용되는 염은 약제학적으로 허용되는 무기 또는 유기 염기 및 산으로부터 유도된 것을 포함한다. 적합한 염은 제약 업계에 공지된 다수의 다른 산 중에서도 포타슘 및 소듐과 같은 알칼리 금속, 칼슘 및 마그네슘과 같은 알칼리 토금속으로부터 유도된 것을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 프로드럭은 예를 들어 숙주에서 대사되어 예컨대 가수분해 또는 산화되어 본 발명의 화합물을 형성하는 화합물을 의미한다. 프로드럭의 전형적인 예는 활성 화합물의 작용 부위상에 생물학적으로 불안정한 보호 그룹을 갖는 화합물을 포함한다. 프로드럭은 산화, 환원, 아민화, 탈아민화, 하이드록실화, 탈하이드록실화, 가수분해, 탈가수분해, 알킬화, 탈알킬화, 아실화, 탈아실화, 포스포릴화, 탈포스포릴화하여 활성 화합물을 생성할 수 있는 화합물을 포함한다. 본 발명의 화합물은 예를 들어 플라비비리다에 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 보유하거나, 이러한 활성을 나타내는 화합물로 대사된다.

**I. 활성 화합물, 그의 생리학적으로 허용되는 염 및 프로드럭**

유효량의 2'-C-메틸-사이티딘-3'-O-L-발린, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 에스테르 또는 프로드럭을 이룰 필요로 하는 숙주에 투여하는 것을 포함하여, 페스티바이러스, 플라비바이러스 및 C형 간염 바이러스 감염을 치료하기 위한 방법 및 조성물이 개시된다.

일례로, 화학식 (I)의 화합물의 하이드로클로라이드 염이 사용된다. 다른 구체예로, 화학식 (I)의 화합물의 디하이드로클로라이드 염이 바람직하다. 그러나, 활성 화합물은 수용체에 투여시 모 화합물을 직간접적으로 제공할 수 있거나, 그 자체로 활성을 나타내는 염의 염 또는 프로드럭으로 투여될 수 있다. 비한정적인 예는 "생리학적으로 허용되는 염"으로도 지칭되는 약제학적으로 허용되는 염 및 5'-위치에서 또는 퓨린 또는 피리미딘 염기상에서 알킬화, 아실화 또는 다르게 변형되어 "약제학적으로 허용되는 프로드럭" 타입을 형성하는 화합물이다. 또한, 변형은 일부의 경우 모 화합물에 비해 활성을 증가시켜 화합물의 생물학적 활성에 영향을 미칠 수 있다. 이는 염 또는 프로드럭을 제조하고 본 원에 개시된 방법 또는 당업자들에 공지된 다른 방법에 따라 그의 항바이러스 활성을 시험하여 용이하게 평가할 수 있다.

제 1 주요 구체예로, 화학식 (I)의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 또는 프로드럭이 제공된다:



화합물의 모든 입체이성체, 토토머 및 다형체가 본 원에 포함되는 것으로 이해하여야 한다. 2'-메틸 치환은 또한 다른 알킬 그룹, 예를 들어 에틸, 프로필 또는 에테닐일 수 있다.

또 다른 구체예로, 활성 화합물은  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 3'-아미노산 에스테르이며, 여기에서 아미노산은 천연 또는 합성일 수 있고, D 또는 L 입체배열일 수 있다. 다른 구체예로, 활성 화합물은  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘의 3'-아실 에스테르이다.

또 다른 구체예로, 5'-하이드록실 그룹이 5'-OR(여기에서, R은 포스페이트(모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 또는 안정화 포스페이트 프로드럭 포함); 안정화된 포스페이트 프로드럭; 아실(저급 아실 포함); 알킬(저급 알킬 포함); 알킬 또는 아릴알킬 설포닐(메탄설포닐 포함)을 포함하는 설포네이트 에스테르 및 벤질(여기에서, 페닐 그룹은 본 원에 주어진 아릴의 정의에 기술된 하나 이상의 치환체 의해 임의로 치환된다); 포스포리피드를 포함한 리피드; 아미노산; 탄수화물; 펩티드; 콜레스테롤; 또는 생체내에 투여시 R이 독립적으로 H 또는 포스페이트를 나타내는 화합물을 제공할 수 있는 다른 약제학적으로 허용되는 이탈 그룹을 나타낸다)로 대체된다.

**II. 활성 화합물의 합성**

본 발명의 화합물은 당업계에 공지된 방법에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, 일례로, 2' C에서 이치환된 뉴클레오사이드, 뉴클레오사이드 유사체, 또는 그의 염, 프로드럭, 입체이성체 또는 토포머가 제조된다.

다른 구체예로, 활성 뉴클레오사이드로 유용하거나 합성 중간체로 사용되는  $\beta$ -D-2'-C-메틸-사이티딘(4-아미노-1-(3,4-디하이드록시-5-하이드록시메틸-3-C-메틸-테트라하이드로-푸란-2-일)-1H-피리미딘-2-온)이 제조된다. 또 다른 구체예로,  $\beta$ -D-2'-C-메틸-사이티딘의 3'-O-발리닐 에스테르(2-아미노-3-메틸-부티르산 5-(4-아미노-2-옥소-2H-피리미딘-1-일)-4-하이드록시-4-C-메틸-2-하이드록시메틸-테트라하이드로-푸란-3-일 에스테르) 또는 하이드로클로라이드 염 형태가 제조된다. 제조된 뉴클레오사이드, 뉴클레오사이드 유사체, 염 또는 에스테르 프로드럭은 각종 다른 뉴클레오사이드 유사체 제조시에 중간체로 사용될 수 있거나, 항바이러스제 및/또는 항종양제로 직접 사용될 수 있다.

**실시예 1:  $\beta$ -D-2'-C-메틸-리보푸라노실 사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르의 합성**

도 1a에 도시된 한 합성 방법으로, 사이토신, BSA 및 SnCl<sub>4</sub>/아세트니트릴을 1,2,3,5-테트라-O-벤조일-2-C-메틸- $\beta$ -D-리보푸라노스(1)와 반응시켜 4-아미노-1-(3,4-디벤조일옥시-5-벤조일옥시메틸-3-메틸-테트라하이드로-푸란-2-일)-1H-피리미딘-2-온(2)을 형성하고; (2)를 NaOMe/MeOH와 반응시켜 4-아미노-1-(3,4-디하이드록시-5-하이드록시메틸-3-메틸테트라하이드로푸란-2-일)-1H-피리미딘-2-온(3)(2-C-메틸- $\beta$ -D-리보푸라노스로도 알려져 있다)을 제공하는 것을 포함한다; 출발물질로서 벤조일사이토신보다 사이토신을 사용하는 것이 공정의 "원자 경제성"을 향상시키고 후속 단계에서 정제를 단순화시킨다.

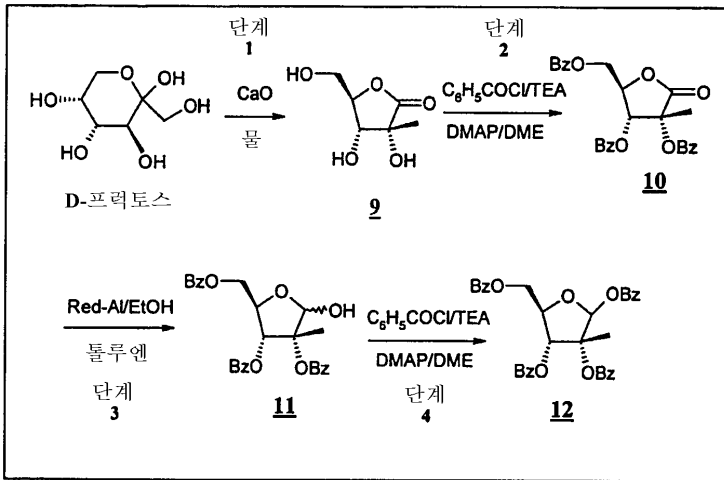
본 방법에서 후속 단계는 (3)을 DMF중에서 Me<sub>2</sub>NCH(OMe)<sub>2</sub>와 반응시켜 (3)의 아미노-보호 형태인 (4), N-[1-(3,4-디하이드록시-5-하이드록시메틸-3-메틸테트라하이드로푸란-2-일)-2-옥소-1,2-디하이드로피리미딘-4-일]-N,N-디메틸포름아미딘을 형성하고; (4)를 DCM에서 TBDPSCI 및 이미다졸과 반응시켜 (4)의 5'-실릴-보호된 형태를 N'-{1-[5-(t-부틸-디페닐실라닐옥시메틸)-3,4-디하이드록시-3-메틸테트라하이드로푸란-2-일]-2-옥소-1,2-디하이드로-피리미딘-4-일]-N,N-디메틸-포름아미딘(5)으로 제공하고(여기에서, DCM의 사용은 디실릴 부산물 형성을 좀 더 제어할 수 있는 이점을 제공한다); (5)를 DCM중에 실온에서 N-Boc-L-발린, EDC 및 DMAP와 반응시켜 2-t-부톡시카보닐아미노-3-메틸-부티르산 2-(t-부틸디페닐실라닐옥시메틸)-5-[4-(디메틸아미노)-2-옥소-2H-피리미딘-1-일]-4-하이드록시-4-메틸-테트라하이드로-푸란-3-일 에스테르(6)을 형성한 후; (6)을 약 10 몰당량의 에틸 아세테이트의 존재하에 MeOH중에서 NH<sub>4</sub>F와 반응시켜 실릴 및 아미노-보호 그룹을 제거하여 유리된 암모니아에 의한 3'-O-발리닐 에스테르 절단을 방지하고, 혼합물을 환류시켜 2-t-부톡시카보닐아미노-3-메틸-부티르산 5-(4-아미노-2-옥소-2H-피리미딘-1-일)-4-하이드록시-2-하이드록시메틸-4-메틸테트라하이드로푸란-3-일 에스테르(7)를 제공하고; 마지막으로 (7)을 EtOH에서 HCl과 반응시켜 2-아미노-3-메틸-부티르산 5-(4-아미노-2-옥소-2H-피리미딘-1-일)-4-하이드록시-2-하이드록시메틸-4-메틸테트라하이드로푸란-3-일 에스테르, 디하이드로클로라이드 염(8)을 최종 생성물로 제공하는 것을 포함한다.

**다른 합성**

도 1b에 도시된 본 발명의 화합물을 합성하는 다른 방법으로, 벤조일사이토신, BSA 및 SnCl<sub>4</sub>/아세트니트릴을 1,2,3,5-테트라-O-벤조일-2-C-메틸- $\beta$ -D-리보푸라노스(1)와 반응시켜 4-벤조일아미노-1-(3,4-디벤조일옥시-5-벤조일옥시메틸-3-메틸테트라하이드로푸란-2-일)-1H-피리미딘-2-온(2a)을 형성하고; (2a)를 메탄올에서 NH<sub>3</sub>와 반응시키고 생성물, 4-아미노-1-(3,4-디하이드록시-5-하이드록시메틸-3-메틸테트라하이드로푸란-2-일)-1H-피리미딘-2-온(또한  $\beta$ -D-2'-C-메틸사이티딘으로도 알려져 있다)을 크로마토그래피적으로 분리한 후; (3)을 DMF중에 실온에서 Me<sub>2</sub>NCH(OMe)<sub>2</sub>와 1.5 시간동안 반응시켜 N-[1-(3,4-디하이드록시-5-하이드록시메틸-3-메틸테트라하이드로푸란-2-일)-2-옥소-1,2-디하이드로피리미딘-4-일]-N,N-디메틸포름아미딘(4)을 형성하며; (4)를 실온에서 TBDPSCI 및 피리딘과 6 시간동안 반응시켜 N'-{1-[5-(t-부틸-디페닐실라닐옥시메틸)-3,4-디하이드록시-3-메틸테트라하이드로푸란-2-일]-2-옥소-1,2-디하이드로피리미딘-4-일]-N,N-디메틸-포름아미딘(5)을 제공하고; (5)를 THF/DMF중에 실온에서 N-Boc-L-발린, DEC 및 DMAP와 이틀간 반응시킨 후, 이 반응으로부터 형성된 생성물을 HPLC에 적용하여 2-t-부톡시카보닐아미노-3-메틸부티르산 2-(t-부틸-디페닐-실라닐옥시메틸)-[4-(디메틸아미노)메틸렌아미노]-2-옥소-2H-피리미딘-1-일]-4-하이드록시-4-메틸테트라하이드로푸란-3-일 에스테르(6)를 제공한 다음; (6)을 MeOH에서 NH<sub>4</sub>F와 약 3 시간동안 환류시켜 실릴 및 아미노-보호 그룹을 제거하고, 생성물을 크로마토그래피 정제하여 2-t-부톡시카보닐아미노-3-메틸부티르산 5-(4-아미노-2-옥소-2H-피리미딘-1-일)-4-하이드록시-2-하이드록시메틸-4-메틸테트라하이드로푸란-3-일 에스테르(7)를 제공하며; 마지막으로 (7)을 EtOH중에서 실온에서 HCl과 반응시켜 2-아미노-3-메틸-부티르산 5-(4-아미노-2-옥소-2H-피리미딘-1-일)-4-하이드록시-2-하이드록시메틸-4-메틸-테트라하이드로-푸란-3-일 에스테르, 디하이드로클로라이드 염(8)을 최종 생성물로 제공한다.

**실시예 2: 2'-C-메틸-사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르(VAl-mCyd)의 합성**

**반응식 1**



**단계 1: 화합물 9: 2-C-메틸-D-리보닉-γ-락톤의 합성**

탈이온수(100 mL)를 오버헤드 교반기, 교반 샤프트, 디지털 온도 관독 장치 및 아르곤 라인이 장착된 250 mL 3-구 환저 플라스크에서 교반하였다. 아르곤을 물에 30 분동안 버블링시키고, D-프럭토스(20.0 g, 0.111 mole)를 첨가하였다. 용액이 수분내에 맑아졌다. 산화칼슘(12.5 g, 0.223 mole)을 5 분간 조금씩 첨가하고, 혼합물을 격렬히 교반하였다. 발열이 관찰되었으며, 산화칼슘 첨가 개시로부터 10 분후 반응 온도가 39.6 °C로 되었다. 약 15 분후, 반응 혼합물은 황색을 나타내었으며 시간이 지남에 따라 짙어졌다. 3 시간후, 분취액을 TLC 분석용으로 취하였다. 옥살산 포화 수용액을 사용하여 분취액을 pH2로 산성화하였다. 생성된 백색 현탁액을 감압하에 증발시켜 물을 제거하였다. 잔사에 톨루엔(2 mL)을 첨가하고, 혼합물을 감압(45-50 °C)하에 증발시켜 미량의 물을 제거하였다. 잔류 고체를 2 mL의 1:1 테트라하이드로푸란:메탄올 혼합물에 재구성화시켰다. 철저히 혼합후, 현탁액을 정지시키고, 맑은 상등액을 TLC에 스포팅하였다(실리카 플레이트를 에틸 아세테이트중의 2% 메탄올중에서 전개하고, 1% 알칼리성 과망간산칼륨에 침지시켜 착색시켰다. 그후, 플레이트를 가열 건조로 핑크 바탕에 황색 반점이 나타날 때까지 가열하였다). 목적하는 락톤은 전형적으로 상기 조건하에서 0.33의 R<sub>f</sub> 값에서 나타난다. 보다 극성인 부산물 및 비반응 물질이 0.0 내지 0.2의 R<sub>f</sub> 값 범위에서 검출되었다.

생성물의 형성이 약 3 시간후 관찰되더라도, 반응은 22 시간동안 계속 진행시키며, 이 동안 반응 혼합물은 25 °C에서 교반된다. 반응 종료후, 혼합물의 pH는 13.06이었다. 이산화탄소 가스를 반응 혼합물에 약 2.5 시간동안 버블링시켰다(pH=7.25). 형성된 탄산칼슘 고체를 진공 여과에 의해 제거하고, 필터 케이크를 50 mL의 탈이온수로 세척하였다. 수층을 합하여 옥살산(5.0 g, 0.056 mole)으로 처리하고, 혼합물을 25 °C에서 30 분간 격렬히 교반하였다(초기 어두운 색이 대부분 사라지고 혼합물은 우유빛 백색 슬러리로 변하였다). 이 단계에서 혼합물의 pH는 전형적으로 2-3이다. 슬러리 혼합물을 45-50 °C에서 밤새 교반하였다. 그후, 혼합물을 감압하에 45-50 °C에서 증발시켜 75 mL의 물을 제거하였다. 염화나트륨(30 g) 및 테트라하이드로푸란(100 mL)을 수성 슬러리(약 75 mL)에 가하고, 혼합물을 25 °C에서 30 분간 격렬히 교반하였다. 층을 분리하여 수층을 새로운 테트라하이드로푸란 75 mL와 10 분동안 교반하였다. 이 과정을 3회 반복하고, 테트라하이드로푸란 용액을 합하여 10 g의 무수 황산마그네슘과 함께 30 분동안 교반하였다. 혼합물을 여과한 후, 황산마그네슘 필터 케이크를 60 mL의 테트라하이드로푸란으로 세척하였다. 여액을 감압하에 40 °C에서 증발시켜 10.86 g의 조 생성물을 암 오렌지색 반고체로 수득하였다. (대규모 공정의 경우에는, 테트라하이드로푸란을 아세톤으로 대체하여 조 생성물의 증발 건조를 실시하지 않는다). 조 생성물을 20 °C에서 아세톤(20 mL)과 3 시간동안 교반한다. 생성물을 진공 여과하여 수집하고 필터 케이크를 12 mL의 아세톤으로 세척하여 목적 생성물 9를 백색 결정성 고체로 수득하였다. 생성물을 진공중에 건조시켜 2.45 g(수율: 13.6%)을 수득하였다. 화합물 9의 용점: 158-162 °C(문헌 용점: 160-161 °C).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 5.69 (s, 1H, D<sub>2</sub>O와 교환가능), 5.41 (d, 1H, D<sub>2</sub>O와 교환가능), 5.00 (t, 1H, D<sub>2</sub>O와 교환가능), 4.15 (m, 1H), 3.73 (m, 2H), 3.52 (m, 1H), 1.22 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 176.44, 82.95, 72.17, 72.02, 59.63, 20.95.

(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>: 이론치 C, 44.45; H, 6.22. 실측치: C, 44.34; H, 6.30).

**단계 2: 화합물 10: 2,3,5-트리-O-벤조일-2-C-메틸-D-리보닉-γ-락톤의 합성**

1,2-디메톡시에탄(50 mL)중의 락톤 1(3.0 g, 18.50 mmol), 4-디메틸아미노피리딘(0.45 g, 3.72 mmol) 및 트리에틸아민(25.27 g, 249.72 mmol)의 혼합물을 25 °C에서 아르곤하에 30 분간 교반하였다. 이 백색 현탁액을 5 °C로 냉각하고, 벤조일 클로라이드(11.7 g, 83.23 mmol)를 15 분간 가하였다. 혼합물을 25 °C에서 2 시간동안 교반하였다. TLC 분석(실리카, 에틸 아세테이트중 2% 메탄올)은 출발물질이 완전히 소모되었음을 나타낸다. 빙냉수(100 g)를 반응 혼합물에 가하고,

30 분동안 교반하였다. 형성된 백색 고체를 진공 여과하여 수집하고, 필터 케이크를 냉수(50 mL)로 세척하였다. 조 생성물을 20 °C에서 t-부틸 메틸 에테르 (60 mL)와 30 분간 교반하고, 여과한 후, 필터 케이크를 t-부틸 메틸 에테르 (25 mL)로 세척한 다음, 진공중에서 건조시켜 화합물 10 7.33 g(수율: 83.4%) 백색 고체로 수득하였다(순도: 97.74%(HPLC/AUC)).

화합물 10의 용점: 137-140 °C(문헌 용점: 141-142 C).

<sup>1</sup>H NMR (CDC1<sub>3</sub>) δppm 8.04 (d, 2H), 7.92 (d, 2H), 7.73 (d, 2H), 7.59 (t, 1H), 7.45 (m, 4H), 7.32 (t, 2H), 7.17 (t, 2H), 5.51 (d, 1H), 5.17 (m, 1H), 4.82-4.66 (AB quartet의 d, 2H) 1.95, (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (CDC1<sub>3</sub>) δ ppm 172.87, 166.17, 166.08, 165.58, 134.06, 133.91, 133.72, 130.09, 129.85, 129.80, 129.37, 128.78, 128.60, 128.49, 127.96, 127.89, 79.67, 75.49, 72.60, 63.29, 23.80.

TOF MS ES+ (M+ 1: 475).

단계 3: 화합물 11: 2,3,5-트리-O-벤조일-2-C-메틸-β-D-리보푸라노스의 합성

무수 톨루엔(2.0 mL)중의 Red-Al(톨루엔중 65wt%, 2.0 mL, 6.56 mmol) 용액을 아르곤 분위기에 0 °C에서 교반하였다. 무수 톨루엔(1.6 mL)중의 무수 에탄올(0.38 mL, 6.56 mmol) 용액을 5 분간 톨루엔 용액에 가하였다. 생성된 혼합물을 0 °C에서 15 분동안 교반하고, 2 mL(2.18 mmol)의 Red-Al/에탄올 시약을 무수 톨루엔(10 mL)중의 2,3,5-트리-O-벤조일-2-C-메틸-D-리보노락톤 2(475 mg, 1.0 mmol)의 냉각(-5 °C) 용액에 10 분간 가하였다. 반응 혼합물을 -5 °C에서 40 분동안 교반하였다. TLC 분석(실리카 플레이트, 헥산중 35% 에틸 아세테이트)은 출발물질이 완전히 소모되었음을 나타낸다. HPLC 분석은 출발물질이 불과 0.1% 존재함을 나타낸다. 반응을 아세톤(0.2 mL), 물(15 mL) 및 1N HCl(15 mL)로 0 °C에서 퀴치하고, 실온으로 가온하였다. 1N HCl(5 mL)을 가하여 무기염(pH: 2-3)을 용해시켰다. 혼합물을 에틸 아세테이트(3 x 25 mL)로 추출한 후, 유기 용액을 염수(25 mL)로 세척하여 건조(무수 황산나트륨, 10 g)시킨 다음, 용매를 감압하에 40 °C의 온도에서 제거하여 목적하는 생성물 11을 정량적인 수율(480 mg)로 수득하였다. 이 물질은 후속 단계에 그대로 사용되었다.

단계 4: 화합물 12: 1,2,3,5-테트라-O-벤조일-2-C-메틸-β-D-리보푸라노스의 합성

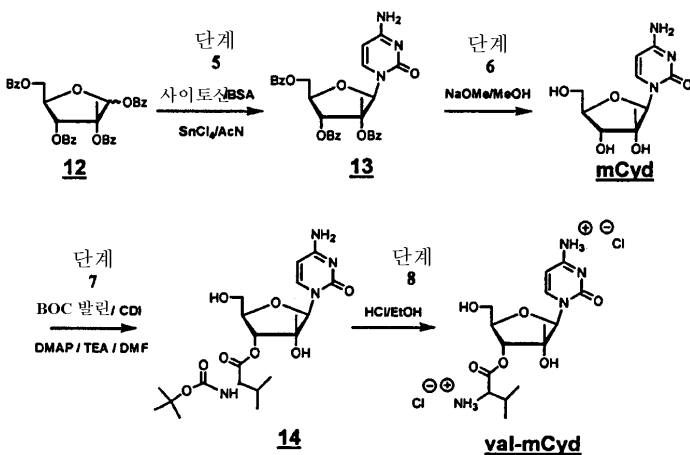
무수 테트라하이드로푸란(5 mL)중의 화합물 11(480 mg, 1.0 mmol), 4-디메틸아미노피리딘(12.3 mg, 0.1 mmol) 및 트리에틸아민(506 mg, 5.0 mmol)의 냉각 용액(5 °C)에 벤조일 클로라이드(283 mg, 2.0 mmol)를 5 분간 가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 아르곤 분위기에 밤새 교반하였다. HPLC 분석은 비반응 출발물질이 0.25%임을 나타내었다. 빙냉수(10 g) 및 중탄산나트륨 포화 수용액을 첨가하여 반응을 퀴치하였다. 테트라하이드로푸란을 감압하에 제거하고, 혼합물을 에틸 아세테이트(50 mL)로 추출하였다. 유기 용액을 물(25 mL), 염수(25 mL)로 세척하여 건조(무수 황산나트륨, 12 g)시키고, 용매를 감압하에 제거하여 650 mg의 농후 오일성 생성물을 수득하였다. 이 조 생성물을 5 mL의 t-부틸 메틸 에테르와 5 분동안 교반한 후, 헥산(5 mL) 및 물(0.1 mL)을 가하고, 20 °C에서 2 시간동안 계속 교반하였다. 고체를 진공 여과하여 수집하고, 필터 케이크를 1:1 헥산:t-부틸 메틸 에테르 용액(6 mL) 및 t-부틸 메틸 에테르(2 mL)로 세척하였다. 고체를 진공중에서 건조시켜 목적하는 생성물 12 300 mg(52%)을 154-156 °C에서 용융되는(문헌 용점: 155-156 °C) 백색 고체로 수득하였다(순도: 98.43%(HPLC/AUC)).

<sup>1</sup>H NMR (CDC1<sub>3</sub>) δppm 8.13 (m, 4H), 8.07 (d, 2H), 7.89 (d, 2H), 7.63 (m, 3H), 7.48 (m, 6H), 7.15 (m, 3H), 7.06 (s, 1H), 5.86 (dd, 1H), 4.79 (m, 1H), 4.70-4.52 (AB quartet의 d, 2H), 1.95, (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (CDC1<sub>3</sub>) δppm 166.31, 165.83, 165.01, 164.77, 134.01, 133.86, 133.70, 133.17, 130.44, 130.13, 129.97, 129.81, 129.59, 129.39, 129.07, 128.84, 128.76, 128.37, 98.01, 86.87, 78.77, 76.35, 64.05, 17.07.

(C<sub>34</sub>H<sub>28</sub>O<sub>9</sub>; 이론치 C, 70.34; H, 4.86. 실측치: C, 70.20; H, 4.95).

반응식 2



단계 5: 화합물 13: 4-아미노-1-(3,4-디벤조일옥시-5-벤질옥시메틸-3-메틸테트라하이드로푸란-2-일)-1H-피리미딘-2-온의 합성

사이토신(89 g, 0.80 mol)을 환류 컨덴서, 오버헤드 교반기 및 아르곤 주입 어댑터가 장착된 12 L 환저 플라스크에서 아세토니트릴(900 ml)에 현탁시켰다. 현탁액을 20 °C에서 아르곤하에 교반하고, N,O-비스(트리메틸실릴)아세트아미드(537 ml, 2.2 mol)를 한번에 가하였다. 생성된 용액을 80 °C로 가열하고, 동일 온도에서 1 시간 추가로 교반하였다. 1,2,3,5-테트라-O-벤조일-2-C-메틸-β-D-리보푸라노스(425.0 g, 0.73 mol)를 아세토니트릴(4000 ml)에 현탁시켜 반응 혼합물에 가하였다. 수분후 반응 혼합물이 맑아지고 온도가 약 50 °C로 떨어졌다. 염화주석(IV)(154 ml, 1.31 mol)을 15 분간 가하고, 80 °C에서 교반을 계속하였다. 1 시간후, 중탄산나트륨 수용액을 가하여 반응 혼합물의 분취액을 퀴치하고, 수층을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 에틸 아세테이트 층을 TLC(실리카겔, 헵탄중 20% 에틸 아세테이트, 당 유도체에 대한 R<sub>f</sub>: 0.40)로 조사하였다. TLC 분석은 당 유도체가 완전히 소모되었음을 나타낸다. 디클로로메탄중의 10% 메탄올을 사용하여 (R<sub>f</sub>: 0.37) TLC로 목적하는 생성물을 검출하였다. 반응을 또한 HPLC(Method # 2)로 모니터링하였다. 반응 혼합물을 20 °C로 냉각하고, 중탄산나트륨 수용액(3000 ml)을 30 분간 가하여 퀴치하였다(최초 수적의 중탄산나트륨 수용액 첨가 시 발열이 관찰되었다). 고체 중탄산나트륨(1350 g)을 조금씩 가하여 포밍을 방지하였다. 혼합물을 pH ≥7이 되도록 체크하였다. 교반을 중단하고, 20 분간 층이 분리되도록 방치하였다. 수층을 제거하고, 에틸 아세테이트(1500 ml)와 교반한 후, 혼합물이 분리되도록 방치하였다(30 분). 유기층을 분리하여 아세토니트릴 용액과 합하였다. 유기 용액을 염수(500 ml)로 세척한 후, 약 750 ml의 부피가 되도록 용매를 탈거하였다. 생성물은 후속 반응에 그대로 사용되었다. 추가로 탈거하여 포용성 고체를 정량적인 수율로 수득하였다. 화합물 10의 구조를 <sup>1</sup>H NMR 분석으로 확인하였다.

단계 6: 화합물 mCvd : 4-아미노-1-(3,4-디하이드록시-5-하이드록시메틸-3-메틸테트라하이드로푸란-2-일)-1H-피리미딘-2-온의 합성

소듐 메톡사이드(13.8 g, 0.26 mol)를 메탄올(2000 ml)중의 화합물 10(416 g, 0.73mol) 용액에 가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하고, TLC(실리카겔, 디클로로메탄중 10% 메탄올, 화합물 9의 R<sub>f</sub>: 0.53 및 실리카겔, 디클로로메탄중 30% 메탄올, 화합물 11의 R<sub>f</sub>: 0.21)로 모니터링하였다. 30 분후 생성물이 침전되기 시작하였으며, TLC는 2 시간후 반응이 완결되었음을 나타내었다. 반응을 또한 HPLC (Method # 2)로 모니터링하였다. 메탄올을 갑압하에 제거하여 약 500 ml의 부피로 만들고, 에탄올(2 x 500 ml)로 약 500 ml의 부피가 되도록 추출하였다. 잔류 농후 슬러리를 750 ml의 에탄올로 희석하고, 혼합물을 20 °C에서 1 시간동안 교반하였다. 생성물을 여과하여 수집하고, 필터 케이크를 에탄올(100 ml) 및 t-부틸 메틸 에테르(100 ml)로 세척한 후, 건조시켜 생성물 11 168 g(두단계에 대한 수율: 90%)을 수득하였다(순도: >97%(HPLC/AUC)). 생성물을 또한 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR로 분석하였다.

단계 7: 화합물 14: 2-t-부톡시카보닐아미노-3-메틸-부티르산 5-(4-아미노-2-옥소-2H-피리미딘-1-일)-4-하이드록시-2-하이드록시메틸-4-메틸테트라하이드로푸란-3-일 에스테르의 합성

2 L 환저 플라스크에서 N-(t-부톡시카보닐)-L-발린(46.50 g, 214 mmol), 카보닐디이미다졸(34.70 g, 214 mmol) 및 무수 테트라하이드로푸란(1000 mL) 용액을 25 °C에서 아르곤하에 1.5 시간동안 교반한 후, 40-50 °C에서 20 분동안 교반하였다. 오버헤드 교반기, 냉각탑, 온도 검침기, 부가 깔때기 및 아르곤 라인이 장착된 별도의 5 L 5-구 환저 플라스크에 4-아미노-1-(3,4-디하이드록시-5-하이드록시메틸-3-메틸테트라하이드로푸란-2-일)-1H-피리미딘-2-온(50.0 g, 195 mmol) 및 무수 N,N-디메틸포름아미드(1000 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 100 °C에서 20 분동안 모든 피리미딘-2-온 유도체 화합물이 용액으로 될 때까지 가열한 후, 용액을 트리에틸 아민(500 mL) 및 4-디메틸아미노피리딘(2.38 g, 19 mmol)을 첨가하였다. 이어서, 혼합물을 97 °C에서 20 분동안 가열하고, 온도가 82 °C 아래로 내려가지 않도록 유지하면서 테트라하이드로푸란 용액을 부가 깔때기를 통해 2 시간에 걸쳐 천천히 가하였다. 반응 혼합물을 82 °C에서 1 시간동안 가열하고, HPLC로 모니터링하였다(생성물 = 68%, SM = 11%, 및 약 12 분에서 불순물 = 17%(디메틸아미노피리딘 제외)). 반응 혼합물을 실온으로 냉각하고, 트리에틸아민 및 테트라하이드로푸란을 진공하에 30 °C에서 제거하였다. 용액을 아세트산으로 pH 7.69로 중화시켰다. N,N-디메틸포름아미드를 진공하에 35 °C에서 제거하고, 에틸 아세테이트(2 x 200 mL)로 추출하였다. 조 생성물을 에틸 아세테이트(500 mL) 및 물(300 mL)과 교반하였다. 두 층을 분리하여 수층을 에틸 아세테이트(500 mL)로 추출하였다. 유기층을 합해 포화 염수 용액(500 mL)으로 세척하였다. 이어서, 유기층을 말론산 수용액(4 x 400 mL, 10 중량%)으로 추출하였다. 유기층을 TLC(실리카, 디클로로메탄중 20% 메탄올)로 체크하여 유기층으로부터 모든 목적 생성물이 제거된 것을 확인하였다. 산성 수성 추출물을 합하여 빙조에서 냉각하고, 용액으로부터 고체가 없도록 트리에틸아민으로 pH 7.40 까지 중화시켰다. 수층에 에틸 아세테이트를 첨가하였다. 진공 여과에 의해 백색 고체를 수집하였다. 목적하는 고체를 진공중에서 건조시켜 99.01 순수한(HPLC) 제 1 수득물 81.08 g을 수득하였다.

단계 8: val-mCvd - 2-아미노-3-메틸-부티르산 5-(4-아미노-2-옥소-2H-피리미딘-1-일)-4-하이드록시-2-하이드록시메틸-4-메틸테트라하이드로푸란-3-일 에스테르(디하이드로클로라이드 염)의 합성

에탄올(168 ml)중의 화합물 14(21.0 g, 0.046 mol)의 용액을 오버헤드 교반기, 온도 검침기, 아르곤 라인 및 염화수소 가스 버블러가 장착된 환저 플라스크에서 교반하였다. 염화수소 가스(22 g)를 맑은 용액을 통해 1 시간 버블링시켰다. 빙수조를 이용하여 반응 온도를 30 °C 이하로 유지하였다. 염화수소 가스 도입 수분후 고체가 형성되기 시작하였다. 4 시간후, HPLC (method # 3)는 출발물질이 불과 0.8%임을 나타내었다. 고체를 여과하여 수집하고, 필터 케이크를 에탄올(20 ml) 및 디에틸 에테르(100 ml)로 세척하였다. 생성물을 진공하에 16 시간동안 건조시킨 후, 19.06 g(96.5%)의 val-mCvd를 97.26% 순도(HPLC, method # 3)로 수득하였다.

용점: 210 °C(갈색), 248-250 °C(용융).

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 10.0 (s, 1H, 1/2NH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O 교환가능), 8.9-8.6 (2 br s, 4H, 1/2NH<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O 교환가능), 8.42 (d, 1H, H-6, J<sub>5-6</sub> = 7.9 Hz), 6.24 (d, 1H H-5, J<sub>5-6</sub> = 7.9 Hz), 5.84 (s, 1H, H-1'), 5.12 (d, 1H, H-3', J<sub>3'-4'</sub> = 8.8 Hz), 4.22 (d, 1H, H-4, J<sub>3'-4'</sub> = 8.7 Hz), 4.0-3.9 (m, 1H, CH), 3.8-3.5 (m, 2H, H-5', H-5''), 2.3-2.1 (m, 1H, CH),

1.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.0 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH); FAB > 0 (GT) 713 (2M+ H)<sup>+</sup>, 449 (M+G+ H)<sup>+</sup>, 357 (M+ H)<sup>+</sup>, 246 (S)<sup>+</sup>, 112 (B+ 2H)<sup>+</sup>; FAB < 0 (GT) 747 (2M+ C1)<sup>-</sup>, 483 (M+ G+ Cl)<sup>-</sup>, 391 (M+ Cl)<sup>-</sup>, 355 (M-H)<sup>-</sup>, 116 (Val)<sup>-</sup>, 110 (B)<sup>-</sup>, 35 (Cl).

상기 화합물들을 분석하기 위하여 두개의 상이한 HPLC 방법이 이용되었다. 두 방법은 모두 하기 역상 칼럼을 사용한다:

**방법 1**

254 nm. 1.00 ml/min 유량의 아세토니트릴/물 선형구배(하기와 같다). 수행 시간 20 분. 수행 사이에 5 분 평형

**표 1: 주요 중간체의 체류 시간**

화합물	체류 시간
화합물 10	10.2 분
화합물 11	9.4 분
화합물 12	12.9 분

**방법 2**

272 nm에서 확인하였다. 사용된 칼럼은 Waters Novapak<sup>R</sup> C18, 3.9 x 150 mm ID, 4µm 입자 크기, 60Å 기공 크기 또는 동등물. 크로마토그래피 조건은 다음과 같다: 주입 부피 = 10 µl, 칼럼 온도 = 25 °C, 유량 = 1.00 ml/min, 272 nm에서 적외선 검출기, 실행 시간은 35 분. 기준 표준물에 대한 상대 표준편차 %의 시스템 안정성 조건은 1.0% 이하이다.

**표 2a: 순도 및 불순물은 272 nm에서 결정되었다**

시간(분)	용매 A - 20nM 트리에틸암모늄 아세테이트 버퍼	용매 B - 아세토니트릴, HPLC 그레이트
0.00	100.0	0.0
10.00	85.0	15.0
25.00	5.0	95.0
35.0	5.0	95.0

**표 2b: 주요 중간체 및 최종 약물의 체류 시간**

화합물	체류 시간(분)
화합물 mCyd	2.7-2.8
화합물 14	15.5
val-mCyd	9.1

**입체화학**

본 발명의 뉴클레오사이드는 수개의 키랄 중심을 가지며 광학적 활성 및 라세미 형태로 존재할 수 있고 분리될 수 있는 것으로 이해하여야 한다. 일부 화합물은 다형체로 나타날 수 있다. 본 발명은 본 명세서에 기술된 유용한 성질을 갖는 본 발명의 화합물의 라세미, 광학적 활성, 디아스테레오머, 다형체, 또는 입체이성체 형태, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것으로 이해하여야 한다. 광학적 활성 형태의 제조방법은 당업계에 익히 공지되었다(예를 들어 재결정 기술에 의한 라세미 형태의 분할, 광학적 활성 출발 물질로부터의 합성, 키랄 합성, 또는 키랄 정지상을 사용한 크로마토그래프 분리).

특히, 뉴클레오사이드의 1' 및 4' 탄소는 키랄이기 때문에, 이들의 비수소 치환체(각각 염기 및 CHOR 그룹)는 당 환 시스템에 대해 시스(동일면상에) 또는 트랜스(반대면상에)일 수 있다. 따라서, 이들의 네가지 광학 이성체는 하기 배열로 표시된다(당 부분을 산소 원자가 뒤로 가도록 수평면으로 배향시키는 경우): 시스(두 그룹이 모두 "위쪽", 이는 자연적으로 존재하는 β-D 뉴클레오사이드의 배열에 상응한다), 시스(두 그룹이 모두 "아래쪽", 이는 자연적으로 존재하지 않는 β-L 뉴클레오사이드의 배열에 상응한다), 트랜스(C2' 치환체가 위쪽이고, C4' 치환체가 아래쪽이다) 및 트랜스(C2' 치환체가 아래쪽이고, C4' 치환체가 위쪽이다). "D-뉴클레오사이드"는 자연적인 구조의 시스 뉴클레오사이드이고, "L-뉴클레오사이드"는 자연적으로 존재하지 않는 구조의 시스 뉴클레오사이드이다.

마찬가지로, 대부분의 아미노산은 키랄이며(L 또는 D로 표시, L-에난티오머는 자연적으로 존재하는 구조이다), 분리된 에난티오머로 존재할 수 있다.

광학적 활성 물질을 수득하는 방법의 예는 적어도 당업계에 공지되었으며, 다음 i) 내지 xiii)을 포함한다:

- i) 결정의 물리적 분리 - 개별 에난티오머의 거시적 결정을 손으로 분리하는 기술. 분리된 에난티오머 결정이 존재하는 경우, 즉 물질이 응집하여 결정이 육안적으로 분리되는 경우 이 기술이 사용될 수 있다;
- ii) 동시 결정화 - 개별 에난티오머를 라세메이트 용액으로부터 별도로 결정화시키는 기술, 가능하다면 후자는 고체상태의 응집체이다;
- iii) 효소적 분할 - 효소에 대한 에난티오머의 반응 속도 차이로 라세메이트를 부분적으로 또는 완전히 분리하는 기술;
- iv) 효소적인 비대칭 합성 - 합성의 적어도 한 단계가 효소 반응을 이용하여 목적하는 에난티오머의 에난티오머적으로 순수하거나 또는 풍부한 합성 전구체를 수득하는 합성 기술;
- v) 화학적 비대칭 합성 - 생성물내에 비대칭(즉 키랄성)을 제공하는 조건하에서 비키랄 전구체로부터 목적하는 에난티오머를 합성하는 합성 기술로서, 키랄 결정 또는 키랄 보조제를 이용하여 수행될 수 있다;
- vi) 디아스테레오머 분리 - 라세미 화합물을, 개별 에난티오머를 디아스테레오머로 전환시키는 에난티오머적으로 순수한 시약(키랄 보조제)과 반응시키는 기술. 그후, 생성된 디아스테레오머를 좀 더 확실한 구조적 차이로 크로마토그래피 또는 결정화에 의해 분리한 후, 키랄 보조제를 제거하여 목적하는 에난티오머를 수득한다;
- vii) 1차- 및 2차- 비대칭 변형 - 라세메이트로부터 디아스테레오머를 평형화시켜 목적하는 에난티오머로부터 디아스테레오머 용액중 우세한 것을 수득하거나, 목적하는 에난티오머로부터 디아스테레오머의 우선적 결정화가 실질적으로 원리상 목적하는 에난티오머로부터 모든 물질이 결정성 디아스테레오머로 전화되도록 평형화를 교란시키는 기술. 그후, 목적하는 에난티오머가 디아스테레오머로부터 방출된다;
- viii) 키네틱 분할 - 이 기술은 키랄 비라세미 시약 또는 촉매를 키네틱 조건하에 사용하여 에난티오머의 반응 속도가 다르다는 것에 기초해 라세메이트(또는 부분적으로 분할된 화합물의 추가적인 분할)를 부분적으로 또는 완전히 분할하는 기술이다;
- ix) 비라세 전구체로부터 에난티오특이적 합성 - 목적하는 에난티오머가 비키랄성 출발물질로부터 수득되며, 입체화학적 보전성이 합성 과정에 따라 보장받지 않거나 최소적으로만 보장되는 합성 기술;
- x) 키랄 액체 크로마토그래피 - 라세메이트의 에난티오머를 정지상과의 상호반응성 차에 의해 액체 이동상으로 분리하는 기술. 정지상은 키랄 물질로 구성될 수 있거나, 이동상은 상호반응 차를 촉진하기 위해 추가의 키랄 물질을 함유할 수 있다;
- xi) 키랄 가스 크로마토그래피 - 라세메이트를 휘발시키고, 고정된 비라세미 키랄 흡착상을 함유하는 칼럼을 이용하여 가스 이동상에서의 상호반응성 차로 에난티오머를 분리하는 기술;
- xii) 키랄 용매에 의한 추출 - 하나의 에난티오머가 특정 키랄 용매로 우선적으로 용해되는 것을 이용하여 에난티오머를 분리하는 기술;
- xiii) 키랄 막을 통한 이동 - 라세메이트를 막막 배리어와 접촉시켜 위치시키는 기술. 배리어는 전형적으로 두개의 혼화성 유체(이중 하나는 라세메이트를 포함)를 분리하며, 농도 또는 압력차와 같은 추진력에 따라 막 배리어를 통해 우선적인 이동이 일어난다. 라세메이트중 하나의 에난티오머만을 통과시키는 막의 비라세미 키랄성의 결과 분리가 일어난다.

### III. 약제학적 조성물

약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제의 존재하에 유효한 양의 활성 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 프로드럭 또는 염을 환자에 투여하여, 페스티바이러스, 플라비바이러스, HCV 또는 RNA-의존 RNA 바이러스성 폴리머라제를 통해 복제하는 다른 유기체로 감염된 인간을 포함한 숙주, 또는 본원에 개시된 다른 질환들이 치료될 수 있다. 활성 물질은 액체 또는 고체 형태로 하여 임의의 적합한 경로, 예를 들어 경구, 비경구, 정맥내, 근육내, 경피 또는 국소적으로 투여될 수 있다.

페스티바이러스, 플라비바이러스 또는 HCV에 바람직한 화합물 용량은 1일 체 체중 1 kg 당 약 1 내지 50 mg, 바람직하게는 1 내지 20 mg, 보다 일반적으로 수용체 체중 1 kg 당 1일 0.1 내지 약 100 mg일 것이다. 보다 적은 용량, 예를 들어 1일 체중 1 kg 당 0.5-100 mg, 0.5-50 mg, 0.5-10 mg 또는 0.5-5 mg이 바람직할 수 있다. 보다 적은 용량이 유용할 수 있으며, 이들 범위는 1일 체중 1 kg 당 0.1-0.5 mg을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염 및 프로드럭의 유효 용량 범위는 전달되는 모 뉴클레오사이드의 중량에 기초하여 산출될 수 있다. 염 또는 프로드럭이 자체적으로 활성을 나타내는 경우, 유효 용량은 염 또는 프로드럭의 중량을 이용하여 상기 언급된 바와 같이, 또는 당업자들에 공지된 다른 수단에 의해 추정될 수 있다.

화합물은 편의상 단위 복용형당 활성 성분을 7 내지 3000 mg, 바람직하게는 70 내지 1400 mg을 함유하나, 이로만 한정되지 않는 적합한 복용형 단위로 투여된다. 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000 mg의 단일 또는 다중 복용형을 포함한 50-1000 mg의 경구용 복용형이 일반적으로 편리하다. 보다 적은 용량, 예를 들어 10-100 또는 1-50 mg이 바람직할 수 있다. 또한 0.1-0.5 mg 또는 0.1-20 mg, 또는 0.1-10.0 mg이 고려된다. 또한, 비경구적 경로, 예를 들어 주사 또는 흡입에 의한 투여의 경우 보다 적은 용량이 이용될 수 있다.

이상적으로, 활성 성분은 약 0.2 내지 70  $\mu\text{M}$ , 바람직하게는 약 1.0 내지 10  $\mu\text{M}$ 의 활성 성분의 피크 혈장 농도를 이루도록 투여되어야 한다. 이는, 예를 들어 임의로 염수중의 활성 성분 0.1 내지 5% 용액을 정맥 주사하거나, 활성 성분의 거환체를 투여함으로써 성취될 수 있다.

약물 조성물중의 활성 화합물의 농도는 약물의 흡수율, 비활성화 및 배출을 뿐만 아니라 당업자들에 알려진 다른 요인들에 따라 달라질 것이다. 투여량은 또한 경감시키고자 하는 증상의 중증도에 따라 변할 것이다. 특정 대상체, 특정 투여 요법이 개개인의 요구 및 조성물을 투여하거나 투여를 지시하는 사람의 전문적인 판단에 따라 경시적으로 조정되어야 하며 본원에 개시된 농도 범위는 단지 예시적인 것으로 청구된 조성물의 실시 또는 영역을 제한할 의도는 아닌 것으로 이해되어야 한다. 활성 성분은 다른 항바이러스제와 함께, 또는 이를 사용하지 않고 한번에 투여될 수 있거나, 다수의 보다 적은 양으로 나누어 다양한 시간 간격으로 투여될 수 있다.

활성 화합물의 바람직한 투여 경로는 경구에 의한 것이다. 경구용 조성물은 일반적으로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함할 것이다. 이들은 젤라틴 캡셀에 포함되거나, 정제로 타정될 수 있다. 경구적 치료 투여의 목적을 위해, 활성 화합물은 부형제내에 함침되어 정제, 구내정(troches) 또는 캡셀제로 사용될 수 있다. 약제학적으로 상용적인 결합제 및/또는 보조 물질이 조성물의 일부로 포함될 수 있다.

정제, 환제, 캡셀제, 구내정 등이 하기 성분 또는 유사한 성질의 화합물을 함유할 수 있다: 결합제, 예를 들어 미정질 셀룰로즈, 트라가칸트검 또는 젤라틴; 부형제, 예를 들어 전분 또는 락토스, 봉해제, 예를 들어 알긴산, 프리모겔(Primogel) 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예를 들어 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로테스(Sterotes); 활제, 예를 들어 콜로이드성 이산화규소; 감미료, 예를 들어 수크로스 또는 사카린; 또는 향미제, 예를 들어 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향. 복용 단위형이 캡셀제인 경우, 이는 상기 타입의 물질 이외에, 지방 오일과 같은 액체 담체를 함유할 수 있다. 또한, 복용 단위형은 복용형의 물리적 형태를 변경시키는 다양한 다른 물질, 예를 들자면 당 코팅, 셸락(shellac) 또는 다른 장용제를 함유할 수 있다.

화합물은 엘릭시스, 현탁액, 시럽, 웨이퍼, 츄잉검 등의 성분으로 투여될 수 있다. 시럽은 활성 화합물 이외에도 감미료로서 수크로스, 특정 방부제, 염료, 착색제 및 향미제를 함유할 수 있다.

화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 프로드럭 또는 염은 또한 목적하는 작용을 손상시키지 않는 다른 활성 물질 또는 목적하는 작용을 보충하는 물질, 예를 들어 항생제, 항진균제, 항염증제 또는 다른 뉴클레오사이드 화합물을 포함하는 다른 항바이러스제와 혼합될 수 있다. 비경구, 피내, 경피 또는 국소 적용용으로 사용되는 용액 또는 현탁액은 하기 성분들을 함유할 수 있다: 멸균 희석액, 예를 들어 주사용수, 식염수, 고정 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 향균제, 예를 들어 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 또는 소듐 바이셀파이트; 킬레이트제, 예를 들어 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충액, 예를 들어 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 장성을 조정하기 위한 제제, 예를 들어 염화나트륨 또는 덱스트로즈. 비경구 제제는 앰플, 일회용 시린지 또는 유리나 플라스틱으로 만들어진 다중복용 바이얼내에 도입될 수 있다.

정맥내로 투여되는 경우, 바람직한 담체는 생리염수 또는 포스페이트 완충염수(PBS)이다.

바람직한 구체예로, 활성 화합물은 서방성 제제와 같이 화합물이 체내로부터 신속히 제거되는 것을 보호할 담체(임플란트 및 마이크로캡셀화 전달 시스템을 포함)와 함께 제조된다. 생분해가능한 생체상용성 폴리머, 예를 들어 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리엔하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제제를 제조하는 방법은 당업자들에게 자명할 것이다. 이들 물질은 또한 Alza Corporation으로부터 상업적으로 입수할 수 있다.

리포좀 현탁액(바이러스성 항원에 대한 모노클로날 항체로 감염된 세포의 표적 리포좀 포함)이 또한 약제학적으로 허용되는 담체로서 바람직하다. 이들은, 예를 들어 본원에 참고로 인용되는 미국 특허 제 4,522,811호에 기술된 바와 같이 당업자들에 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 리포좀 제제는 적절한 리피드(들)(예: 스테아로일 포스파티딜 에탄올아민, 스테아로일 포스파티딜 콜린, 아라카도일 포스파티딜 콜린 및 콜레스테롤)를 유기 용매에 용해시킨 후, 이를 증발시켜 용기의 표면상에 건조된 리피드의 박막을 제공함으로써 제조될 수 있다. 그후, 활성 화합물 또는 그의 모노포스페이트, 디포스페이트 및/또는 트리포스페이트의 수용액을 용기내에 도입한다. 이어서, 용기를 손으로 흔들어 용기면으로부터 리피드 물질을 유리시키고 리피드 응집물을 분산시켜 리포좀 현탁액을 형성한다.

#### IV. 프로드럭 및 유도제

##### 염 형성

약제학적으로 허용되는 염으로 뉴클레오사이드를 투여하는 것이 본 발명의 범주내에 포함된다. 약제학적으로 허용되는 염의 예는 생리적으로 허용되는 음이온을 제공하는 산과 형성된 유기산 부가염이다. 약제학적으로 허용되는 염의 예에는 토실레이트, 메탄설포네이트, 아세테이트, 시트레이트, 말로네이트, 타르타레이트, 숙시네이트, 벤조에이트, 아스코르베이트,  $\alpha$ -케토글루타레이트,  $\alpha$ -글리세로포스페이트, 포르메이트, 푸마레이트, 프로피오네이트, 글리콜레이트, 락테이트, 피루베이트, 옥살레이트, 말레에이트 및 살리실레이트가 포함된다. 셀페이트, 나이트레이트, 바이카보네이트, 하이드로브로메이트, 카보네이트 및 인산염을 포함한 적합한 무기염이 또한 형성될 수 있다. 특히 바람직한 구체예는 모노 또는 디하이드로클로라이드염이다.

약제학적으로 허용되는 염은 당 업계에 널리 공지된 표준 방법을 사용하여, 예를 들면, 아민과 같은 충분한 염기성 화합물을 적합한 산과 반응시켜 생리학적으로 허용되는 음이온을 형성함으로써 수득할 수 있다. 카복실산의 알칼리 금속(예: 소듐, 포타슘 또는 리튬) 또는 알칼리 토금속(예: 칼슘) 염이 또한 제조될 수 있다. 일례로, 염은 화합물의 하이드로클로라이드

드염이다. 또 다른 구체예로, 약제학적으로 허용되는 염은 화학식 (I)의 화합물의 디하이드로클로라이드염이다. 본 발명의 화합물은 플라비바이러스, 페스티바이러스 또는 HCV에 대해 항바이러스성 활성을 가지거나, 이러한 활성을 나타내는 화합물로 대사된다.

#### 뉴클레오사이드 프로드럭

본 원에 기술된 모든 뉴클레오사이드는 뉴클레오사이드의 활성, 생체이용율, 안정성을 증가시키거나 다르게는 성질을 변화시키기 위하여 프로드럭으로서 투여될 수 있다. 다수의 뉴클레오타이드 프로드럭 리간드가 공지되어 있다. 일반적으로, 뉴클레오사이드의 모노-, 디- 또는 트리포스페이트의 알킬화, 아실화 또는 다른 친유성 변형에 의해 극성이 감소되고, 세포로 유입되는 것이 가능해진다. 포스포네이트 부위상의 하나 이상의 수소를 치환시킬 수 있는 치환체 그룹의 예에 알킬, 아릴, 스테로이드, 당을 포함하는 카보하이드레이트, 1,2-디아실글리세롤과 같은 알콜이 있다. 다수가 [R. Jones and N. Bischofberger, *Antiviral Research*, 27(1995) 1-17]에 기재되어 있다. 목적하는 효과를 얻기 위하여 이들중 어느 것을 개시된 뉴클레오사이드와 배합하여 사용할 수 있다.

본 원에 참고로 인용되는 하기의 참고 문헌에 기술된 바와 같이 활성 화합물은 또한 5'-포스포에테르 리피드 또는 5'-에테르 리피드로 제공될 수 있다[Kucera, L. S., N. Iyer, E. Leake, A. Raben, Modest E. K., D. L. W., and C. Piantadosi. 1990. "Novel membrane-interactive ether lipid analog that inhibit infectious HIV-1 production and induce defective virus formation." *AIDS Res. Hum. Retro Viruses*, 6: 491-501; Piantadosi, C., J. Marasco C. J., S. L. Morris-Natschke, K. L. Meyer, F. Gumus, J. R. Surles, K. S. Ishaq, L. S. Kucera, N. Iyer, C. A. Wallen, S. Piantadosi, and E. J. Modest. 1991. "Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV activity." *J. Med. Chem.* 34:1408.1414; Hosteller, K. Y., D. D. Richman, D. A. Carson, L. M. Stuhmiller, G. M. T. van Wijk, and H. van den Bosch. 1992. "Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cell by 3'-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3'-deoxythymidine." *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2025.2029; Hosetler, K. Y., L. M. Stuhmiller, H. B. Lenting, H. van den Bosch, and D. D. Richman, 1990. "Synthesis and antiretrovirus activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleoside." *J. Biol. Chem.* 265: 61127].

뉴클레오사이드, 바람직하게는 뉴클레오사이드 또는 친유성 제제의 5'-OH 위치에 공유적으로 도입될 수 있는 적합한 친유성 치환체를 기술한 미국 특허의 비제한적인 예로는 다음과 같은 특허들이 포함되고, 이 모두는 본 명세서에서 참고로 인용된다: 미국 특허 5,149,794(Sep. 22, 1992, Yatvin 등); 5,194,654(Mar. 16, 1993, Hostetler 등); 5,223,263(June 29, 1993, Hostetler 등); 5,256,641(Oct. 26, 1993, Yatvin 등); 5,411,947(May 2, 1995, Hostetler 등); 5,463,092(Oct. 31, 1995, Hostetler 등); 5,543,389(Aug. 6, 1996, Yatvin 등); 5,543,390(Aug. 6, 1996, Yatvin 등); 5,543,391(Aug. 6, 1996, Yatvin 등); 및 5,554,728(Sep. 10, 1996; Basava 등). 본 발명의 뉴클레오사이드에 결합될 수 있는 친유성 치환체, 또는 친유성 제제를 기술하고 있는 외국 특허 출원은 WO 89/02733, WO 90/00555, WO 91/16920, WO 91/18914, WO 93/00910, WO 94/26273, WO 96/15132, EP 0 350 287, EP 93917054.4 및 WO 91/19721을 포함한다.

#### IV. 병용 또는 교대 요법

본 발명의 활성 화합물은 다른 항플라비바이러스 또는 페스티바이러스제, 특히 항-HCV제와 함께, 또는 이와 교대로 투여될 수 있다. 병용 요법에서는, 2 이상의 제제의 유효 용량이 함께 투여되는 반면, 교대 또는 연속-단계 요법에서는 각 제제의 유효 용량이 일련적으로 또는 연속적으로 투여된다. 주어진 용량은 약물의 흡수율, 비활성화 및 배출을 뿐만 아니라 당뇨병자들에게 알려진 다른 요인들에 따라 달라질 것이다. 용량은 또한 경감시키고자 하는 증상의 중증도에 따라 변할 것이다. 특정 대상체, 특정 투여 요법이 개인의 요구 및 조성물을 투여하거나 투여를 지시하는 사람의 전문적인 판단에 따라 경시적으로 조정되어야 한다. 바람직한 구체예로, 10-15 $\mu$ M, 또는 바람직하게는 1-5  $\mu$ M의 EC<sub>50</sub>을 나타내는 항-HCV(또는 항페스티바이러스 또는 항플라비바이러스) 화합물이 바람직하다.

플라비바이러스, 페스티바이러스 또는 HCV의 약물-내성 변이체가 항바이러스제로 장기 치료후 출현할 수 있음을 인정해야 한다. 약물 내성은 가장 전형적으로는 바이러스 복제에 사용되는 효소를 코딩하는 유전자 돌연변이에 의해 일어난다. 바이러스 감염에 대한 약물 효율은 화합물을 원리 약물에 의해 유발된 것과 상이한 돌연변이를 유도하는 제 2, 및 가능하게는 제 3의 항바이러스성 화합물과 함께, 또는 이와 교대로 투여함으로써 연장, 증진 또는 수복될 수 있다. 또한, 약물의 약물동력학, 생체분포(biodistribution), 또는 다른 파라미터가 상기의 병용 요법 또는 교대 요법에 의해 변경될 수 있다. 일반적으로, 병용 요법이 바이러스상에서 다중의 스트레스를 동시에 유도하기 때문에 교대 요법보다 바람직하다.

본 발명의 배경에 기술된 바이러스 치료제가 본 명세서에 기술된 화합물과 함께, 또는 이와 교대로 사용될 수 있다. 이들에는 다음과 같은 것들이 포함되나, 이들로만 한정되는 것은 아니다:

##### (1) 프로테아제 저해제

예에는 알파케토아미드 및 히드라지노우레아를 포함한 기질에 기초한 NS3 프로테아제 저해제(Attwood *et al.*, *Antiviral peptide derivatives*, PCT WO 98/22496, 1998; Attwood *et al.*, *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 1999, 10, 259-273; Attwood *et al.*, *Preparation and use of amino acid derivatives as anti-viral agents*, German Patent Pub. DE 19914474; Tung *et al.*, *Inhibitors of serine proteases, particularly hepatitis C virus NS3 protease*, PCT WO 98/17679), 및 보론산 또는 포스포네이트와 같은 친전자체로 종결된 저해제(Llinas-Brunet *et al.*, *hepatitis C inhibitor peptide analogues*, PCT WO 99/07734); 아미드가 14개의 탄소쇄로 치환된 RD3-4082 및 파라-페녹시페닐 그룹을 갖는 RD3-4078을 포함하는 2,4,6-트리하이드록시-3-니트로-벤즈아미드 유도체와 같은 비기질-기초 NS3 프로테아제 저해제(Sudo K. *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 238, 643-647; and Sudo K. *et al.* *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 1998, 9, 186)가 포함된다.

페니실리움 그리세오폴뮴(*Penicillium griseofulvum*) 진균으로부터 분리된 Sch 351633이 프로테아제 저해제로 동정되었다(Chu, M. *et al Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9, 1949-1952). 거머리로부터 분리된 엘긴 c.는 *S. 그리세우스(S. griseus)* 프로테아제 A 및 B, α-키모트립신 및 서브틸리신과 같은 수개의 세린 프로테아제의 유효한 저해제이다(Qasim M. A. *et al., Biochemistry* 36: 1598-1607, 1997).

다수의 미국 특허가 HCV 치료용 프로테아제 저해제를 개시하였다. 예를 들어, Spruce 등에 의한 미국 특허 제 6,004,933호는 HCV 엔도펩티다제 2를 억제하기 위한 시스테인 프로테아제 저해제 종류를 개시하였다. Zhang 등에 의한 미국 특허 제 5,990,276호는 C형 간염 바이러스 NS3 프로테아제의 합성 저해제를 개시하였다. 저해제는 NS3 프로테아제의 기질 또는 NS4A 조효소의 기질의 서브시퀀스이다. HCV를 치료하기 위한 제한 효소의 용도가 Reyes 등에 의한 미국 특허 제 5,538,865호에 기재되어 있다. HCV의 NS3 세린 프로테아제 저해제로서의 펩티다제가 Corvas International, Inc.에 의한 WO 02/008251 및 Schering Corporation에 의한 WO 02/08187 및 WO 02/008256에 기재되어 있다. HCV 저해제 트리펩티드가 Boehringer Ingelheim에 의한 미국 특허 제 6,534,523호, 6,410,531호 및 6,420,380호 및 Bristol Myers Squibb에 의한 WO 02/060926에 기재되어 있다. HCV의 NS3 세린 프로테아제 저해제로서의 디아릴 펩티드가 Schering Corporation에 의한 WO 02/48172에 기재되어 있다. HCV의 NS3 세린 프로테아제 저해제로서의 이미다졸이논이 Schering Corporation에 의한 WO 02/08198 및 Bristol Myers Squibb에 의한 WO 02/48157에 기재되어 있다. Vertex Pharmaceuticals에 의한 WO 98/17679 및 Bristol Myers Squibb에 의한 WO 02/48116이 또한 HCV 프로테아제 저해제를 개시하였다.

(2) NS3/4A 융합 단백질 및 NS5A/5B 기질을 사용한 역상 HPLC 분석에서 관련 저해성을 나타내는 티아졸리딘 유도체(Sudo K. *et al. Antiviral Research* 1996, 32, 9-18), 특히 장 알킬 쇠에 의해 치환된 융합 신나모일 부분을 가지는 화합물 RD-1-6250, RD4 6205 및 RD4 6193;

(3) [Kakiuchi N. *et al. J. EBS Letters* 421, 217-220 and Takeshita N. *et al. Analytical Biochemistry*, 1997, 247, 242-246]에서 확인된 티아졸리딘 및 벤즈아닐라이드;

(4) SDS-PAGE 및 자가방사선 분석에서 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces sp.*), Sch 68631의 발효 배양액으로부터 분리된 HCV 프로테아제(Chu M. *et al. Tetrahedron Letters* 1996, 37, 7229-7232) 및 섬광 근접 분석(scintillation proximity assay)에서 활성이 입증된, 페니실리움 그리세오폴뮴(*Penicillium griseofulvum*) 진균으로부터 분리된 Sch 351633(Chu, M. *et al Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 9, 1949-1952)에 대하여 활성을 갖는 페난-트렌퀴논;

(5) 헬리카제 저해제(Diana, G. D. *et al. Compounds, compositions and methods for treatment of hepatitis C*, 미국 특허 5,633,358 및 Diana, G. D. *et al. Piperidine derivatives, pharmaceutical compositions thereof and their use in the treatment of hepatitis C*, PCT WO 97/36554);

(6) 뉴클레오타이드 폴리머라제 저해제 및 글리오톡신(Ferrari, R. *et al. Journal of Virology* 1999, 73, 1649-1654), 및 천연 산물인 세룰레닌(Lohmann, V. *et al. Virology* 1998, 249, 108-118);

(7) 바이러스의 5' 비-코딩 영역(NCR)에서 서열 스트레치에 상보적인 안티센스 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오타이드(S-ODN)(Alt, M. *et al. Hepatology* 1995, 22, 707-717) 또는 NCR의 3' 말단을 포함하는 뉴클레오타이드 326-348 및 HCV RNA의 코어 코딩 영역에 위치하는 뉴클레오타이드 371-388(Alt, M. *et al. Archives of Virology* 1997, 142, 589-599 and Galderisi, U. *et al. Journal of Cellular Physiology* 1999, 181, 251-257);

(8) IRES-의존 해독 저해제(Ikeda, N *et al. Agent for the prevention and treatment of hepatitis C*, 일본 특허 공개 JP-08268890; Kai, Y. *et al Prevention and treatment of viral diseases*, 일본 특허 공개 JP 10101591);

(9) 리보자임, 예를 들어 뉴클레아제-내성 리보자임(Maccjak, D. J. *et al. Hepatology* 1999, 30, abstract 995) 및 Barber 등에 의한 미국 특허 제 6,043,077호, 및 Draper 등에 의한 미국 특허 제 5,869,253호 및 5,610,054호; 및

(10) 또한, 플라비비리다에 감염 치료용으로 뉴클레오사이드 유사체가 개발되었다;

(11) Idenix Pharmaceuticals에 의해 국제 공개 제 WO 01/90121 및 WO 01/92282에 개시된 임의의 화합물;

(12) C형 간염 바이러스를 치료하기 위한 특정 뉴클레오사이드의 용도를 개시한 다른 특허 출원은 다음과 같은 특허들을 포함한다: BioChem Pharma, Inc. 에 의해 출원된 PCT/CA00/01316(WO 01/32153; 2000. 11.3일 출원) 및 PCT/CA01/00197(WO 01/60315; 2001. 2.19일 출원)(현재 소유권자: Shire Biochem, Inc.); Merck & Co., Inc.에 의해 출원된 PCT/US02/01531(WO 02/057425; 2002. 1. 18일 출원) 및 PCT/US02/03086(WO 02/057287; 2002. 1. 18일 출원), Roche에 의해 출원된 PCT/EP01/09633(WO 02/18404; 2001. 8. 21일 공개), Pharmasset, Ltd.에 의해 출원된 및 PCT 공개 WO 01/79246(2001. 4. 13일 출원), WO 02/32920(2001. 10. 18일 출원) 및 WO 02/48165.

(13) Emory University에 의한 PCT 공개 WO 99/43691(발명의 명칭: HCV를 치료하기 위해 특정의 2'-플루오로뉴클레오사이드의 용도).

(14) 1-아미노-알킬사이클로헥산(Gold 등에 의한 미국 특허 제 6,034,134호), 알킬 리피드(Chojkier 등에 의한 미국 특허 제 5,922,757호), 비타민 E 및 기타 항산화제(Chojkier 등에 의한 미국 특허 제 5,922,757호), 스쿠알렌, 아만타딘, 담즙산(Ozeki 등에 의한 미국 특허 제 5,846,964호), N-(포스포노아세틸)-L-아스파르트산(Diana 등에 의한 미국 특허 제 5,830,905호), 벤젠디카복사미드(Diana 등에 의한 미국 특허 제 5,633,388호), 폴리아데닐산 유도체(Wang 등에 의한 미국 특허 제 5,496,546호), 2',3'-디데옥시시노신(Yarchoan 등에 의한 미국 특허 제 5,026,687호), 벤즈이미다졸

(Colacino 등에 의한 미국 특허 제5,891,874호), 식물 추출물(Tsai 등에 의한 미국 특허 제5,837,257호), Omer 등에 의한 미국 특허 제 5,725,859호 및 미국 특허 제 6,056, 961호), 및 피페라딘(Diana 등에 의한 미국 특허 제 5,830,905호)을 포함한 기타 화합물.

(15) 다음 화합물들을 포함한 C형 간염 바이러스 치료용으로 현재 예비임상 또는 임상 개발중인 임의의 다른 화합물: Schering-Plough에 의한 인터류킨-10, Interneuron에 의한 IP-501, Vertex에 의한 Merimebodib(VX-497), Endo Labs Solvay에 의한 AMANTADINE<sup>R</sup>(Symmetrel), RPI에 의한 HEPTAZYME<sup>R</sup>, Idun Pharma.에 의한 IDN-6556, XTL.에 의한 XTL-002, Chiron에 의한 HCV/MF59, NABI에 의한 CIVACIR (C형 간염 면역 글로불린), ICN/Ribapharm에 의한 LEVOVIRIN<sup>R</sup>, ICN/Ribapharm에 의한 VIRAMIDINE<sup>R</sup>, Sci Clone에 의한 ZADAXIN<sup>R</sup>(티모신 알파-1), Sci Clone에 의한 티모신 및 폐길화 인터페론, Maxim에 의한 CEPLENE<sup>R</sup>(히스타민 디하이드로클로라이드), Vertex/Eli Lilly의 VX 950/LY 570310, Isis Pharmaceutical/Elan의 ISIS 14803, Idun Pharmaceuticals, Inc.의 IDN-6556, AKROS Pharma.의 JTK 003, Boehringer Ingelheim의 BILN-2061, Roche의 CellCept(마이코페놀레이트 모페틸), Tularik의 T67, β-튜블린 저해제, Innogenetics의 E2 관련 치료 백신, Fujisawa Healthcare, Inc.의 FK788, IdB 1016(Siliphos, 경구용 실리빈-포스파티딜콜린 피토솜), ViroPharma/Wyeth의 RNA 복제 저해제(VP50406), Intercell의 치료 백신, Epimmune/Genencor의 치료 백신, Anadys의 IRES 저해제, Anadys의 ANA 245 및 ANA 246, Avant의 면역요법(Therapore), Corvas/Schering의 프로테아제 저해제, Vertex의 헬리카제 저해제, Trimeris의 융합 저해제, CellExSys의 T 세포 치료제, Biocryst의 폴리머라제 저해제, PTC Therapeutics의 표적 RNA 화학, Immtech, Int.의 디카타이온, Agouron의 프로테아제 저해제, Chiron/Medivir의 프로테아제 저해제, AVI BioPharma의 안티센스 요법, Hybridon의 안티센스 요법, Aethlon Medical의 헤모푸리화이어, Merix의 치료 백신, Bristol-Myers Squibb/Axys의 프로테아제 저해제, Tripep의 치료 백신, Chron-VacC, United Therapeutics의 UT 231B, Genelabs Technologies의 프로테아제, 헬리카제 및 폴리머라제 저해제, Immusol의 IRES 저해제, Rigel Pharmaceuticals의 R803, InterMune의 INFERGEN<sup>R</sup>(인터페론 알파콘-1), Viragen의 OMNIFERON<sup>R</sup>(천연 인터페론), Human Genome Sciences의 ALBUFERON<sup>R</sup>, AresSerono의 REBIF(인터페론 베타-la), BioMedicine의 오메가 인터페론, Amarillo Biosciences의 경구용 인터페론 알파, InterMune의 인터페론 감마, 인터페론 타우 및 인터페론 감마-1b.

V. 생물학적 데이터

항바이러스 활성을 결정하기 위한 세포 배양 시스템

HCV 및 그의 저해를 검출하기에 유용한 세포-기초 어세이에 의해 HCV 레플리콘을 포함하는 Huh7 세포로부터 레플리콘 RNA 수준을 평가한다. 이들 세포를 표준 배지, 예를 들어 10% 소 태아 혈청, 1 × 비필수 아미노산, Pen-Strep-Glu(각각 100 단위/리터, 100 마이크로그램/리터, 및 2.92 mg/리터) 및 G418(C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>; 500 - 1000 마이크로그램/밀리리터)을 함유하는 DMEM 배지(고 글로코즈, 무 피루베이트)에서 배양할 수 있다. 항바이러스 스크리닝 어세이는 G418을 함유하지 않는 동일 배지에서 수행할 수 있다. 세포를 대수 성장 상태로 유지하기 위하여, 세포를 저밀도(예를 들어 웰당 1000세포)로 96-웰 플레이트에 시드하였다. 세포를 시드한 직후 시험 화합물을 부가하고 3 내지 7일 동안 37°C에서 인큐베이터에서 배양하였다. 그후, 배지를 제거하고, 세포를 총 RNA 추출(레플리콘 RNA + 숙주 RNA 포함)용으로 준비하였다. 레플리콘 RNA는 실시간 RT-PCR(Q-RT-PCR) 프로토콜로 증폭시키고 정량화할 수 있다.

레플리콘 RNA의 정량화에서 관찰된 차이는 시험 화합물의 항바이러스 효능을 표현하는 하나의 방법이다. 전형적인 실험에서, 음성 대조군 및 비활성 화합물-조건에서 상당한 양의 레플리콘이 생성되었다. 이로부터 두 세팅에서 측정된 HCV RT-PCR의 트레스홀드 사이클이 거의 동일하다는 결론을 얻을 수 있다. 이러한 실험에서, 화합물의 항바이러스 효과를 표시하는 방법은 화합물의 트레스홀드(threshold) RT-PCR 사이클(Ct<sub>시험 화합물</sub>)로부터 음성 대조군의 평균 트레스홀드 RT-PCR 사이클(Ct<sub>음성</sub>)을 빼는 것이다. 이 수치는 ΔCt (ΔCt = Ct<sub>시험 화합물</sub> - Ct<sub>음성</sub>)라 한다. 3.3의 ΔCt는 레플리콘 생산에 있어서 1-로그 감소를 나타낸다. 양성 대조군으로, 재조합 인터페론 알파-2a(예를 들어, 로페론-A, 호프만-로케, 뉴저지, 미국)가 시험 화합물과 나란히 사용될 수 있다. 또한, 화합물을 일련의 희석(전형적으로 100, 33, 10, 3 및 1 μM)으로 시험할 수 있다. 각 농도에 대한 ΔCt 수치로부터 50% 유효 농도(EC<sub>50</sub>)를 계산할 수 있다.

세포 시스템 및 바이러스 병원체를 변경하여 상기 어세이를 플라비비리다에의 다른 멤버에 응용할 수 있다. 항바이러스성 화합물의 효능을 결정하기 위한 방법론은 Holbrook MR 등에 의한 Virus Res. 2000, 69, 31; Markland W et al. Antimicrob. Agents, Chemother. 2000, 44, 859; Diamond MS et al., J. Virol. 2000, 74, 7814; Jordan I et al. J. Infect. Dis. 2000, 182, 1214; Sreenivasan V et al. J. Virol. Methods 1993, 45 (1), 1; 또는 Baginski SG 등에 의한 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000.97 (14), 7981에 기술된 표준 기술 또는 실시간 RT-PCR 기술의 변형을 포함한다. 예로, HuH7 세포에서 HCV 레플리콘 시스템(Lohmann V et al. Science 1999, 285 (5424), 110) 또는 그의 변형(Blight et al. 2000)이 이용될 수 있다.

HCV 검출에 적합하도록 응용된 비세포 기초 어세이

핵산 증폭 기술은 생물학적 샘플에서 미코박테리움 튜베쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)와 같은 미생물, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 및 C형 간염 바이러스(HCV)의 크면서 여전히 성장하는 수를 정량하기 위해 선택되는 방법이다. 핵산 증폭 기술은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR), 리가제 연쇄 반응(LCR), 핵산 서열-기초 증폭(NASBA), 스트랜드-치환 증폭(SDA) 및 전자-매개 증폭(TMA)을 포함한다. 수개의 FDA-승인 진단 제품은 이들 분자 진단 방법(이하 표 참조)을 포함한다. 핵산 증폭 기술 시험은 증폭뿐만 아니라 검출 방법론을 포함한다. 분자 진단가망으로 그의 검체-프로세싱, 증폭 및 표적-검출 단계가 개량되었고, 이들 단계를 자동 포맷으로 통합시킬 수 있었다.

FDA-승인 어세이	증폭 생성물:검출방법	핵산 증폭 방법	입수원
<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> ,	불균질:열량계	PCR	Roche Diagnostics

<i>M. tuberculosis</i> , <i>HIV-1</i>			
<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>	불균질:화학발광	LCR	Abbott Laboratories
<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>	균질:형광	SDA	Becton Dickinson
<i>C. trachomatis</i> , <i>M. tuberculosis</i>	균질:화학발광 (HPA)	TMA	Gen-Probe

증폭-생성물 검출 스킴

증폭-생성물 검출 스킴은 불균질 및 균질의 두가지 기본적인 타입이 있다. 불균질 검출은 하이브리드화 프로브로부터 비하이브리드화된 프로브를 제거하도록 디자인된, 세척과 같은 상이한 단계로 특정화되는 반면, 균질 검출에는 결합된 프로브로부터 유리된 프로브를 제거하기 위한 물리적인 분리 단계가 없다. 다중 불균질 및 균질 검출 방법이 존재한다. 이들 불균질 또는 균질 어세이의 임의의 것이 HCV와 같은 RNA-의존성 RNA 폴리머라제 바이러스에 대한 본 발명의 화합물의 유효성을 평가하기 위해 사용될 수 있다.

불균질 검출: 서던 블로팅(Southern blotting)은, 예를 들어 불균질 검출 기술이다. 서던 블로팅에서, 크기 및 전하에 의해 증폭 생성물을 분리하기 위해 전기영동이 사용된다. 크기 분류된 생성물을 확산, 진공 또는 일렉트로블로팅(electroblotting)에 의해 막 또는 필터로 옮긴다. 이어서, 표지화된 검출 프로브를 용액에서 막-결합된 표적에 하이브리드화시키고, 필터를 세척하여 비하이브리드화된 프로브를 제거한 후, 막상에 하이브리드화된 프로브를 다양한 방법으로 검출한다.

다른 타입의 불균질 검출은 효소-결합된 면역흡착 어세이(ELISA)에 의해 증폭 생성물을 특정 포획하는 것에 기초한다. PCR을 사용한 한 방법은 하나의 프라이머를 합텐 또는 리간드, 예컨대 비오틴으로 표지화하고, 증폭후, 이를 항체- 또는 스트렙타비딘-코팅된 마이크로플레이트와 함께 포획하는 것을 포함한다. 다른 프라이머를 플루오레세인과 같은 리포터로 표지화하고 안티플루오레세인 항체, 양고추냉이 퍼옥시다제(HRP) 콘주게이트를 첨가하여 검출한다. 이러한 타입의 방법은 대상으로 하는 한정된 증폭 생성물로 하이브리드화하는 검출 프로브를 사용하는 것만큼 특이적이지 않다.

LCx 프로브 시스템(Abbott Laboratories; Abbott Park, IL) 및 Amplicor HIV-1 시험(Roche Molecular Systems Inc.; Pleasanton, CA)은 불균질 검출 방법을 이용하는 시스템이다. LCx 시스템에서, 합텐-표지된 올리고뉴클레오타이드는 리가제 연쇄 반응에서 열사이클을 프로브한다. 포획 합텐 또는 검출 합텐은 네개의 프라이머 올리고뉴클레오타이드에 각각 공유 결합한다. 증폭시, 각 증폭된 생성물(앰플리콘)은 하나의 포획 합텐 및 하나의 검출 합텐을 가진다. 증폭 완료시, LCx 시스템 장치가 반응물을 새로운 웰로 이동시키며, 여기에서 항체-코팅된 마이크로입자가 포획 합텐에 결합한다. 그후, 각 마이크로입자는 유리-섬유 매트릭스에 비가역적으로 결합한다. 세척 단계는 마이크로입자로부터 검출 합텐만을 함유하는 프로브를 제거한다. LCx 장치가 검출 합텐에 결합하는 알칼리성 포스파타제(AP)-항체 콘주게이트를 가한다. AP에 대한 플루오리제닉 기질은 4-메틸움벨리페릴이다. AP에 의한 4-메틸움벨리페릴의 탈포스포릴화로 형광체인 4-메틸움벨리페론으로 전환된다.

Amplicor HIV-1 시험은 ELISA 포맷을 이용한다. PCR에 의한 증폭후, 앰플리콘은 화학적으로 변성된다. 앰플리콘-특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브는 코팅 마이크로플레이트상의 변성 스트랜드를 포획한다. 오퍼레이터는 세척 단계에서 임의의 합침되지 않은 프라이머 및 비하이브리드화된 물질들을 세척하여 제거한 후, 각 웰에 아비딘-HRP 콘주게이트를 가한다. 콘주게이트는 플레이트상에 포획된 비오틴-표지화된 앰플리콘에 결합한다. 그후, 오퍼레이터는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB), 크로모제닉(chromogenic) HRP 기질을 가한다. 과산화수소가 존재하는 경우, HRP는 TMB를 산화시킨다. 시그널은 열량적으로 결정된다.

균질 검출: 하이브리드화 및 비하이브리드화 검출 프로브는 균질 검출 시스템에서 물리적으로 분리되지 않기 때문에, 이들 방법은 불균질 방법보다 적은 단계를 필요로 하며, 덜 오염된다. 형광 및 화학발광 라벨의 균질 검출을 이용하는 시판 키트에는 TaqMan 시스템(Applied Biosystems; Foster City, CA), BDProbeTecET 시스템(Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ), QPCR 시스템 5000 (Perkin-Elmer Corp.; Norwalk, CT) 및 하이브리드화 보호 어세이(Gen-Probe Inc.; 샌디에고)가 있다.

TaqMan 시스템은 앰플리콘을 실시간으로 검출한다. 앰플리콘내 영역으로 하이브리드화하는 검출 프로브는 그의 5' 말단에 도너 플루오로포어 및 그의 3' 말단에 퀀처 부분, 예를 들어 로다민을 함유한다. 퀀처 및 플루오로포어는 둘다 동일한 올리고뉴클레오타이드상에 있으며, 도너 형광이 억제된다. 증폭동안 프로브가 표적에 결합한다. Taq 폴리머라제는 치환 스트랜드를 합성하는 동안 검출 프로브를 치환 및 절단한다. 검출 프로브의 절단으로 퀀처로부터 플루오로포어가 분리되며, 이에 따라 도너 형광 시그널이 증가된다. 각 증폭 사이클동안 프로세스가 반복된다. 형광 시그널의 양은 앰플리콘의 양이 증가함에 따라 증가한다.

분자 비콘(beacon)은 퀀처 및 플루오로포어를 또한 이용한다. 비콘은 표적 앰플리콘에 상보적인 프로브이나, 각 말단에 상보 올리고뉴클레오타이드의 짧은 스트레치(약 5개의 뉴클레오타이드)를 함유한다. 비콘의 5' 및 3' 말단은 각각 플루오로포어 및 퀀처로 표지된다. 비콘이 표적에 하이브리드화하지 않는 경우, 플루오로포어와 퀀처가 접촉하여 형광체가 퀀칭됨으로써 머리핀 구조가 형성된다. 루프 영역은 앰플리콘에 상보적인 영역을 함유한다. 표적에 하이브리드화시에, 머리핀 구조가 열려 퀀처 및 플루오로포어가 분리됨에 따라 형광체 시그널<sup>14</sup>이 전개된다. 형광체는 시그널을 실시간으로 측정한다.

BDProbeTecET 시스템은 TaqMan 및 분자 비콘의 특징을 조합한 실시간 검출 방법을 이용한다. 프로브는 머리핀 루프 구조를 가지며 플루오로세인 및 로다민 표지를 함유한다. 그러나, 이 시스템에서는 표적 분자에 상보적인 영역이 루프내에 있지 않고, 로다민 표지의 3' 영역에 있다. 표적에 상보적인 서열을 함유하는 대신, 시그널-스트랜드된 루프는 제한 효

소 BsoBI에 대한 제한 영역을 함유한다. 시그널-스트랜드된 시퀀스는 효소에 대한 기질이 아니다. 플루오레세인 및 로다민 표지는 증폭전에 서로 인접하여 플루오레세인 형광을 쉼터한다. 스트랜드-치환 증폭은 프로브를 이중-스트랜드된 분자로 전환시킨다. 이후, BsoBI 제한 효소는 분자를 절단하여 표지를 분리시키고 형광 시그널을 증가시킨다.

QPCR 시스템 5000은 루테늄 표지와 함께 전기화학발광을 이용한다. 비오틴화된 프라이머가 사용된다. 증폭후, 비오틴 생성물은 스트랩타비딘-코팅된 상자성 비드상에 포획된다. 비드는 아스피레이션에 의해 전기화학 유동 셀내로 이동하며 전극 표면에 자기적으로 유지된다. 전기 자극시, 루테늄-표지된 프로브가 발광한다.

하이브리드화 보호 어셈블리가 Gen-프로브 비증폭 PACE 어셈블리뿐 아니라 증폭 마이코박테리움 튜베쿨로시스 및 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*) 어셈블리에 사용된다. HPA에서 검출 올리고뉴클레오타이드 프로브는 링커 암에 의해 화학발광제 아크리디늄 에스테르(AE)로 표지된다. 하이브리드화는 증폭이 일어나는 동일 튜브내에서 60 °C에서 15 분간 발생한다. 하이브리드화후 가해진 선택 시약, 미 염기성 완충액이 임의의 비하이브리드화 프로브상의 AE를 하이브리드화하여 비화학발광성으로 만든다. 하이브리드화된 프로브상의 AE는 이중 헬릭스의 소 그루브내로 접혀 그 자신이 선택 시약에 의해 가수분해되는 것으로부터 보호한다. AE는 과산화수소에 이어 수산화나트륨에 의한 가수분해시에 화학발광 시그널을 방출한다. 발광계는 화학발광 시그널을 2 초간(소등 시간) 기록하며 상대 광단위(RLU)에 대해 방출된 광자를 보고한다.

검출-프로브 디자인은 증폭 생성물을 검출하기 위해 프로브를 사용하는 모든 방법에서 중요하다. 우수한 검출 프로브는 특이적 증폭 생성물만을 하이브리드화하며 비특이적 생성물은 하이브리드화하지 않는다. 검출 방법을 최적화하는데 있어서 다른 주요 이슈는 프로브의 표지화 및 샘플 처리량의 최대화를 포함한다.

표지화 방법 및 리포터 분자. 검출 프로브는 수개의 상이한 방법으로 표지될 수 있다. 프로브내에 <sup>32</sup>P 또는 <sup>35</sup>S의 효소 합침은 동위원소 표지화의 가장 일반적인 방법이다. 하이브리드화 및 세척후, 시그널이 자동방사선사진 필름상에 검출된다.

비방사성 검출을 수행하기 위해, 프로브를 다양한 분자로 효소적으로 표지화할 수 있다. 비오틴을 효소적으로 도입한 후, 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트(BCIP) 및 니트로블루 테트라졸륨(NBT) 등의 AP 기질을 사용하여 스트랩타비딘-콘주게이트된 알칼리성 포스파타제로 검출할 수 있다. Lumi-Phos 530 또는 Lumi-Phos Plus(Lumigen, Southfield, MI)와 같은 화학발광 기질을 또한 AP와 함께 사용할 수 있다. 또한, 디옥시게닌-11-dUTP가 DNA 또는 RNA 내로 효소적으로 도입될 수 있으며, 안티디옥시게닌 AP 콘주게이트가 열량계 또는 화학발광 검출과 함께 이용될 수 있다.

아크리디늄 에스테르와 같은 화학발광 부분을 포함하여 많은 다른 타입의 리포터 분자가 있다. 많은 형광 부분이 또한 가능하다. 트리스 (2,2'-비피리딘) 루테늄 (II)과 같은 전기화학발광 화합물이 또한 사용될 수 있다. 이들 및 유사 기술의 추가적인 논의를 Schiff ER, de Medina M, Kahn RS. Semin Liver Dis. 1999; 19 (Suppl 1: 3-15)에서 확인할 수 있다.

**실시예 3: 2'-C-메틸-사이티딘-3'-O-L-발린 에스테르(VAL-mCyd)의 세포 약리학**

*뉴클레오사이드의 활성 트리포스페이트로의 포스포릴화 어셈블리*

화합물의 세포 대사를 결정하기 위하여, HepG2 세포를 ATCC(American Type Culture Collection)(Rockville, MD)로부터 수득하고, 225 cm<sup>2</sup> 조직 배양 플라스크에 넣어 비필수 아미노산, 1% 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 최소 필수 배지에서 증식시켰다. 배지를 3일마다 새것으로 교환하고, 세포를 1주일에 한번 계대배양하였다. 트립신-EDTA 30 ml에 10 분 노출시키고 배지로 3회 연속 세척하여 부착 단층을 분리시킨 후, 용합 HepG2 세포를 6-웰 플레이트에서 웰당 2.5 x 10<sup>6</sup> 세포 밀도로 시딩하고, [<sup>3</sup>H] 표지된 활성 화합물(500 dpm/pmol) 10 μM에 정해진 시간동안 노출시켰다. 세포를 5% CO<sub>2</sub> 분위기하에 37 °C로 유지하였다. 선택된 시간대에, 세포를 냉각 포스페이트-완충 염수(PBS)로 3회 세척하였다. 세포 펠렛을 -20 °C에서 60% 메탄올과 밤새 배양한 후, 빙조에서 1 시간동안 냉메탄올 20 μl로 추출하여 세포내 활성 화합물 및 그의 각각의 대사물을 추출하였다. 이후, 추출물을 합해 온화한 필터 기류하에 건조시키고, -20 °C에서 HPLC 분석때까지 저장하였다.

항바이러스성 뉴클레오사이드 및 뉴클레오사이드 유사체는 일반적으로 세포내 키나제에 의해 활성 대사물인 5'-트리포스페이트(TP) 유도체로 전환된다. 이후, 뉴클레오사이드-TPs는 바이러스 복제동안 바이러스 폴리머라제를 저해함으로써 그의 항바이러스성 효과를 발휘한다. 일차 간암 배양물, 인간 간암 세포주(HepG2), 및 소 신장 세포주(MDBK)에서, mCyd는 소량의 유리된 5'-트리포스페이트 유도체인 2'-C-메틸-유리딘-5'-트리포스페이트(mUrd-TP)와 함께, 주요 대사물인 2'-C-메틸-사이티딘-5'-트리포스페이트(mCyd-TP)로 전환된다. mCyd-TP는 시험관내에서 시험되는 경우, BVDV 복제 효소, NS5B RNA 의존성 RNA 폴리머라제에 대한 저해제이며, mCyd의 항바이러스 활성에 기여하는 것으로 판단된다.

10 μM [<sup>3</sup>H]-mCyd에 노출된 인간의 일차 간세포, HepG2 세포 및 MDBK 세포를 사용하여 mCyd의 세포성 대사를 조사하였다. 고압 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석에 의해 mCyd가 모두 세가지 세포 타입으로 포스포릴화함이 입증되었으며, 24 시간후 mCyd-TP가 현저한 대사물인 것으로 나타났다. 인간 간암 HepG2 세포를 10 μM [<sup>3</sup>H]-mCyd에 48 시간 노출후 수득한 대사 프로파일을 테스트하였다. HepG2 세포에서, mCyd-TP 수준을 24 시간후 41.5±13.4 μM에서 피크를 이룬 후(표 3 참조), 이후 점차 떨어졌다. 일차 인간 간세포에서, 24 시간에서의 피크 mCyd-TP 농도는 10.7±6.7 μM에서 4배 적었다. MDBK 소 신장 세포는 중간 수준의 mCyd-TP(24 시간에서 30.1±6.9 μM)를 제공하였다.

간세포를 mCyd에 노출하는 것은 이차 5'-트리포스페이트 유도체, mUrd-TP를 생산하였다. MDBK 세포에서 8.1±3.4 μM 및 일차 인간 간세포에서 3.2±2.0 μM인 것에 비해, 10 μM [<sup>3</sup>H]-mCyd에 노출된 HepG2 세포에서, mUrd-TP 수준은 24 시간제에 1.9±1.6 μM에 이르렀다. MDBK 및 HepG2 세포가 24 시간제에 필적할만한 총량의 포스포릴화 종(각각 약 43 대 47 μM)을 제공하는 것에 반해, mUrd-TP는 HepG2 세포에서 불과 4%인 것에 비하여 MDBK 세포에서 19%의 총 생성물을 포함하였다. mUrd-TP 농도는 꾸준히 증가하다가, 24 시간후에 안정 상태를 이루거나 감소하였다.

**표 3**

간세포 및 MDBK 세포에서 mCyd(10 μM)의 활성화

세포 <sup>a</sup>	n	대사물 (μM)					
		mCyd-MP	mUrd-MP	mCyd-DP	mUrd-DP	mCyd-TP	mUrd-TP
HepG2	6	ND	ND	3.7 ± 2.1	ND	41.5 ± 13.4	1.9 ± 1.6
인간 일차 간세포	5	ND	ND	1.15 ± 1.1	0.26 ± 0.4 C	10.7 ± 6.7	3.2 ± 2.0
MDBK 소 신장세포	7	ND	ND	4.2 ± 2.7	0.76 ± 0.95	30.1 ± 6.9	8.1 ± 3.4

a. 세포는 [<sup>3</sup>H]-mCyd와 24 시간동안 배양되었다, 특이적 활성: HepG2 어세이 = 0.5 Ci/mmol; 인간 및 원숭이 간세포 어세이 = 1.0 Ci/mmol.

b. 대사물 농도는 밀리온 세포당 pmole로 결정되었다. 밀리온 세포당 1 pmole은 대략 1 μM과 같다.

ND, 측정되지 않음.

mCyd-TP의 걸보기 세포내 반감기는 HepG2 세포에서 13.9 ± 2.2 시간이었고, MDBK 세포에서 7.6 ± 0.6 시간이었다: 데이터는 mUrd-TP의 반감기를 계산하는데 적합치 않다. 상기 제시된 특이적 차이 이외에, 일차 인간 간세포에서 검출된 포스포릴화 패턴은 HepG2 또는 MDBK 세포를 사용하여 수득한 것과 정량적으로 유사하였다.

**실시예 4: 세포 독성**

*미토콘드리아 독성 시험*

HepG2 세포를 상술한 12-웰 플레이트에서 배양하고, Pan-Zhou X-R, Cui L, Zhou X-J, Sommadossi J-P, Darley-Usmer VM. "Differential effects of antiretroviral nucleoside analogs on mitochondrial function in HepG2 cells" *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44: 496-503에 교시된 다양한 약물 농도에 노출시켰다. 4 시간 약물 노출후 배양 배지에서 락트산 수준을 Boehringer 락트산 어세이 키트를 사용하여 측정하였다. 락트산 수준을 혈구계 카운트로 측정된 세포수로 정규화하였다.

*세포독성 시험*

세포를 습윤 CO<sub>2</sub>(5%) 대기중에 37 °C에서 증식 배지중의 96-웰 플레이트에서 5 x 10<sup>3</sup> 및 5 x 10<sup>4</sup>/웰의 비율로 배양 시켰다. 일련의 약물 희석물을 함유하는 새로운 증식 배지를 가하였다. 4 일간 배양후, 배지를 50% TCA로 고정시키고, 설 포포다민B로 염색하였다. 광밀도를 550 nm에서 판독하였다. 세포독성 농도를 세포수를 50%로 감소시키는데 필요한 농도(CC<sub>50</sub>)로 표시하였다.

통상적인 세포 증식 어세이를 사용하여 신속히 분할하는 세포에서 mCyd 및 그의 세포 대사물의 세포독성을 평가하였다. mCyd가 특이 세포주에 대해 상응하는 CC<sub>50</sub> 보다 훨씬 과량의 농도에서 용합 세포에 대해 독성을 나타내지 않기 때문에, mCyd의 저해 효과는 사실상 세포증식 억제인 것으로 결정되었다. mCyd는 시험된 최고 농도(CC<sub>50</sub> > 250 μM)에서 신속히 증식하는 Huh7 인간 간암 세포 또는 H9c2 래트 심근 세포에 대해 세포독성이 아니다. mCyd CC<sub>50</sub> 값은 각각 BHK-21 햄스터 신장 및 HepG2 인간 간암 세포주에서 132 및 161 μM 이었다. 세포가 4 또는 10 일간 콜라겐-코팅된 플레이트상에서 증식되는 경우, HepG2 세포에서 mCyd에 대한 CC<sub>50</sub>은 200 μM로 증가하였다. 비교용으로, 리바비린은 HepG2 및 Huh7 세포에서 시험된 경우, 35-36 μM의 CC<sub>50</sub> 값이 도출되었다. BVDV 항바이러스 조사를 위해 사용된 MDBK 소 신장 세포에서, mCyd의 CC<sub>50</sub>은 36 μM이었다. MT-4 인간 T-림프구 세포에서 mCyd에 대해 유사한 CC<sub>50</sub> 값(34 μM)이 결정되었다. 또한, National Institutes of Health (NIH) Antiviral Research and Antimicrobial Chemistry Program에 의해 수행된 시험에서, mCyd는 대부분 수개의 인간 암종 세포주를 포함하여 다수의 다른 인간 및 다른 포유동물 기원의 세포주에 대해 비세포독성 또는 약한 세포독성(CC<sub>50</sub> > 50 - > 200 μM)을 나타내었다. 예외로, 급속히 증식하는 HFF 인간 포피 섬유모세포 및 MEF 마우스 배아 섬유모세포에서, mCyd는 좀 더 큰 세포독성을 나타내었다(각각 CC<sub>50</sub>가 16.9 및 2.4 μM). 또한, mCyd는 정지상 섬유모세포에 독성이 훨씬 덜하다.

세포성 DNA 또는 RNA 합성상에서 mCyd의 양을 증가시키는 세포독성 효과를 [<sup>3</sup>H]-티미딘 또는 [<sup>3</sup>H]-유리딘에 노출된 HepG2 세포에서 조사하였다. HepG2 세포에서, 세포성 DNA 또는 RNA내에 방사표지된 티미딘 및 유리딘의 도입을 50% 감소시키는데 필요한 mCyd의 CC<sub>50</sub>은 각각 112 및 186 μM이었다. DNA 및 RNA 합성에서 리바비린(RBV)에 대해 결정된 CC<sub>50</sub>은 각각 3.16 및 6.85 μM이었다. 이들 값은 일반적으로 통상적인 세포 증식 세포독성 시험에서 각각 mCyd 및 RBV에 대해 결정된 161 및 36 μM의 CC<sub>50</sub>을 반영한다. 세포성 RNA 및 DNA내 mCyd의 도입을 평가하기 위하여, HepG2 세포를 10 μM [<sup>3</sup>H]-mCyd 또는 대조 뉴클레오사이드(특이적 활성 5.6-8. 0 Ci/mmol, 염기에서 표지)에 30 시간동안

노출시켰다. 표지된 세포성 RNA 또는 DNA 종을 따로 분리하고, 신틸레이션 계수로 도입을 결정하였다. mCyd에 HepG2 세포를 노출하였을 때 세포성 DNA 또는 RNA로의 리보뉴클레오사이드 유사체의 도입은 매우 낮은 수준이었다(0.0013-0.0014 pmole/μg 핵산). 이들 수준은 각각 RNA내로의 ZDV 및 ddC 도입에 대해 결정된 0.0009 및 0.0013 pmole/μg과 유사하다: 이들 데옥시뉴클레오사이드는 RNA로 도입되지 않을 것으로 예상되기 때문에, 이들 수준은 분석 백그라운드를 반영한다. DNA로의 ZDV 및 ddC 도입은 상당히 높다(각각 0.103 및 0.0055 pmole/μg). DNA 및 RNA 둘다에 도입된 리바비린(RBV)은 mCyd 보다 10-배 이상의 수준이다.

표 4a: HepG2 세포에서 세포성 핵산 합성 및 도입 시험(10 μM의 약물 및 뉴클레오사이드 대조군)

화합물	CC <sub>50</sub> (μM)		도입된 약물의 양	
	DNA ( <sup>3</sup> H]T 티미딘)	RNA ( <sup>3</sup> H] 유리딘)	pmole/μg DNA	pmole/μg RNA
mCyd	112.3 ± 34.5	186.1 ± 28.2	0.0013 ± 0.0008 <sup>a</sup>	0.0014 ± 0.0008 <sup>a</sup>
ZDV	nd	nd	0.103 ± 0.0123 <sup>a</sup>	0.0009 ± 0.0003 <sup>a</sup>
ddC	nd	nd	0.0055 <sup>b</sup>	0.0013 <sup>b</sup>
리바비린	3.16 ± 0.13	6.85 ± 1.83	0.0120 <sup>b</sup>	0.0132 <sup>c</sup>

a. 데이터는 세 실험의 평균값을 나타낸다.

b. 데이터는 1회 실험을 나타낸다.

c. 데이터는 두 실험의 평균값을 나타낸다.

nd, 측정되지 않음.

표 4b: 포유동물 세포주에서 mCyd의 세포독성

세포주 <sup>a</sup>	n	CC <sub>50</sub> (μM)
Huh 7	7	>250
Hep G2	6	161 ± 19
Hep G2 <sup>b</sup>	2	>200
MDBK	7	36 ± 7
BHK-21	2	132 ± 6
H9c2	2	>250

a. 모든 세포독성 시험은 신속한 세포 분열 조건하에 행해졌다.

b. 세포는 4 또는 10일동안 콜라겐 코팅된 플레이트상에서 증식되었다.

인간 골수 전구세포에 대한 효과

골수 세포독성 시험

건강한 정상인 지원자에게서 인간 골수 세포를 채취하고, Sommadossi J-P, Carlisle R. "Toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine for normal human hematopoietic progenitor cell in vitro "Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1987; 31: 452-454; 및 Sommadossi J-P, Schinazi RF, Chu CK, Xie M-Y. "Comparison of cytotoxicity of the (-) -and (+) -enantiomer of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine in normal human bone marrow progenitor cells" *Biochemical Pharmacology* 1992; 44: 1921-1925에 기술된 바와 같이 Ficoll-Hypaque 구배 원심분리에 의해 단핵 집단을 분리하였다. 이층 소프트 아가 또는 메틸셀룰로즈 방법을 이용하여 CFU-GM 및 BFU-E에 대한 배양 분석을 수행하였다. 약물을 조직 배양 배지로 희석하고 여과하였다. 공기중 5% CO<sub>2</sub> 의 습윤 대기중에 37 °C에서 14 내지 18 일후, 독립 현미경을 이용하여 50 보다 많은 세포 콜로니를 계수하였다. 결과를 용매 대조 배지에 대한 약물 존재하의 콜로니 형성 저해율(%)로 나타내었다.

세포 보호 어세이(CPA)

실질적으로 Baginski, S. G.; Pevear, D. C.; Seipel, M.; Sun, S. C. C.; Benetatos, C. A.; Chundururu, S. K.; Rice, C. M. 및 M. S. Collett "Mechanism of action of psetivirus antiviral compound" *PNAS USA* 2000,97 (14), 7981-7986에 기술된 바와 같이 어세이를 실시하였다. MDBK 세포(ATCC)를 사용 24 시간전에 96-웰 배양 플레이트(웰당 4,000 세포) 상에 시딩하였다. 세포당 0.02 플라크 형성 단위의 감염 다중도(MOD)로 BVDV(스트레인 NADL, ATCC)를 감염시킨 후, 일련의 희석 시험 화합물을 성장 배지에서 0.5% DMSO 의 최종 농도로 감염 및 비감염 세포에 가하였다. 각 희석물을 4회 실시하였다. 세포 밀도 및 바이러스 접종물을 실험을 통해 연속 세포 증식이 가능하고 4일 후-감염후 비처리 대조군에서

90% 이상이 바이러스에 의해 세포 파괴되도록 조정하였다. 4 일 후, 플레이트를 50% TCA로 고정하고, 설포로다민 B로 염색하였다. 광밀도를 550 nm에서 판독하였다. 50% 유효 농도(EC<sub>50</sub>)는 바이러스의 세포독성 효과를 50% 감소시키는 데 필요한 화합물의 농도로 정의된다.

특정 뉴클레오사이드 유사체의 골수억제 효과는 클론원성 어세이에서 인간 골수 전구세포의 성장에 대해 조사되는 약물의 잠재적인 효과를 시험하는데 있어서 가장 중요한 부분이다. 특히, 빈혈 및 호중성백혈구산소증은 HCV 치료에 사용되는 케어 병용 요법의 표준에서 항-HIV 약물 지도부딘(ZDV) 또는 리바비린(RBV) 성분과 관련하여 나타나는 가장 일반적인 약물-관련 임상적 독성이다. 이들 독성은 건강한 지원자로부터 얻은 골수 세포를 사용하는 시험관내 분석에서 모델이 되고 있다(Sommadossi J-P, Carlisle R. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1987; 31 (3): 452-454). ZDV는 이러한 모델에서 1-2µM의 임상적 관련 농도에서 인간 과립구-대식세포 콜로니 형성(CFU-GM) 및 적혈구 버스트-형성(BFU-E) 활성을 직접 저해하는 것으로 나타났다(Berman E, et al. *Blood* 1989; 74 (4): 1281-1286; Yoshida Y, Yoshida C. *AIDS Res. Hum. Retrovirus* 1990; 6 (7): 929-932.; Lerza R, et al. *Exp. Hemato.* 1997; 25 (3): 252-255; Dornsife RE, Averett DR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40 (2): 514-519; Kurtzberg J, Carter SG. *Exp. Hematol.* 1990; 18 (10): 1094-1096; Weinberg RS, et al. *Mt. Sinai. J. Med.* 1998; 65 (1) : 5-13). 인간 골수 세포 클론원성 어세이 이용시에, CFU-GM 및 BFU-E에서 mCyd의 CC<sub>50</sub> 값은 각각 14.1±4.5 및 13.9±3.2 µM(표 5 참조)이었다. mCyd는 ZDV 및 RBV 둘다 보다 골수 세포에 독성이 상당히 낮았다(표 5 참조).

표 5: 과립구-대식 전구세포 적혈구 전구세포에서 mCyd의 골수 세포 독성

화합물	CFU-GM*	BFU-E*
	CC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)
mCyd	14.1 ± 4.5 µM	13.9 ± 3.2
ZDV	0.89 ± 0.47	0.35 ± 0.28
RBV	7.49 ± 2.20	0.99 ± 0.24

a. RBV에 대한 3 개의 독립적 실험 및 mCyd 및 ZDV에 대한 5-8개의 독립적 실험으로부터의 데이터. 모든 실험은 3회 수행되었다.

모노콘드리아성 작용에 대한 효과

ZDV, 스타부딘(d4T), 디디노신(ddI) 및 잘시타빈(ddC)과 같은 HIV 치료용으로 승인된 항바이러스성 뉴클레오사이드 유사체는 가끔 말초 신경병증, 근육병증 및 체장염과 같은 임상적 제한 자연 독성에 연루된다 (Browne MJ, et al. *J. Infect. Dis.* 1993; 167 (1) : 21-29; Fischl MA, et al. *Ann. Intern. Med.* 1993; 18 (10) : 762-769.; Richman DD, et al. *N. Engl. J. Med.* 1987; 317 (4): 192-197; Yarchoan R, et al. *Lancet* 1990; 336 (8714): 526- 529). 이들 임상적 부작용은 일부 전문가들에 의해 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 함량 및 mtDNA로의 뉴클레오사이드 유사체 도입 감소에 기인한 미토콘드리아 기능 저해에 의한 것으로 밝혀졌다. 또한, 한 특정 뉴클레오사이드 유사체인 피알유리딘(1,-2'-데옥시-2'-플루오로-1-β-D-아라비노푸라노실-5-요오도-우라실; FIAU)은 직접적인 미토콘드리아 독성에 의한 간부전, 체장염, 신경병증, 근육병증 및 락트산증을 야기한다.(McKenzie R, et al. *N Engl J Med* 1995; 333 (17) : 1099-1105). 락트산 생성의 약물-연관 증가는 손상된 미토콘드리아 기능 또는 산화적 포스포릴화의 마커인 것으로 판단될 수 있다(Colacino, J. M. *Antiviral Res* 1996 29 (2-3): 125-39).

미토콘드리아성 독성을 생성하는 mCyd의 잠재성을 평가하기 위하여, 인간 간암 세포주 HepG2 또는 Huh7을 사용하여 다수의 시험관내 시험을 수행하였다. 이들 시험은 락트산 생성, mtDNA 함량 및 미토콘드리아 초미세구조의 형태학(예: 능선의 손실, 매트릭스 용해 및 팽윤 및 리피드 소적 형성) 변화 결정 어세이를 포함한다.

미토콘드리아에 대한 mCyd의 효과는 표 6에 나타나 있다. Huh7 세포에서 50 µM 이하의 mCyd 또는 HepG2 세포에서 10 µM 이하의 mCyd에서 mCyd-처리 세포의 락트산 생성은 비처리 세포에 비해 차이가 없는 것으로 나타났다. 락트산 생성의 적당한(38%) 증가는 50 µM mCyd로 처리된 HepG2 세포에서 나타났다. 이러한 발견의 유의성은, 특히 mCyd가 임상적으로 50 µM의 혈장 농도에 도달하지 않을 것이기 때문에 모호하다. 비교용으로, 락트산 생성은 10 µM FIAU로 처리된 세포에서 대조군에 비해 100%까지 증가되었다(Cui L, Yoon, et al. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 555-563). HepG2 세포를 mCyd에 50 µM 이하의 농도로 6 또는 14 일간 노출시, ddC-처리된 세포에서 각각 56 또는 80% 감소한 것에 비해 미토콘드리아성 DNA 감소에 부정적인 영향을 미치지 않았다.

10 µM의 mCyd에 14 일간 노출후, HepG2 세포, 및 특히 미토콘드리아의 초미세구조를 투과전자현미경으로 조사하였다. 대부분의 세포에서 세포 구조, 또는 미토콘드리아 수 또는 형태(능선 포함)에 변화가 없는 것으로 관찰되었다. 세포의 17%에서, 세포당 평균 25개중 1 내지 2개의 미토콘드리아가 확대된 것으로 나타났다. 이러한 미소 변화는 미토콘드리아 기능에 결정적인 영향을 주지는 않을 것으로 판단된다. ddC-처리 세포는 능선 손실 및 지방 소적 축적과 같은 비정상적인 미토콘드리아성 형태학을 나타내었다(Medina, D. J., C. H. Tsai, et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994 38 (8): 1824-8; Lewis W, et al. *J. Clin. Invest.* 1992; 89 (4): 1354-1360., Lewis, L. D., F. M. Hamzeh, et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992 36 (9): 2061-5).

표 6: HepG2 세포에서 간세포 증식, 미토콘드리아 기능 및 형태학에 대한 mCyd의 영향

		L-락테이트 (대조군에 대한 % <sup>a</sup> )		mtDNA/ 핵 DNA (대조군에 대한 % <sup>b</sup> )		전자 현미경 <sup>c</sup>	
제제	농도 ( $\mu\text{M}$ )	HepG2 세포	Huh7 Cells	6 일 처리	14 일 처리	리퍼드 소적 형성	미토 콘트리아 형태
Cont.	0	100	100	100	100	부정적	정상
mCyd	10	98.6 $\pm$ 7.3	98.0 $\pm$ 12.3	117.3 $\pm$ 17.5	99.7 $\pm$ 23.9	부정적	정상 <sup>d</sup>
	50	138.0 $\pm$ 8.9	97.1 $\pm$ 10.1	158.2 $\pm$ 17.5	83.0 $\pm$ 15.5	nd	nd
ddC	1	nd	nd	44.3 $\pm$ 9.3	19.6 $\pm$ 8.2	nd	nd
	10	nd	nd	nd	nd	긍정적	능선 손실

인간 DNA 폴리머라제  $\alpha$ ,  $\beta$  및  $\gamma$ 에 대한 효과

세포성 DNA 폴리머라제는 정상적인 핵 및 미토콘드리아성 DNA 합성 및 수복에 관여한다. 뉴클레오사이드 유사체 트리포스페이트는 DNA 폴리머라제의 잠재적 저해제이며, 따라서 중요한 세포 기능을 파괴할 수 있다. 특히, 미토콘드리아성 DNA 합성에 관여하는 효소인 인간 폴리머라제  $\gamma$ 의 저해는 미토콘드리아 기능의 결함과 관련된다(Lewis, W., E. S. Levine, et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1996 93 (8): 3592-7). mCyd-TP가 인간 DNA 폴리머라제를 저해하는지를 실험으로 결정하였다. 표 7에 보여진 바와 같이, mCyd-TP는 인간 DNA 폴리머라제  $\alpha$ ,  $\beta$  또는  $\gamma$ 에 대한 기질이 아니다. 심지어, 1 mM의 mCyd-TP도 대부분의 복제 어세이에서 이들 효소를 50% 저해하는데 실패하였으며,  $IC_{50}$  값만이 880-1000  $\mu\text{M}$ 을 초과한 것으로 결정되었다. 대조적으로, ddC는 세가지 모든 인간 DNA 폴리머라제, 특히 폴리머라제  $\beta$  및  $\gamma$ 의 유효한 저해제이다(각각  $IC_{50}$ 이 4.8 및 2.7  $\mu\text{M}$ ). 유효한 저해제는 또한 DNA-의존성-DNA 폴리머라제 저해제로 공지된 대조 약물, 액티노마이신 D인 것으로 나타났다.

표 7: mCyd-트리포스페이트에 의한 인간 폴리머라제 저해

	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )		
	mCyd-TP <sup>a</sup>	ddC-TP <sup>b</sup>	Act. D <sup>c</sup>
<b>Pol <math>\alpha</math></b>	<b><math>\geq 1000</math></b>	<b>78 <math>\pm</math> 23.4</b>	<b>5.8 <math>\pm</math> 3.1</b>
<b>Pol <math>\beta</math></b>	<b><math>\geq 883.3 \pm 165</math></b>	<b>4.8 <math>\pm</math> 1</b>	<b>7.9 <math>\pm</math> 3</b>
<b>Pol <math>\gamma</math></b>	<b><math>\geq 929.3 \pm 100</math></b>	<b>2.7 <math>\pm</math> 1</b>	<b>15.5 <math>\pm</math> 4</b>

a. 4개의 데이터 세트로부터 평균  $\pm$ S.D.

b. 2개의 데이터 세트로부터 평균  $\pm$ S.D.

a. HepG2 또는 huh7 세포를 4일동안 화합물로 처리하였고, 데이터는 적어도 세개의 독립적 실험을 나타낸다.

b. HepG2 세포를 6 및 14일동안 화합물로 처리하였고, 데이터는 적어도 세개의 독립적 실험을 나타낸다.

c. HepG2 세포를 14일동안 화합물로 처리하였다.

d. 적어도 두개의 독립 실험에서 17% 세포(64개중 11)가 25개중 1 또는 2개의 확대된 미토콘드리아를 함유하였다.

실시예 5: BVDV에 대한 시험관내 항바이러스 활성

화합물은 플라비바이러스 또는 페스티바이러스 폴리머라제를 저해하거나, 복제 사이클에 필요한 다른 효소를 저해하거나, 또는 다른 경로로 항-플라비바이러스 또는 페스티바이러스 활성을 나타낼 수 있다.

플라크 감소 어세이

각 화합물에 대해, 듀플리케이트 24-웰 플레이트에서 플라크 감소 어세이로 유효 농도를 결정하였다. 세포 단층을 100 PFU/웰 바이러스로 감염시켰다. 그후, 2% 불활성 혈청 및 0.75% 메틸셀룰로스를 함유하는 MEM에서 시험 화합물을 일련적으로 희석하여 단층에 가하였다. 배양물을 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 3일간 추가로 배양한 후, 50% 에탄올 및 0.8% 크리스탈 바이올렛으로 고정화시킨 다음, 세척하고, 공기-건조시켰다. 이어서, 플라크를 계수하여 바이러스를 90% 억제하는데 필요한 농도를 결정하였다.

일드 감소 어세이

각 화합물에 대해, 바이러스 적재시에 6-로그 감소를 얻는데 필요한 농도를 일드 감소 어세이에 의해 듀플리케이트 24-웰 플레이트에서 결정하였다. 이 어세이는 Baginski, S. G.; Pevear, D. C.; Seipel, M.; Sun, S. C. C.; Benetatos, C. A.; Chunduru, S. K.; Rice, C. M. 및 M. S. Collett "Mechanism of action of pestivirus antiviral compound" *PNAS USA* 2000,97 (14), 7981-7986을 약간 변경하여 수행하였다. 간략하여 나타내면, MDBK 세포를 BVDV로 감염시키기 24 시간전에 세포당 0.1 PFU 감염 다중도(MOI)로 24-웰 플레이트(웰당  $2 \times 10^5$  세포)에 시딩하였다. 일련의 희석 시험 화합물을 성장 배지에서 0.5% DMSO의 최종 농도로 세포에 가하였다. 각 희석을 3회 실시하였다. 3일후, 세포 배양물(세포 단층 및 상등액)을 3회의 냉동-해동 사이클로 용해시키고, 바이러스 일드를 플라크 어세이로 정량화하였다. 요약하면, MDBK 세포를 사용 24 시간전에 6-웰 플레이트(웰당  $5 \times 10^5$  세포)상에 시딩하였다. 세포를 0.2 mL의 시험 용해물로 1 시간동안 접촉시키고, 세척한 후, 성장 배지에서 0.5% 아가로스로 도포하였다. 3일후, 세포 단층을 3.5% 포름알데하이드로 고정한 후, 1% 크리스탈 바이올렛(50% 에탄올중 w/v)으로 염색하여 플라크를 가시화하였다. 플라크를 계수하여 바이러스 적재시 6-로그 감소를 얻는데 필요한 농도를 구하였다.

배양 세포에서 mCyd의 항바이러스 활성에 대한 조사를 수행하였다. mCyd 항바이러스 효능을 결정하는데 사용되는 주요 어세이는 BVDV-기초 세포-보호 어세이(CPA)이다. 이 어세이는 BVDV의 세포변성 NADL 스트레인에 의한 파괴로부터 성장 MDBK 소 신장 세포를 보호하는 mCyd의 능력을 측정한다. 비감염 세포에 대한 시험 약물의 세포독성을 함께 측정하였다. CPA에서 리바비린 및 mCyd의 항바이러스 활성을 표 8a에 비교하여 나타내었다. mCyd는  $EC_{50} = 0.67 \pm 0.22 \mu M$ 로 데노보-감염된 MDBK 세포를 농도-의존적인 방식으로 효과적으로 보호한다(표 8a 참조). mCyd는 이 어세이에서 mCyd에 대해 하기  $CC_{50}$ 의 농도( $38 \pm 9 \mu M$ )에서 완전한 세포보호 효과를 나타낸다. CPA에서 뿐 아니라 이후 다른 어세이에서, 리바비린은 명확한 항바이러스 효과를 나타내지 못했다: 리바비린의 세포독성이 보호 효과를 오버래핑하여 차폐함으로써, 대부분의 어세이에서 유의적인(50% 이상) 세포 보호를 이루지 못했다. 즉, 리바비린은 CPA에서  $CC_{50}$ 이  $4.3 \pm 0.6 \mu M$ 이고,  $EC_{50}$ 이  $> 4.3 \mu M$ 이었다.

표 8a: 세포 보호 시험에서 BVDV에 대한 mCyd의 시험관내 활성

화합물	n	$EC_{50}, \mu M$	$CC_{50}, \mu M$
mCyd	11	$0.67 \pm 0.22$	$38 \pm 9$
RBV	3	$>4.3$	$4.3 \pm 0.6$

표 8b:  $\beta$ -2'-C-메틸사이티딘(화합물 G),  $\beta$ -D-2'-C-메틸사이티딘 디하이드로클로라이드 염의 3'-O-발리닐 에스테르(화합물 M) 및  $\beta$ -2'-C-메틸-우라실(화합물 N)에 대한  $CC_{50}$  시험 결과

화합물	$CC_{50}$							
		BVDV	YFV	DENV	WNV	CVB-	Sb-1	REO
				2		2		
G	34	2.3	54	95	80	12	11.5	13
M	24	5.8	82	$>100$	82	12	14	22
N	$>100$	18	100	$> \text{or} = 100$	80	$>100$	55	$>100$

주: 사용된 세포주는 HIV에 대해 MT-4; SARS에 대해 베로 76, 아프리카 사바나 원숭이 신장 세포; 소 바이러스성 설사 바이러스에 대해 BHK; 폴리오바이러스 사빈(Sabin) 타입-1에 대해 Sb-1; 콕사키바이러스 B-2, B-3, B-4 및 A-9에 대해 CVB-2, CVB-3, CVB-4 및 CVA-9; 및 이중 스트랜드 RNA 바이러스에 대해 REO-1이었다.

표 8c:  $\beta$ -D-2'-C-메틸사이티딘(화합물 G)에 대한  $CC_{50}$  및  $EC_{50}$  시험 결과

화합물	$CC_{50}$	$CC_{50}$	$CC_{50}$	$EC_{50}$	$EC_{50}$	$EC_{50}$	$EC_{50}$	$EC_{50}$	$EC_{50}$
	MT-4	Vero	BHK	Sb-1	CVB-	CVB-	CVB-	CVA-	REO-
		76			2	3	4	9	1
G	34	$>100$	$>100$	6	11	9	13	26	13

주: 사용된 세포주는 HIV에 대해 MT-4; SARS에 대해 베로 76, 아프리카 사바나 원숭이 신장 세포; 소 바이러스성 설사 바이러스에 대해 BHK; 폴리오바이러스 사빈(Sabin) 타입-1에 대해 Sb-1; 콕사키바이러스 B-2, B-3, B-4 및 A-9에 대해 CVB-2, CVB-3, CVB-4 및 CVA-9; 및 이중 스트랜드 RNA 바이러스에 대해 REO-1이었다.

mCyd의 전체 항바이러스 효능을 세포 보호 어세이에서뿐 아니라 플라크 감소 및 일드 감소 어세이에서 BVDV의 상이한 스트레인 및 세포변성(cp) 및 세포비변성(ncp) 생물형에 대해 결정하였다. 후자 어세이는 세포로부터 감염 바이러스의 생산을 측정하고, 따라서 엄격한 항바이러스 효능 시험을 제공한다. 모두 세가지 어세이로부터 얻은 상이한 데이터는 표 9에 요약한 바와 같이 서로 부합한다. mCyd에 대한 50% 및 90% 유효 저해제 농도 범위( $EC_{50}$  및  $EC_{90}$ ) 값은 각각 0.3 내지  $2.8 \mu M$  및 0.87 내지  $4.8 \mu M$ 이었다.

BVDV 일드 감소 어세이에서, mCyd의 아세포독성 농도(약 20 μM)는 데노보 BVDV 생산을 6 log<sub>10</sub> 이하로 억제하였으며, 이 시점에서 감염 바이러스는 검출되지 않았다. BVDV 생산에서 4 log<sub>10</sub> 유효 감소(EC<sub>4log10</sub> 또는 EC<sub>99.99</sub>)는 6.0 내지 13.9 μM mCyd에 이르렀다. 이와 대조적으로, 인터페론 알파 2b(IFN α2b)는 이 어세이에서 BVDV에 대해 활성적이나(EC<sub>50</sub> 2.6 IU/ml), 1000 IU/ml 에서조차도 바이러스를 2 log 이상으로 감소시키지 못했다. 따라서, BVDV에 대한 mCyd의 항바이러스 효과는 IFNα2b 또는 RBV 보다도 훨씬 크다.

**실시예 6 : 다른-포지티브-스트랜드 RNA 바이러스에 대한 시험관내 활성**

mCyd에 대해 BVDV 이외의 다른 포지티브-스트랜드 RNA 바이러스에 대한 효율을 시험하였다. 수득한 데이터를 표 9 및 10에 요약하여 나타냈다. 플라비바이러스에 대해, mCyd는 가장 활성적이었다. 두 부분으로부터 결정된 합성 EC<sub>50</sub>(μM) 범위는 다음과 같다: 웨스트 닐 바이러스(46-97); 황색열(9-80); 및 뎅기 바이러스(59-95). 알파 바이러스, 베네수엘라 말뚝염 바이러스에 대한 mCyd의 경우, EC<sub>50</sub> 값은 1.3-45 μM이었다. mCyd는 피코나바이러스, 예를 들어 폴리오 바이러스(EC<sub>50</sub> = 6 μM), 콕사키바이러스(EC<sub>50</sub> = 15 μM), 리노바이러스 타입 5 및 14(EC<sub>50</sub> = < 0.1 및 0.6 μg/ml) 및 리노바이러스 타입 2(EC<sub>50</sub> 2 - 10 μM)에 대해 광범위 활성을 나타내었다. mCyd는 일반적으로 포지티브-스트랜드 RNA 바이러스를 제외한 시험된 모든 RNA 및 DNA 바이러스에 대해 불활성이다. mCyd는 또한 MT-4 인간 T 림프구 세포에서 HIV 또는 HepG2.2.15 세포에서 HBV에 대해 활성이 없는 것으로 확인되었다.

표 9: 플러스-스트랜드 RNA 바이러스에 대한 mCyd의 시험관내 항바이러스 활성

어세이 방법	바이러스 타입	세포 타입	n	항바이러스 효율 (μM)		
				EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>	EC <sub>4log</sub>
세포 보호 어세이	BVDV NADL cp	MDBK	11	0.67 ± 0.22		
일드 감소 어세이	BVDV NADL cp	MDBK	3	2.77 ± 1.16	4.8 ± 1.55	13.9 ± 3.07
	BVDV	MDBK	6	0.30 ± 0.07	0.87 ± 0.18	6.03 ± 1.41

표 9 - 계속

	New York-1 ncp					
	BVDV I-NADL cp	MDBK	1	0.68	1.73	8.22
	BVDV I-N-dIns ncp	MDBK	1	0.59	1.49	7.14
플라크 감소 어세이	BVDV NADL cp	MDBK	3	2.57 ± 0.35	4.63 ± 0.72	
세포 보호 어세이	웨스트 닐 바이러스	BHK	3	63-97		
세포 보호 어세이	황색열 바이러스 17D	BHK	1	60-80		
	DENV-2	BHK	2	95		
세포 보호 어세이	DENV-4	BHK	1	59		
	폴리오 바이러스					
플라크 감소 어세이	Sb-1	VERO	1	6		
플라크 감소 어세이	콕사키 바이러스 B2	VERO	1	15		

cp, 세포변성 바이러스; ncp 비세포변성 바이러스

1-NADL cp 및 1-N-dIns ncp는 제조함 BVDV 바이러스를 나타낸다

표 10: mCyd의 시험관내 항바이러스 활성, 선택성 및 세포변성

바이러스 (세포주)	EC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (μM)	CC <sub>50</sub> <sup>c</sup> (μM)
WNV (Vero)	46	114-124
YFV (Vero)	9-30	150->200
VEE (Vero)	1.3-45	>200
HSV-1 (HFF) <sup>d</sup>	>100	>100
HSV-2 (HFF) <sup>d</sup>	>100	>100
VZV (HFF) <sup>d</sup>	>20	67.8
EBV (Daudi) <sup>d</sup>	25.5	>50
HCMV (HFF) <sup>d</sup>	9.9-15.6	67-73
MCMV (MEF)	>0.8	2.4
인플루엔자 A/H1N1 (MDCK)	>200	>200
인플루엔자 A/H3N2 (MDCK)	>20	45-65
인플루엔자 B (MDCK)	>200	55-140
아테노바이러스 타입 1 (A549)	>200	>200
파라인플루엔자 타입 3 (MA-104)	>200	>200
리노바이러스 타입 2 (KB)	2-10	>200
리노바이러스 타입 5 (KB) <sup>d</sup>	0.6	20-30
리노바이러스 타입 14 (HeLa-Ohio) <sup>d</sup>	<0.1	20->100
RSV 타입 A (MA-104)	>200	200
Punta Toro A (LLC-MK2)	>200	>200

a. HFF, 인간 포피 섬유모세포; Daudi, Burkitt's B-세포 림프종; MDCK, 개 신장 세포; CV-1, 아프리카 사바나 원숭이 신장 세포; KB, 인간 코인두암종; MA-104, 붉은털원숭이 신장 세포; LLC-MK2, 붉은털원숭이 신장 세포; A549, 인간 폐암종 세포; MEF, 마우스 배아 섬유모세포; Vero, 아프리카 사바나 원숭이 신장 세포; HeLa, 인간 자궁경부선암 세포.

b. EC<sub>50</sub> = 50% 유효 농도.

c. CC<sub>50</sub> = 50% 세포독성 농도.

d. 결과는 μM 이 아닌 μg/ml로 표시된다.

**실시예 7: 감염 다중도(MOI) 및 항바이러스성 효과**

BVDV 바이러스 양 증가가 mCyd의 EC<sub>50</sub>에 미치는 효과를 시험하기 위하여 세포 보호 어세이 포맷을 이용하였다. 이 어세이에서 BVDV의 감염 다중도(MOI)를 0.04 에서 0.16으로 증가시키면, mCyd의 EC<sub>50</sub>을 0.5μ 에서 약 2.2 μM로 선형적으로 증가시켰다.

**실시예 8: MCYD 처리 세포에서 바이러스 복구**

BVDV의 비세포변성 스트레인(스트레인 I-N-dIns)으로 영구 감염된 MDBK 세포에서 mCyd 처리 증지에 대한 효과를 시험하였다. 세포 계대 배양에서, 세포는 배지 1 ml당 감염 바이러스 입자를 대략 10<sup>6</sup> 내지 > 10<sup>7</sup>로 지속적으로 생성하였다. 비감염 MDBK 세포에 처리 MDBK(BVDV) 세포로부터의 배양 상등액을 첨가하고, BVDV-특이 항체로 면역염색하여 노출 후 생성된 바이러스 foci 수를 세어 상기 바이러스를 측정할 수 있다. 영구 감염된 세포주를 4 μM의 mCyd로 단일 세포 계대 배양(3 일)동안 처리하여 BVDV 역가치를 ml당 10<sup>7</sup> 감염 단위에 가까스로 모자르는 예비처리 및 대조 세포 수준으로부터 약 3 log<sub>10</sub>으로 감소시켰다. 이 시점에, mCyd 처리를 중지하였다. 단일 계대 배양에서, BVDV 역가치는 ml당 10<sup>7</sup> 감염 단위를 가까스로 초과하는 비처리 대조 수준으로 복구되었다.

**실시예 9: 작용 메커니즘**

표준 BVDV CPA 어세이에서, mCyd 처리는 세포가 성장함에 따라 BVDV의 세포변성 효과로부터 보호되는 총 세포 RNA 함량을 현저히 증가시켰다. 이는 mCyd에 기인하여 BVDV RNA 생성이 현저히 감소되는 것과 연관된다. 역으로, mCyd 부재하에, 총 세포 RNA는 세포변성 바이러스에 의해 세포가 사멸함으로써 BVDV RNA가 증가함에 따라 실질적으로 감소한다. 바이러스 및 세포 RNA에 대한 mCyd의 효과를 추가로 시험하기 위하여, 세포내 BVDV RNA 축적을 감염 18 시간후 MDBK 세포(대략 바이러스 복제 1회 사이클후)에서 실시간 RT-PCR로 모니터링하였다. 이와 함께, 세포 하우스키핑 리포솜성 단백질 mRNA(rig S15 mRNA)를 또한 특정 프라이머를 사용하여 RT-PCR로 정량하였다. 결과는 mCyd가 데노보-감염된 MDBK 세포에서 BVDV RNA 수준을 1.7 μM의 EC<sub>50</sub> 및 2.3 μM의 EC<sub>90</sub>으로 상당히 감소시킨 것으로 나타났다. 최대 바이러스성 RNA 감소는 시험된 가장 높은 저해제 농도(125 μM)에서 4 log<sub>10</sub>이었다. rig S15 세포성 mRNA 대조군의

수준에 대한 효과는 관찰되지 않았다. 이와 함께, 전술한 발견은 mCyd가 세포 RNA 함량에 영향없이 바이러스성 게놈 RNA 합성을 특이적으로 방해하여 BVDV를 저해함을 제시한다. 이러한 아이디어는 HepG2 세포에서 [<sup>3</sup>H]-유리딘 흡수로 측정되는 바, RNA 합성 저해가 높은 mCyd 농도(EC<sub>50</sub> = 186 μM)를 필요로 한다는 관찰(표 4a)에 의해 추가로 뒷받침된다.

정제된 BVDV NS5B RNA-의존성 RNA 폴리머라제(Kao, C. C., A. M. Del Vecchio, et al. (1999). "De novo initiation of RNA synthesis by recombinant flaviviridae RNA-dependent RNA polymerase." *Virology* 253 (1):1-7) 및 합성 RNA 템플레이트를 사용한 시험관내 연구에서, mCyd-TP는 RNA 합성을 IC<sub>50</sub> 0.74 μM으로 감소시켰고, 천연 CTP 기질에 대해 BVDV NS5B RNA-의존성 RNA 폴리머라제의 경쟁적인 저해제이었다. mCyd-TP에 대한 저해 상수(K<sub>i</sub>)는 0.16 μM이고, CTP에 대한 미카엘리스-멘텐(Michaelis-Menten) 상수(K<sub>m</sub>)는 0.03 μM이었다. mCyd-TP에 의한 RNA 합성 저해는 RNA 템플레이트에서 동일 기원의 G 잔기 존재를 필요로 한다. 템플레이트를 따라 전진하는 단일 G 잔기를 포함하는 일련의 짧은(21mer) 합성 RNA 템플레이트를 사용하여, CTP 부재하에서의 RNA 합성에 대한 mCyd-TP 효과를 좀 더 상세히 조사하였다. mCyd-TP 존재하에 이들 템플레이트로부터 생성된 새로이 합성된 전사물을 분석하여 RNA 연장이 G 잔기까지 계속되다가 중단됨을 알았다(도 2 참조). 복수개의 G 잔기를 함유하는 템플레이트에서, RNA 합성은 폴리머라제와 만나는 제 1 G 잔기에서 중단된다. 이러한 데이터는 m-Cyd-TP가 조건적(non-obligate) 사슬 종결제로 작용함을 강력히 시사한다. 이러한 명백한 사슬 종결 메커니즘이 추가로 조사중에 있다.

**실시예 10: 영구 BVDV 감염 근절**

BVDV의 비세포변성 스트레인(스트레인 I-N-dins)으로 영구 감염된 MDBK 세포에서 mCyd의 바이러스성 감염 근절 능력을 시험하였다(Vassilev, V. B. 및 R. O. Donis *Virus Res* 2000 69 (2): 95-107). 비처리 세포와 비교하여, 영구 감염된 세포를 16 μM의 mCyd로 처리하였더니 ml당 6 log 이상의 바이러스 생산이 두번의 세포 계대 배양(각 계대 배양마다 3 내지 4 일)에서 검출가능하지 않은 수준으로 감소되었다. 12회의 계대 배양을 통해 mCyd로 연속 처리시 더 이상의 바이러스 생성은 검출되지 않았다. 8, 9 및 10회 계대 배양(화살표, 도 3)에서, 일부 세포를 약물 부재하에 두번 더 계대 배양하여 mCyd-TP가 붕괴되고 바이러스 복제가 복구되도록 하기에 충분한 시간을 제공하였다. 처리된 MDBK(BVDV) 세포로부터의 배양 상등액을 비감염 MDBK 세포에 첨가하고, BVDV-특이 항체로 면역염색하여 노출후 생성된 바이러스 foci 수를 세어 세포로부터의 배양 배지를 바이러스 재출현에 대해 반복 시험하였다. 이러한 여세이로 단일 바이러스 입자를 검출할 수 있다 하더라도, 약물 처리후 세포로부터 바이러스는 출현하지 않았다. 따라서, mCyd로 8회 이상 계대 배양 처리하는 것이 영구 감염 세포로부터 바이러스를 제거하는데 충분하다.

**실시예 11: 인터페론 알파 2B와의 병용 시험**

BVDV의 New York-1(NY-1) 스트레인으로 영구 감염된 MDBK 세포에서 첫번째 조사를 수행하여 mCyd(8 μM) 또는 인터페론 알파 2b(200 IU/ml)의 단일 요법 효과를 두가지 약물을 배합한 효과와 비교하였다(도 4a). 이 실험에서, 8 μM의 mCyd는 단독으로 1회 계대 배양후 바이러스 역가치를 약 3.5 log<sub>10</sub>으로 2회 이상 계대 배양동안 유지되는 수준으로 감소시켰다. 인터페론 알파 2b는 단독으로 데노보 BVDV 감염에 활성적임에도 불구하고 영구 BVDV 감염에 대해 실질적으로 불활성적이었다(바이러스 역가가 약 0.1 log<sub>10</sub> 감소). 그러나, mCyd와 인터페론 알파 2b를 조합시 2회 계대 배양에 의해 바이러스를 검출가능하지 않은 수준으로 감소시켰으며, 이는 단일요법보다 훨씬 효과가 우수함을 나타낸다.

BVDV의 I-N-dins 비세포변성 스트레인으로 영구 감염된 MDBK 세포의 연속 시험(도 4b)으로, mCyd를 0, 2, 4 및 8 μM의 고정 용량으로 공급하고, 인터페론 알파 2b를 ml당 0 내지 2,000 IU로 적정하였다. 또 다시, 인터페론 알파 2b는 실질적으로 불활성적인 반면(바이러스 역가에서 0.1 log 감소), mCyd 단독은 용량-의존적인 방식으로 BVDV(스트레인 I-N-dins) 증식을 억제하였다. 8 μM의 mCyd는 바이러스 생성을 6.2 log<sub>10</sub>로 거의 백그라운드 수준으로 감소시켰다.

**실시예 12: 내성 출현**

초기 세포 배양 연구에서, mCyd 존재하에 MDBK 세포에서 BVDV의 세포변성 스트레인을 반복 계대 배양한 것은 내성 돌연변이체를 제공하는데 실패하였으며, 이는 mCyd-내성 BVDV 돌연변이체 분리가 어렵다는 것을 시사한다. 그러나, BVDV의 비세포변성 형으로 영구 감염된 세포주에서의 연구에 따라, mCyd로 약물의 차선적인 치료 농도(실험에 따라 2 내지 8 μM)로 비교적 장기간 처리시에 내성 바이러스를 분리하기에 이르렀다. 도 5a에 도시된 대표적인 실험에서, 바이러스는 8 μM의 mCyd 존재하에 2회 계대 배양후 더 이상 검출되지 않았으나, 6회 계대 배양으로 재출현하였다. 데이터로부터 더 낮은 역가치의 재출현 바이러스임이 명백하다: 내성 바이러스는 전형적으로 야생형 바이러스에 비해 10 배 이상 낮은 역가치를 가지며 인트론 A와의 공동 치료로 용이하게 억제된다(도 5a). 재출현한 바이러스의 표현형은 초기 야생형 바이러스와 상당히 달라져 있었다: 도 5b에 도시된 바와 같이, 훨씬 적은 foci(전형적으로 야생형 바이러스 직경보다 3 내지 10 배 작은)를 제공하였다. 이러한 표현형은 저해제 존재하에 장기간(적어도 72 일) 계대 배양후 변화되지 않았으나, 처리 중지후 바로 야생형 표현형(대형 foci)으로 복구되었다.

내성 돌연변이체의 RT-PCR 시퀀싱을 이용하여 내성에 관여하는 돌연변이를 동정하였다. 뉴클레오사이드 저해제 표적인 것으로 추정되는 BVDV의 NS5B RNA의존성 RNA 폴리머라제 영역에 시퀀싱 초점을 맞추었다. 폴리머라제의 고도로 보존된 B 도메인 모티프의 개시 시점에 특이적 S405T 아미노산 치환이 동정되었다. B 도메인은 폴리머라제 활성 영역의 일부이며, 뉴클레오사이드 결합에 관여하는 것으로 판단된다(Lesburg, C. A., M. B. Cable, et al. *Nature Structural Biology* 1999 6 (10): 937-43). 뉴클레오사이드에 대한 내성을 HBV와 같은 다른 바이러스에 대한 상기 도메인에 맵핑하였다(Ono et al, *J Clin Invest.* 2001 Feb; 107 (4): 449-55). 이러한 돌연변이가 관찰된 내성에 관여하는지를 확인하기 위하여, 돌연변이를 BVDV의 재조합 분자 클론 백본에 재도입하였다. 생성된 클론은 분리된 돌연변이체 바이러스와 표현형 성질에 있어서 차이가 없었으며, 이로부터 S405T 돌연변이가 내성에 관여하고 NS5B RNA-의존성 RNA 폴리머라제가 mCyd에 대한 분자 표적임을 확신할 수 있다. 뉴클레오타이드 시퀀스에서 고도로 보존된 이러한 모티프의 성질(Lai, V. C., C. C. Kao, et al. *J Virol* 1999 73 (12): 10129-36) 및 포지티브-스트랜드 RNA 바이러스중에 구조적 수준(HCV 포함)은 HCV NS5B RNA-의존성 RNA 폴리머라제에서 등가 수준의 돌연변이가 아마도 S282T임을 예측하도록 한다.

S405T 돌연변이체 BVDV는 시험된 최고 농도 이하의 mCyd( $EC_{50} > 32 \mu M$ )에 내성적이었으나, 또한 야생형 바이러스에 비해 생존성이 상당히 손상되었다. 상기 언급된 바와 같이, S405T 돌연변이체는 야생형 BVDV 보다 1-2  $\log_{10}$  낮은 역가치를 나타내었으며, 훨씬 적은 바이러스 플라크를 생성하였다. 또한, 돌연변이체 바이러스는 단일 복제 사이클 속도를 현저히 낮추었으며(12시간에 > 1000-배 낮은 바이러스 역가치), 심지어 36 시간 복제후 야생형 바이러스보다 약 100 배 낮은 수준으로 누적되었다(도 5c). 바이러스는 또한 약물 중단시 야생형 바이러스로 빠르게 복구되었다. 마지막으로, 돌연변이체는 또한 도 5d에 도시된 바와 같이, 야생형보다 IFN 알파 2b 처리에 민감하였다(~40 배).

약물 존재하에 S405T 돌연변이체 바이러스를 추가 계대 배양하여 두번째 돌연변이 C446S를 관찰하였다. 이러한 돌연변이는 BVDV NS5B RNA-의존성 RNA 폴리머라제의 C 도메인에서 필수 GDD 모티프에 앞서 즉시 나타났다. 예비 시험으로부터 두개의 돌연변이를 가지는 바이러스가 S405T 돌연변이체보다 상당히 복제되지 않는 것을 알 수 있으며, 따라서 바이러스 적응도에 대한 이러한 돌연변이의 관여는 명확하지 않은 것으로 남아 있다.

**실시예 13: 동물 효과 모델에서 VAL-MCYD의 생체내 항바이러스 활성**

HCV로 만성 감염된 침팬지는 인간 환자의 HCV 감염에 대한 가장 널리 허용되고 있는 동물 모델이다(Lanford, R. E., C. Bigger, et al. *Jar J* 2001 42 (2): 117-26; Grakoui, A., H. L. Hanson, et al. *Hepatology* 2001 33 (3): 489-95). 만성 C형 간염 바이러스 감염의 침팬지 모델에서 val-mCyd를 경구 투여한 단일 생체내 시험을 수행하였다.

Southwest Foundation Primate Center에서 직원에 안정성 위험이 있는 지를 확인하기 위해 시설에서 모든 동물의 질병 상태를 조사하도록 설계된 위탁 국제 건강 보존 프로그램 일부로 다섯마리의 침팬지에 대한 HCV 유전형 조사를 수행하였다. 본 시험에 사용된 다섯마리의 침팬지는 1 HCV 유전형을 다른 모든 유전형과 구별하나, 유전형 1a와 1b를 구별하지 못하는 유전형 RT-PCR 어세이에서 높은 HCV 역가를 나타내었다. 이는 본 시험에 사용된 침팬지가 유전형 1 HCV(HCV-1)로 감염되었음을 제시한다.

표 11: 만성 HCV 감염 침팬지 모델에서 Val-mCyd 생체내 활성 조사에 대한 요약

조사 내역	종 (N)	Val-mCyd 투여량 (mg/kg)(n)	투여 회수/ 경로	조사 종료점
만성 C형 간염 바이러스 (유전형 1)-감염된 침팬지에서 mCyd의 1주간 항바이러스 활성	침팬지 (5)	10 및 20(각 2) [유리 염기의 8.3 및 16.6 mpk에 상당] 및 비히클 대조군(1)	QD x 7일 (PO)	혈청 HCV RNA, 혈청 화학, CBCs, 일반적인 건강한 삶 및 임상적 관찰

**만성 C형 간염 바이러스 감염의 침팬지 모델에서 7 일간 항바이러스 활성 조사**

네마리의 침팬지(10 mg/kg/day 또는 20 mg/kg/day로 그룹당 두마리)에 향이 풍부한 과일 음료 비히클에 새로이 용해시킨 val-mCyd 디하이드로클로라이드를 투여하였다. 이들 용량은 각각 val-mCyd 유리 염기의 8.3 및 16.6 mg/kg/day에 상당한다. 비히클을 단독으로 투여한 다섯번째 침팬지에는 대조 위약을 제공하였다. 이 시험의 디자인은 처리 1주동안 바이러스 적재의 베이스라인 변동 및 3회 출혈(치료 2, 5 및 7일째)을 확립하여 항바이러스 효과를 평가하는 3회 예비처리 출혈을 포함한다. 1 주 투여 만료시에 분석을 완료하고, 더 이상 수행하지 않았다.

**HCV RNA 결정**

조사내내 HCV RNA의 혈청 수준을 두 임상 병원 실험실에서 독립적으로 결정하였다. HCV RNA는 정량적 RT-PCR 핵산 증폭 시험을 이용하여 분석하였다(Roche Amplicor HCV Monitor Test, version 2.0). 이 분석은 검출 하한(LLOD)이 600 IU/mL 이고 선형 범위가 600-850,000 IU/mL이었다.

치료동안 나타나는 바이러스 적재 감소를 해석하는데 도움을 주기 위해, (i) 개별 동물에서 베이스라인 HCV 바이러스 적재 변동도, 및 (ii) HCV 바이러스 적재 분석의 고유 생존성 및 재현성을 결정하는데 주력하였다. 이러한 이슈에 중점을 두어, 두 실험실로부터 얻은 모든 바이러스 적재 데이터를 비교하였다. 두 실험실로부터 얻은 결과는 예비처리 HCV 바이러스 적재의 안정성뿐 아니라 HCV Roche Amplicor 어세이의 신뢰성에 확신이 가고, 이들 서로가 매우 필적할만한 것으로 나타났다. 조사의 가장 균형을 이루는 검증을 위해, 두 데이터 세트를 조합하여 구한 평균값을 사용하여 도 6 및 7에 도시된 결과를 도출하였다. 도 6은 용량 코호르트(cohort)에 대한 평균 데이터를 나타내고, 도 7은 개별 동물 데이터를 나타낸다. 각 동물에 대해 각 실험실에서의 치료동안 보여진 베이스라인으로부터의 바이러스 적재량 변화를 표 12에 요약하여 나타내었다.

두 실험실로부터의 HCV 바이러스 적재량 분석은 예비처리 HCV 바이러스 적재가 (i) 다섯마리 모든 동물 및 모든 3 투여량 그룹에서 매우 유사하고, (ii) 3-주 예비처리 기간에 걸쳐 매우 안정함을 나타낸다. 다섯마리 개별 동물중에서 평균 예비처리  $\log_{10}$  바이러스 적재 및 표준 편차는  $5.8 \pm 0.1$ (실험실 1) 및  $5.6 \pm 0.1$ (실험실 2)이었다. 이들 데이터는 어세이의 c. v.(편차 계수)가 두 실험실에서 불과 약 2%임을 나타낸다. 예비처리동안 동물에서 보여진 HCV 바이러스 적재량의 가장 큰 변동은 약  $0.3 \log_{10}$  이었다.

도 6 및 7에서 알 수 있는 바와 같이, val-mCyd를 하루 한번 경구 전달하면 위약 동물에서나 예비처리동안 관찰되지 않는 신속한 항바이러스 효과를 얻을 수 있었다. 바이러스 역가는 val-mCyd를 수용한 모든 동물에서 이들 치료후 베이스라인

으로부터 실질적으로 감소되었으며, 두개의 처리 팔에서 연속 치료 범위에 속해 있었다. 치료 종료(7 일)시, 베이스라인 HCV 바이러스 적재량으로부터의 평균 감소는 8.3 및 16.6 mg/kg/day 투여량에 대해 각각 0.83 log<sub>10</sub> 및 1.05 log<sub>10</sub> 이었다. 위약 동물의 적재량은 처리 기간동안 베이스라인으로부터 실질적으로 변화되지 않고 남아 있었다.

치료에 응답한 베이스라인 HCV 바이러스 적재량의 변화에 대한 두 정량화 실험실로부터의 데이터 분석을 표 12에 나타내었다. 종합적으로, 두 데이터 세트는 잘 일치하였으며, 이는 어세이의 신뢰성을 확신시키는 것이다. 동물 501을 제외하고, 두 실험실간 바이러스 적재량 차이는 일반적으로 0.3 log<sub>10</sub> 이하이며, 이는 예비처리기간동안 관찰된 변동과 유사하다. 동물 501의 경우, 0.5 log<sub>10</sub> 에 근접하여 불일치가 있었다. 치료에 응답하여 나타난 바이러스 적재량 강하는 0.436(동물 501, 실험실 1)에서 1.514 log<sub>10</sub>(동물 497, 실험실 2)로 다양하였다. 후자는 ml당 535,000(예비처리) 내지 16,500(7 일) 계놈의 HCV 바이러스 적재량 변화에 상당한다.

표 12: 치료동안 베이스라인 Log<sub>10</sub> HCV RNA 바이러스 적재량 변화에 대한 요약

투여량 (mpk)	동물 ID	실험실	2 일	5 일	7 일
0	499	1	-0.00041	-0.11518	0.14085
		2	-0.06604	0.10612	-0.16273
8.3	500	1	-1.15634	-0.40385	-0.80507
		2	-1.07902	-0.55027	-1.06259
8.3	501	1	-0.25180	-0.36179	-0.43610
		2	-0.45201	-0.71254	-0.90034
16.6	497	1	-0.72148	-0.90704	-1.27723
		2	-0.85561	-1.01993	-1.51351
16.6	498	1	-0.29472	-0.28139	-0.60304
		2	-0.65846	-0.55966	-0.69138

mCyd에 대한 침팬지 노출

제한적인 HPLC 분석을 수행하여 val-mCyd 투여후 침팬지 혈청에 도달한 mCyd 농도를 결정하였다. 투여 2 및 5일에 투여 1 내지 2 시간후 채취한 혈청에서, 처리 동물의 mCyd 수준은 전형적으로 2.9 내지 12.1 µM(각각 750 및 3100 ng/mL) 이었다. 예비처리 혈청 또는 위약 대조 혈청에서 mCyd는 검출되지 않았다. 최종 투여 24 시간내에, mCyd의 혈청 수준은 0.2 내지 0.4 µM(각각 50 및 100 ng/mL)이었다. 사용된 방법이 mUrd에 대해 0.4 µM(100 ng/mL)의 정량 하한을 가지더라도, 혈청 샘플에서 mUrd는 검출되지 않았다.

만성 HCV 감염의 침팬지 모델에서 mCyd 안정성

조사기간동안 훈련된 수의사가 침팬지의 체중 감소, 체온, 식이 및 일반적인 건강한 삶, 혈액의 화학적 프로파일 및 CBC를 모니터링하였다. 약물에 의한 부작용은 주목할만 하지 않았다. 약물은 처리된 네마리 동물 모두에게 잘 받아들여진 것처럼 보였다. 조사기간동안 다섯마리 모두 약간의 체중 감소를 나타내었으며, 약간의 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) 상승을 나타내었으나, 이는 조사 약물에 의한 것이기 보다는 사용된 진정제와 관련하여 나타나는 일반적인 현상이다. 알려진 아미노트랜스퍼라제(ALT)를 겪은 단일 동물이 투여 시작전 예비처리기간에 발적하였으나, ALT 수준은 처리동안 감소되었다. 즉, 분리된 ALT는 약물에 기인하지 않는다.

실시예 14: 시험관내 대사

인간 혈장에서 val-mCyd 및 mCyd의 안정성을 결정하기 위한 조사가 수행되었다. Val-mCyd를 0, 21 또는 37 °C에서 인간 혈장에서 배양하고, 샘플을 최대 10 시간동안 다양한 시점에 분석하였다(도 8). 37 °C에서, val-mCyd는 mCyd로 효과적으로 전환되었으며, 10 시간후 투입된 val-mCyd의 2% 만이 존재하였다. 37 °C에서 인간 혈장중 val-mCyd의 시험관내 반감기는 1.81 시간이었다. 인간 혈장에서 mCyd의 시험관내 안정성 조사 또는 인간 사이티딘/데옥시사이티딘 데아미나제 효소가 풍부한 조 제제로 처리시에, mCyd는 실질적으로 변하지 않은 상태로 남아 있었으며, 37 °C에서 배양후 초래되는 mCyd의 유리딘 유도체(mUrd)로 탈아민화되지 않았다. 사마나 및 사이노몰로구스 원숭이 혈장에서만 제한적인 탈아민화가 관찰되었다. 대조 사이티딘 유사체가 집중적으로 탈아민화되는 조건하에서, mCyd를 사이노몰로구스 원숭이 혈장에서 37 °C로 배양하고 24 및 48 시간후에 각각 6.7 및 13.0%의 mUrd 탈아민화가 이루어졌다.

mCyd 및 mUrd의 TP 유도체 이외에, 소량, 대략 상응하는 TP의 10% 양의 mCyd-5'-디포스페이트, mCyd-DP가 세 세포 타입 모두에서 관찰되었다. 두 세포 타입, 일차 인간 간세포 및 MDBK 세포에서만 보다 적은 양의 mUrd-DP가 검출되었다. 모노포스페이트(MP) 대사물은 모든 타입에서도 검출되지 않았다. 미량의 세포내 mUrd도 존재하지 않았으며, 이는 다른 사이티딘 유사체의 세포 대사에 보여지는 5'-디포스포콜린 종과 같은 리포뉴클레오타이드 대사물이 형성되지 않음을 입증하는 것이다.

도 9는 HepG2 세포를 10 µM [<sup>3</sup>H]-mCyd에 24 시간동안 노출후 결정된 mCyd-TP의 프로파일 붕괴를 나타낸다. mCyd-TP의 결보기 세포내 반감기는 HepG2 세포에서 13.9±2.2 시간이고, MDBK 세포에서 7.6±0.6 시간이었다. 데이터는 mUrd-TP의 반감기를 산출하는데 적합치 않다. 인간 간암세포에서 mCyd-TP의 긴 반감기는 HCV 치료에 대한 임상 시험에서 val-mCyd의 1일 1회 투여가 유효함을 입증한다. 도 9c의 HepG2 세포에서 보여진 바와 같이, mCyd의 포스

포틸화는 모든 세 세포 타입에서 50  $\mu\text{M}$  의 약물에 이르기까지 용량-의존적인 방식으로 일어난다, 상기 언급된 특이적인 차이 이외에, 일차 인간 간세포에서 검출된 포스포틸화 패턴은 HepG2 또는 MDBK 세포를 사용하여 수득한 것과 정량적으로 유사하다.

**mUrd 관여**

세포내 활성 부위, mCyd-TP 이외에, 상이한 종으로부터의 세포는 세포내 mCyd 종의 탈아민화를 통해 가변적인 보다 적은 양의 제 2의 트리포스페이트, mUrd-TP를 생성하는 것으로 나타났다. BVDV NS5B RNA-의존성 RNA 폴리머라제에 대한 mUrd-TP의 활성은 현재까지 시험되지 않았으나, 계획중이다. 현재까지, mUrd의 세포독성 및 항바이러스 효과에 대한 실질적인 세포배양 조사로부터의 데이터는 mUrd가 (a) BVDV에 대해 mCyd 보다 약 10 배 덜 효과적이고; (b) 다른 광범위 스펙트럼의 바이러스에 대해 실질적으로 항바이러스 활성을 나타내지 않으며; (c) 각종 세포독성 시험(골수 어세포, 미토콘드리아 기능 어세포 및 세포 핵산으로의 도입)에서 고농도로 시험시에 네거티브적임을 제안한다. 이러한 결과에 비추어, mCyd의 종합적인 항바이러스 활성 또는 세포독성 프로파일에 대한 mUrd 기여는 아마도 미약한 것으로 보여진다. 원숭이에서 val-mCyd로 수행된 아만성 조사로부터 mCyd가 mUrd로 대사시에 독물학적 적용 범위는 광대하다.

**실시예 15: 대사 활성에 대한 세포 경로**

mCyd의 포스포틸화에 관여하는 효소 성질을 기질 경쟁 실험으로 조사하였다. 사이티딘(Cyd)은 Cyd가 Cyd-5'-모노포스페이트(CMP)로 전환하는데 관여하는 피리미딘 구조 효소인 사이토솔릭 유리딘-사이티딘 키나제(UCK)의 천연 기질이다. mCyd의 mCyd-TP로의 세포내 포스포틸화는 사이티딘 또는 유리딘의 존재하에 사이티딘에 대해  $19.17 \pm 4.67 \mu\text{M}$  및 유리딘에 대해  $20.92 \pm 7.10 \mu\text{M}$ 의  $\text{EC}_{50}$  값으로 용량-의존적인 방식으로 감소하였다. 반면, 효소 테옥시사이티딘 키나제(dCK)에 대한 기질인 테옥시사이티딘은  $\text{EC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ 으로 mCyd-TP 형성에 거의 효과가 없었다. 테옥시사이티딘이 아닌 사이티딘 및 유리딘 둘다에 의한 mCyd-TP 포스포틸화 저해는 mCyd가 피리미딘 구조 효소, 유리딘-사이티딘 키나제에 의해 포스포틸화됨을 시사한다(Van Rompay, A. R., A. Norda, et al. *Mol Pharmacol* 2001 59 (5): 1181-6). 또한, mCyd 활성화에 키나제의 제안된 역할을 확신하기 위한 조사가 요구된다.

**실시예 16: mURD-TP의 세포내 생합성 경로**

상술한 바와 같이, mUrd-TP는 상이한 종으로부터 세포에서 다양한 정도로 일어나는 중요치 않은 대사물이다. mUrd는 탈아민화 활성이 결여된 세포 배지에서 관찰되지 않기 때문에, mUrd는 mCyd의 세포외 탈아민화를 경유하여 유래되지 않는다. 세포의 대사 데이터는 mUrd-TP가 세포내 mCyd 종의 생체변환을 통해 야기되는 아이디어와 일치한다. 공지된 리보뉴클레오사이드 대사 경로를 고려하여 아마도 대부분의 경로는 두개의 상이한 탈아민화 효소에 의해 두개의 mCyd 종중 하나의 탈아민화를 포함할 것임을 시사한다: 사이티딜레이트 데아미나제(예컨대 테옥시사이티딜레이트 데아미나제, dCMPD)에 의한 mCyd-MP, 또는 사이티딘 데아미나제(CD)에 의한 mCyd. 추가의 포스포틸화 단계로 mUrd-TP가 초래된다. 이러한 가능성이 추가로 조사중에 있다.

**실시예 17: VAL-MCYD의 임상적 평가**

기준에 적절한 환자를 약물 투여 첫날인 베이스라인(1 일)에 무작위로 추출하여 조사하였다. 각 투여 코호트는 12 명의 환자로, 약물 또는 매칭하는 위약 처리에 대한 비율을 10:2 비율로 무작위로 나누었다. 1, 2, 4, 8, 11 및 15일에 환자가 연구 센터를 왕진하여 프로토콜 평가를 받았다. 15일후, 조사 약물을 중단하였다. 그후, 환자를 16, 17, 22 및 29일에 왕진하도록 하였다. 모든 환자에 대해 처리 첫째날 및 마지막날(1 및 15일)에 굵은 상태로 약물동력학적 샘플링을 시행하였다.

- (i) 15일에 HCV RNA 수준이 베이스라인으로부터  $\geq 1.0 \log_{10}$ 로 감소하는 환자 비율, (ii) 혈청 HCV RNA 수준에서  $\geq 1.0 \log_{10}$ 로 감소하는 시간, (iii) 1일에서 15일까지 HCV RNA 수준의 변화, (iv) 1일에서 29일까지 HCV RNA 수준의 변화, (v) 29일까지 혈청 HCV RNA 수준이 베이스라인으로 복구되는 환자 비율, 및 (vi) 1일에서 15일까지 HCV RNA 변화에 대한 val-mCyd 용량 관계에 의해 val-mCyd의 항바이러스 효과를 평가하였다.

**Val-mCyd의 점증적 용량을 경구 투여한 후 mCyd의 임상적 약물동력학**

1일에 최초 투여하고 15일에 마지막으로 투여한 후 8 시간에 걸쳐 약물동력학을 평가하고, 2, 4, 8, 11 및 16일에 24 시간 최저치, 및 17일에 48시간 최저치를 모니터링하였다. mCyd, mUrd 및 Val-mCyd의 혈장 농도를 HPLC/MS/MS 방법으로 측정하였다(20 ng/ml에서 정량 하한선(LOQ)).

비구획화 접근으로 mCyd의 약물동력학을 분석하였다. 하기 표에 나타난 바와 같이, 주요 약물동력학 파라미터는 1 및 15일에서 서로 필적할만 하였으며, 이는 반복 투여후 약물이 혈장에 축적되지 않음을 나타내는 것이다. 혈장 노출은 또한 용량에 선형 함수인 것으로 나타났다. 이후 표로부터 알 수 있는 바와 같이, 약물 노출의 주요 약물동력학 파라미터( $C_{\text{max}}$  및 AUC)는 용량이 50 에서 100 mg으로 점차적으로 확대됨에 따라 두배로 되었다.

**표 13: mCyd 50 mg 에서 약물동력학적 파라미터**

파라미터	C <sub>max</sub>	T <sub>max</sub>	AUC <sub>0-inf</sub>	t <sub>1/2</sub>
	(ng/ml)	(h)	(ng/ml×h)	(h)
1일				
평균	428.1	2.5	3118.7	4.1
SD	175.5	1.1	1246.4	0.6
CV %	41.0	43.2	40.0	13.8
15일				
평균	362.7	2.2	3168.4	4.6
SD	165.7	1.0	1714.8	1.3
CV %	45.7	46.9	54.1	28.6

표 14: mCyd 100 mg 에서 약물동력학적 파라미터

파라미터	C <sub>max</sub>	T <sub>max</sub>	AUC <sub>0-inf</sub>	t <sub>1/2</sub>
	(ng/ml)	(h)	(ng/ml×h)	(h)
1일				
평균	982.1	2.6	6901.7	4.4
SD	453.2	1.0	2445.7	1.1
CV %	46.1	36.2	35.4	25.2
15일				
평균	1054.7	2.0	7667.5	4.2
SD	181.0	0.0	1391.5	0.5
CV %	17.2	0.0	18.1	11.7

mCyd 50 및 100 mg에서 1일 및 15일에서의 평균 혈장 키네틱 프로파일을 도 10에 도시하였다.

요약하여 나타내면, val-mCyd의 경구 투여후, 모 화합물 mCyd는 HCV-감염 대상체의 혈장에서 검출가능하였다. mCyd는 이들 대상체에서 조사된 두 용량 수준에 걸쳐 선형 혈장 약물동력학을 나타내었다. 조사된 용량에서 매일 투여하고 15일 후 대상체의 혈장에서 mCyd는 추적하지 않은 것으로 나타났다.

HCV-감염 환자에서 15 일간 Val-mCyd를 50 mg/day로 투여하기 시작하여 점진적으로 늘려나가는 방식으로 경구 투여 후 mCyd의 항바이러스 활성

폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 방법을 이용하는 Amplicor HCV Monitor<sup>TM</sup> 어세이 v2.0(Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA)로 혈청 HCV RNA 수준을 결정하였다. 이 어세이의 정량 하한선(LLOQ)은 약 600 IU/mL인 것으로 추정되었으며, 이 어세이의 정량 상한선(ULOQ)은 500,000 IU/mL로 추정되었다.

HCV RNA의 혈청 샘플을 선별(-42일 - -7일)하여 조사에 적합한지를 결정하였다. 선별된 혈청 HCV RNA 값은 중앙 연구 실험실에서 Amplicor HBV Monitor<sup>TM</sup> 어세이에 의한 바,  $\geq 5 \log_{10}$  IU/mL이었다.

조사 당일, HCV RNA 혈청 샘플을 베이스라인(1일)으로 취득하고, 베이스라인후 프로토콜에 약속한 조사일에 왕진하였다 (2, 4, 8, 11, 15, 16, 17, 22 및 29일). 조사일로부터 서둘러 중단한 환자를 프로토콜에 약속한 왕진일에 왕진하여 HCV RNA 혈청 샘플을 또한 수집하였다.

조사 진행중 최초 두 코호르트(50 및 100 mg/일)에 대한 항바이러스 활성을 하기 표 및 그래프에 요약하여 나타내었다. 투여 기간이 짧고(15 일), 최초 투여 용량이 낮음에, 감염 환자의 혈장에서 HCV RNA 수준에 뚜렷한 효과가 있었다.

표 15: HCV RNA의 통계 요약(Log<sub>10</sub> 스케일)

		일										
		-1	1	2	4	8	11	15	16	17	22	29
처리												
위약	N	6	5	5	4	4	4	4	4	3	4	3
	중간	6.45	6.25	6.25	6.52	6.42	6.28	6.58	6.51	6.64	6.35	6.61
	평균	6.45	6.28	6.40	6.48	6.36	6.34	6.54	6.52	6.50	6.40	6.40
	StdErr	0.25	0.12	0.15	0.18	0.24	0.16	0.11	0.19	0.31	0.23	0.30
50 mg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	중간	6.81	6.69	6.58	6.55	6.56	6.46	6.57	6.45	6.54	6.73	6.67
	평균	6.72	6.72	6.60	6.56	6.62	6.47	6.57	6.57	6.54	6.64	6.71
	StdErr	0.11	0.11	0.12	0.06	0.10	0.09	0.08	0.11	0.08	0.10	0.09
100 mg	N	11	10	10	10	9	10	10	9	9	10	4
	중간	6.75	6.93	6.80	6.46	6.59	6.56	6.41	6.40	6.72	6.66	6.71
	평균	6.60	6.68	6.52	6.43	6.42	6.36	6.30	6.23	6.65	6.53	6.67
	StdErr	0.16	0.24	0.23	0.21	0.24	0.22	0.22	0.23	0.16	0.18	0.17

표 16: 베이스라인(1일)으로부터의 변화에 대한 통계 요약(Log<sub>10</sub>HCV RNA)

		일									
		2	4	8	11	15	16	17	22	29	
처리											
위약	N	5	4	4	4	4	4	3	4	3	
	중간	0.17	0.21	0.15	0.08	0.31	0.21	0.27	0.17	0.09	
	평균	0.12	0.22	0.10	0.08	0.28	0.25	0.15	0.14	0.09	
	StdErr	0.09	0.12	0.16	0.06	0.15	0.10	0.18	0.09	0.16	
50 mg	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	중간	-0.07	-0.13	-0.06	-0.26	-0.10	-0.13	-0.21	-0.09	-0.04	
	평균	-0.13	-0.16	-0.11	-0.26	-0.15	-0.15	-0.18	-0.09	-0.01	
	StdErr	0.05	0.07	0.05	0.06	0.08	0.05	0.07	0.06	0.10	
100 mg	N	10	10	9	10	10	9	9	10	4	
	중간	-0.12	-0.24	-0.20	-0.28	-0.43	-0.49	-0.24	-0.19	-0.12	
	평균	-0.16	-0.25	-0.21	-0.32	-0.38	-0.39	-0.18	-0.15	0.13	
	StdErr	0.07	0.10	0.16	0.13	0.12	0.14	0.15	0.13	0.28	

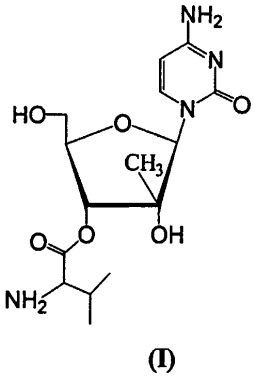
도 11은 왕진에 따른 베이스라인으로부터의 중간 변화를 Log<sub>10</sub> HCV RNA로 도시한다.

본 발명이 실시예로 상세히 설명되었다. 당업자들은 이들 실시예가 한정하기 위한 것이 아니며, 상세한 설명이 본 발명의 정신 및 영역을 벗어나지 않고 변경될 수 있음을 알 수 있을 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염:

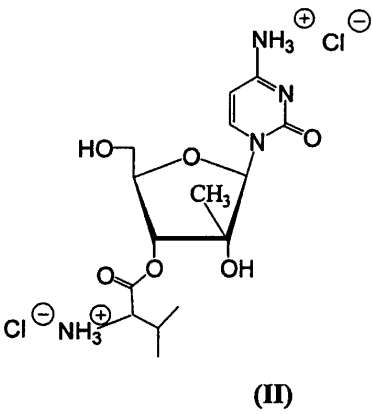


청구항 2.

제 1 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 하이드로클로라이드 염인 화합물.

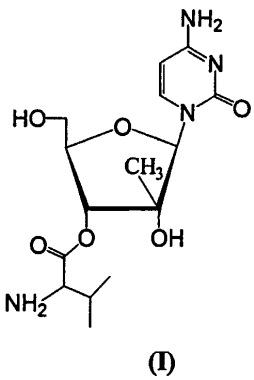
청구항 3.

제 1 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 화학식 (II)의 디하이드로클로라이드 염인 화합물:



청구항 4.

약제학적으로 허용되는 담체중에 플라비비리다에 감염을 치료하기에 유효한 양의 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 약제학적 조성물:



청구항 5.

제 4 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 하이드로클로라이드 염인 약제학적 조성물.

**청구항 6.**

제 4 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 디하이드로클로라이드 염인 약제학적 조성물.

**청구항 7.**

제 4 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체가 경구 전달에 적합한 것인 약제학적 조성물.

**청구항 8.**

제 4 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 9.**

제 8 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제가 인터페론, 리바비린, 인터류킨, NS3 프로테아제 저해제, 시스테인 프로테아제 저해제, 페난트레퀴논, 티아졸리딘 유도체, 티아졸리딘, 벤즈아닐리드, 헬리카제 저해제, 폴리머라제 저해제, 뉴클레오타이드 유사체, 글리오톡신, 세물레닌, 안티센스 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오타이드, IRES-의존성 해독 저해제 및 리보자임으로 구성된 그룹중에서 선택되는 약제학적 조성물.

**청구항 10.**

제 8 항에 있어서, 제 2 제제가 인터페론인 약제학적 조성물.

**청구항 11.**

제 8 항에 있어서, 제 2 제제가 폐길화 인터페론 알파 2a, 인터페론 알파콘-1, 천연 인터페론, 알부페론, 인터페론 베타-1a, 오메가 인터페론, 인터페론 알파, 인터페론 감마, 인터페론 타우, 인터페론 델타 및 인터페론 감마-1b로 구성된 그룹중에서 선택되는 약제학적 조성물.

**청구항 12.**

제 8 항에 있어서, 제 2 제제가 인터페론 알파 2인 약제학적 조성물.

**청구항 13.**

제 4 항에 있어서, 화합물이 복용 단위형인 약제학적 조성물.

**청구항 14.**

제 13 항에 있어서, 복용 단위형이 0.01 내지 50 mg의 화합물을 함유하는 약제학적 조성물.

**청구항 15.**

제 13 항에 있어서, 복용 단위형이 정제 또는 캡셀제인 약제학적 조성물.

**청구항 16.**

제 4 항에 있어서, 화합물이 실질적으로 순수한 형태인 약제학적 조성물.

**청구항 17.**

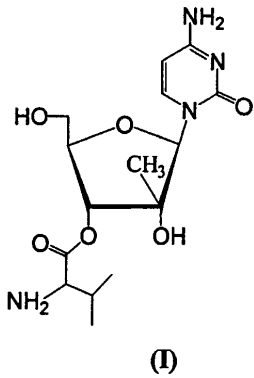
제 1 항 내지 3 항중 어느 한항에 있어서, 화합물이 적어도 90 중량%의 β-D-이성체인 약제학적 조성물.

**청구항 18.**

제 1 항 내지 3 항중 어느 한항에 있어서, 화합물이 적어도 95 중량%의 β-D-이성체인 약제학적 조성물.

**청구항 19.**

임의로 약제학적으로 허용되는 담체중의 유효량의 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 또는 프로드럭을 이를 필요로 하는 숙주에 투여함을 특징으로 하여, 플라비바이러스 또는 페스티바이러스로 감염된 숙주를 치료하는 방법.



**청구항 20.**

제 19 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 하이드로클로라이드 염인 방법.

**청구항 21.**

제 19 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 디하이드로클로라이드 염인 방법.

**청구항 22.**

제 19 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제중의 화합물을 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 23.**

제 19 항에 있어서, 화합물이 제 2의 항바이러스제와 함께, 또는 교대로 투여되는 방법.

**청구항 24.**

제 23 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제가 인터페론, 리바비린, 인터류킨, NS3 프로테아제 저해제, 시스테인 프로테아제 저해제, 티아졸리딘 유도체, 티아졸리딘, 벤즈아닐리드, 페난트레퀴논, 헬리카제 저해제, 폴리머라제 저해제, 뉴클레오타이드 유사체, 클리오톡신, 세롤레닌, 안티센스 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오타이드, IRES-의존성 해독 저해제 및 리보자임으로 구성된 그룹중에서 선택되는 방법.

#### 청구항 25.

제 23 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제가 인터페론인 방법.

#### 청구항 26.

제 19 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제가 폐길화 인터페론 알파 2a, 인터페론 알파콘-1, 천연 인터페론, 알부페론, 인터페론 베타-1a, 오메가 인터페론, 인터페론 알파, 인터페론 감마, 인터페론 타우, 인터페론 델타 및 인터페론 감마-1b로 구성된 그룹중에서 선택되는 방법.

#### 청구항 27.

제 26 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제가 인터페론 알파 2인 방법.

#### 청구항 28.

제 19 항에 있어서, 숙주가 인간인 방법.

#### 청구항 29.

제 19 항에 있어서, 화합물이 복용 단위형인 방법.

#### 청구항 30.

제 29 항에 있어서, 복용 단위형이 10 내지 500 mg의 화합물을 함유하는 방법.

#### 청구항 31.

제 29 항에 있어서, 복용 단위형이 정제 또는 캡슐제인 방법.

#### 청구항 32.

제 19 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체가 경구 또는 정맥내 전달에 적합한 방법.

#### 청구항 33.

제 19 항에 있어서, 화합물이 실질적으로 순수한 형태로 투여되는 방법.

#### 청구항 34.

제 19 항에 있어서, 화합물이 적어도 90 중량%의  $\beta$ -D-이성체인 방법.

**청구항 35.**

제 19 항에 있어서, 화합물이 적어도 90 중량%의 β-D-이성체인 방법.

**청구항 36.**

제 19 항에 있어서, 바이러스가 HCV인 방법.

**청구항 37.**

5'-하이드록실 그룹이 5'-OR(여기에서, R은 포스페이트, 안정화 포스페이트 프로드럭; 아실; 알킬; 알킬 또는 아릴알킬 설포닐(메탄설포닐 포함)을 포함하는 설포네이트 에스테르; 벤질(여기에서, 페닐 그룹은 임의로 치환된다); 리피드; 아미노산; 탄수화물; 펩티드; 콜레스테롤; 또는 생체내에 투여시 R이 독립적으로 H 또는 포스페이트를 나타내는 화합물을 제공할 수 있는 다른 약제학적으로 허용되는 이탈 그룹을 나타낸다)로 대체된 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물.

**청구항 38.**

약제학적으로 허용되는 담체중의 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물(여기에서, 5'-하이드록실 그룹은 5'-OR(여기에서, R은 포스페이트, 안정화 포스페이트 프로드럭; 아실; 알킬; 알킬 또는 아릴알킬 설포닐(메탄설포닐 포함)을 포함하는 설포네이트 에스테르; 벤질(여기에서, 페닐 그룹은 임의로 치환된다); 리피드; 아미노산; 탄수화물; 펩티드; 콜레스테롤; 또는 생체내에 투여시 R이 독립적으로 H 또는 포스페이트를 나타내는 화합물을 제공할 수 있는 다른 약제학적으로 허용되는 이탈 그룹을 나타낸다)로 대체된다)을 포함하는 약제학적 조성물.

**청구항 39.**

약제학적으로 허용되는 담체중의 유효량의 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물(여기에서, 5'-하이드록실 그룹은 5'-OR(여기에서, R은 포스페이트, 안정화 포스페이트 프로드럭; 아실; 알킬; 알킬 또는 아릴알킬 설포닐(메탄설포닐 포함)을 포함하는 설포네이트 에스테르; 벤질(여기에서, 페닐 그룹은 임의로 치환된다); 리피드; 아미노산; 탄수화물; 펩티드; 콜레스테롤; 또는 생체내에 투여시 R이 독립적으로 H 또는 포스페이트를 나타내는 화합물을 제공할 수 있는 다른 약제학적으로 허용되는 이탈 그룹을 나타낸다)로 대체된다)을 투여하는 것을 특징으로 하여, RNA-의존성 RNA 폴리머라제 바이러스로 감염된 숙주를 치료하는 방법.

**청구항 40.**

제 39 항에 있어서, 바이러스가 플라비비리다에 바이러스인 방법.

**청구항 41.**

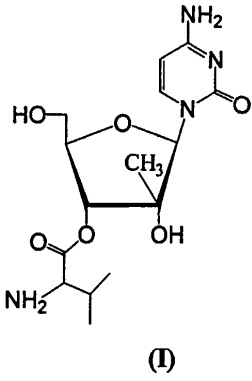
제 39 항 또는 40 항에 있어서, 플라비비리다에 바이러스가 C형 간염인 방법.

**청구항 42.**

제 39 항, 40 항 또는 41 항에 있어서, 숙주가 인간인 방법.

**청구항 43.**

임의로 플라비바이러스 또는 페스티바이러스로 감염된 숙주 치료용 약제를 제조하기 위한, 화학식 (I)의 구조를 갖는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 또는 프로드럭의 용도:



**청구항 44.**

제 43 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 하이드로클로라이드 염인 용도.

**청구항 45.**

제 43 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 디하이드로클로라이드 염인 용도.

**청구항 46.**

제 43 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제중의 화합물을 투여하는 것을 추가로 포함하는 용도.

**청구항 47.**

제 43 항에 있어서, 화합물이 제 2의 항바이러스제와 배합하여 제조되는 용도.

**청구항 48.**

제 47 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제가 인터페론, 리바비린, 인터류킨, NS3 프로테아제 저해제, 시스테인 프로테아제 저해제, 티아졸리딘 유도체, 티아졸리딘, 벤즈아닐리드, 페난트레퀴논, 헬리카제 저해제, 폴리머라제 저해제, 뉴클레오타이드 유사체, 클리오톡신, 세물레닌, 안티센스 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오타이드, IRES-의존성 해독 저해제 및 리보자임으로 구성된 그룹중에서 선택되는 용도.

**청구항 49.**

제 47 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제가 인터페론인 용도.

**청구항 50.**

제 47 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제가 폐길화 인터페론 알파 2a, 인터페론 알파콘-1, 천연 인터페론, 알부페론, 인터페론 베타-1a, 오메가 인터페론, 인터페론 알파, 인터페론 감마, 인터페론 타우, 인터페론 델타 및 인터페론 감마-1b로 구성된 그룹중에서 선택되는 용도.

**청구항 51.**

제 47 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제가 인터페론 알파 2인 용도.

**청구항 52.**

제 47 항에 있어서, 숙주가 인간인 용도.

**청구항 53.**

제 47 항에 있어서, 화합물이 복용 단위형인 용도.

**청구항 54.**

제 43 항에 있어서, 복용 단위형이 10 내지 500 mg의 화합물을 함유하는 용도.

**청구항 55.**

제 43 항에 있어서, 복용 단위형이 정제 또는 캡슐제인 용도.

**청구항 56.**

제 43 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체가 경구 전달에 적합한 용도.

**청구항 57.**

제 43 항에 있어서, 화합물이 실질적으로 순수한 형태로 투여되는 용도.

**청구항 58.**

제 43 항에 있어서, 화합물이 적어도 90 중량%의  $\beta$ -D-이성체인 용도.

**청구항 59.**

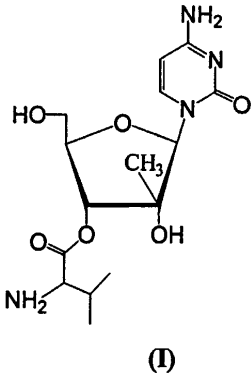
제 43 항에 있어서, 화합물이 적어도 90 중량%의  $\beta$ -D-이성체인 용도.

**청구항 60.**

제 43 항에 있어서, 바이러스가 HCV인 용도.

**청구항 61.**

플라비바이러스 또는 페스티바이러스로 감염된 숙주를 치료하기 위한, 임의로 약제학적으로 허용되는 담체중의 화학식 (I)의 구조를 갖는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 또는 프로드럭:



**청구항 62.**

제 61 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 하이드로클로라이드 염인 화합물.

**청구항 63.**

제 61 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 디하이드로클로라이드 염인 화합물.

**청구항 64.**

제 61 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함하는 화합물.

**청구항 65.**

제 61 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제를 추가로 포함하는 화합물.

**청구항 66.**

제 65 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제가 인터페론, 리바비린, 인터류킨, NS3 프로테아제 저해제, 시스테인 프로테아제 저해제, 티아졸리딘 유도체, 티아졸리딘, 벤즈아닐리드, 페난트레퀴논, 헬리카제 저해제, 폴리머라제 저해제, 뉴클레오타이드 유사체, 클리오톡신, 세물레닌, 안티센스 포스포로티오에이트 올리고데옥시뉴클레오타이드, IRES-의존성 해독 저해제 및 리보자임으로 구성된 그룹중에서 선택되는 화합물.

**청구항 67.**

제 65 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제가 인터페론인 화합물.

**청구항 68.**

제 65 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제가 폐길화 인터페론 알파 2a, 인터페론 알파콘-1, 천연 인터페론, 알부페론, 인터페론 베타-1a, 오메가 인터페론, 인터페론 알파, 인터페론 감마, 인터페론 타우, 인터페론 델타 및 인터페론 감마-1b로 구성된 그룹중에서 선택되는 화합물.

**청구항 69.**

제 65 항에 있어서, 제 2의 항바이러스제가 인터페론 2알파인 화합물.

**청구항 70.**

제 65 항에 있어서, 숙주가 인간인 화합물.

**청구항 71.**

제 65 항에 있어서, 화합물이 복용 단위형인 화합물.

**청구항 72.**

제 61 항에 있어서, 복용 단위형이 화합물 10 내지 500 mg을 함유하는 화합물.

**청구항 73.**

제 72 항에 있어서, 복용 단위형이 정제 또는 캡슐제인 화합물.

**청구항 74.**

제 61 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체가 경구 전달에 적합한 화합물.

**청구항 75.**

제 61 항에 있어서, 실질적으로 순수한 형태로 투여되는 화합물.

**청구항 76.**

제 61 항에 있어서, 적어도 90 중량%의  $\beta$ -D-이성체인 화합물.

**청구항 77.**

제 61 항에 있어서, 적어도 95 중량%의  $\beta$ -D-이성체인 화합물.

**청구항 78.**

제 61 항에 있어서, 바이러스가 HCV인 화합물.

**청구항 79.**

제 1 항 또는 61 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 토실레이트, 메탄설포네이트, 아세테이트, 시트레이트, 말로네이트, 타르타레이트, 숙시네이트, 벤조에이트, 아스코르베이트,  $\alpha$ -케토글루타레이트,  $\alpha$ -글리세로포스페이트, 포르메이트, 푸마레이트, 프로피오네이트, 클리콜레이트, 락테이트, 피루베이트, 옥살레이트, 말레에이트, 살리실레이트, 설페이트, 설포네이트, 나이트레이트, 바이카보네이트, 하이드로브로메이트, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 카보네이트 및 인산염중에서 선택되는 화합물.

**청구항 80.**

제 4 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 토실레이트, 메탄설포네이트, 아세테이트, 시트레이트, 말로네이트, 타르타레이트, 숙시네이트, 벤조에이트, 아스코르베이트,  $\alpha$ -케토글루타레이트,  $\alpha$ -글리세로포스페이트, 포르메이트, 푸마레이

트, 프로피오네이트, 글리콜레이트, 락테이트, 피루베이트, 옥살레이트, 말레에이트, 살리실레이트, 설페이트, 설포네이트, 나이트레이트, 바이카보네이트, 하이드로브로메이트, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 카보네이트 및 인산염중에서 선택되는 조성물.

### 청구항 81.

제 19 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 토실레이트, 메탄설포네이트, 아세테이트, 시트레이트, 말로네이트, 타르타레이트, 숙시네이트, 벤조에이트, 아스코르베이트, α-케토글루타레이트, α-글리세로포스페이트, 포르메이트, 푸마레이트, 프로피오네이트, 글리콜레이트, 락테이트, 피루베이트, 옥살레이트, 말레에이트, 살리실레이트, 설페이트, 설포네이트, 나이트레이트, 바이카보네이트, 하이드로브로메이트, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 카보네이트 및 인산염중에서 선택되는 방법.

### 청구항 82.

제 42 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염이 토실레이트, 메탄설포네이트, 아세테이트, 시트레이트, 말로네이트, 타르타레이트, 숙시네이트, 벤조에이트, 아스코르베이트, α-케토글루타레이트, α-글리세로포스페이트, 포르메이트, 푸마레이트, 프로피오네이트, 글리콜레이트, 락테이트, 피루베이트, 옥살레이트, 말레에이트, 살리실레이트, 설페이트, 설포네이트, 나이트레이트, 바이카보네이트, 하이드로브로메이트, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 카보네이트 및 인산염중에서 선택되는 용도.

### 요약

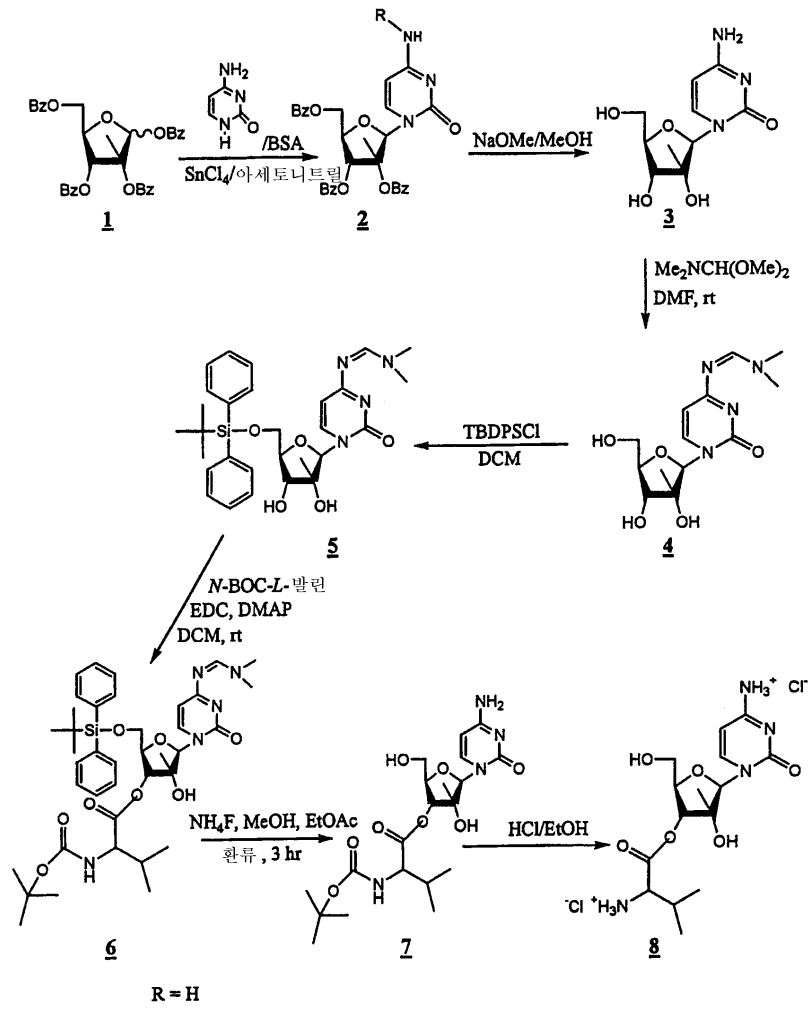
β-D-2'-C-메틸리보푸라노실 사이티딘의 3'-L-발린 에스테르는 C형 간염 바이러스를 포함한 플라비바이러스 및 페스티 바이러스에 대해 뛰어난 결과를 제공한다. 이러한 발견에 기초하여, 임의로 약제학적으로 허용되는 담체중의 유효량의 val-mCyd 또는 그의 염, 에스테르, 프로드럭 또는 에스테르를 투여하는 것을 포함하여, HCV를 포함한 플라비바이러스를 치료하기 위한 화합물, 조성물, 방법 및 용도가 제공된다. 다른 구체예로, val-mCyd는 RNA-의존성 RNA 폴리머라제를 통해 복제되는 바이러스를 치료하기 위해 사용된다.

### 대표도

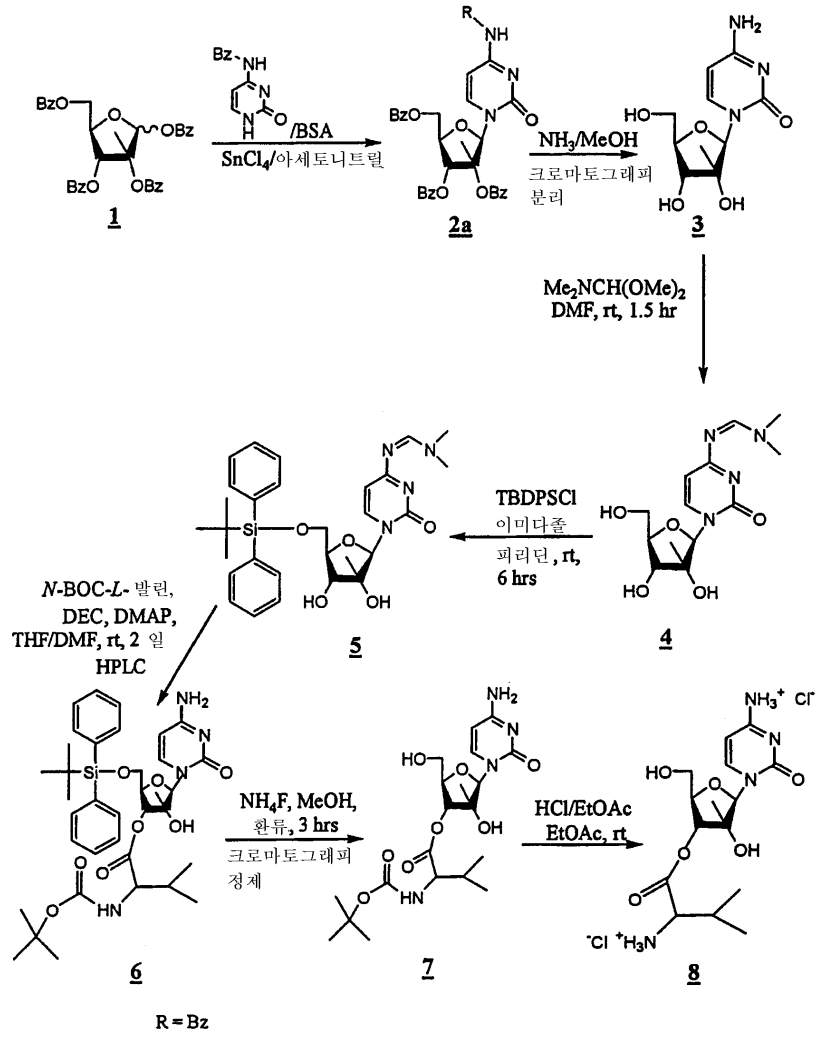
도 1a

### 도면

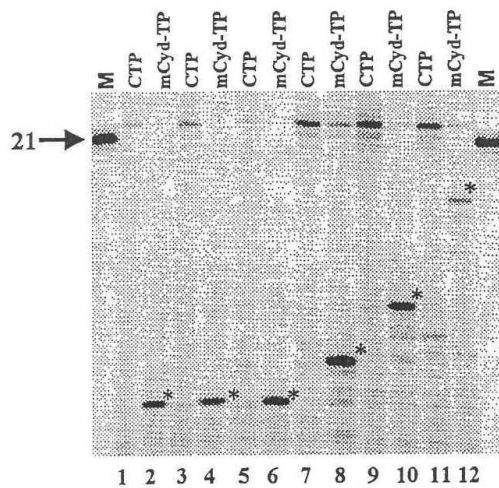
도면1a



도면1b

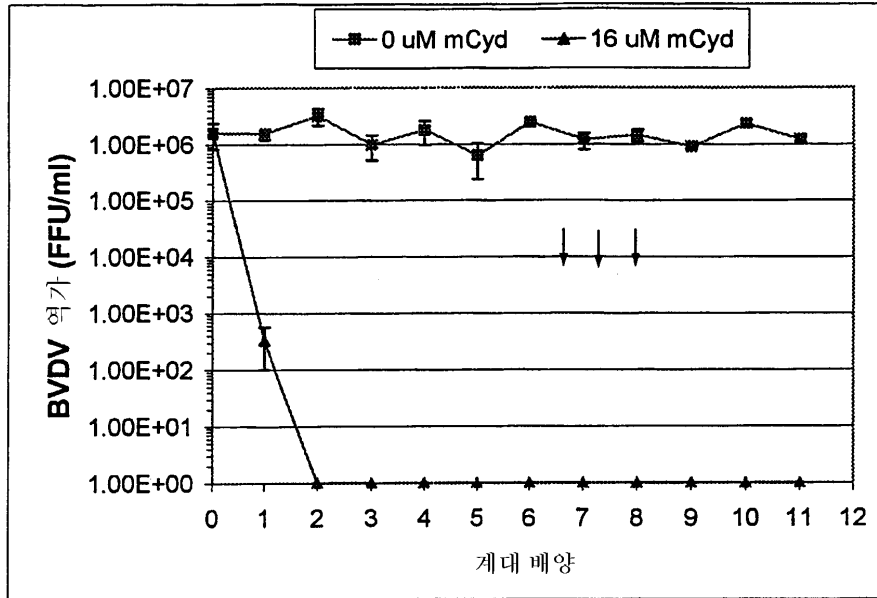


도면2

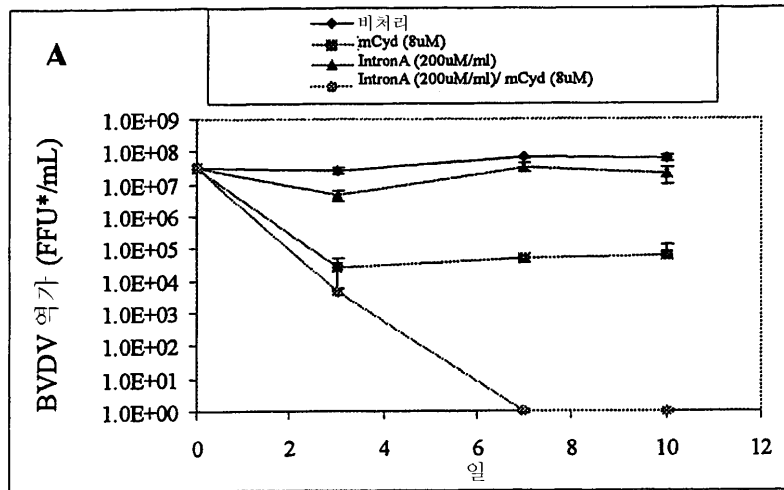


Lane #	template	→
1-2	(-21)	3' CAUAUGCUCUAAUCUUUCC
3-4	(-21)-7G	3' CAUAUGGUCUAAUCUUUCC
5-6	(-21)-9G	3' CAUAUGCUGUAAUCUUUCC
7-8	(-21)-6C/7G	3' CAUAUCGUCUAAUCUUUCC
9-10	(-21)-6C/9G	3' CAUAUCCUGUAAUCUUUCC
11-12	(-21)-6C/15G	3' CAUAUCCUCUAAUGUUUCC

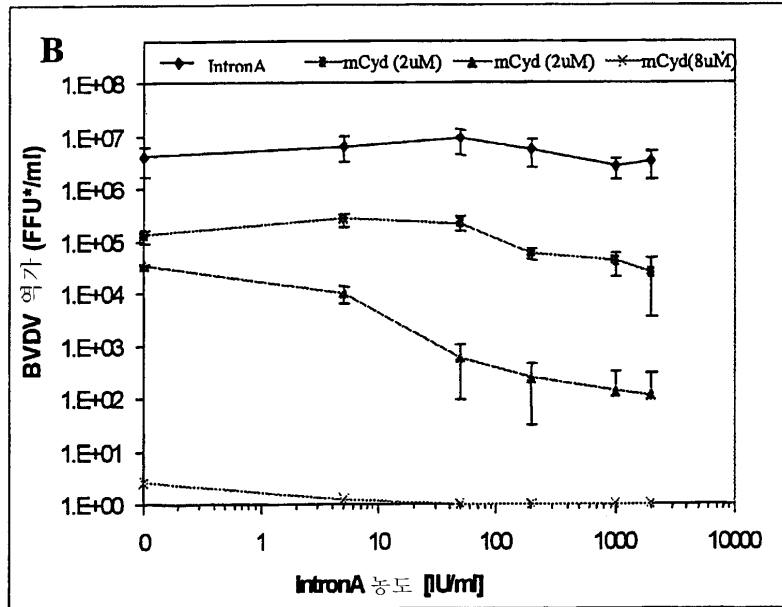
도면3



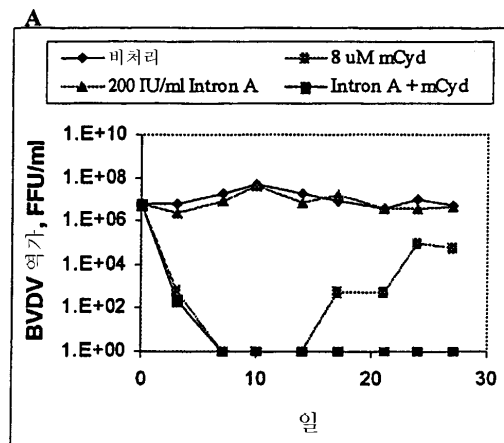
도면4a



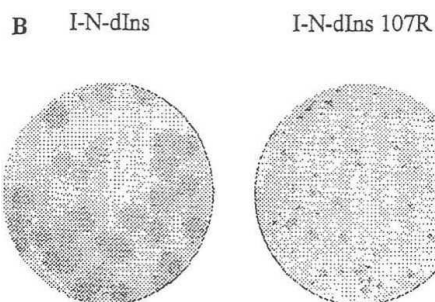
도면4b



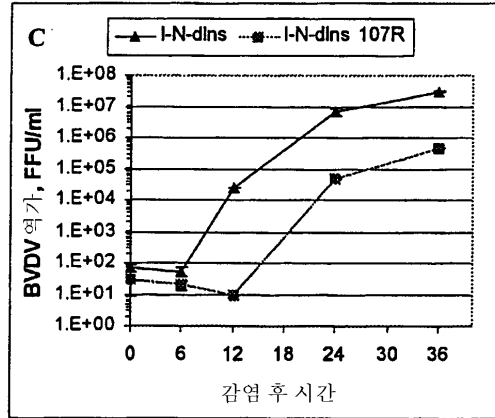
도면5a



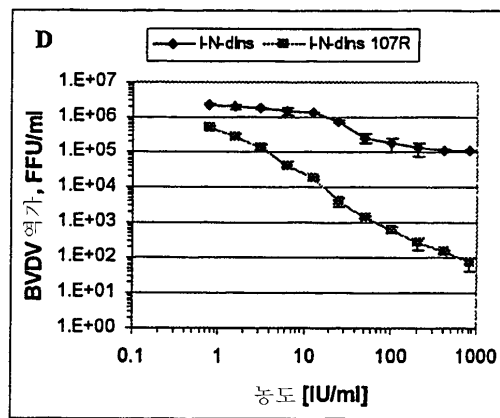
도면5b



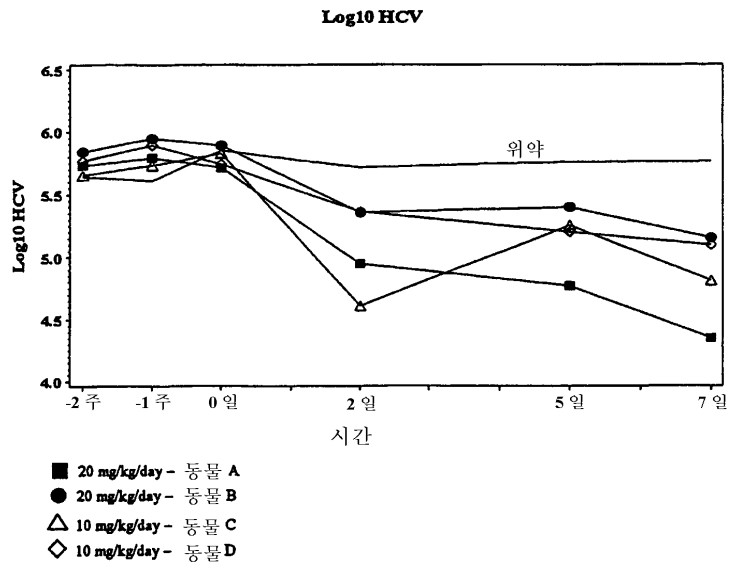
도면5c



도면5d

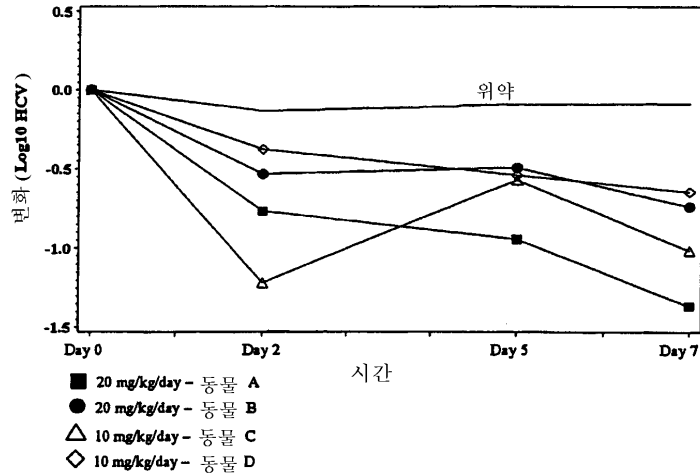


도면6

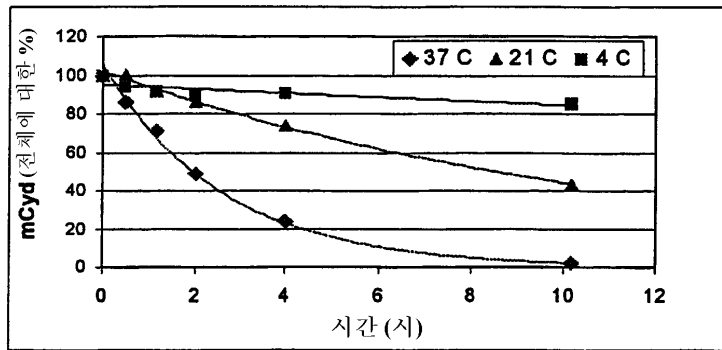


도면7

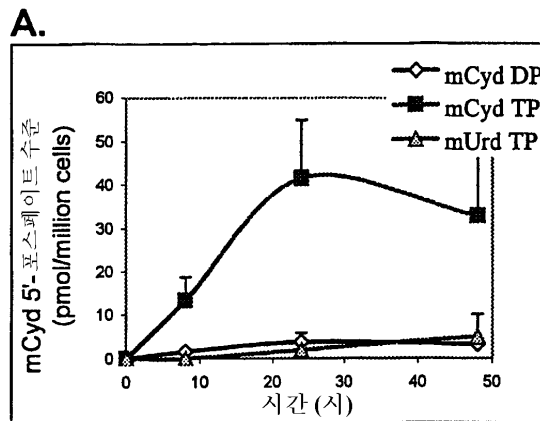
0일로부터의 변화 (Log10 HCV)



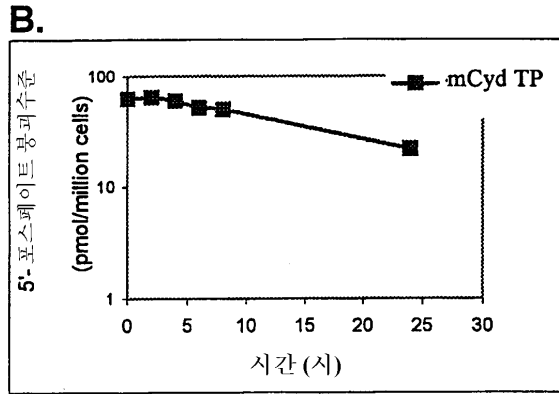
도면8



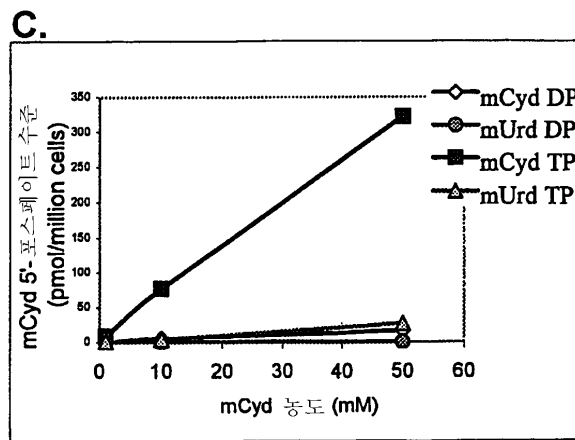
도면9a



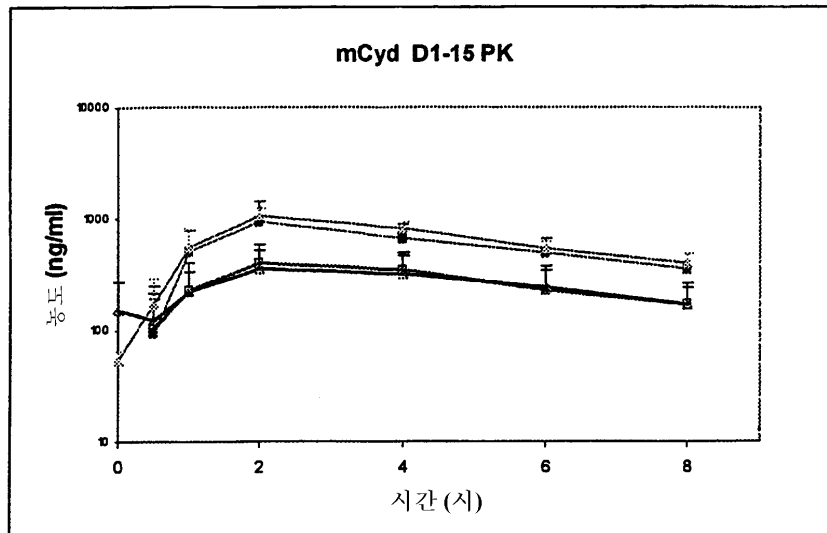
도면9b



도면9c



도면10



도면11

