



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월25일  
(11) 등록번호 10-2733555  
(24) 등록일자 2024년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07H 19/20 (2006.01) A61K 31/7068 (2006.01)  
A61K 31/7072 (2006.01) A61K 31/7076  
(2006.01)  
A61K 31/708 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)  
A61P 37/04 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07H 19/20 (2013.01)  
A61K 31/7068 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-7012233  
(22) 출원일자(국제) 2018년10월25일  
심사청구일자 2021년10월25일  
(85) 번역문제출일자 2020년04월27일  
(65) 공개번호 10-2020-0090154  
(43) 공개일자 2020년07월28일  
(86) 국제출원번호 PCT/CN2018/111885  
(87) 국제공개번호 WO 2019/080898  
국제공개일자 2019년05월02일  
(30) 우선권주장  
PCT/CN2017/107962 2017년10월27일 중국(CN)  
(뒷면에 계속)  
(56) 선행기술조사문헌  
WO2017119815 A1

(73) 특허권자  
상하이 야오 유안 바이오테크놀로지 컴퍼니 리미  
티드  
중국, 상하이 200444, 바오산 디스트릭트, 유안펑  
로드 69, 빌딩 5  
(72) 발명자  
수 티안  
중국, 상하이 200437, 43 한단 로드, 룸 701  
수 쿵  
중국, 상하이 200437, 43 한단 로드, 룸 701  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 변진석

(54) 발명의 명칭 알파 단백질 키나제 1의 활성화에 의해 면역 반응을 조절하는 조성물 및 방법

(57) 요약

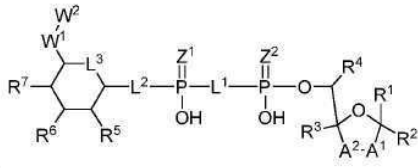
본 개시내용은 면역 반응을 조절하고 암, 감염, 염증 및 관련 질환 및 장애를 치료 또는 예방할 뿐만 아니라 표  
적 항원에 대한 면역 반응을 강화시키기 위한 알파-키나제 1(ALPK1)의 활성화와 관련된 조성물 및 방법에 관한  
것이다. 본 개시내용은 또한 알파 단백질 키나제 1(ALPK1)의 효능제로서 화학식 I의 헤테로사이클릭 화합물 및  
(뒷면에 계속)

대표도

ALPK1 동형 1	
HHHVVVHHH LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	60
FFVKKQVQK AVKHHKVK KVVVQVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	120
LIVVKKLLV KKKKKKKK LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	180
WVKKKKKK LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	240
LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	300
WVKKKKKK LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	360
LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	420
WVKKKKKK LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	480
LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	540
WVKKKKKK LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	600
LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	660
WVKKKKKK LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	720
LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	780
WVKKKKKK LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	840
LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	900
WVKKKKKK LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	960
LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	1020
WVKKKKKK LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	1080
LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	1140
WVKKKKKK LQKCKVQVQ LLLAAVQVH KKKKKKKK ALPKKLLT LQKHHHHH	1200

ALPK1을 활성화시키고, 면역 반응을 조절하며 암과 같은 질환을 치료하는데 있어서 이들의 용도를 제공한다:

[화학식 I]



상기식에서,

$A^1$ ,  $A^2$ ,  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $Z^1$ ,  $Z^2$ ,  $W^1$ ,  $W^2$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  및  $R^7$ 은 본원에 정의된 바와 같다.

(52) CPC특허분류

**A61K 31/7072** (2013.01)

**A61K 31/7076** (2013.01)

**A61K 31/708** (2013.01)

**A61P 25/00** (2018.01)

**A61P 37/04** (2018.01)

(30) 우선권주장

PCT/CN2018/083153 2018년04월16일 중국(CN)

PCT/CN2018/100871 2018년08월16일 중국(CN)

(72) 발명자

**리우 단양**

중국, 상하이 200437, 43 한단 로드, 룸 701

**판 지에칭**

중국, 상하이 200437, 43 한단 로드, 룸 701

**판 안팡**

중국, 상하이 200437, 43 한단 로드, 룸 701

**리 통루에이 레이몬드**

중국, 상하이 200437, 43 한단 로드, 룸 701

**첸 샤오둥**

중국, 상하이 200437, 43 한단 로드, 룸 701

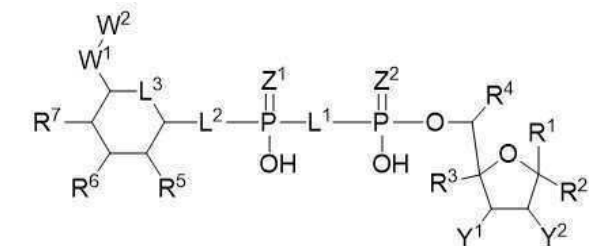
## 명세서

## 청구범위

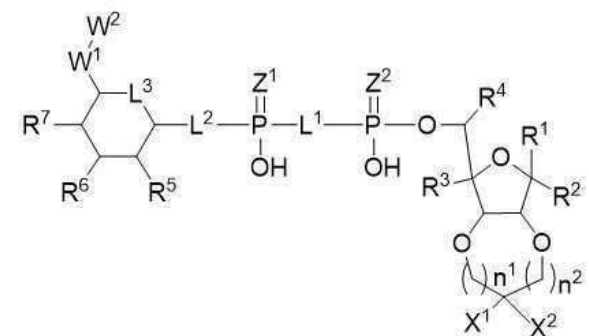
### 청구항 1

화학식 IA 또는 화학식 IB의 화합물 또는 이의 입체이성체, 호변이성체(tautomer) 또는 약제학적으로 허용되는 염:

[화학식 IA]



[화학식 IB]



상기 식에서,

$Y^1$  및  $Y^2$ 는 H, D, -OH, 할로젠,  $C_1-C_4$  알킬,  $C_1-C_4$  알콕실,  $C_1-C_4$  할로알킬,  $C_1-C_4$  할로알콕실,  $C_1-C_4$  알카노일옥실 및  $C_2-C_4$  알케닐옥실로부터 독립적으로 선택되고;

$n^1$  및  $n^2$ 는 각각 0이고;

$X^1$  및  $X^2$ 는 H, D, 및  $C_1-C_4$  알킬로부터 독립적으로 선택되고;

$L^2$ 는 0이고;

$L^1$ 은 0이고;

$L^3$ 은 0 또는 S이고;

$Z^1$  및  $Z^2$ 는 O 및 S로부터 독립적으로 선택되고;

$W^1$ 은  $-C(R^{10}R^{11})-$ 이고, 여기서  $R^{10}$ 은 할로젠이며  $R^{11}$ 은 H, D, -OH, 할로젠,  $C_1-C_4$  알킬,  $C_1-C_4$  알콕실,  $C_1-C_4$  할로알킬,  $C_1-C_4$ -할로알콕실,  $C_1-C_4$  알카노일옥실 및  $C_2-C_4$  알케닐옥실로부터 선택되고;

$W^2$ 는 H이거나, -OH 및  $R^{12}CO_2-$ 로부터 선택된 1개의 치환체로 임의로 치환되는  $C_1-C_3$  알킬이고, 여기서  $R^{12}$ 는  $C_1-C_3$

알킬이고;

$R^1$ 은 5 내지 10개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 헤테로아릴이고, 여기서  $R^1$ 은 D, 할로젠, -OH, =O, CN,  $NH_2$ ,  $C_1-C_4$  알킬,  $C_1-C_4$  알콕시,  $C_1-C_4$  알킬아민,  $C_1-C_4$  디알킬아민 및  $(R^{13}R^{14})NCO$ -로부터 선택된 1 내지 3개의 치환체로 임의로 치환되고, 여기서  $R^{13}$  및  $R^{14}$ 는 H 및  $C_1-C_4$  알킬로부터 독립적으로 선택되고;

$R^2$ ,  $R^3$  및  $R^4$ 는 H, D, 할로젠 및  $C_1-C_4$  알킬로부터 독립적으로 선택되며;

$R^5$ ,  $R^6$  및  $R^7$ 은 -OH 및  $C_1-C_4$  알카노일옥실로 이루어진 그룹으로부터 각각 독립적으로 선택된다.

## 청구항 2

삭제

## 청구항 3

제1항에 있어서,

$Y^1$  및  $Y^2$ 가 -OH, 할로젠,  $C_1-C_4$  알킬 및  $C_1-C_4$  알카노일옥실로부터 독립적으로 선택되고,

$R^1$  내지  $R^7$ ,  $L^1$  내지  $L^3$ ,  $Z^1$ ,  $Z^2$ ,  $W^1$  및  $W^2$ 가 제1항에서 정의된 바와 같은 화합물.

## 청구항 4

삭제

## 청구항 5

삭제

## 청구항 6

삭제

## 청구항 7

제1항에 있어서,

$R^2$ ,  $R^3$  및  $R^4$ 가 각각 H인 화합물.

## 청구항 8

삭제

## 청구항 9

제1항에 있어서,

$W^1$ 이  $-C(R^{10}R^{11})-$ 이고, 여기서  $R^{10}$ 이 할로젠이고,  $R^{11}$ 이 H, D, -OH, 할로젠 및  $C_1-C_4$  알카노일옥실로부터 선택되는 화합물.

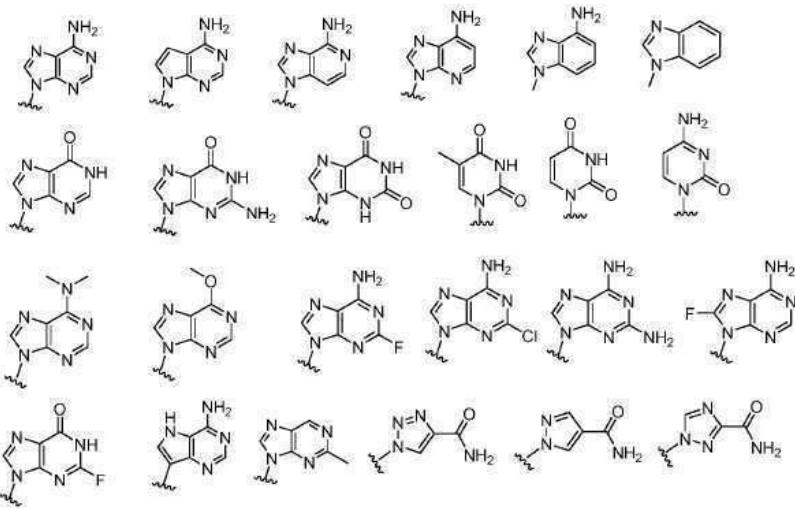
## 청구항 10

삭제

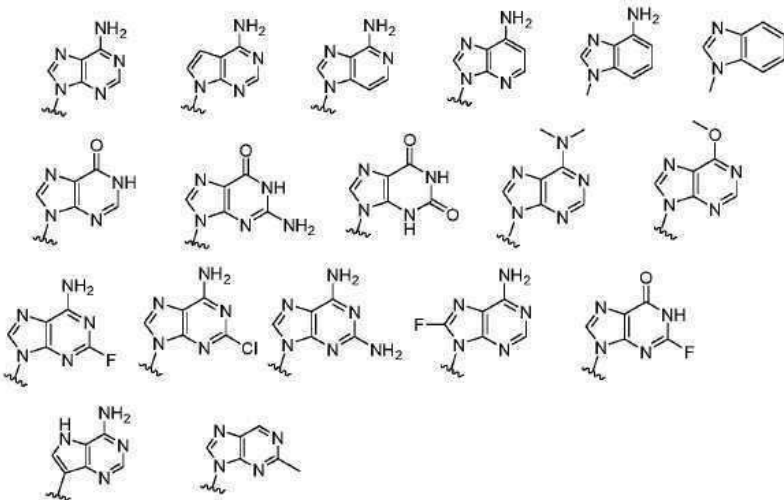
## 청구항 11

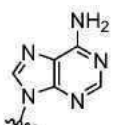
제1항에 있어서, R<sup>1</sup>이

a) 하기로부터 선택되거나



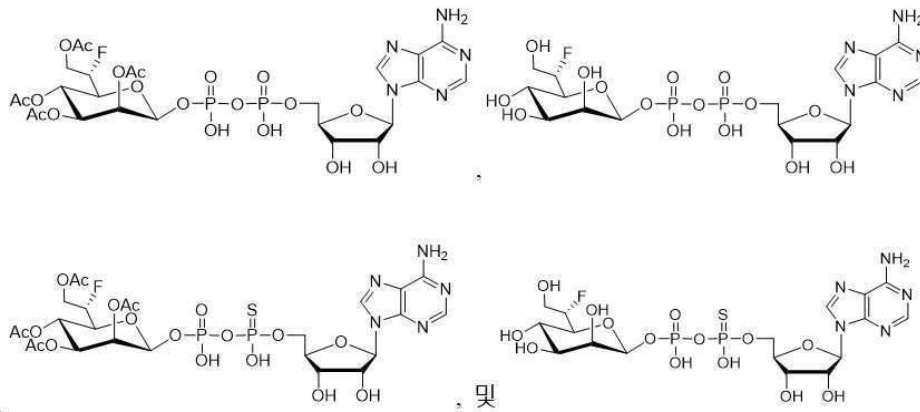
b) 하기로부터 선택되거나



c)  인, 화합물.

## 청구항 12

하기로부터 선택되는 화합물, 또는 이의 입체이성체, 또는 약제학적으로 허용되는 염:



### 청구항 13

제1항, 제3항, 제7항, 제9항, 제11항 및 제12항 중 어느 한 항의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물로서,

암을 치료하는 방법에 사용하기 위한; 또는

세포 내에서 NF $\kappa$ B, p38 및 JNK 세포 신호전달 경로의 활성화에 의해 치료할 수 있는 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 것으로서, 상기 질환 또는 장애가 결핵, 수막염, 폐렴, 궤양, 패혈증, 비염, 천식, 알레르기, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 염증성 창자병, 관절염, 비만, 방사선-유발된 염증, 건선, 아토피성 피부염, 비-알코올성 지방간염(NASH), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 전신 홍반 루프스(SLE), 자가면역성 갑상샘염(그레이브스 질환(Grave's disease)), 다발성 경화증, 강직성 척수염(ankylosing spondylitis bullous disease), 광선 각화증, 궤양성 대장염, 크론 질환(Crohn's disease), 원형탈모증, 및 C형 간염 바이러스(HCV), B형 간염 바이러스(HBV) 또는 사람 면역결핍성 바이러스(HIV)에 의해 유발된 질환 및 장애로부터 선택되는,

약제학적 조성물.

### 청구항 14

삭제

### 청구항 15

삭제

### 청구항 16

삭제

### 청구항 17

삭제

### 청구항 18

삭제

### 청구항 19

제13항에 있어서, 간 질환 또는 장애의 치료가 요구되는 대상체에서 간 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물로서, 이러한 방법이 저용량의 화합물을 대상체에게 투여함을 포함하고, 저용량의 화합물이 1 ng/kg 내지 1 mg/kg의 화합물에 해당하고,

임의로, 간 질환 또는 장애가 간염, 비-알코올성 지방간염(NASH), 및 C형 간염 바이러스(HCV) 또는 B형 간염 바이러스(HBV)에 의한 감염으로 유발된 질환 또는 장애로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제



청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

**청구항 84**

삭제

**청구항 85**

삭제

**청구항 86**

삭제

**청구항 87**

삭제

**청구항 88**

삭제

**청구항 89**

삭제

**청구항 90**

삭제

**청구항 91**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **발명의 분야**

[0002] 본 발명은 알파 단백질 키나제 1(ALPK1)을 활성화시킴에 의한 치료요법을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] **발명의 배경**

[0004] 염증 반응의 메커니즘에 대한 연구는 필수적인 신호전달 구성성분으로서 작용하는 다양한 단백질 키나제를 확인하였다. 단백질 키나제에 있어서의 결함은 흔히 사람 염증 질환, 암 및 당뇨병의 발병기전과 관련되어 있다.

[0005] 알파-키나제는 대표적인 단백질 카나제에 대해 서열 유사성을 거의 나타내지 않는, 유일한 단백질 키나제 상과 (superfamily)이다. 알파-단백질 키나제 1(ALPK1), ALPK2, ALPK3, 신장된 인자(elongated factor)-2 키나제 (eEF2K), 및 일시적인 수용체 잠재적인 양이온 채널 M6 및 M7(TRPM6 및 TRPM7)을 포함하는 총 6개의 알파키나제 구성원이 확인되었다(Ryazanov AG et al., Curr Biol 1999 9(2):R43-45; Ryazanov AG et al., Proc Natl Acad Sci USA 1997 94(10):4884-4889).

[0006] ALPK1은 내피 세포내에서 래프트-함유 슈크로즈-이소머라제(raft-containing sucrose-isomerase)(SI) 소낭의 새로운 구성성분임이 확인되었다(Heinet M et al., J. Biol. Chem. 2005 280(27): 25637-43). ALPK1은 미오신 1을 인산화(phosphorylating)시키며 정점의 혈장막으로의 엑소사이트 수송(exocytic transport)에 필수적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 마우스에서 ALPK1의 트랜스포존(transposon)-삽입된 동형 불활성화 돌연변이는 전체 길이의 ALPK1을 과발현함으로써 구제될 수 있는 운동 조정력 결함을 야기하였다(Chen M et al., BMC Neurosci. 2011 12:1).

[0007] 모든 확인된 동질이상이 모든 집단에서 복제되지는 않았지만, 몇가지 유전적 관련성 연구는 염소의 경우 위험에서 ALPK1을 관련시켰다(Wang SJ et al., J. Mol. Med. 2011 89:1241-51; Ko AM et al., J. Intl. Epidemiol.

2013 42: 466-474; Chiba T et al., 사람 Cell 2015 28:1-4). 다른 유전적 관련성 연구는 만성 신장 질환, 심근경색, 및 당뇨병에 대한 위험 인자로서 ALPK1을 연관시켰다(Yamada Y et al. J Med Genet 2013 50:410-418; Fujimaki T et al., Biomed Report 2014 2:127-131; Shimotaka S et al., Biomed Report 1 2013 940-44; Yamada Y et al., Biomed. Report 2015 DOI: 10.3892/br.2015.439).

[0008] 마우스에서 ALPK1의 과발현은 보다 낮은 수준의 테스토스테론 및 전염증성 사이토킨 IL-1 $\beta$  및 TGF- $\beta$ 의 증가된 생산을 야기하였으며, 이는 ALPK1과 테스토스테론 사이의 균형이 전-염증성 사이토킨의 테스토스테론-매개된 억제에 역할을 담당할 수 있음을 시사한다(Kuo TM et al., J Steroid Biochem Mol Biol 2015 154: 150-158).

[0009] ALPK1 활성화는 또한 폐, 결장직장, 및 유방 암을 포함하는 암에서 역할을 담당하는 것으로 연관되어 왔다(Liao HF et al. Scientific Reports 2016 6:27350; Strietz J et al., Oncotarget 2016 1-16).

[0010] 최근의 연구는 ALPK1을 특정 세균에 의해 활성화된 선천성 면역 반응의 중요한 조절인자로서 연관시켰다. 예를 들면, APLK1은 에스. 플렉스네리(*S. flexneri*), 에스. 티피무리움(*S. typhimurium*), 및 나에세리아 메닝기티데스(*Neisseria meningitides*)에 의한 감염에 대한 반응시 이의 TIFA 올리고머화 및 인터루킨 8(IL8) 발현의 촉진을 통해 세균에 대한 선천성 면역력의 주요 조절인자인 것으로 제시되었다(Milivojevic M et al., PLoS Pathog 2017 13(2): e1006224). 짐머만(Zimmerman) 등은 ALPK1 및 TIFA 의존성의 선천성 면역 반응이 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*) 제IV형 분비 시스템에 의해 개시되었음을 기술하고 있다(Zimmermann S et al., Cell Reports 2017 20(10): 2384-95). 이러한 연구 둘 다는 세균 대사산물인, 헵토즈-1,7-비스포스페이트(HBP)가 TIFA-의존성의 선천성 면역성을 활성화시킴을 시사하고 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 임상 소견이 염증 및 다양한 감염으로부터 야기되는 많은 질환, 장애, 및 상태가 존재한다. 이러한 질환, 장애, 및 상태를 치료하기 위해 표적 조직내 염증을 조절하기 위한 신규 방법에 대한 요구가 존재한다. 본 개시내용은 이러한 요구를 해결한다.

### 과제의 해결 수단

[0012] 발명의 요약

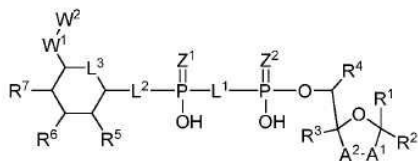
[0013] 본 발명은 부분적으로, D-글리세로- $\beta$ -D-만노-헵토즈 1,7-비스포스페이트(헵토즈 1,7 비스포스페이트 또는 "HBP") 뿐만 아니라 본원에 기술된 화학식 IA, IB, 또는 IC로 나타낸 D-글리세로- $\beta$ -D-만노-헵토즈-1-포스페이트(HMP-1bP), L-글리세로-D-만노-헵토즈-1 $\beta$ -ADP(H1b-ADP-6L) 및 D-글리세로-D-만노-헵토즈-1 $\beta$ -ADP(H1b-ADP), 및 이의 유도체를 포함하는 특성의 세균 대사산물이 IL-8 및 TNF  $\alpha$ 와 같은 전염증성 사이토킨의 증가된 발현을 포함하는 하부 신호전달(downstream signaling)의 ALPK1-의존성 활성화를 유도한다는 발견을 기반으로 한다. HMP-1bP, 이의 하부 생성물 H1b-ADP-6L, 및 특히 H1b-ADP의 생물학적 활성은 세균 대사산물에 의한 선천성 면역성의 활성화에 있어서 ALPK1 및 이의 역할에 대해 현재 공지된 것으로부터 예측할 수 없었다. 본 개시내용은 또한 H1b-ADP 및 H1b-ADP 유도체에 의한 항-종양 활성의 증거를 제공하며 H1b-ADP와 면역 체크포인트 억제제(immune checkpoint inhibitor) 및 면역 조절인자, 예를 들면, 항-PD-L1 및 항-PD-1 항체, 항-CTLA4 항체, 및 항-CD4 항체의 공-투여(co-administration)는 상승적인 항-종양 효과를 가짐을 입증한다. 본 개시내용은 또한 H1b-ADP와 면역 조절인자, 예를 들면, 각각의 인터페론 알파(INF  $\alpha$ ), 인터페론 유전자의 자극인자("STING") 효능제, 및 TLR 효능제(레스퀴모드)의 공-투여는 상승적인 항-종양 효과를 가짐을 입증한다.

[0014] 따라서, 본 개시내용은 면역 반응을 조절하고, 암을 치료하며, 표적 항원에 대한 면역 반응을 강화시키고, NF $\kappa$ B, p38, 및 JNK 세포 신호전달 경로의 활성화에 의한 치료에 대해 조절가능한 질환 또는 장애를 치료하고, ALPK1의 활성화를 통해 감염체에 의해 유발된 질환 또는 장애를 치료하거나 예방하는 것과 관련된 조성물 및 방법을 제공한다. 특성의 구현예에서, ALPK1 활성화는 본원에 기술된 화학식 IA, IB, 또는 IC로 나타낸 HBP, HMP-1bP, H1b-ADP-6L, 및 H1b-ADP, 바람직하게는 HMP-1bP, H1b-ADP-6L, 및 H1b-ADP, 및 가장 바람직하게는 H1b-ADP-6L 및 H1b-ADP, 또는 이의 유도체로부터 선택된 ALPK1 효능제의 투여를 통해 달성된다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 대상체에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 대상체에게 본원에 기술된 화학식 I, IA, 또는 IC로 나타낸 ALPK1 효능제 중 임의의 하나를 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다.

[0015] 본 발명은 ALPK1의 효능제로서 신규한 헤테로사이클릭 화합물을 개시한다. 이러한 화합물은 화학식 I로 나타낸

다:

[화학식 I]



상기식에서,

$A^1$ ,  $A^2$ ,  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $Z^1$ ,  $Z^2$ ,  $W^1$ ,  $W^2$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  및  $R^7$ 은 본원에 정의된 바와 같다. 또한 화학식 I의 화합물의 입체이성체, 호변이성체(tautomer), 안정한 동위원소, 전구약물(prodrug), 및 약제학적으로 허용되는 염이 포함된다.

$A^1$  및  $A^2$ 는 O, S 및  $-C(R^8R^9)$ -로부터 독립적으로 선택되고, 여기서  $R^8$  및  $R^9$ 는 H, D, -OH,  $N_3$ , -CN, 할로젠,  $C_1$ - $C_4$  알킬,  $C_1$ - $C_4$  알콕실,  $C_1$ - $C_4$  할로알킬,  $C_1$ - $C_4$  할로알콕실,  $C_1$ - $C_4$  알카노일옥실,  $C_1$ - $C_4$  알카노일옥실, 및 치환되거나 비치환된 아르알킬옥실로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 임의의 치환체는 D, 할로젠, -OH, =O,  $C_1$ - $C_4$  알킬 및  $C_1$ - $C_4$  알콕시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체이며;  $A^1$  또는  $A^2$  중 적어도 하나는  $-C(R^8R^9)$ 이고; 여기서  $A^1$  내  $R^8$  또는  $R^9$ 는  $A^2$  내  $R^8$  또는  $R^9$ 와 함께 고리화되어  $C_3$ - $C_6$  사이클로알킬 및 3 내지 9개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 가지는 사이클로헤테로알킬을 형성할 수 있으며, 각각은 D, 할로젠, -OH, =O,  $C_1$ - $C_4$  알킬 및  $C_1$ - $C_4$  알콕시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체로 임의의 치환되고;

$L^1$  및  $L^2$ 는 O,  $CH_2$ , CHF 및  $CF_2$ 로부터 독립적으로 선택되며;

$L^3$ 은 O, S,  $CH_2$  또는  $CH(OH)$ 이고;

$Z^1$  및  $Z^2$ 는 O 및 S로부터 독립적으로 선택되며;

$W^1$ 은  $-C(R^{10}R^{11})$ -이고, 여기서  $R^{10}$  및  $R^{11}$ 은 H, D, -OH, 할로젠, 및  $C_1$ - $C_4$  알킬,  $C_1$ - $C_4$  알콕실,  $C_1$ - $C_4$  할로알킬,  $C_1$ - $C_4$  할로알콕실,  $C_1$ - $C_4$  알케닐옥실, 또는 아르알킬옥실 및  $R^{12}CO_2$ -로부터 선택된 임의로 치환된 그룹으로부터 독립적으로 선택되며, 여기서  $R^{12}$ 는  $C_1$ - $C_4$  알킬,  $C_1$ - $C_4$  알콕실,  $C_1$ - $C_4$  알케닐옥실,  $C_1$ - $C_4$  알킬아미노,  $C_3$ - $C_6$  사이클로알킬, 3 내지 6개의 환 구성원을 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 사이클로헤테로알킬,  $C_6$ - $C_{10}$  아릴, 및 5 내지 10개의 환 원자를 함유하고 환 원자로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 헤테로아릴로부터 선택되며; 여기서  $R^{10}$  및  $R^{11}$ 에 대한 임의의 치환체는 D, 할로젠, -OH, =O,  $C_1$ - $C_4$  알킬 및  $C_1$ - $C_4$  알콕시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체이고;

$W^2$ 는 H이거나 D, 할로젠, -OH, =O,  $C_1$ - $C_3$  알콕실,  $C_1$ - $C_3$  할로알킬,  $C_1$ - $C_3$  할로알콕실,  $C_1$ - $C_3$  알케닐옥시 및  $R^{12}CO_2$ -로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체로 임의의 치환된  $C_1$ - $C_3$  알킬이며, 여기서  $R^{12}$ 는  $C_1$ - $C_4$  알킬,  $C_1$ - $C_4$  알콕시,  $C_1$ - $C_4$  알킬아미노,  $C_3$ - $C_6$  사이클로알킬, 3 내지 6개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 사이클로헤테로알킬, 및 5 내지 10개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 헤테로아릴이다.

$R^1$ 은  $C_6$ - $C_{10}$  아릴 또는 5 내지 10개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 헤테로아릴이고, 여기서  $R^1$ 은 D, 할로젠, -OH, =O, CN,  $NH_2$ ,  $C_1$ - $C_4$  알킬,  $C_1$ - $C_4$  알콕시,

C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬아민, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 디알킬아민 및 (R<sup>13</sup>R<sup>14</sup>)NCO-로부터 선택된 1 내지 3개의 치환체로 임의 치환되고, 여기서 R<sup>13</sup> 및 R<sup>14</sup>는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 사이클로알킬, 3 내지 6개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 사이클로헤테로알킬, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 아릴, 및 5 내지 10개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 헤테로아릴로부터 독립적으로 선택되며;

[0027] R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> 및 R<sup>4</sup>는 H, D, 할로젠, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 할로알킬로부터 독립적으로 선택되고;

[0028] R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> 및 R<sup>7</sup>은 H, D, 할로젠 및 -OH, R<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-로부터 선택되며, 여기서 R<sup>12</sup>는 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알카노일옥실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알케닐옥실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬아미노, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 사이클로알킬, 4 내지 6개의 환 구성원을 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 사이클로헤테로알킬, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 아릴, 및 5 내지 10개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 헤테로아릴로부터 선택되며; 여기서 R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> 및 R<sup>7</sup>의 인접한 그룹 중 임의의 2개는 고리화되어 5 내지 9개의 환 구성원을 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 사이클로헤테로알킬을 형성하며, 각각은 D, 할로젠, -OH, =O, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체로 임의 치환된다.

[0029] 구현예에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 상기 대상체에게 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타낸 ALPK1 효능제, ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 돌연변이체 중 임의의 하나를 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다. 구현예에서, 면역 반응을 조절하는 방법은 선천성 면역성의 활성화 및 적응성 면역성의 활성화로부터 선택된다.

[0030] 구현예에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 대상체에게 ALPK1의 효능제, 예를 들면, 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타낸 ALPK1의 효능제, ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 돌연변이체 중 임의의 하나를 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다. 구현예에서, 조성물은 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타낸 화합물로부터 선택되거나 HBP, HMP-1bP, H1b-ADP-6L, 및 H1b-ADP, 바람직하게는 HMP-1bP, H1b-ADP-6L, 및 H1b-ADP, 및 가장 바람직하게는 H1b-ADP-6L 및 H1b-ADP로부터 선택된 화합물로부터 선택된 ALPK1 효능제를 포함한다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 H1b-ADP이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 1 내지 3, 9 내지 17, 19, 20 내지 22, 및 26 내지 32 중 임의의 하나로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 15이다. 구현예에서, 암은 연조직 육종, 유방암, 두경부암, 흑색종, 자궁경부암, 방광암, 혈액암, 교아세포종, 췌장암, 전립선암, 결장암, 유방암, 신장암, 폐암, 머켈 세포 암종(merkel cell carcinoma), 소장암, 갑상선암, 급성 골수 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 위암, 위장 기질 종양, 비-호지킨 림프종(non-Hodgkins lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkins lymphoma), 간암, 백혈병, 림프종, T-세포 림프종, 뇌암, 및 다발 골수종으로부터 선택된다. 구현예에서, 암은 유방암, 두경부암, 흑색종, 신장암, 폐암, 머켈 세포 암종, 및 림프종으로부터 선택된다.

[0031] 구현예에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 항원에 대한 면역 반응을 증강시키는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 대상체에게 ALPK1의 효능제, 예를 들면, 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타낸 ALPK1 효능제, ALPK1 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 돌연변이체 중 임의의 하나를 포함하는 조성물을 표적 항원에 대한 면역 반응을 증강시키는 작용을 하는 백신 또는 면역학적 보조제로서 투여함을 포함한다. 구현예에서, 표적 항원은 아데노바이러스, 콕삭키에(Coxsackie) B 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 동부형 말 뇌막염 바이러스(eastern equine encephalitis virus), 에볼라 바이러스, 엔테로바이러스(enterovirus) 71, 엡슈타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus), 헤모필러스 인플루엔자 제b형(Hib), C형 간염 바이러스(HCV), 헤르페스 바이러스, 사람 면역결핍성 바이러스(HIV), 사람 파필로마바이러스(HPV), 십이지장충(hookworm), 마르부르그 바이러스(Marburg virus), 노로바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus; RSV), 로타바이러스, 살모넬라 타이피(salmonella typhi), 스타필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 스트렙토코쿠스 피오게네

스(*Streptococcus pyogenes*), 바리셀라(*varicella*), 웨스트 나일 바이러스(*West Nile virus*), 예르시니아 해충(*Yersinia pestis*), 및 지카 바이러스(*Zika virus*)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 감염체(infectious agent)의 항원이다. 구현예에서, ALPK1의 효능제, 예를 들면, 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타낸 ALPK1 효능제, ALPK1 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 단백질은 탄저병, 카리에스(caries), 샤가스병(Chagas disease), 뎅기열(dengue), 디프테리아, 에를리히증(ehrlichiosis), A 또는 B형 간염, 헤르페스(herpes), 계절성 인플루엔자, 일본 뇌염, 나병, 라임병(lyme disease), 말라리아, 홍역, 볼거리(mump), 수막구균성 질환, 예를 들면, 수막염 및 패혈증, 회선사상충증(*Onchocerciasis river blindness*), 백일해(pertussis, whooping cough), 폐렴쌍구균 질환, 폴리오(polio), 라비스(rabies), 루벨라(rubella), 주혈흡충병, 중증 급성 호흡기 증후군(SARS), 대상포진, 천연두, 매독, 파상풍, 폐결핵, 야토병, 진드기-매개 뇌염 바이러스(tick-borne encephalitis virus), 장티푸스(typhoid fever), 트리파노소마증(*trypanosomiasis*), 황열병(yellow fever), 또는 내장리슈만편모충증(*visceral leishmaniasis*)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 감염체의 항원이다.

[0032] 구현예에서, 본 개시내용은 대상체의 세포내에서 NFkB, p38, 및 JNK 세포 신호전달의 활성화에 의해 치료에 대해 수정가능한 질환 또는 장애의 치료 방법을 제공하며, 이러한 방법은 대상체에게 ALPK1의 효능제, ALPK1 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 돌연변이체 중 임의의 하나를 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다. 구현예에서, 질환 또는 장애는 결핵, 수막염, 폐렴, 폐양, 패혈증, 비염, 천식, 알레르기, COPD, 염증성 창자병, 관절염, 비만, 방사선-유발된 염증, 건선, 아토피성 피부염, 비-알코올성 스테아토간염(non-alcoholic steatohepatitis: NASH), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 전신 홍반 루프스(SLE), 자가면역성갑상샘염(그레이브스 질환(Grave's disease)), 다발성 경화증, 강직성 척수염(ankylosing spondylitis bullous disease), 및 C형 간염 바이러스(HCV), B형 간염 바이러스(HBV), 또는 사람 면역결핍성 바이러스(HIV)에 의해 유발된 질환 및 장애로부터 선택된다.

[0033] 구현예에서, 본 개시내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 세균, 바이러스, 또는 기생충으로부터 선택된 감염체에 의해 유발된 질환 또는 장애를 치료하거나 예방하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 ALPK1의 효능제, 예를 들면, 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB 또는 IC로 나타낸 ALPK1 효능제, ALPK1 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 돌연변이체 중 어느 하나를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여함을 포함한다. 구현예에서, 감염체는 세균이다. 구현예에서, 감염체는 바이러스이다. 구현예에서, 감염체는 기생충이다. 구현예에서, 세균은 그람-음성 또는 그람-양성 세균이다. 구현예에서, 그람-음성 세균은 악시네토박터 바우마니이(*Acinetobacter baumannii*), 아그레가토박터 악티노마이세템코미탄스(*Aggregatobacter actinomycetemcomitans*), 바르토넬라 바실리포르미스(*Bartonella bacilliformis*), 바르토넬라 헨셀라에(*Bartonella henselae*), 바르토넬라 키타나(*Bartonella quintana*), 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 보렐리아(*Borrelia*), 보르타델라 페르투씨스(*Bordetella pertussis*), 브루셀라 종(*Brucella sp.*), 부르콜데리아 세파시스(*Burkholderia cepacia*), 부르콜데리아 프세도말레이(*Burkholderia pseudomallei*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 카디오박테리움 호미니스(*Cardiobacterium hominis*), 캄필로박터 페투스(*Campylobacter fetus*), 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumonia*), 클리미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*), 시아노박테리아(*Cyanobacteria*), 에이켄넬라 코로덴스(*Eikennella corrodens*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 엔테로코쿠스 파시움(*Enterococcus faecium*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 에스케리키아 콜라이 0157, 프란세일라 툴라렌시스(*Franciaella tularensis*), 푸소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*), 헤모필루스 아프로필루스(*Haemophilus aphrophilus*), 헤모필루스 두크레이(*Haemophilus ducreyi*), 헤모필루스 파라인플루엔자(*Haemophilus parainfluenzae*), 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*), 킹젤라 킹가(*Kingella kingae*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 레지오넬라 박테리아(*Legionella bacteria*), 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*) 혈청그룹 1, 렙토스피라(*Leptospira*), 모르가넬라 모르가니이(*Morganella morganii*), 나이세리아 고노로에아(*Neisseria gonorrhoeae*), 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 믹소파시엔스(*Proteus myxofaciens*), 프로비덴시아 레트게리(*Providencia rettgeri*), 프로비덴시아 알칼리파시엔스(*Providencia alcalifaciens*), 프로비덴시아 스투아르티이(*Providencia stuartii*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 파우시모빌리스(*Pseudomonas paucimobilis*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 악시도보란스



(*Pseudomonas acidovorans*), 리케치아에(*Rickettsiae*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*), 살모넬라 파라티피(*Salmonella paratyphi*) A형, B형 티푸스(*typhus*), 살모넬라, 더블린(*Salmonella dublin*), 살모넬라 아리조나에(*Salmonella arizonae*), 살모넬라 콜레라에수이스(*Salmonella choleraesuis*), 세라티아 마르세스센스(*Serratia marcescens*), 시겔라 다이센테리아에(*Schigella dysenteriae*), 시겔라 플렉스네리(*Schigella flexneri*), 시겔라 보이디이(*Schigella boydii*), 시겔라 소네이(*Schigella sonnei*), 트레포네마(*Treponema*), 스테노트로포모나스 말토피리아(*Stenotrophomonas maltophilia*), 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*), 비브리오 미미쿠스(*Vibrio mimicus*), 비브리오 알기노라이티쿠스(*Vibrio alginolyticus*), 비브리오 홀리사에(*Vibrio hollisae*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 볼니피쿠스(*Vibrio vulnificus*) 및 예르시니아 페스티티스(*Yersinia pestitis*)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 구현예에서, 그람 양성 세균은 악티노마이세테스(*Actinomycetes*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*), 클로스트리디움 페르핀겐스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*), 코리네박테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*), 엔테로코쿠스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로코쿠스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 에리시펠로트릭스 루시오 패티아에(*Erysipelothrix rhusiopathiae*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 마이코박테리움 레프라에(*Mycobacterium leprae*), 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코플라스마(*Mycoplasma*), 노카르디아(*Nocardia*), 프로피오니박테리움(*Propionibacterium*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 뉴모콕시(*Pneumococci*), 스탕필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스탕필로코쿠스 에피데르미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 메티실린 내성 스탕필로코쿠스 아우레우스(*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; MRSA), 반코마이신 내성 스탕필로코쿠스 아우레우스(VRSA), 스탕필로코쿠스 루그두넨시스(*Staphylococcus lugdunensis*), 스탕필루코쿠스 사프로피타쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*), 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 및 스트렙토코쿠스 돌연변이체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 구현예에서, 바이러스는 에볼라바이러스(*ebolavirus*), B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 헤르페스 단성 바이러스(*herpes simplex virus*), 사람 면역결핍성 바이러스(HIV), 사람 파필로마바이러스(*Human papillomavirus*) (HPV-6, HPV-11), 사람 SARS 코로나바이러스, 인플루엔자 A 바이러스, 인플루엔자 B 바이러스, 인플루엔자 C 바이러스, 홍역 바이러스, 라비스 바이러스(*rabies virus*), 폴리오바이러스(*poliovirus*), SARS 코로나 바이러스, 및 황열 바이러스(*yellow fever virus*)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 구현예에서, 기생충은 아칸타모에바 종(*Acanthamoeba spp*), 아메리칸 트리파노소미아시스(*American trypanosomiasis*), 발라무티아 만드닐라니스(*Balamuthia mandnillanis*), 바베시아 디베르겐네스(*Babesia divergenes*), 바베시아 비게미나(*Babesia bigemina*), 바베시아 에퀴(*Babesia equi*), 바베시아 마이크로프티(*Babesia microfti*), 바베시아 둔카니(*Babesia duncani*), 발란티디움 콜리(*Balantidium coli*), 블라스토시스티스 종(*Blastocystis spp*), 크립토스포리디움 종(*Cryptosporidium spp*), 사이클로스포라 카에타넨시스(*Cyclospora cayetanensis*), 디엔타모에바 프라길리스(*Dientamoeba fragilis*), 디필로보트리움 라툼(*Diphyllobothrium latum*), 레이슈마니아 아마조네시스(*Leishmania amazonensis*), 나에글레리아 포우데리(*Naegleria fowderi*), 플라스모디움 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 플라스모디움 비박스(*Plasmodium vivax*), 플라스모디움 오발레 쿠르티시(*Plasmodium ovale curtisi*), 플라스모디움 말라리아에(*Plasmodium malariae*), 리노스포리디움 시베리(*Rhinosporidium seeberi*), 사르코시스티스 보비호미니스(*Sarcocystis bovi hominis*), 사르코시스티스 수이호미니스(*Sarcocystis sui hominis*), 톡소플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*), 트리크모나스 바기날리스(*Trichomonas vaginalis*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 및 타에니아 멀티셉스(*Taenia multiceps*)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0034] 상기한 방법 중 어느 하나의 구현예에서, 방법은 대상체에게 하나 이상의 추가의 치료제 또는 면역 조절제, 및 이의 조합물을 투여함을 추가로 포함할 수 있다. 구현예에서, 하나 이상의 추가의 치료제는 항-미생물제, 예를 들면, 항-세균제, 항-바이러스제, 또는 항-기생충제, 항암제, 또는 결핵, 뇌수막염, 폐렴, 결양, 폐혈증, 비염, 천식, 알레르기, COPD, 염증성 창자병, 관절염, 비만, 방사선-유발된 염증, 건선, 아토피성 피부염, 비-알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis; NASH), 알츠하이머 질환, 전신 홍반 루푸스(systemic lupus, erythematosus; SLE), 자가면역 갑상선염(그레이브스 질환(Grave's disease)), 다발 경화증, 및 강직성 척추염 기증 질환(ankylosing spondylitis bullous disease)의 치료를 위한 치료제로부터 선택된다.

[0035] 암 치료 방법의 구현예에서, 하나 이상의 추가의 치료제는 면역 조절인자이다. 구현예에서, 면역 조절인자는 면역체코포인트 조절인자의 억제제 또는 길항제, 면역 자극 분자, 및 면역 공-자극성 분자의 효능제 중 하나 이상



으로부터 선택된다. 구현예에서, 면역 체크포인트 조절인자의 억제제 또는 길항제는 PD-1/PD-L1 억제제이다. 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제는 니볼루맙, 펌브롤리주맙, 피딜리주맙, BMS-936559, 아테졸리주맙, 두르발루맙, 및 아벨루맙으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 구현예에서, 면역 조절인자는 인터페론 알파(INF  $\alpha$ ), 인터페론 유전자의 자극인자("STING") 효능제, TLR 효능제(예컨대, 레스퀴모드), 및 항-OX40(CD134) 효능제 항체로부터 선택된다. 구현예에서, 면역 공-자극 분자의 효능제는 항-OX40(CD134) 효능제 항체이다. 구현예에서, 암은 진단된 흑색종, 비-소세포 폐암, 신장 세포 암종, 방광암, 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 간암, 위암, 결장암, 유방암, 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 전립선암, 두경부암, 갑상샘암, 뇌암, 급성 골수성 백혈병(AML), 머켈 세포 암종(merkel cell carcinoma), 다발 골수종, 자궁경부암, 및 육종으로부터 선택된다.

[0036] 구현예에서, 하나 이상의 추가의 면역 조절인자는 면역 체크포인트 조절인자의 억제제 또는 길항제, 또는 면역 체크포인트 조절인자에 대한 백신이다. 구현예에서, 하나 이상의 추가의 면역 조절인자는 면역 체크포인트 조절인자의 효능제, 예컨대, 공-자극 분자, 예를 들면, OX40의 효능제(CD134)이다. 구현예에서, 면역 체크포인트 조절인자는 프로그램된 세포 사멸 1(PD-1) 수용체(CD279), PD-1의 리간드(예컨대, PD-L1), 세포독성 T-림프구 관련 단백질 4(CTLA4), 종양 괴사 인자 수용체 상과 구성원 9(대안적으로 TNFRSF9, 4-1BB) 및 4-1BB 리간드, 종양 괴사 인자 수용체 상과 구성원 4(대안적으로 TNFRSF4, OX40) 및 OX40 리간드, 글루코코르티코이드-유도된 TNFR-관련 단백질(GITR), 종양 괴사 인자 수용체 상과 구성원 7(대안적으로 TNFRSF7, 분화의 집단 27, CD27), TNFRSF25 및 TNF-유사 리간드 1A(TL1A), TNF 수용체 상과 구성원 5(대안적으로 TNFRSF5, CD40) 및 CD40 리간드, 헤르페스바이러스 도입 매개인자(Herpesvirus entry mediator; HVEM)-종양 괴사 인자 리간드 상과 구성원 14(대안적으로 TNFSF14, LIGHT)-림프독소 알파(LTA), 헤르페스바이러스 도입 매개인자-(HVEM)-B- 및 T-림프구 약화인자(BTLA)-CD160(대안적으로 TNFSF14), 림프구 활성화 유전자 3(LAG3), T-세포 면역글로불린 및 뮤신(mucin)-도메인 함유-3(TIM3), 시알산-결합 면역글로불린-유사 렉틴(SIGLEC), 유도성 T-세포 공자극인자(ICOS) 및 ICOS 리간드, B7-H3(B7 계열, 대안적으로 CD276), V-세트 도메인-함유 T-세포 활성화 억제제 1(VTCN1, 대안적으로 B7-H4), T-세포 활성화의 V-형 면역글로불린 도메인-함유 억제인자(Type immunoglobulin domain-containing suppressor of T-cell activation; VISTA), 사람 내인성 레트로바이러스-H 긴 말단 반복체-관련 단백질 2(HHLA2)-막관통 및 면역글로불린 도메인 함유 2(TMIGD2), 부티로필린, 천연 킬러 세포 수용체 2B4(대안적으로 NK2B4, CD244) 및 B-세포 막 단백질(CD48), 면역글로불린(Ig)을 지닌 T-세포 면역수용체 및 면역수용체 타이로신-기반 억제 모티프 도메인(TIGIT) 및 폴리오바이러스 수용체(PVR) 계열 구성원, 킬러-세포 면역글로불린-유사 수용체(KIR), 면역글로불린-유사 전사체(Immunoglobulin-like transcript; ILT) 및 백혈구 면역글로불린-유사 수용체(leukocyte immunoglobulin-like 수용체; LIR), 천연 킬러 그룹 단백질 2 구성원 D(NKG2D) 및 천연 킬러 그룹 단백질 2 구성원 A(NKG2A), 주요 조직적합성 복합체(MHC) 제I 부류 폴리펩타이드-관련 서열 A(MICA) 및 MHC 제I 부류 폴리펩타이드-관련 서열 B(MICB), 천연 킬러 세포 수용체 2B4(CD244), 콜로니 자극 인자 1 수용체(CSF1R), 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO), 형질전환 성장 인자 베타(TGF  $\beta$ ), 아데노신-엑토-뉴클레오타이드 트리포스페이트 디포스포하이드롤라제 1(CD39)-5'-뉴클레오타이드(CD73), C-X-C 모티프 케모킨 수용체 4(CXCR4) 및 C-X-C 모티프 케모킨 리간드 12(CXCL12), 포스포티딜세린, 신호 조절성 단백질 알파(SIRPA) 및 인테그린 관련 단백질(CD47), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 및 뉴로필린으로부터 선택된다.

[0037] 구현예에서, 하나 이상의 추가의 면역 조절인자는 백신이다.

[0038] 암 치료용 방법의 구현예에서, 백신은 종양 항원에 대한 백신이다. 구현예에서, 종양 항원은 당단백질 100(gp100), 뮤신 1(MUC1), 및 흑색종-관련 항원 3(MAGEA3)로부터 선택된다.

[0039] 구현예에서, 하나 이상의 추가의 면역 조절인자는 T 세포, 바람직하게는 키메라 항원 수용체 T 세포이다. 구현예에서, 하나 이상의 추가의 면역 조절인자는 바람직하게는 과립구-대식구 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 인터루킨 7(IL-7), IL-12, IL-15, IL-18, 및 IL-21으로부터 선택된 재조합 단백질이다.

[0040] 상기한 방법 중 어느 하나의 구현예에서, 조성물은 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타낸 ALPK1 효능제, 또는 D-글리세로- $\beta$ -D-만노-헵토즈 1,7-비스포스페이트(HBP)로부터 선택된 ALPK1 효능제, 및 이의 전구 약물, 유사체 및 유도체를 포함할 수 있다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 HBP이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 1-3, 9-17, 19, 20-22, 및 26-32 중 임의의 하나로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 15이다.

[0041] 구현예에서, ALPK1 효능제는 HBP의 전구약물이다. 구현예에서, 전구약물은 카보닐옥시메틸, 사이클로살리게닐, 사이클릭 1-아릴-1,3-프로판일 에스테르, 아릴옥시 포스포라미데이트 또는 포스포아미데이트, 및 메틸아릴 할로알킬아미데이트로 이루어진 그룹으로부터 선택된 보호 그룹을 포함한다. 구현예에서, 전구약물은 화학식 3a,

3b, 3c, 3d, 또는 3e의 화합물이다. 구현예에서, 전구약물은 표 1의 화합물로부터 선택된다.

- [0042] 상기한 방법 중 어느 하나의 구현예에서, 조성물은 ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 돌연변이체를 포함할 수 있다. 구현예에서, 조성물은 ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체를 포함한다. 구현예에서, 조성물은 바이러스 또는 비-바이러스 유전자 전달 시스템을 사용하여 대상체에게 투여하기 위해 조정된다. 구현예에서, 조성물은 바이러스 유전자 전달 시스템을 사용하여 대상체에게 투여하기 위해 조정된다. 구현예에서, 조성물은 바이러스 입자를 추가로 포함한다. 구현예에서, 조성물은 비-바이러스 유전자 전달 시스템을 사용하여 대상체에게 투여하기 위해 조정된다. 구현예에서, 조성물은 리포좀 입자, 나노입자, 미니서클(minicircle), 미니백터, 및 중합체성 담체 중 하나 이상을 추가로 포함한다. 구현예에서, 비-바이러스 유전자 전달 시스템은 유전자 편집 기술을 포함한다. 구현예에서, 유전자 편집 기술은 메가뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제(zinc finger nuclease; ZFN), 전사 활성인자-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 CRISPR/Cas-9를 이용한다.
- [0043] 구현예에서, 본 개시내용은 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에서 간 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 저 용량의 H1b-ADP, 또는 이의 유도체를 대상체에게 투여함을 포함한다. 구현예에서, 저 용량은 체중 킬로그램당 1 나노그램 내지 1 밀리그램(1 ng/kg 내지 1 mg/kg), 바람직하게는 체중 킬로그램당 1 마이크로그램 내지 100 마이크로그램(1 ug/kg 내지 100 ug /kg)이다. 구현예에서, 간 질환 또는 장애는 간암, 비-알코올성 지방간염(NASH), 및 C형 간염(HCV) 또는 B형 간염(HBV)에 의한 감염으로 유발된 질환 또는 장애로부터 선택된다.
- [0044] 구현예에서, 본 개시내용은 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 H1b-ADP 또는 H1b-ADP-6L을 생산하는 세균을 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다. 구현예에서, 조성물은 종양내 주사를 통해 투여된다.
- [0045] 상기한 방법 중 어느 하나의 구현예에서, 대상체는 척추동물일 수 있다. 구현예에서, 대상체는 사람이다.
- [0046] 본 개시내용은 또한 ALPK1의 효능제를 포함하는 백신 조성물 또는 백신 보조제(adjuvant) 및 ALPK1의 효능제, 및 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 이러한 조성물의 구현예에서, ALPK1의 효능제는 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타난 화합물, HBP, 또는 이의 전구약물, 유사체, 또는 유도체이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 1-3, 9-17, 19, 20-22, 및 26-32 중 어느 하나로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 15이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 HBP의 전구약물이다. 구현예에서, 전구약물은 카보닐옥시메틸, 사이클로살리게닐, 사이클릭 1-아릴-1,3-프로판일 에스테르, 아릴옥시 포스포르아미데이트 또는 포스포아미데이트, 및 메틸아릴 할로알킬아미데이트로 이루어진 그룹으로부터 선택된 보호 그룹을 포함한다. 구현예에서, 전구약물은 화학식 3a, 3b, 3c, 3d, 또는 3e의 화합물이다. 구현예에서, 전구약물은 표 1의 화합물로부터 선택된다.
- [0047] 본 개시내용은 또한 포유동물 대상체에서 면역 반응을 조절할 수 있는 화합물을 선택하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 ALPK1을 시험 화합물과 ATP의 존재하에서 및, 별도로 그러나 동시에, ATP의 부재하에서 접촉시킨 다음, 검정을 수행하여 ALPK1 신호전달의 하나 이상의 하부 표적의 ALPK1 인산화 및/또는 활성화를 검출함을 포함한다. 구현예에서, ALPK1과 시험 화합물의 접촉은 세포-유리 시스템 또는 세포 시스템내에서 수행한다. 구현예에서, ALPK1 신호전달의 하나 이상의 하부 표적의 ALPK1 인산화 및/또는 활성화는 방사측정 기반 키나제 검정, 형광성-기반 키나제 검정, 시간-분할된 형광성 에너지 전달(time-resolved fluorescence energy transfer; TR-FRET) 기반 검정, 알파-기술 기반 검정, 효소-연결된 면역흡착성 검정, 발광 검출, 이동성 쉬프트 기반 키나제 검정(mobility shift based kinase assay), 웨스턴 기반 키나제 검정(Western based kinase assay), 및 리간드-키나제 결합 검정을 포함한다.
- [0048] 본원에 기술된 방법 중 어느 하나에 따라서, ALPK1 효능제는 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타난 화합물, D-글리세로-b-D-만노-헵토즈 1,7-비스포스페이트(HBP), D-글리세로-b-D-만노-헵토즈-1-포스페이트(HMP-1bP), L-글리세로-D-만노-헵토즈-1β-ADP(H1b-ADP-6L) 및 D-글리세로-D-만노-헵토즈-1β-ADP(H1b-ADP), 및 상기한 분자 중 어느 하나의 전구약물, 유사체 및 유도체로부터 선택될 수 있다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 HMP-1bP, H1b-ADP, 및 H1b-ADP-6L로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 본원에 기술된 바와 같은 H1b-ADP 또는 H1b-ADP-6L, 및 이의 유도체이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 H1b-ADP이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 1-3, 9-17, 19, 20-22, 및 26-32 중 임의의 하나로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 15이다.

- [0049] 구현예에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타낸 화합물, HBP, HMP-1bP, H1b-ADP, 및 H1b-ADP-6L로부터 선택된 ALPK1의 효능제를 포함하는 백신 조성물 또는 백신 보조제 조성물을 제공한다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 HMP-1bP, H1b-ADP, 및 H1b-ADP-6L로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 본원에 기술된 바와 같은 H1b-ADP 또는 H1b-ADP-6L, 및 이의 유도체이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 H1b-ADP이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타낸 화합물이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 1-3, 9-17, 19, 20-22, 및 26-32 중 임의의 하나로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 15이다.
- [0050] 구현예에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타낸 화합물, HBP, HMP-1bP, H1b-ADP, 및 H1b-ADP-6L로부터 선택된 ALPK1의 효능제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 HMP-1bP, H1b-ADP, 및 H1b-ADP-6L로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 본원에 기술된 바와 같은 H1b-ADP 또는 H1b-ADP-6L, 및 이의 유도체이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 H1b-ADP이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타낸 화합물이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 1-3, 9-17, 19, 20-22, 및 26-32 중 어느 하나로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 15이다.
- [0051] 구현예에서, 본 개시내용은 대상체에게 본원에 기술된 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타낸 화합물, HBP, HMP-1bP, H1b-ADP 및 H1b-ADP-6L로 이루어진 그룹으로부터 선택된 ALPK1의 효능제를 포함하는 조성물을 투여함을 포함하여, 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 HMP-1bP, H1b-ADP 및 H1b-ADP-6L로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 본원에 기술된 바와 같은 H1b-ADP 또는 H1b-ADP-6L, 및 이의 유도체이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 H1b-ADP이다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 1-3, 9-17, 19, 20-22, 및 26-32 중 어느 하나로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 화합물 15이다. 구현예에서, 방법은 대상체에게 면역 공-자극 분자의 PD-1/PD-L1 억제제 또는 효능제를 투여함을 추가로 포함한다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 H1b-ADP이고 PD-1/PD-L1 억제제는 니볼루맵, 펌브롤리주맵, 피딜리주맵, BMS-936559, 아테졸리주맵, 두루발루주맵, 및 아벨루맵으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 H1b-ADP이고 면역 공-자극 분자의 효능제는 항-OX40(CD134) 효능제 항체이다. 상기한 방법에 따라서, 대상체는 사람 대상체일 수 있고 암은 상기 본원에 기술된 바와 같은 암일 수 있다. 구현예에서, 암은 고형 종양이다. 구현예에서, 암은 난치성이다.
- [0052] 본 개시내용은 또한 치료요법(therapy)에서 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 이러한 조성물은 D-글리세로-β-D-만노-헵토스 1,7-비스포스페이트(HBP), D-글리세로-β-D-만노-헵토스-1-포스페이트(HMP-1bP), L-글리세로-D-만노-헵토스-1β-ADP(H1b-ADP-6L) 및 D-글리세로-D-만노-헵토스-1β-ADP(H1b-ADP)로부터 선택된 ALPK1 효능제, 및 이의 전구약물, 유사체 및 유도체를 포함하거나; 조성물은 H1b-ADP-6L, H1b-ADP로부터 선택된 ALPK1 효능제, 또는 청구항 1 내지 22 중 어느 하나의 화합물 및 표 1의 화합물 1-33 중 어느 하나로부터 선택된 이의 유도체를 포함한다.
- [0053] 본 개시내용은 또한 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 조절하는 방법에서 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 이러한 조성물은 D-글리세로-β-D-만노-헵토스 1,7-비스포스페이트(HBP), D-글리세로-β-D-만노-헵토스-1-포스페이트(HMP-1bP), L-글리세로-D-만노-헵토스-1β-ADP(H1b-ADP-6L) 및 D-글리세로-D-만노-헵토스-1β-ADP(H1b-ADP)로부터 선택된 ALPK1 효능제, 및 이의 전구약물, 유사체 및 유도체를 포함하거나; 조성물은 H1b-ADP-6L, H1b-ADP로부터 선택된 ALPK1 효능제, 또는 청구항 1 내지 22 중 어느 하나 및 표 1의 화합물 1-33 중 어느 하나의 화합물로부터 선택된 이의 유도체를 포함한다.
- [0054] 본 개시내용은 또한 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 이러한 조성물은 D-글리세로-β-D-만노-헵토스 1,7-비스포스페이트(HBP), D-글리세로-β-D-만노-헵토스-1-포스페이트(HMP-1bP), L-글리세로-D-만노-헵토스-1β-ADP(H1b-ADP-6L) 및 D-글리세로-D-만노-헵토스-1β-ADP(H1b-ADP)로부터 선택된 ALPK1 효능제, 및 이의 전구약물, 유사체 및 유도체를 포함하거나; 조성물은 H1b-ADP-6L, H1b-ADP로부터 선택된 ALPK1 효능제, 또는 청구항 1 내지 22 중 어느 하나의 화합물 및 표 1의 화합물 1 내지 33 중 어느 하나로부터 선택된 이의 유도체를 포함한다.
- [0055] 본 개시내용은 또한 이러한 치료가 필요한 대상체에서 면역 반응을 강화시키기 위한 방법에서 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 이러한 조성물은 D-글리세로-β-D-만노-헵토스 1,7-비스포스페이트(HBP), D-글리세로-β-D-만노-헵토스-1-포스페이트(HMP-1bP), L-글리세로-D-만노-헵토스-1β-ADP(H1b-ADP-6L) 및 D-글리세로-D-만노-헵토스-1β-ADP(H1b-ADP)로부터 선택된 ALPK1 효능제, 및 이의 전구약물, 유사체 및 유도체를 포함하거나; 조성물

은 H1b-ADP-6L, H1b-ADP로부터 선택된 ALPK1 효능제, 또는 청구항 1 내지 22 중 어느 하나의 화합물 및 표 1의 화합물 1 내지 33 중 어느 하나로부터 선택된 이의 유도체를 포함한다.

[0056] 본 개시내용은 또한 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에서 대상체의 세포내 NFkB, p38, 및 JNK 세포 신호전달 경로의 활성화에 의해 치료에 대해 조정가능한(amendable) 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법에서 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 이러한 조성물은 D-글리세로-β-D-만노-헵토즈 1,7-비스포스페이트(HBP), D-글리세로-β-D-만노-헵토즈-1-포스페이트(HMP-1bP), L-글리세로-D-만노-헵토즈-1β-ADP(H1b-ADP-6L) 및 D-글리세로-D-만노-헵토즈-1β-ADP(H1b-ADP)로부터 선택된 ALPK1 효능제, 및 이의 전구약물, 유사체 및 유도체를 포함하거나; 조성물은 H1b-ADP-6L, H1b-ADP로부터 선택된 ALPK1 효능제, 또는 청구항 1 내지 22 중 어느 하나의 화합물 및 표 1의 화합물 1 내지 33 중 어느 하나로부터 선택된 이의 유도체를 포함한다.

[0057] 본 개시내용은 또한 이를 필요로 하는 대상체에서 세균, 바이러스, 또는 기생충으로부터 선택된 감염체에 의해 유발된 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 이러한 조성물은 D-글리세로-β-D-만노-헵토즈 1,7-비스포스페이트(HBP), D-글리세로-β-D-만노-헵토즈-1-포스페이트 (HMP-1bP), L-글리세로-D-만노-헵토즈-1β-ADP(H1b-ADP-6L) 및 D-글리세로-D-만노-헵토즈-1β-ADP(H1b-ADP)로부터 선택된 ALPK1 효능제, 및 이의 전구약물, 유사체 및 유도체를 포함하거나; 조성물은 H1b-ADP-6L, H1b-ADP로부터 선택된 ALPK1 효능제, 또는 청구항 1 내지 22 중 어느 하나의 화합물 및 표 1의 화합물 1 내지 33 중 어느 하나로부터 선택된 이의 유도체를 포함한다.

[0058] 본 개시내용은 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 방법에서 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 이러한 조성물은 H1b-ADP-6L, H1b-ADP로 이루어진 그룹으로부터 선택된 ALPK1의 효능제, 또는 청구항 1 내지 22 중 어느 하나 및 표 1의 화합물 1 내지 33 중 어느 하나의 화합물로부터 선택된 이의 유도체를 포함하며, 이러한 방법은 ALPK1 효능제와, 면역 체크포인트 조절인자의 억제제 또는 길항제, 면역 자극성 분자, 및 면역 공-자극성 분자의 효능제 중 하나 이상으로부터 선택된 면역 조절인자의 조합 치료요법을 포함한다.

[0059] 본 개시내용은 또한 이러한 치료가 필요한 대상체에서 간 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법에서 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 이러한 조성물은 저 용량의 H1b-ADP, 또는 이의 유도체를 포함하고, 여기서 간 질환 또는 장애는 간염, 비-알코올성 지방간(NASH), 및 C형 간염 바이러스(HCV) 또는 B형 간염 바이러스(HBV)에 의한 감염으로 유발된 질환 또는 장애로부터 임의로 선택된다.

[0060] 본 개시내용은 또한 암을 치료하기 위한 방법에서 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 이러한 조성물은 H1b-ADP 또는 H1b-ADP-6L을 생산하는 세균을 포함하며, 여기서 조성물은 종양내 주사를 위해 임의로 조정된다.

## 도면의 간단한 설명

[0061] 도면의 간단한 설명

도 1a 및 1b: ALPK1 동형(isoform) 1(A) 및 동형 2(B)에 대한 단백질 서열.

도 2a 및 2b: IL-8(A) 및 TNF α (B) mRNA 발현은 ALPK1-의존적인 방식으로 HBP(화학적으로-합성됨)에 의해 둘 다 증가되었다.

도 3a 및 3b: IL-8(A) 및 TNF α (B) mRNA 발현은 ALPK1-의존적인 방식으로 HMP-1bP(화학적으로-합성됨)에 의해 둘 다 증가되었다.

도 4a 내지 4b: IL-8(A) 및 TNF α (B) mRNA 발현은 ALPK1-의존적인 방식으로 H1b-ADP(화학적으로-합성됨)에 의해 둘 다 증가되었다.

도 5a 및 5b: 각각의 HBP, HMP-1bP, 및 H1b-ADP에 의해 유도된 IL-8(A) 및 TNF α (B) mRNA 발현.

도 6: 화학적으로-합성된 HBP, HMP-1bP, 및 H1b-ADP(H1b-ADP 만이 결합한다)의 존재하에서 ALPK1에 대한 결합을 나타내는 열-이동 검정(Thermal-shift assay).

도 7: 화학적으로-합성된 HBP, HMP-1bP 및 H1b-ADP(TIFA는 H1b-ADP의 존재하에서만 인산화된다)의 존재하에서 ALPK1 기질 TIFA의 인산화를 나타내는 세포-유리된 검정.

도 8: H1b-ADP(화학적으로-합성됨)의 존재하에서 ALPK1의 자가-인산화의 세포-유리된 키나제 검정.

도 9: H1b-ADP(화학적으로-합성됨)의 존재하에서 I κB의 ALPK1-의존적인 인산화의 세포-유리된 키나제 검정.



- 도 10:** 화학적으로-합성된 H1b-ADP 및 H1b-ADP-6L의 존재하에서 ALPK1 기질 TIFA의 인산화를 나타내는 세포-유리된 키나제 검정.
- 도 11:** H1b-ADP의 종양내 주사는 마우스 CT26 이종이식체 모델에서 종양 성장을 억제하나, HMP-1bP는 그렇지 않다.
- 도 12:** H1b-ADP의 종양내 주사는 사이토킨 및 PD-1, PD-L1의 증가된 발현을 야기한다.
- 도 13a 및 13b:** H1b-ADP 및 항-PD-1 항체(RMP1-14)의 종양내 주사는 마우스 CT26 이종이식체 모델에서 주사된 종양(A) 및 멀리 떨어진 종양(B)에서 종양 성장을 상승적으로 억제한다.
- 도 14:** H1b-ADP 및 항-PD-1 항체(OX40)의 종양내 주사는 마우스 CT26 이종이식체 모델에서 종양 성장을 상승적으로 억제한다.
- 도 15:** H1dE 돌연변이체 이. 콜라이(E. coli)로부터 정제된 HBP+ H1da(좌측) 또는 야생형 이. 콜라이로부터 정제된 HBP+ H1da(우측)의 존재하에서 ALPK1-의존성 TIFA 인산화를 위한 시험관내(in vitro) 키나제 반응 후 포스포-TIFA의 웨스턴 분석.
- 도 16a 및 16b:** H1b-ADP 및 항-PD-L1 항체의 종양내 주사는 마우스 CT26 이종이식체 모델에서 주사된 종양(A) 및 멀리 떨어진 종양(B)에서 종양 성장을 상승적으로 억제한다.
- 도 17a 내지 17b:** H1b-ADP 및 IFN- $\alpha$ 의 종양내 주사는 마우스 CT26 이종이식체 모델에서 주사된 종양(A) 및 멀리 떨어진 종양(B)에서 종양 성장을 상승적으로 억제한다.
- 도 18:** H1b-ADP 및 항-CTLA-4 항체의 종양내 주사는 마우스 CT26 이종이식체 모델에서 종양 성장을 상승적으로 억제한다. 쌍식(Pair-wise) p 값은 T 시험으로 측정하였으며 우측에 바아로 나타낸다, \*p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.
- 도 19:** H1b-ADP 및 STING 효능제 c-디-AM(PS)2의 종양내 주사는 마우스 CT26 이종이식체 모델에서 종양 성장을 상승적으로 억제한다. 쌍식 p 값은 T 시험으로 측정하였고 우측에 바아로 나타낸다, \*p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.
- 도 20:** H1b-ADP 및 항-CD4 항체의 종양내 주사는 마우스 CT26 이종이식체 모델에서 종양 성장을 상승적으로 억제한다.
- 도 21:** H1b-ADP 및 TLR 효능제 레스퀴모드(resiquimod)의 종양내 주사는 마우스 CT26 이종이식체 모델에서 종양 성장을 상승적으로 억제한다.
- 도 22:** 소 태아(fetal bovine), 사람, 및 마우스 혈청은 HEK293 세포내에서 IL8 분비를 유도하는데 있어서 H1b-ADP의 활성을 감소시킨다.
- 도 23:** Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>는 소 태아 혈청에 의한 분해로부터 H1b-ADP를 보호한다.
- 도 24:** Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>는 소 태아 혈청에 의한 분해로부터 H1b-ADP를 보호하고 HEK293 세포내에서 IL8 분비를 유도하는 이의 활성을 유지한다.
- 도 25:** AMP는 소 태아 혈청에 의한 분해로부터 H1b-ADP를 보호하고 HEK293 세포내에서 IL8 분비를 유도하는 이의 활성을 유지한다.
- 도 26:** 화학식 I의 화합물(1, 2, 9-12)은 ALPK1의 활성화를 통해 HEK293 세포내에서 IL8 분비를 활성화시킨다. HEK293 세포는 FBS의 부재하에서 배양되었다.
- 도 27a 및 27b:** 화학식 I의 화합물(3, 15, 19, 20)은 ALPK1의 활성화를 통해 FBS의 부재(A) 및 10% FBS 세포의 존재(B) 하에 HEK293 내에서 IL8 분비를 활성화시킨다. 화합물 15는 FBS 분해에 대해 내성이다.
- 도 28a 및 28b:** 화학식 I의 화합물(5, 13, 14, 17, 21, 22)은 FBS의 부재(A) 및 10% FBS의 존재(B) 하에서 HEK293 세포내에서 증가된 IL8 분비에 의해 입증된 바와 같이 ALPK1을 활성화시킨다.
- 도 29a 및 29b:** 화학식 I의 화합물(16, 26 내지 32)은 FBS의 부재(A) 및 10% FBS의 존재(B) 하에 HEK293 세포내에서 증가된 IL8 분비에 의해 입증된 바와 같이 ALPK1을 활성화시킨다.

도 30: 화학식 I의 화합물(1, 2)은 CT26 동계(syngeneic) 마우스 종양 모델에서 종양 성장을 억제한다.

도 31: 골수-유래된 마우스 대식구는 매우 낮은 농도의 H1b-ADP로 활성화될 수 있다.

도 32a 및 32b: 화합물 1은 2 nmole(1.2  $\mu$ g) 정도로 낮은 용량에서 간 조직(A) 및 200 nmole의 용량에서 폐 조직(B) 내 염증 반응을 활성화시킨다.

도 33: 세균 H1b-ADP-생합성 경로의 개략도.

## 상세한 설명

본 개시내용은 적합한 효능제, ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 돌연변이체를 사용한 ALPK1의 치료학적 활성화와 관련된 조성물 및 방법을 제공한다.

## 정의

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "ALPK1"은 사람 ALPK1 유전자의 2개의 스플라이스 변이체(splice variant)인, 동형 1 또는 동형2 중 어느 하나에 관한 것일 수 있다. 각각의 동형은 동일한 키나제 도메인을 공유한다. 참고로, 사람 ALPK1 유전자는 엔트레즈 유전자 확인번호(Entrez Gene ID) 800으로 확인된다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "ALPK1의 활성화"는 ALPK1 키나제 활성의 활성화를 지칭한다. 구현예에서, 본 개시내용은 예를 들면, ALPK1 활성화 리간드, 예를 들면, HBP일 수 있는 ALPK1 효능제, 또는 이의 전구약물, 유사체 또는 유도체를 제공함으로써 ALPK1을 활성화시키는 방법을 제공한다. 합성 HBP를 제조하는 방법은 예를 들면, 문헌: Inuki S et al. Organic Letter 2017 19(12):3079-82에 기술된 바와 같이 공지되어 있다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 HMP-1bP 및 H1b-ADP 및 이의 전구약물, 유사체 및 유도체로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 H1b-ADP, 또는 이의 전구약물, 유사체 또는 유도체이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 화학식 I, IA, IB, 또는 IC로 나타낸 ALPK1 효능제를 제공함으로써 ALPK1을 활성화시키는 방법을 제공한다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "알킬"은 나타낸 탄소 원자의 수를 갖는 직쇄 또는 측쇄의, 포화된, 지방족 라디칼을 지칭한다. 알킬은 임의의 수의 탄소, 예를 들면, C<sub>1-2</sub>, C<sub>1-3</sub>, C<sub>1-4</sub>, C<sub>1-5</sub>, C<sub>1-6</sub>, C<sub>1-7</sub>, C<sub>1-8</sub>, C<sub>1-9</sub>, C<sub>1-10</sub>, C<sub>2-3</sub>, C<sub>2-4</sub>, C<sub>2-5</sub>, C<sub>2-6</sub>, C<sub>3-4</sub>, C<sub>3-5</sub>, C<sub>3-6</sub>, C<sub>4-5</sub>, C<sub>4-6</sub> 및 C<sub>5-6</sub>를 포함할 수 있다. 예를 들면, C<sub>1-6</sub> 알킬은 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 2급-부틸, 3급-부틸, 펜틸, 이소펜틸, 헥실 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 알킬은 또한 20개 이하의 탄소 원자를 갖는 알킬 그룹, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실 등을 지칭할 수 있다. 알킬 그룹은 치환되거나 비치환될 수 있다. 일부 구현예에서, 알킬 그룹은 1 내지 2개의 치환체로 치환된다. 비-제한적인 예로서, 적합한 치환체는 할로겐 및 하이드록실을 포함한다.

본원에 사용된 바와 같은, "알케닐"은 적어도 2개의 탄소 원자 및 적어도 하나의 이중 결합을 갖는 직쇄 또는 측쇄 탄화수소를 지칭한다. 알케닐은 임의의 수의 탄소, 예를 들면, C<sub>2</sub>, C<sub>2-3</sub>, C<sub>2-4</sub>, C<sub>2-5</sub>, C<sub>2-6</sub>, C<sub>2-7</sub>, C<sub>2-8</sub>, C<sub>2-9</sub>, C<sub>2-10</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>3-4</sub>, C<sub>3-5</sub>, C<sub>3-6</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>4-5</sub>, C<sub>4-6</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>5-6</sub>, 및 C<sub>6</sub>를 포함할 수 있다. 알케닐 그룹은 임의의 적합한 수의 이중 결합, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는, 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 이중 결합을 가질 수 있다. 알케닐 그룹은 치환되거나 비치환될 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "알킬렌"은 나타낸 탄소 원자의 수를 가지고, 적어도 2개의 다른 그룹, 즉, 2가 탄화수소 라디칼을 연결시키는 직쇄 또는 측쇄의, 포화된, 지방족 라디칼을 지칭한다. 알킬렌에 연결된 2개의 모이어티(moiety)는 알킬렌 그룹의 동일한 원자 또는 상이한 원자에 연결될 수 있다. 예를 들면, 직쇄 알킬렌은 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-의 2가 라디칼일 수 있으며, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다. 대표적인 알킬렌 그룹은 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 이소프로필렌, 부틸렌, 이소부틸렌, 2급-부틸렌, 펜틸렌 및 헥실렌을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 알킬렌 그룹은 치환되거나 비치환될 수 있다. 일부 구현예에서, 알킬렌 그룹은 1 내지 2개의 치환체로 치환된다. 비-제한적인 예로서, 적합한 치환체는 할로겐 및 하이드록실을 포함한다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "알콕시" 또는 "알콕실"은 알킬 그룹을 부착 점에 연결시키는 산소 원자를 갖는 알킬 그룹을 지칭한다: 알킬-O-. 알킬 그룹의 경우, 알콕실 그룹은 임의의 적합한 수의 탄소 원자, 예를 들면, C<sub>1-6</sub>를 가질 수 있다. 알콕실 그룹은 예를 들면, 메톡시, 에톡시, 프로톡시, 이소-프로톡시, 부톡시, 2-부톡시, 이소-부톡시, 2급-부톡시, 3급-부톡시, 펜톡시, 헥톡시 등을 포함한다. 알콕시 그룹은 치환되거나 비치환될 수

있다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "알케닐옥시" 또는 "알케닐옥실"은 상기 정의된 바와 같이, 알케닐 그룹을 부착 점에 연결시키는 산소 원자를 갖는 알케닐 그룹을 지칭한다: 알케닐-O-. 알케닐옥실 그룹은  $C_{1-6}$ 과 같이 임의의 적합한 수의 탄소 원자를 가질 수 있다. 알케닐옥실 그룹은 자체내에 기술된 다양한 치환체로 추가로 치환될 수 있다. 알케닐옥실 그룹은 치환되거나 비치환될 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "알킬아민" 또는 "알킬아미노"는 알킬 그룹을 부착 점에 연결시키는 질소 원자를 갖는 알킬 그룹을 지칭한다: 알킬-N-. 알킬 그룹의 경우, 알콕실 그룹은  $C_{1-6}$ 과 같이 임의의 적합한 수의 탄소 원자를 가질 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "할로겐"은 불소, 염소, 브롬 및 요오드를 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "할로알킬"은 상기 정의된 바와 같은 알킬을 지칭하며, 여기서 수소 원자 중 일부 또는 모두는 할로겐 원자로 대체된다. 알킬 그룹의 경우, 할로알킬 그룹은  $C_{1-6}$ 과 같이 임의의 적합한 수의 탄소 원자를 가질 수 있다. 예를 들면, 할로알킬은 트리플루오로메틸, 플루오로메틸 등을 포함한다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "할로알콕실" 또는 "할로알콕시"는 알콕실 그룹을 지칭하며 여기서 수소 원자 중 일부 또는 모두는 할로겐 원자로 치환된다. 알킬 그룹의 경우, 할로알콕시 그룹은  $C_{1-6}$ 과 같이 임의의 적합한 수의 탄소 원자를 가질 수 있다. 알콕시 그룹은 1, 2, 3개 이상의 할로겐으로 치환될 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "알카노일"은 알킬 그룹을 부착 점에 연결시키는 카보닐 그룹을 갖는 알킬 그룹을 지칭한다: 알킬-C(O)-. 알킬 그룹의 경우, 알카노일옥실 그룹은  $C_{1-4}$ 와 같이 임의의 적합한 수의 탄소 원자를 가질 수 있다. 예를 들면, 알카노일 그룹은 아세틸, 프로피오닐, 부티릴 등을 포함한다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "알카노일옥실"은 알카노일 그룹을 부착 점에 연결시키는 산소 원자를 갖는 알카노일 그룹을 지칭한다: 알킬-C(O)-O-. 알킬 그룹의 경우, 알카노일옥실 그룹은  $C_{1-4}$ 와 같이 임의의 적합한 수의 탄소 원자를 가질 수 있다. 예시적인 알카노일옥실 그룹은 아세톡시, 프로피오닐옥시, 부틸옥시 등을 포함한다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "옥소"는 이중 결합(=O)에 의해 부착 점에 연결된 산소 원자를 지칭한다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "아릴"은 임의의 적합한 수의 환 원자 및 임의의 적합한 수의 환을 갖는 방향족 환 시스템을 지칭한다. 아릴 그룹은 임의의 적합한 수의 환 원자, 예를 들면, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16개의 환 원자 뿐만 아니라 6 내지 10개, 6 내지 12개, 또는 6 내지 14개의 환 구성원을 포함할 수 있다. 아릴 그룹은 모노사이클릭일 수 있거나, 융합되어 비사이클릭 또는 트리사이클릭 그룹을 형성할 수 있거나, 결합에 의해 연결되어 비아릴 그룹을 형성할 수 있다. 대표적인 아릴 그룹은 페닐, 나프틸 및 비페닐을 포함한다. 다른 아릴 그룹은 메틸렌 연결 그룹을 갖는 벤질을 포함한다. 일부 아릴 그룹은 페닐, 나프틸 또는 비페닐과 같은 6 내지 12개의 환 구성원을 갖는다. 다른 아릴 그룹은 페닐 또는 나프틸과 같은 6 내지 10개의 환 구성원을 갖는다. 일부 다른 아릴 그룹은 페닐과 같은 6개의 환 구성원을 갖는다. 아릴 그룹은 치환되거나 비치환될 수 있다. 일부 구현예에서, 아릴 그룹은 1 내지 2개의 치환체로 치환된다. 비-제한적인 예로서, 적합한 치환체는 할로겐, 하이드록실,  $-NO_2$ ,  $C_{1-8}$  알킬,  $C_{1-8}$  알콕시를 포함한다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "아르알킬옥실"은 상기 정의한 바와 같이, 아릴 그룹을 부착 점에 연결시키는 산소 원자 및 알킬을 갖는 아릴 그룹을 지칭한다: 아릴-알킬-O-. 알킬 그룹의 경우, 아르알킬옥실 그룹은  $C_{1-4}$ 과 같이 임의의 적합한 수의 탄소 원자를 가질 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "헤테로아릴"은 5 내지 12개의 환 원자를 함유하는 모노사이클릭 또는 융합된 비사이클릭 방향족 환 조립체를 지칭하며, 여기서 1 내지 5개의 환 원자는 N, O 또는 S와 같은 헤테로원자이다. B, Al, Si 및 P를 포함하나, 이에 한정되지 않는 추가의 헤테로원자가 또한 유리할 수 있다. 헤테로원자는 또한  $-S(O)-$  및  $-S(O)_2-$ 와 같이 산화될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 헤테로아릴 그룹은 임의의 수의 환 원자, 예를 들면, 3 내지 6개, 4 내지 6개, 5 내지 6개, 3 내지 8개, 4 내지 8개, 5 내지 8개, 6 내지 8개, 3 내지 9개, 3 내지 10개, 3 내지 11개, 또는 3 내지 12개의 환 구성원을 포함할 수 있다. 1, 2, 3, 4, 또는 5개, 또는 1 내지 2개, 1 내지 3개, 1 내지 4개, 1 내지 5개, 2 내지 3개, 2 내지 4개, 2 내지 5개, 3 내지 4개, 또는 3 내지 5개와 같이 임의의 적합한 수의 헤테로원자가 헤테로아릴 그룹 내에 포함될 수 있다. 헤테로아릴 그룹은 5

내지 9개의 환 구성원 및 1 내지 4개의 헤테로원자, 또는 5 내지 9개의 환 구성원 및 1 내지 3개의 헤테로원자, 또는 5 내지 6개의 환 구성원 및 1 내지 4개의 헤테로원자, 또는 5 내지 6개의 환 구성원 및 1 내지 3개의 헤테로원자를 가질 수 있다. 헤테로아릴 그룹은 피롤, 피리딘, 이미다졸, 피라졸, 트리아졸, 테트라졸, 피라진, 피리미딘, 피리다진, 트리아진(1,2,3-, 1,2,4- 및 1,3,5-이성체), 푸린과 같은 그룹을 포함할 수 있다. 헤테로아릴 그룹은 방향족 환 시스템, 예를 들면, 페닐 환에 융합되어 벤조피롤, 예를 들면, 인돌 및 이소인돌, 벤조피리딘, 예를 들면, 퀴놀린 및 이소퀴놀린, 벤조피라진(퀴녹살린), 벤조피리미딘(퀴나졸린), 벤조피리다진, 예를 들면, 프탈라진 및 신놀린, 벤조티오펜, 및 벤조푸란을 포함하나, 이에 한정되지 않는 구성원을 형성할 수 있다. 다른 헤테로아릴 그룹은 결합에 의해 연결된 헤테로아릴 환, 예를 들면, 비피리딘을 포함한다. 헤테로아릴 그룹은 치환되거나 비치환될 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은, "사이클로알킬"은 3 내지 8개의 환 원자, 또는 나타난 수의 원자를 함유하는 포화된 환 조립체를 지칭한다. 사이클로알킬은 C<sub>3-6</sub>, C<sub>4-6</sub>, C<sub>5-6</sub>, C<sub>3-8</sub>, C<sub>4-8</sub>, C<sub>5-8</sub>, C<sub>6-8</sub>과 같은 임의의 수의 탄소를 포함할 수 있다. 사이클로알킬 환은 예를 들면, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 및 사이클로옥틸을 포함한다. 사이클로알킬 그룹은 치환되거나 비치환될 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 "사이클로헤테로알킬"은 3 내지 12개의 환 구성원 및 N, O 및 S의 1 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 포화된 환 시스템을 지칭한다. B, Al, Si 및 P를 포함하나, 이에 한정되지 않는 추가의 헤테로원자가 또한 유용할 수 있다. 헤테로원자는 -S(O)- 및 -S(O)<sub>2</sub>-와 같이, 또한 산화될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 헤테로사이클로알킬 그룹은 임의의 수의 환 원자, 예를 들면, 3 내지 6개, 4 내지 6개, 5 내지 6개, 3 내지 8개, 4 내지 8개, 5 내지 8개, 6 내지 8개, 3 내지 9개, 3 내지 10개, 3 내지 11개, 또는 3 내지 12개의 환 구성원을 포함할 수 있다. 1, 2, 3, 또는 4개, 또는 1 내지 2개, 1 내지 3개, 1 내지 4개, 2 내지 3개, 2 내지 4개, 또는 3 내지 4개의 임의의 적합한 수의 헤테로원자가 헤테로사이클로알킬 그룹 내에 포함될 수 있다. 헤테로사이클로알킬 그룹은 아지리딘, 아제티딘, 피롤리딘, 피페리딘, 아제판, 아조칸, 퀴놀리딘, 피라졸리딘, 이미다졸리딘, 피페라진(1,2-, 1,3- 및 1,4-이성체), 옥시란, 테트라하이드로푸란, 옥산(테트라하이드로피란), 옥세판, 티올란(테트라하이드로티오펜), 티안(테트라하이드로티오피란), 옥사졸리딘, 이속사졸리딘, 티아졸리딘, 이소티아졸리딘, 디옥솔란, 디티올란, 모르폴린 등과 같은 그룹을 포함할 수 있다. 헤테로사이클로알킬 그룹은 비치환되거나 치환될 수 있다. 예를 들면, 헤테로사이클로알킬 그룹은 많은 다른 것들 중에서 C<sub>1-6</sub> 알킬 또는 옥소(=O)로 치환될 수 있다.

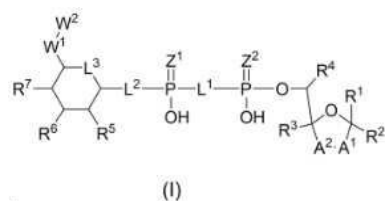
본 발명의 특징의 화합물은 비대칭 탄소 원자(광학 중심) 또는 이중 결합을 지니며; 라세메이트, 부분입체이성체, 기하 이성체, 레지오이성체(regioisomer) 및 개개 이성체(예컨대, 별도의 거울상이성체)는 모두 본 발명의 영역내에 포함되는 것으로 의도된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물은 실질적으로 다른 형태가 없는 특수한 거울상이성체, 아노머(anomer), 또는 부분입체이성체이다.

본원에 사용된 바와 같은, 용어 "실질적으로 유리된"은 10% 이하의 다른 형태의 양, 바람직하게는 8%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 이하의 다른 형태의 양을 지칭한다. 일부 구현예에서, 이성체는 부분입체이성체이다.

#### 구현예의 상세한 설명

일부 구현예에서, 본 개시내용은 화학식 I로 나타난 ALPK1 효능제 및/또는 이의 입체이성체, 호변이성체(tautomer), 안정한 동위원소, 전구약물 또는 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다:

[화학식 I]



상기식에서,

A<sup>1</sup> 및 A<sup>2</sup>는 O, S 및 -C(R<sup>8</sup>R<sup>9</sup>)-로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 R<sup>8</sup> 및 R<sup>9</sup>는 H, D, -OH, N<sub>3</sub>, -CN, 할로젠, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 할로알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 할로알콕실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알카노일옥실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알케닐옥실 및 치환되거나



비치환된 아르알킬옥실로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 임의의 치환체는 D, 할로젠, -OH, =O, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체이고 A<sup>1</sup> 또는 A<sup>2</sup> 중 적어도 하나는 -C(R<sup>8</sup>R<sup>9</sup>)이며; 여기서 A<sup>1</sup> 내 R<sup>8</sup> 또는 R<sup>9</sup>는 A<sup>2</sup> 내에서 R<sup>8</sup> 또는 R<sup>9</sup>와 함께 고리화되어 D, 할로젠, -OH, =O, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체로 각각 임의 치환된, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 사이클로알킬 및 3 내지 9개의 환 구성원을 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 사이클로헤테로알킬을 형성할 수 있으며;

L<sup>1</sup> 및 L<sup>2</sup>는 O, CH<sub>2</sub>, CHF 및 CF<sub>2</sub>로부터 독립적으로 선택되고;

L<sup>3</sup>은 O, S, CH<sub>2</sub> 또는 CH(OH)이며;

Z<sup>1</sup> 및 Z<sup>2</sup>는 O 및 S로부터 독립적으로 선택되고;

W<sup>1</sup>은 -C(R<sup>10</sup>R<sup>11</sup>)-이며, 여기서 R<sup>10</sup> 및 R<sup>11</sup>은 H, D, -OH, 할로젠, 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 할로알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-할로알콕실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알케닐옥실, 아르알킬옥실 및 R<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-로부터 선택된 임의 치환된 그룹이며, 여기서 R<sup>12</sup>는 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알케닐옥실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬아미노, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 사이클로알킬, 3 내지 6개의 환 구성원을 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 사이클로헤테로알킬, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 아릴, 및 5 내지 10개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 헤테로아릴로부터 선택되고; 여기서 R<sup>10</sup> 및 R<sup>11</sup>에 대한 임의의 치환체는 D, 할로젠, -OH, =O, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체이고;

W<sup>2</sup>는 H이거나, D, 할로젠, -OH, =O, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알콕실, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 할로알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 할로알콕실, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알케닐옥실 및 R<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체로 임의 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이고, 여기서 R<sup>12</sup>는 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕시, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬아미노, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 사이클로알킬, 3 내지 6개의 환 구성원을 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 사이클로헤테로알킬, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 아릴, 및 5 내지 10개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 헤테로아릴이며;

R<sup>1</sup>은 C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 아릴 또는 5 내지 10개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 헤테로아릴이고, 여기서 R<sup>1</sup>은 D, 할로젠, -OH, =O, CN, NH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕시, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬아민, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 디알킬아민 및 (R<sup>13</sup>R<sup>14</sup>)NCO-로부터 선택된 1 내지 3개의 치환체로 임의 치환되며, 여기서 R<sup>13</sup> 및 R<sup>14</sup>는 H, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 사이클로알킬, 3 내지 6개의 환 구성원을 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 사이클로헤테로알킬, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 아릴, 및 5 내지 10개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 헤테로아릴이고;

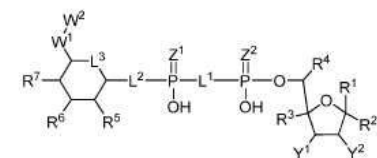
R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> 및 R<sup>4</sup>는 H, D, 할로젠, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 할로알킬로부터 독립적으로 선택되며;

R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> 및 R<sup>7</sup>은 H, D, 할로젠 및 -OH, R<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-로부터 선택되고, 여기서 R<sup>12</sup>는 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알케닐옥실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬아미노, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 사이클로알킬, 3 내지 6개의 환 구성원을 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 사이클로헤테로알킬, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> 아릴, 및 5 내지 10개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 헤테로아릴이며; 여기서 R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> 및 R<sup>7</sup>의 인접한 그룹 중 임의의 2개는 고리화되어 각각 D, 할로젠, -OH, =O, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체로 임의 치환된, 5 내지 9개의 환 구성원을 함유하고 환 구성원

으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 사이클로헤테로알킬을 형성할 수 있다.

일부 구현예에서, 화학식 I의 화합물은 화학식 IA의 화합물 및/또는 이의 입체이성체, 안정한 동위원소, 전구약물 또는 약제학적으로 허용되는 염으로 나타낸다:

[화학식 IA]



상기식에서,

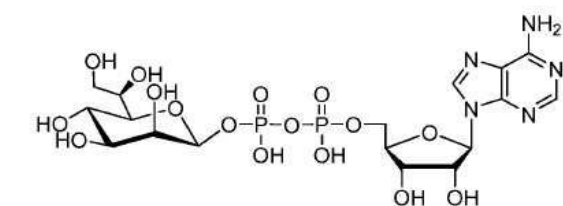
$Y^1$  및  $Y^2$ 는 H, D, -OH,  $N_3$ , -CN, 할로젠 및  $C_1$ - $C_4$  알킬,  $C_1$ - $C_4$  알콕실,  $C_1$ - $C_4$  할로알킬,  $C_1$ - $C_4$  할로알콕실,  $C_1$ - $C_4$  알카노일옥실,  $C_1$ - $C_4$  알케닐옥실 및 아르알킬옥실로부터 선택된 임의 치환된 그룹으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 임의의 치환체는 D, 할로젠, -OH, =O,  $C_1$ - $C_4$  알킬 및  $C_1$ - $C_4$  알콕시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체이고;

$R^1$  내지  $R^7$ ,  $L^1$  내지  $L^3$ ,  $Z^1$ ,  $Z^2$ ,  $W^1$  및  $W^2$ 는 위에서 정의한 바와 같다.

일부 구현예에서, 화학식 IA의 화합물 내  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 H, D, -OH, 할로젠,  $C_1$ - $C_4$  알킬,  $C_1$ - $C_4$  알콕실,  $C_1$ - $C_4$  할로알킬,  $C_1$ - $C_4$  할로알콕실,  $C_1$ - $C_4$  알카노일옥실, 및  $C_1$ - $C_4$  알케닐옥실로부터 독립적으로 선택되고;  $R^1$  내지  $R^7$ ,  $L^1$  내지  $L^3$ ,  $Z^1$ ,  $Z^2$ ,  $W^1$  및  $W^2$ 는 위에서 정의한 바와 같다.

일부 구현예에서, 화학식 IA의 화합물 내  $Y^1$  및  $Y^2$ 는 -OH, 할로젠,  $C_1$ - $C_4$  알킬, 및  $C_1$ - $C_4$  알카노일옥실로부터 독립적으로 선택되고;  $R^1$  내지  $R^7$ ,  $L^1$  내지  $L^3$ ,  $Z^1$ ,  $Z^2$ ,  $W^1$  및  $W^2$ 는 상기 정의된 바와 같다.

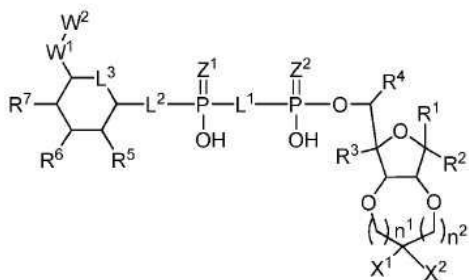
일부 구현예에서, 화학식 I 또는 화학식 IA의 화합물은 하기 나타난 화합물인, D-글리세로-D-만노-헵토즈-1 $\beta$ -ADP(또한 본원에서 H1b-ADP 또는 H1b-D-ADP로 지칭됨):



, 또는 이의 부분입체 이성체 L-글리세로-D-만노-헵토즈-1 $\beta$ -ADP(또한 본원에서 H1b-ADP-6L 또는 H1b-L-ADP로서 지칭됨)를 포함하지 않는다.

일부 구현예에서, 화학식 I의 화합물은 화학식 IB의 화합물 및/또는 이의 입체이성체, 안정한 동위원소, 전구약물 또는 약제학적으로 허용되는 염으로 나타낸다:

[화학식 IB]



상기식에서,

$n^1$  및  $n^2$ 는 각각 0 내지 2로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 정수이고;

$X^1$  및  $X^2$ 는 H, D, -OH,  $N_3$ , -CN, 할로젠 및  $C_1$ - $C_4$  알킬,  $C_1$ - $C_4$  알콕실,  $C_1$ - $C_4$  할로알킬,  $C_1$ - $C_4$  할로알콕실,  $C_1$ - $C_4$  알카노일옥실,  $C_1$ - $C_4$  알케닐옥실 및 아르알킬옥실로부터 선택된 임의 치환된 그룹으로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 임의의 치환체는 D, 할로젠, -OH, =O,  $C_1$ - $C_4$  알킬 및  $C_1$ - $C_4$  알콕시로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체이고;

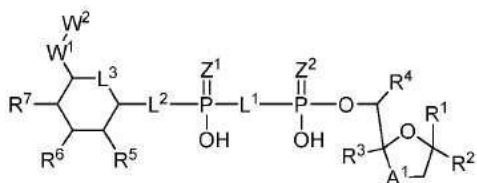
$R^1$  내지  $R^7$ ,  $L^1$  내지  $L^3$ ,  $Z^1$ ,  $Z^2$ ,  $W^1$  및  $W^2$ 는 위에 정의된 바와 같다.

일부 구현예에서, 화학식 IB의  $n^1$  및  $n^2$ 는 각각 0이다.

일부 구현예에서, 화학식 IB의  $X^1$  및  $X^2$ 는 H, D,  $C_1$ - $C_4$  알콕실 및  $C_1$ - $C_4$  알킬로부터 선택되고;  $R^1$  내지  $R^7$ ,  $L^1$  내지  $L^3$ ,  $Z^1$ ,  $Z^2$ ,  $W^1$  및  $W^2$ 는 상기 정의된 바와 같다.

일부 구현예에서, 화학식 I의 화합물은 화학식 IC의 화합물 및/또는 이의 입체이성체, 안정한 동위원소, 전구약물 또는 약제학적으로 허용되는 염으로 나타낸다:

[화학식 IC]



상기식에서,

$A^1$ 은  $-C(R^{10}R^{11})-$ , O 또는 S이고;

$R^1$  내지  $R^9$ ,  $L^1$ - $L^3$ ,  $Z^1$ ,  $Z^2$ ,  $W^1$  및  $W^2$ 는 위에서 정의된 바와 같다.

일부 구현예에서, I, IA, IB, 및 IC에서  $R^2$ ,  $R^3$ , 및  $R^4$ 는 각각 H이다.

일부 구현예에서, 화학식 I, IA, IB, 및 IC에서  $R^5$ ,  $R^6$ , 및  $R^7$ 은 -OH, 및  $C_1$ - $C_4$  알카노일옥실-로 이루어진 그룹으로부터 각각 독립적으로 선택된다.

일부 구현예에서 화학식 I, IA, IB, 및 IC에서  $L^3$ 은 0이다.

일부 구현예에서 화학식 I, IA, IB, 및 IC에서  $L^2$ 는 0이다.

일부 구현예에서, 화학식 I, IA, IB, 및 IC에서  $L^1$ 은 O 또는 S.

일부 구현예에서, 화학식 I, IA, IB, 및 IC에서  $W^1$ 은  $-C(R^{10}R^{11})-$ 이고, 여기서  $R^{10}$  및  $R^{11}$ 은 H, D, -OH, 할로젠,  $C_1-C_4$  알킬,  $C_1-C_4$  알콕실,  $C_1-C_4$  할로알킬,  $C_1-C_4$  할로알콕실,  $C_1-C_4$  알카노일옥실,  $C_1-C_4$  알케닐옥실,  $R^{12}CO_2$ -로부터 독립적으로 선택되고, 여기서  $R^{12}$ 는  $C_1-C_4$  알킬,  $C_1-C_4$  알콕실,  $C_1-C_4$  알카노일옥실 및  $C_1-C_4$  알케닐옥실로부터 선택된다.

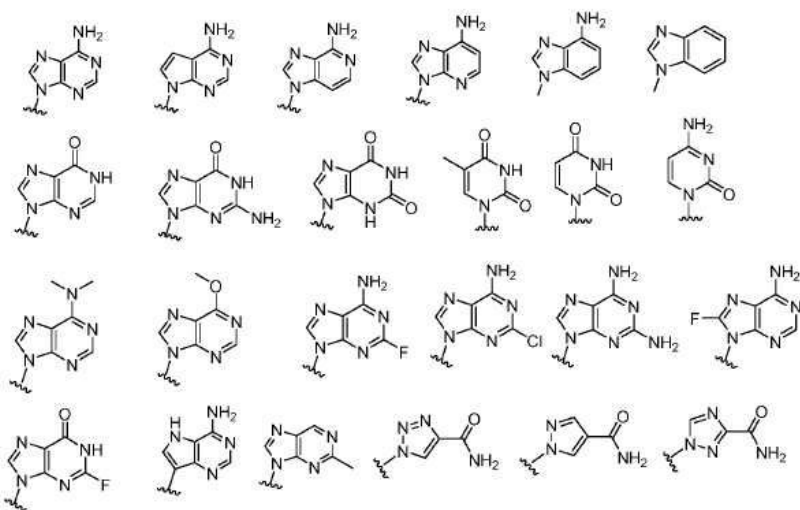
일부 구현예에서, I, IA, IB, 및 IC에서  $W^1$ 은  $-C(R^{10}R^{11})-$ 이고, 여기서  $R^{10}$  및  $R^{11}$ 은 H, D, -OH, 할로젠 및  $C_1-C_4$  알카노일옥실로부터 독립적으로 선택된다.

일부 구현예에서, 화학식 I, IA, IB, 및 IC에서  $W^2$ 는 D, 할로젠, -OH, =O,  $C_1-C_3$  알콕실,  $C_1-C_3$  할로알킬,  $C_1-C_3$  할로알콕실,  $C_1-C_3$  알케닐옥실 및  $R^{12}CO_2$ -로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체로 임의 치환된  $C_1-C_3$  알킬이고, 여기서  $R^{12}$ 는  $C_1-C_4$  알킬,  $C_1-C_4$  알콕시 및  $C_1-C_4$  알킬아미노이다.

일부 구현예에서, 화학식 I, IA, IB, 및 IC에서  $W^2$ 는 D, 할로젠, -OH 및  $R^{12}CO_2$ -로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 치환체로 임의 치환된  $C_1-C_3$  알킬이고, 여기서  $R^{12}$ 는  $C_1-C_3$  알킬이다.

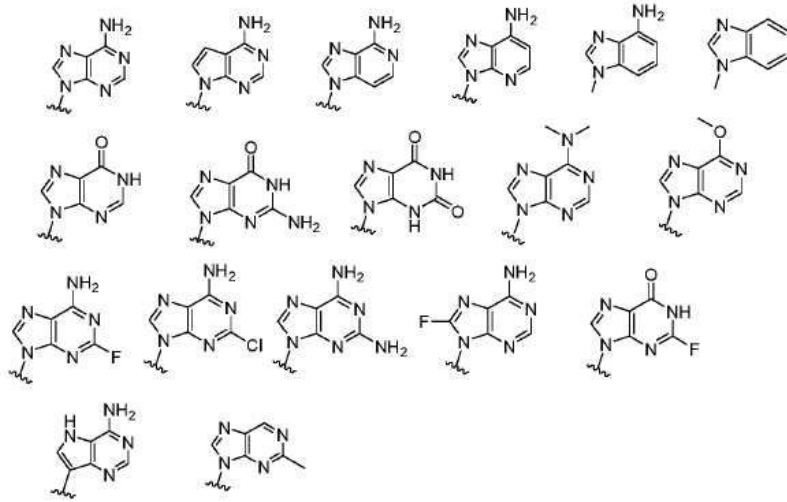
일부 구현예에서, 화학식 I, IA, IB, 및 IC에서  $W^2$ 는 -OH 및  $R^{12}CO_2$ -로부터 선택된 1개의 치환체로 임의 치환된  $C_1$  알킬이며, 여기서  $R^{12}$ 는  $C_1-C_3$  알킬이다.

일부 구현예에서, 화학식 I, IA, IB 및 IC에서  $R^1$ 은

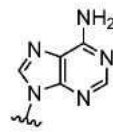


이다.

일부 구현예에서, 화학식 I, IA, IB 및 IC에서  $R^1$ 은

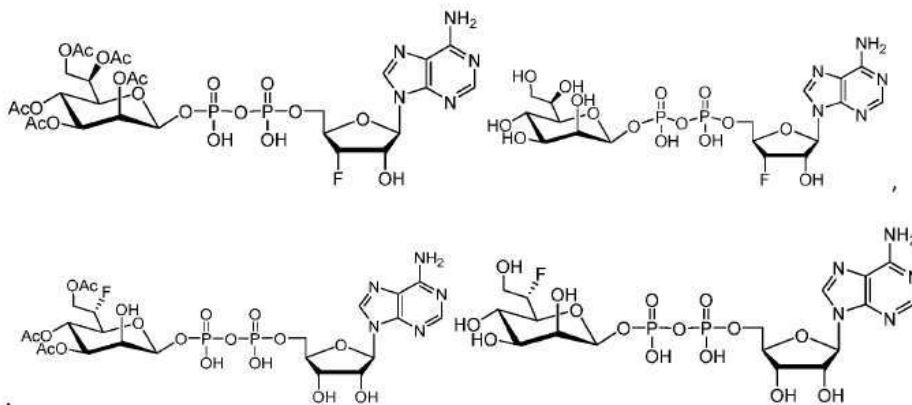


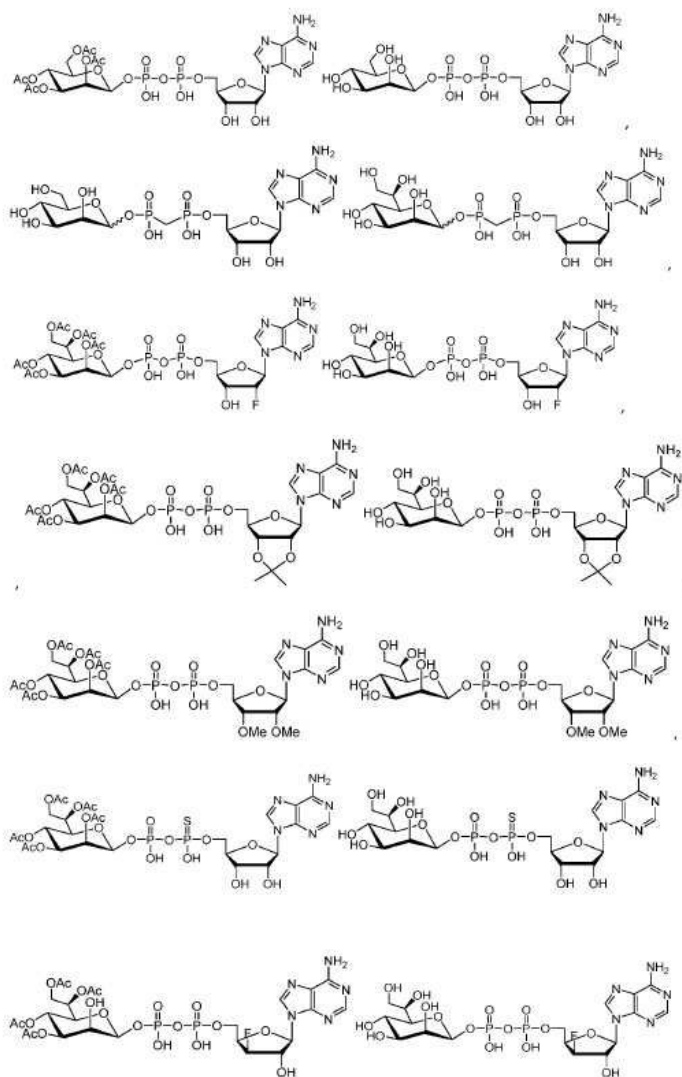
이다.

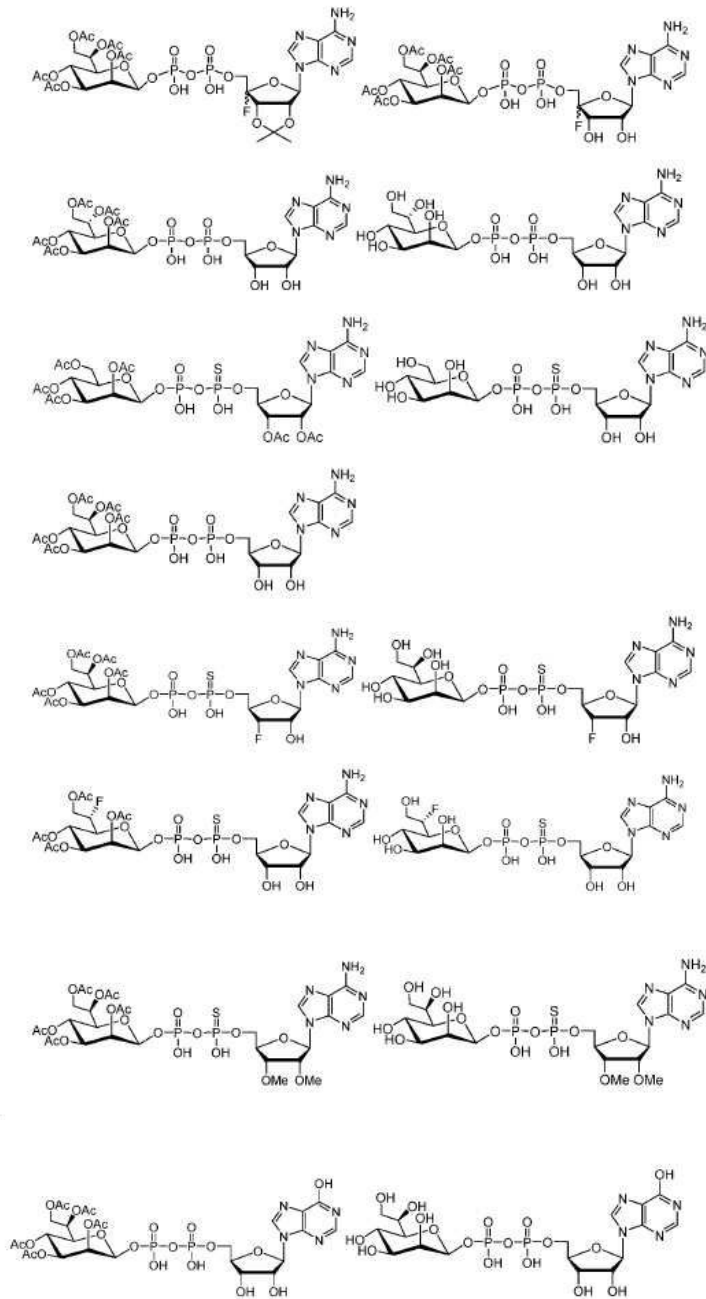


일부 구현예에서, 화학식 I, IA, IB 및 IC에서 R<sup>1</sup>은 이다.

일부 구현예에서, 화학식 I의 화합물은







및/또는 이의 입체이성체, 안정한 동위원소, 전구약물 또는 약제학적으로 허용되는 염이다.

일부 구현예에서, 화학식 I의 화합물은 본 출원의 실시예에 기술된 화합물이다.

본 개시내용의 화합물은 반응식 I, II, III, 및 IV에 기술된 일반 공정 뿐만 아니라 예시적인 구현예에 기술된 기술을 사용하여 제조할 수 있다.

구현예에서, 본 개시내용은 작은 유기 분자 형태, 예를 들면, D-글리세로-β-D-만노-헵토즈 1,7-비스포스페이트 (헵토즈 1,7 비스포스페이트 또는 "HBP"), D-글리세로-β-D-만노-헵토즈-1-포스페이트(HMP-1bP), D-글리세로-D-만노-헵토즈-1β-ADP(H1b-ADP), 및 L-글리세로-D-만노-헵토즈-1β-ADP(H1b-ADP-6L) 및 이의 전구약물, 유사체 및 유도체, 또는 거대 생물분자의 형태, 예를 들면, 단백질(예컨대, ALPK1 자체, 또는 ALPK1 키나제 활성을 활성화시키는 ALPK1-지시된 항체 또는 이의 Fc 단편) 또는 폴리뉴클레오타이드(예컨대, ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)의 형태의 ALPK1 효능제를 제공한다.

구현예에서, 본 개시내용은 HBP, HMP-1bP, H1b-ADP-6L, 및 H1b-ADP, 바람직하게는 HMP-1bP, H1b-ADP-6L, 및 H1b-ADP, 및 가장 바람직하게는 H1b-ADP-6L 및 H1b-ADP로부터 선택된 ALPK1 효능제를 투여함으로써 암을 치료하는 방법을 제공한다. 암을 치료하는 방법의 추가의 구현예에서, 본 개시내용은 H1b-ADP-6L 및 H1b-ADP로부터 선택된 ALPK1 효능제 및 체크포인트 억제체로부터 선택된 면역 체크포인트 조절인자, 예를 들면, 항-PD-1/PD-L1

항체, 및 면역 공-자극성 분자의 효능제, 예를 들면, 항-OX40(CD134) 효능제 항체를 투여함을 포함하는 조합 치료요법을 제공한다. 임의의 특수한 이론에 얽매이지 않고, 본 발명자는 H1b-ADP 및 유사 분자, 예를 들면, H1b-ADP-6L이 종양 침윤 항원 제시 세포(APC)의 항원-제시 기능(antigen-presenting function) 및 종양-특이적인 T 세포 증식 및 분화를 촉진할 수 있다. 또한, 이러한 분자는 종양 세포내에서 PD-L1 발현을 증가시킴으로써 종양에 대한 종양-특이적인 CD8<sup>+</sup> T 세포의 보충을 강화시킬 수도 있다.

다른 구현예에서, 본 개시내용은 재조합 단백질의 형태 또는 ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 형태, 또는 재조합 ALPK1 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 조성물의 형태의, ALPK1을 대상체에게 투여하거나, ALPK1을 대상체의 세포, 예를 들면, 세포들 또는 조직내에 도입함으로써 ALPK1을 활성화시키는 방법을 제공한다. ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 적절한 조절 서열, 예를 들면, 프로모터 서열의 제어 하에 위치하는 경우 ALPK1 단백질로 전사 및 해독되는 것이다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 원핵 또는 진핵 DNA로부터의 서열, 또는 합성 DNA 서열, 및 상기한 것 중 임의의 것의 조합을 포함할 수 있다.

바람직하게는, 투여되거나 도입된 ALPK1은 구성적으로 활성인 ALPK1(또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)이다. 용어 "구성적으로 활성인"은 이의 키나제 활성이 리간드의 부재하에서 활성인 ALPK1 단백질을 지칭한다. 구현예에서, 구성적으로 활성인 ALPK1은 리간드-독립적인 올리고머화 및 키나제 활성화를 촉진하는 이의 N-말단 도메인(domain) 내에 활성화 돌연변이를 수반한다.

ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 살아있는 세포(living cell) 내로의 유전자 전달에 적합한 핵산 벡터 또는 다른 비히클의 형태일 수 있다. 플라스미드는 염색체 DNA와는 독립적으로 복제할 수 있는 염색체의 DNA 분자인 핵산 벡터의 일반적인 유형이다. 플라스미드는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고 흔히 환형이다. 다른 유용한 비히클은 DNA 또는 RNA 미니서클(minicircle) 및 미니벡터(minivector)를 포함할 수 있다. 미니서클은 부위-특이적인 재조합을 사용하여 모 플라스미드로부터 세균 DNA의 대부분을 결실시킴으로써 형성된다. 수득되는 환형 DNA 분자는 형질감염될 목적인 유전자 서열, 예컨대, ALPK1 서열, 및 단지 소량의 세균 DNA를 함유한다. 미니벡터는 이들이 짧은 통합 서열을 포함하는 것을 제외하고는 유사하다. 유전자 전달을 위한 이들 및 다른 적합한 비-바이러스 DNA 벡터는 예를 들면, 문헌: Hardee et al., "Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy", Genes 2017 8:65에 기술되어 있다.

ALPK1의 유전자 전달을 위한 다른 적합한 핵산 벡터는 예를 들면, 바이러스 벡터, 예를 들면, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 및 렌티바이러스 벡터를 포함할 수 있다.

ALPK1을 암호화하는 핵산 벡터는 적합한 기술, 예를 들면, 바이러스 전달 시스템, 유전자 총(gene gun)을 사용하는 것과 같은 직접적인 주사, 또는 예를 들면, 리포좀, 나노입자, 중합체, 전기천공, 세포 스퀴징(cell squeezing), 소노포레이션(sonoporation), 광학적 형질감염, 임페일팩션(impalefection), 및 유체역학적 전달을 포함하는 비-바이러스 전달 시스템을 사용하여 표적 세포내로 도입할 수 있다. 예시적인 비-바이러스 전달 시스템 및 이들의 용도는 예를 들면, 문헌: Jones et al., "Contemporary approaches for nonviral gene therapy," Discov. Med. 2015;19: 447-454에 기술되어 있다.

본원에 기술된 방법의 임의의 구현예에 따라서, ALPK1은 예를 들면, 바이러스 입자, 리포좀 입자, 나노입자의 형태를 포함하는 적합한 제형으로서, 예를 들면, 폴리라이신, 폴리아르기닌, 폴리오르니틴, 프로타민, 스페르민, 스페르미딘, 및 푸트레신을 포함하는 중합체 담체와의 복합체로서 투여될 수 있다. 리포좀 입자는 DNA, RNA, 및 플라스미드 형태를 포함하는 다양한 형태의 ALPK1을 전달하는데 사용될 수 있다. 구현예에서, ALPK1 폴리뉴클레오타이드는 다른 입자 또는 담체의 부재하에서 플라스미드 DNA로서 투여될 수 있다.

구현예에서, ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이의 활성 돌연변이체는 유전자 편집 기술(gene editing technique)을 사용하여 세포내로 삽입된다. 유전자 편집 기술은 메가뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제(zinc finger nuclease: ZFN), 전사 활성인자-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 및 CRISPR/Cas-9를 기반으로 한 것을 포함한다.

구현예에서, 본 개시내용은 대상체에서 면역 반응을 조절하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 대상체에게 ALPK1 효능제, ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 돌연변이체 중 어느 하나를 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다.

구현예에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 항원에 대한 면역 반응을 강화시키는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 대상체에게 ALPK1 효능제, ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이



체, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 돌연변이체 중 어느 하나를 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다. 구현예에서, 표적 항원은 감염체의 항원, 예를 들면, 세균 항원, 바이러스 항원, 또는 기생충의 항원일 수 있다. 구현예에서, 항원은 종양 항원이다. 이러한 구현예 중 어느 하나에 따라서, 본원에 기술된 바와 같은, ALPK1 효능제, 폴리뉴클레오타이드, 또는 단백질은 감염체에 의해 유발된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방용, 또는 암의 치료용, 또는 백신 조성물을 사용하여 치료될 수 있는 다른 질환 또는 장애, 예를 들면, 알츠하이머 질환의 치료용 백신 조성물에 대한 보조제로서 제공될 수 있다. 구현예에서, 항원은 알츠하이머 질환의 치료시 아밀로이드 단백질로부터 선택된다. 구현예에서, 항원은 암의 치료시 당단백질 100(gp100), 뮤신 1(MUC1), 및 흑색종-관련 항원 3(MAGEA3)으로부터 선택된다. 구현예에서, 암은 유방, 난소, 또는 전립선 암으로부터 선택된다. 구현예에서, 암은 HTLV-1 T-림프친화성 백혈병이다.

구현예에서, 암은 흑색종이고 본원에 기술된 바와 같은, ALPK1 효능제, 폴리뉴클레오타이드, 또는 단백질은 탈리모진 라헤르파레펙(Talimogene laherparepvec)(T-VEC)을 사용한 치료에 대한 보조제로서 제공될 수 있거나, T-VEC과의 조합 치료요법 섭생(regimen)에서 사용될 수 있다.

감염성 질환의 치료 또는 예방을 위한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은, ALPK1 효능제, 폴리뉴클레오타이드, 또는 단백질은 탄저병, 충치, 샤가스병(Chagas disease), 뎅기열, 디프테리아, 에를리히증(ehrlichiosis), A형 또는 B형 간염, 헤르페스, 계절성 독감(seasonal influenza), 일본 뇌염, 나병, 라임병, 말라리아, 홍역, 볼거리, 수막구균성 질환, 예를 들면, 수막염 및 패혈증, 회선사상충증(Onchocerciasis river blindness), 백일해(백일 기침; pertussis, whooping cough), 폐렴 쌍구균 질환, 폴리오, 라비스, 루벨라, 주혈흡충병, 중증 급성 호흡기 증후군(SARS), 대상포진, 천연두, 매독, 파상풍, 폐결핵, 야토병, 진드기-매개 뇌염 바이러스, 장티푸스, 트리파노소마증, 황열병, 또는 내장리슈만편모충증의 치료 또는 예방용 백신 조성물에 대한 보조제로서 제공될 수 있다.

감염성 질환의 치료 또는 예방을 위한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은, ALPK1 효능제, 폴리뉴클레오타이드, 또는 단백질은 아데노바이러스, 콕사키에 B형 바이러스(Coxsackie B virus), 사이토메갈로바이러스, 동부형 말 뇌막염 바이러스, 에볼라 바이러스, 엔테로바이러스 71, 엡슈타인-바르 바이러스, 헤모필러스 인플루엔자 제 b형(Hib), C형 간염 바이러스(HCV), 헤르페스 바이러스, 사람 면역결핍성 바이러스(HIV), 사람 파필로마바이러스(HPV), 십이지장충, 마르부르크 바이러스, 노로바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV), 로타바이러스, 살모넬라 타이피, 스타필로코쿠스 아우레우스, 스트렙토코쿠스 피오게네스, 바리셀라, 웨스트 나일 바이러스, 예르시니아 해충, 및 지카 바이러스에 의해 유발된 질환 또는 장애의 치료 또는 예방용 백신 조성물에 대한 보조제로서 제공될 수 있다.

상기한 구현예 중 어느 하나에 따라서, 방법은 ALPK1 효능제, 바람직하게는 HBP, HMP-1bP, H1b-ADP-6L 및 H1b-ADP로부터 선택되거나, HMP-1bP, H1b-ADP-6L, 및 H1b-ADP로부터 선택된 ALPK1 효능제, 및 가장 바람직하게는 H1b-ADP-6L 및 H1b-ADP로부터 선택된 ALPK1 효능제, ALPK1 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 돌연변이체 중 어느 하나를 포함하는 백신 조성물 또는 보조제를 투여함을 포함할 수 있다.

구현예에서, 본 개시내용은 대상체의 세포내에서 NFkB, p38, 및 JNK 세포 신호전달의 활성화에 의한 치료에 대해 조정될 수 있는 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 대상체에게 ALPK1의 효능제, ALPK1 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 돌연변이체 중 어느 하나를 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다. 구현예에서, 질환 또는 장애는 하기에 보다 상세히 기술된 바와 같은, 세균, 바이러스, 또는 기생충 감염에 의해 유발되며, 예를 들면 C형 간염 바이러스(HCV), B형 간염 바이러스(HBV), 및 사람 면역결핍성 바이러스(HIV)에 의해 유발된 질환 및 장애를 포함한다. 구현예에서, 질환 또는 장애는 결핵, 수막염, 폐렴, 폐양, 및 패혈증으로부터 선택된다. 구현예에서, 질환 또는 장애는 비염, 천식, 알레르기, COPD, 염증성 창자병, 관절염, 비만, 방사선-유발된 염증, 건선, 아토피성 피부염, 비-알코올성 스테아토간염(NASH), 알츠하이머병, 전신 홍반 루프스(SLE), 자가면역성갑상샘염(그레이브스 질환), 다발성 경화증, 강직성 척수염, 및 기종으로부터 선택된다. 구현예에서, 질환 또는 장애는 광선각화증, 궤양성 대장염, 크론 질환(Crohn's disease), 및 원형탈모증으로부터 선택된다.

구현예에서, 본 개시내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 세균, 바이러스, 또는 기생충 감염을 치료하거나 예방하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 대상체에게 ALPK1 효능제, ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 돌연변이체를 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다.

구현예에서, 방법은 세균 감염을 치료하거나 예방하는 방법이다. 구현예에서, 세균 감염은 그람-음성 또는 그람-양성 세균에 의해 유발된다. 구현예에서, 세균은 악시네토박터 바우마니이(*Acinetobacter baumannii*), 아그레가토박터 악티노마이세테스(*Aggregatobacter actinomycetemcomitans*), 바르토넬라 박실리포르미스(*Bartonella bacilliformis*), 바르토넬라 헨셀라에(*Bartonella henselae*), 바르토넬라 쿠타나(*Bartonella quintana*), 비피도박테리움 보렐리아(*Bifidobacterium Borrelia*), 보르타텔라 페르투시스(*Bortadella pertussis*), 브루셀라 종(*Brucella sp*), 부르콜데리아 세파시스(*Burkholderia cepacis*), 부르콜데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 카디오박테리움 호미니스(*Cardiobacterium hominis*), 캄필로박터 페투스(*Campylobacter fetus*), 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumonia*), 클리마이디아 트라코마티스(*Chlmydia trachomatis*), 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*), 시아노박테리아(*Cyanobacteria*), 에이켄넬라 코로텐스(*Eikennella corrodens*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 엔테로코쿠스 팍시움(*Enterococcus faccium*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 에스케리키아 콜라이 0157, 프란세일라 툴라렌시스(*Franceilla tularensis*), 푸소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*), 헤모필루스 아프로필루스(*Haemophilus aphrophilus*), 헤모필루스 두크레이(*Haemophilus ducreyi*), 헤모필루스 파라인플루엔자(*Haemophilus parainfluenzae*), 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*), 킹겔라 킹가(*Kingella kingae*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*), 레지오넬라 박테리아(*Legionella bacteria*), 레지오넬라 뉴모필라 혈청그룹 1(*Legionella pneumophila serogroup 1*), 렙토스피리아(*Leptospria*), 모르가넬라 모르가니이(*Morganella morganii*), 나이세리아 고노로에아(*Neisseria gonorrhoeae*), 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 프로테우스 믹소파시엔스(*Proteus myxofaciens*), 프로비덴시아 레트게리(*Providencia rettgeri*), 프로비덴시아 알칼리파시엔스(*Providencia alcalifaciens*), 프로비덴시아 스투아르티이(*Providencia stuartii*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 파우시모빌리스(*Pseudomonas paucimobilis*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 악시도보란스(*Pseudomonas acidovorans*), 리케치아에(*Rickettsiae*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*), 살모넬라 파라티피 A, B형 타이푸스(*Salmonella paratyphi types A, B typhus*), 살모넬라 두블린(*Salmonella dublin*), 살모넬라 아리조나에(*Salmonella arizonae*), 살모넬라 콜레라에수이스(*Salmonella choleraesuis*), 세라티아 마르케스켄스(*Serratia marcescens*), 시겔라 다이센테리아에(*Schigella dysenteriae*), 시겔라 플렉스네리(*Schigella flexneri*), 시겔라 보이디이(*Schigella boydii*), 시겔라 손네이(*Schigella sonnei*), 트레포네마(*Treponema*), 스테노트로포모나스 말토폰리아(*Stenotrophomonas maltophilia*), 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*), 비브리오 미미쿠스(*Vibrio mimicus*), 비브리오 알기놀리티쿠스(*Vibrio alginolyticus*), 비브리오 홀리사(*Vibrio holisae*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 불니피쿠스(*Vibrio vulnificus*) 및 예르시니아 페스티티스(*Yersinia pestitis*)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 그람-음성 세균이다.

구현예에서, 세균은 악티노마이세테스(*Actinomycetes*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*), 클로스트리디움 페르핀겐스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*), 코리네박테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*), 엔테로코쿠스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로코쿠스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 에리시펠로트릭스 루시오파티아에(*Erysipelothrix ruhsiopathiae*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 마이코박테리움 레프라이(*Mycobacterium leprae*), 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코플라스마(*Mycoplasma*), 노카르디아(*Nocardia*), 프로피오니박테리움(*Propionibacterium*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 뉴모콕시(*Pneumococci*), 스탕필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스탕필로코쿠스 에피데르미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 메티실린 내성 스탕필로코쿠스 아우레우스(*methicillin resistant Staphylococcus aureus*; MRSA), 반코마이신 내성 스탕필로코쿠스 아우레우스(*vancomycin resistant Staphylococcus aureus*; VRSA), 스탕필로코쿠스 루그두넨시스(*Staphylococcus lugdunensis*), 스탕필로코쿠스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*), 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 및 스트렙토코쿠스 돌연변이체(*Streptococcus mutant*)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 그람-양성 세균이다.

구현예에서, 방법은 바이러스 감염을 치료하거나 예방하는 방법이다. 구현예에서, 바이러스 감염은 아데노-관련 바이러스(*Adeno-associated virus*), 아이키 바이러스(*Aichi virus*), 알파 바이러스(*Alpha virus*), 아레나 바이

러스(*Arena virus*), 아로보바이러스(*Arobovirus*), 오스트랄리안 배트 리싸바이러스(*Australian bat lyssavirus*), BK 폴리오마바이러스(*BK polyomavirus*), 반나 바이러스(*Banna virus*), 비르나바이러스(*Birnavirus*), 보르나바이러스(*Bornavirus*), 부니아웨라 바이러스(*bunyamwera virus*), 부니아바이러스 라 크로쎬(*Bunyavirus La Crosse*), 분야바이러스 스노우쇼에 하레(*Bunyavirus snowshoe hare*), 발리시바이러스(*Valicivirus*), 세르코피테신 헤르페스바이러스(*Cercopithecine herpesvirus*), 찬디푸라 바이러스(*Chandipura virus*), 키쿠군야 바이러스(*Chikugunya virus*), 코사바이러스(*Cosavirus*) A, 콕스폭스 바이러스(*Coxsack virus*), 콕사키에바이러스(*Coxsackievirus*), 크림반도-콩고 유행성 출혈열 바이러스(*Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*), 뎡기열 바이러스(*Dengue virus*), 도리 바이러스(*Dhori virus*), 두그베 바이러스(*Dugbe virus*), 데벤하게 바이러스(*Devenhage virus*), 동부 말 뇌염 바이러스(*Eastern equine encephalitis virus*), 에볼라바이러스(*Ebolavirus*), 에코바이러스(*Echovirus*), 뇌척수심근염 바이러스(*Encephalomyocarditis virus*), 엡슈타인-바르 바이러스(*Epstein-Barr virus*), 유럽 박쥐 리싸바이러스(*European bat lyssavirus*), 플라비바이러스(*Flavivirus*), GB 바이러스/G형 간염 바이러스, 한탄 바이러스(*Hantaan virus*), 헨드라 바이러스(*Hendra virus*), 헤파드나바이러스(*hepadnavirus*), A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, 델타 간염 바이러스(*Hepatitis delta virus*), 헤르페스 단성 바이러스(*Herpes simplex virus*), 호스폭스 바이러스(*horsepox virus*), 사람 아데노바이러스(*Human adenovirus*), 사람 아스트로바이러스(*Human astrovirus*), 사람 코로나바이러스(*Human coronavirus*), 사람 사이토메갈로바이러스(*Human cytomegalovirus*), 사람 엔테로바이러스(*Human enterovirus*) 68,70, 사람 헤르페스바이러스(*Human herpesvirus*) 1, 사람 헤르페스 바이러스 2, 사람 헤르페스바이러스 6, 사람 헤르페스바이러스 7, 사람 헤르페스바이러스 8, 사람 면역결핍성 바이러스(*Human immunodeficiency virus; HIV*), 사람 파필로마바이러스(*Human papillomavirus*)(HPV-6, HPV-11), 사람 스푸마레트로바이러스(*Human spumaretrovirus*), 사람 T-림프친화성 바이러스(*Human lymphotropic virus*), 사람 토로바이러스(*Human torovirus*), A형 독감 바이러스(*Influenza A virus*), B형 독감 바이러스(*Influenza B virus*), C형 독감 바이러스(*Influenza C virus*), 이스파하 바이러스(*Isfaha virus*), JC 폴리오마 바이러스(*JC polyomavirus*), 일본 뇌염 바이러스(*Japanese encephalitis virus*), 주닌 아레나바이러스(*Junin arenavirus*), 카포시 육종(*Kaposi's sarcoma*)(HHV-8), KI 폴리오마바이러스(*KI polyomavirus*), 쿤진 바이러스(*Kunjin virus*), 라고스 박쥐 바이러스(*Lagos bat virus*), 레이크 빅토리아 마르부그바이러스(*Lake Vitoria marbugvirus*), 랑가트 바이러스(*Langat virus*), 라싸 바이러스(*Lassa virus*), LMC 바이러스(*LMC virus*), 로르드스달레 바이러스(*Lordsdale virus*), 로우핑 일 바이러스(*Louping ill virus*), 림프구성 맥락수막염 바이러스(*Lymphocytic choriomeningitis virus*), 마쿠포바이러스(*Machupovirus*), 마르마쓰 포레스트 바이러스(*Marmath forest virus*), 마야로 바이러스(*Mayaro virus*), 메르스 코로나바이러스(*MERS coronavirus*), 홍역 바이러스(*Measles virus*), 멩고 엔세팔로마이카르디티스 바이러스(*Mengo encephalomyocarditis virus*), 메르켈 세포 폴리오마바이러스(*Merkel cell polyomavirus*), 밀루스쿰 콘타기오숨(*mlluscum contagiosum*), 파르보바이러스(*parvovirus*) B19, 모콜라 바이러스(*Mokola virus*), 볼거리 바이러스(*Mumps virus*), 머레이 밸리 뇌염 바이러스(*Murray valley encephalitis virus*), 뉴욕 바이러스(*New York virus*), 니파 바이러스(*Nipha virus*), 노르윅 바이러스(*Norwalk virus*), 오뎡-훙 바이러스(*O'nyong-hyong virus*), 오르프 바이러스(*Orf virus*), 오로포우크 바이러스(*Oropouche virus*), 오르쏘믹소바이러스(*Orthomyxovirus*), 파라인플루엔자 바이러스(*parainfluenza virus*), 파라믹소바리스(*paramyxovaris*), 파르보바이러스(*parvovirus*), 프킨데 바이러스(*Phchinde virus*), 피코마바이러스(*picomavirus*), 폴리오바이러스(*poliovirus*), 폴리오마바이러스(*polyomavirus*), 폭스바이러스(*poxvirus*), 폰타 토로 플레보비리스(*Punta toro phleboviridis*), 푸우말라 바이러스(*Puumala virus*), 라브도바이러스(*rabdovirus*), 라비에스 바이러스(*Rabies virus*), 레오바이러스(*reovirus*), 리노바이러스(*rhinovirus*), 호흡기 합포체 바이러스(*respiratory syncytial virus*), 리프트 밸리열 바이러스(*Rift valley fever virus*), 로사바이러스(*Rosavirus*) A, 로스 리버 바이러스(*Ross river virus*), 로타바이러스(*Rotavirus*) A, 로타바이러스 B, 로타바이러스 C, 루벨라 바이러스(*Rubella virus*), 사기야마 바이러스(*Sagiyama virus*), 살리바이러스(*Salivirus*) A, 샌드플라이 열 신킬리안 바이러스(*Sandfly fever sicillian virus*), 사포로 바이러스(*Sapporo virus*), 쉴리키 포레스트 바이러스(*Semliki forest virus*), 서울 바이러스(*Seoul virus*), 시미안 포아미 바이러스(*Simian foamy virus*), 시미안 바이러스(*Simian virus*) 5, 신드비스 바이러스(*Sindbis virus*), 사우탐프톤 바이러스(*Southampton virus*), 세인트 루이스 뇌염 바이러스(*St. louis encephalitis virus*), 진드기-매개 포와싼 바이러스(*Tick-borne powassan virus*), 토가바이러스(*togavirus*), 토크 바이러스(*Torque virus*), 토스카나 바이러스(*Toscana virus*), 우우쿠니에미 바이러스(*Uukuniemi virus*), 박시나 바이러스(*Vaccina virus*), 바리셀라-조스터 바이러스(*Varicella-zoster virus*), 바리올라 바이러스(*Variola virus*), 베네주엘라 말 뇌염 바이러스(*Venezuelan equine encephalitis virus*), 수포성 구내염 바이러스(*Vesicular stomatitits virus*), 웨스턴 말 뇌염 바이러스(*Western equine encephalitis virus*), UU 폴리오마바이러스(*UU polyomavirus*), 웨스트 나

일 바이러스(*West Nile virus*), 야마 원숭이 종양 바이러스(*Yaba monkey tumor virus*), 야마-유사 질환 바이러스(*Yaba-like disease virus*), 황색열 바이러스(*Yellow fever virus*), 및 지카 바이러스(*Zika virus*)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 바이러스에 의해 유발된다.

구현예에서, 방법은 기생충 감염을 치료하거나 예방하는 방법이다. 구현예에서, 기생충 감염은 아칸타모에바 종(*Acanthamoeba spp*), 아메리칸 트립파노소미아시스(*American trypanosomiasis*), 발라무티아 만드닐라니스(*Balamuthia mandrillanis*), 바베시아 디베르제네스(*Babesia divergenes*), 바베시아 비게미나(*Babesia bigemina*), 바베시아 에퀴(*Babesia equi*), 바베시아 미크로프티(*Babesia microfti*), 바베시아 둔카니(*Babesia duncani*), 발란티디움 콜라이(*Balantidium coli*), 블라스토시스티스 종(*Blastocystis spp*), 크립토스포리디움 종(*Cryptosporidium spp*), 사이클로스포라 카에타넨시스(*Cyclospora cayetanensis*), 디엔타모에바 프라길리스(*dientamoeba fragilis*), 디필로보트리움 라툼(*Diphyllbothrium latum*), 레이슈마니아 아마조네시스(*Leishmania amazonensis*), 나에글레리아 포우데리(*Naegleria fowderi*), 플라스모디움 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 플라스모디움 비박스(*Plasmodium vivax*), 플라스모디움 오발레 쿠르티시(*Plasmodium ovale curtisi*), 플라스모디움 말라리아에(*Plasmodium malariae*), 리노스포리디움 시베리(*Rhinosporidium seeberi*), 사르코시스티스 보비호미니스(*Sarcocystis bovihominis*), 사르코시스티스 수이호미니스(*Sarcocystis suihominis*), 톡소플라스마 곤다이(*Toxoplasma gondii*), 트리크모나스 바기날리스(*Trichomonas vaginalis*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*) 및 타에니아 멀티셉스(*Taenia multiceps*)로부터 선택된 기생충에 의해 유발된다.

구현예에서, 본 개시내용은 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 대상체에게 ALPK1 효능제, ALPK1를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 구성적으로 활성인 돌연변이체, 또는 ALPK1 단백질 또는 상기 단백질의 구성적으로 활성인 돌연변이체 중 어느 하나를 포함하는 조성물을 투여함을 포함한다. 암을 치료하기 위한 방법의 구현예에서, ALPK1 효능제는 HBP, HMP-1bP, H1b-ADP-6L 및 H1b-ADP로부터 선택되고, 바람직하게는 HMP-1bP, H1b-ADP-6L, 및 H1b-ADP로부터 선택되며, 가장 바람직하게는 ALPK1 효능제는 H1b-ADP-6L 및 H1b-ADP, 및 이의 전구약물, 유사체 및 유도체로부터 선택된다. 암을 치료하는 방법의 특징의 구현예에서, ALPK1 효능제는 HMP-1bP, H1b-ADP-6L 또는 H1b-ADP, 또는 이의 전구약물, 유사체 또는 유도체이다. 암을 치료하기 위한 방법의 추가의 구현예에서, ALPK1 효능제는 H1b-ADP-6L 또는 H1b-ADP, 또는 이의 전구약물, 유사체 또는 유도체이다. 구현예에서, 암은 연 조직 육종, 유방암, 두경부암, 흑색종, 자궁경부암, 방광암, 혈액암, 교아세포종, 췌장암, 전립선암, 결장암, 유방암, 신장암, 폐암, 머켈 세포 암종, 소장암, 갑상선암, 급성 골수 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 위암, 위장 기질 종양, 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 간암, 백혈병, 림프종, T-세포 림프종으로부터 선택된다.

본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 구현예에서, 바람직하게는 H1b-ADP-6L 및 H1b-ADP로부터 선택된 ALPK1 효능제는 하나 이상의 추가의 치료제 또는 면역 조절인자, 예를 들면, 백신 또는 백신 보조제와 함께 투여될 수 있다. 구현예에서, 하나 이상의 추가 치료제는 면역 체크포인트 분자, 예를 들면, 프로그램된 세포 사멸 1(PD-1) 수용체(CD279), PD-1의 리간드(예컨대, PD-L1), 세포독성 T-림프구 관련 단백질 4(CTLA4), 종양 괴사 인자 수용체 상과 구성원 9(대안적으로 TNFRSF9, 4-1BB) 및 4-1BB 리간드, 종양 괴사 인자 수용체 상과 구성원 4(대안적으로 TNFRSF4, OX40) 및 OX40 리간드, 글루코코르티코이드-유도된 TNFR-관련 단백질(GITR), 종양 괴사 인자 수용체 상과 구성원 7(대안적으로 TNFRSF7, 분화 27의 집단(cluster of differentiation 27), CD27), TNFRSF25 및 TNF-유사 리간드 1A(TL1A), TNF 수용체 상과 구성원 5(대안적으로 TNFRSF5, CD40) 및 CD40 리간드, 헤르페스바이러스 도입 매개인자(ligand, Herpesvirus entry mediator; HVEM)-종양 괴사 인자 리간드 상과 구성원 14(대안적으로 TNFSF14, LIGHT)-림프독소 알파(lymphotoxin alpha)(LTA), 헤르페스바이러스 도입 매개인자-(HVEM)-B- 및 T-림프구 약화인자(lymphocyte attenuator; BTLA)-CD160(대안적으로 TNFSF14), 림프구 활성화 유전자(lymphocyte activating gene) 3(LAG3), T-세포 면역글로불린 및 뮤신-도메인 함유(mucin-domain containing)-3(TIM3), 시알산-결합 면역글로불린-유사 렉틴(sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin; SIGLEC), 유도성 T-세포 공자극인자(inducible T-cell costimulator; ICOS) 및 ICOS 리간드, B7-H3(B7 계열, 대안적으로 CD276), V-세트 도메인-함유 T-세포 활성화 억제제(set domain-containing T-cell activation inhibitor) 1(VTCN1, 대안적으로 B7-H4), T-세포 활성화의 V-형 면역글로불린 도메인-함유 억제인자(V-Type immunoglobulin domain-containing suppressor of T-cell activation; VISTA), 사람 내인성 레트로바이러스-H 긴 말단 반복체-관련 단백질 2(Human endogenous retrovirus-H long terminal repeat-associating protein 2; HHLA2)-막관통(transmembrane) 및 면역글로불린 도메인 함유 2(Immunoglobulin domain containing 2; TMIGD2), 부티로필린(butyrophilin), 천연 킬러 세포 수용체(natural killer cell receptor) 2B4(대안적으로 NKR2B4, CD244) 및 B-세포막 단백질(CD48), 면역글로불린(Ig)을 지닌 T-세포 면역수용체 및 면역수용체 타이로신-기반

억제 모티프 도메인(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif domains; **TIGIT**) 및 폴리오바이러스 수용체(Poliiovirus receptor; **PVR**) 계열 구성원, 킬러-세포 면역글로불린-유사 수용체(killer-cell immunoglobulin-like receptor; **KIR**), 면역글로불린-유사 전사체(Immunoglobulin-like transcript; **ILT**) 및 백혈구 면역글로불린-유사 수용체(leukocyte immunoglobulin-like receptor; **LIR**), 천연 킬러 그룹 단백질 2 구성원 D(natural killer group protein 2 member D; **NKG2D**) 및 천연 킬러 그룹 단백질 2 구성원 A(**NKG2A**), 주요 조직적합성 복합체(major histocompatibility complex; **MHC**) 제 I 부류 폴리펩타이드-관련 서열 A(**MICA**) 및 MHC 제 I 부류 폴리펩타이드-관련 서열 B(**MICB**), 천연 킬러 세포 수용체 2B4(**CD244**), 콜로니 자극 인자 1 수용체(colony stimulating factor 1 receptor; **CSF1R**), 인돌아민 2,3-디옥시게나제(**IDO**), 형질전환 성장 인자 베타(transforming growth factor beta; **TGF $\beta$** ), 아데노신-엑토-뉴클레오티다제 트리포스페이트 디포스포하이드롤라제 1(**CD39**)-5'-뉴클레오티다제(**CD73**), C-X-C 모티프 케모킨 수용체(motif chemokine receptor) 4(**CXCR4**) 및 C-X-C 모티프 케모킨 리간드 12(**CXCL12**), 포스포티달세린, 신호 조절성 단백질 알파(signal regulatory protein alpha; **SIRPA**) 및 인테그린 관련 단백질(**CD47**), 혈관 내피 성장 인자(**VEGF**), 및 뉴로필린의 억제제 또는 길항제, 또는 이에 대한 백신이다.

본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 구현예에서 ALPK1 효능제는 체크포인트 억제제 또는 면역 공-자극성 분자의 효능제, 예를 들면, 항-OX40(**CD134**) 효능제 항체와 함께 투여될 수 있다. 구현예에서, 체크포인트 억제제는 PD-1/PD-L1 억제제, 예를 들면, 항-PD1 항체 또는 항-PD-L1 항체이며, ALPK1 효능제는 H1b-ADP-6L 및 H1b-ADP, 및 이의 전구약물, 유사체 및 유도체로부터 선택된다.

구현예에서, ALPK1 효능제는 하나 이상의 면역 조절인자와 함께 투여될 수 있다. 구현예에서, 면역 조절인자는 백신일 수 있다. 구현예에서, 백신은 상기 기술된 바와 같이, 감염체에 대한 백신이다. 구현예에서, 백신은 암 백신이다. 구현예에서, 암 백신은 당단백질 100(gp100), 뮤신 1(MUC1), 및 흑색종-관련 항원 3(MAGEA3)으로부터 선택된 종양 항원을 표적화한다.

구현예에서, 하나 이상의 면역 조절인자는 재조합 단백질, 예를 들면, 과립구-대식구 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 인터루킨 7(IL-7), IL-12, IL-15, IL-18, 또는 IL-21일 수 있다.

암 치료의 구현예에서, ALPK1 효능제는 T 세포 치료요법, 예를 들면, 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포 치료요법과 함께 투여될 수 있다.

암 치료 방법의 구현예에서 ALPK1 효능제는 PD-1/PD-L1 억제제 또는 면역 공-자극성 분자의 효능제, 예를 들면, 항-OX40(**CD134**) 효능제 항체와 함께 투여될 수 있다. 구현예에서, PD-1/PD-L1 억제제 또는 면역 공-자극성 분자의 효능제와 함께 투여된 ALPK1 효능제는 H1b-ADP-6L 및 H1b-ADP로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 H1b-ADP, 또는 이의 전구약물, 유사체 또는 유도체이다. 구현예에서, 암은 진단된 흑색종, 비-소세포 폐암, 신장 세포 암종, 방광암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 비-호지킨 림프종, 전립선암, 두경부암, 갑상선암, 뇌암, 급성 골수 백혈병(AML), 머켈 세포 암종(merkel cell carcinoma), 다발 골수종, 자궁경부암, 및 육종으로부터 선택되며 이러한 방법은 PD-1/PD-L1 억제제 또는 면역 공-자극 분자의 효능제를 대상체에게 투여함을 추가로 포함한다.

면역 반응을 조절하거나 세균, 바이러스, 또는 기생충 감염을 치료 또는 예방하기 위한 방법의 구현예에서, 하나 이상의 추가의 치료제는 면역 조절인자, 예를 들면, 면역 체크포인트 분자의 억제제 또는 길항제일 수 있다. 이러한 분자는 일반적으로 면역계의 주요 조절인자(key regulator)로서, 예를 들면, 면역 반응의 공-자극인자로서 작용한다.

구현예에서, 본 개시내용은 또한 ALPK1 효능제를 포함하는 백신 조성물 또는 백신 보조제를 제공한다. 본원에 기술된 백신 조성물은 하나 이상의 보조제를 추가로 포함할 수 있다.

구현예에서, 본 개시내용은 또한 ALPK1 효능제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 상기 논의된 바와 같은, 작은 유기 분자, 예를 들면, HBP의 형태일 수 있거나, 또는 큰 생물분자, 예를 들면, 단백질(예컨대, ALPK1 자체 또는 ALPK1 키나제 활성을 활성화하는 ALPK1-지시된 항체 또는 이의 Fc 단편) 또는 폴리뉴클레오타이드(예컨대, ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)의 형태일 수 있다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 HMP-1bP 및 H1b-ADP 및 이의 전구약물, 유사체 및 유도체로부터 선택된다. 구현예에서, ALPK1 효능제는 H1b-ADP, 또는 이의 전구약물, 유사체 또는 유도체이다.

구현예에서, 본 개시내용은 또한 ALPK1 신호전달의 하부 표적의 ALPK1 자가인산화 및/또는 활성화에 대한 시험 화합물의 효과를 측정함으로써 면역 반응을 조절할 수 있는 화합물을 선택하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은

ALPK1을 시험 화합물과 ATP의 존재하에서 및, 별도로 ATP의 부재하에서 접촉시킨 다음, 검정을 수행하여 ALPK1 신호전달의 하나 이상의 하부 표적의 ALPK1 자가인산화 및/또는 활성화를 검출함을 포함한다. 구현예에서, ALPK1과 시험 화합물의 접촉은 세포-유리된 시스템 또는 세포-기반 시스템에서 수행된다.

본원에 기술된 방법의 맥락에서, 용어 "치료하는"은 치료되는 질환, 장애 또는 상태와 관련된 하나 이상의 증상의 완화 또는 안정화를 지칭할 수 있다. 용어 "치료하는"은 또한 대상체가 치료요법으로부터 유래하는 유리한 효과를 지칭하지만 근본적인 질환, 장애, 또는 상태를 치유하지 않는 질환, 장애 또는 상태의 관리를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 맥락에서, 용어 "예방"은 질환, 장애, 또는 상태의 하나 이상의 증상의 재발, 발달, 진행 또는 발병을 예방하는 것을 지칭한다.

치료학적 유효량의 화합물 또는 조성물이 대상체에게 투여되는 구현예에서, 치료학적 유효량은 목적한 치료학적 결과, 예를 들면, 치료되는 질환, 장애 또는 상태의 하나 이상의 증상의 완화 또는 안정화를 달성하기에 충분한 양, 또는 예방의 맥락에서, 질환, 장애, 또는 상태의 하나 이상의 증상의 재발, 발달, 진행 또는 발병의 예방을 달성하기에 충분한 양이다.

구현예에서, 치료학적 유효량은 표준 치료요법과 비교하여 적어도 증가의 치료학적 효과를 달성하는데 필요한 양이다. 표준 치료요법의 예는 동일한 질환, 장애 또는 상태를 치료하기 위해 나타낸 FDA-승인된 약물이다.

본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 맥락에서, 대상체는 바람직하게는 사람이지만 비-사람 척추동물일 수 있다. 다른 구현예에서, 비-사람 척추동물은 예를 들면, 개, 고양이, 설치류(예컨대, 마우스, 랫트, 토끼), 말, 소, 양, 염소, 닭, 오리, 또는 임의의 다른 비-사람 척추동물일 수 있다.

구현예에서, 사람 대상체는 이러한 용어가 의학적 숙련가에 의해 이해되는 바와 같이, 예를 들면, 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug Administration)에 의해 정의된 바와 같이, 성인 사람, 소아 사람, 또는 노인 사람으로부터 선택된다.

구현예에서, 본 개시내용은 ALPK1 효능제를 포함하는 조성물, 또는 ALPK1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 조성물, 또는 ALPK1 단백질을 포함하는 조성물, 및 하나 이상의 부형제 또는 담체, 바람직하게는 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 제공한다. 본원에 사용된 바와 같은, 어구 "약제학적으로 허용되는"은 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증없이, 적절하게 충분한 이익/위험 비로 사람 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한, 건전한 의학적 판단의 영역 내에 있는 화합물, 물질, 조성물, 담체, 및/또는 투여형을 지칭한다. 약제학적 조성물을 제조하기 위한 부형제는 일반적으로 사람 또는 동물체에 투여되는 경우 안정하고 무-독성인 것으로 알려진 것이다. 약제학적으로 허용되는 부형제의 예는 제한없이, 멸균액, 물, 완충 염수, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 오일, 세제, 현탁제, 탄수화물(예컨대, 글루코즈, 락토즈, 슈크로즈 또는 텍스트란), 향산화제(예컨대, 아스코르브산 또는 글루타티온), 킬레이팅제(chelating agent), 저 분자량 단백질, 및 상기한 것 중 어느 하나의 적합한 혼합물을 포함한다. 조성물 속에 이용된 특수한 부형제는 다양한 인자, 예를 들면, 제형화되는 화합물의 화학적 안전성 및 용해도 및 의도된 투여 경로에 의존할 것이다.

약제학적 조성물은 다량(bulk) 또는 단위 투여형으로 제공될 수 있다. 약제학적 조성물을 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위한 단위 투여형으로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 용어 "단위 투여형"은 치료될 대상체에 대해 통합된 투여량으로서 적합한 생리학적으로 별개인 단위를 지칭하고; 각각의 단위는 필요한 약제학적 담체와 관련하여 목적한 치료학적 효과를 생산하기 위해 계산된 활성 화합물의 예정된 양을 함유한다. 단위 투여형은 앰플(ampoule), 바이알(vial), 좌제, 당의정(dragee), 정제, 캡셀제, IV 백, 또는 에어로졸 흡입기 상의 단일 펄프일 수 있다.

치료학적 적용시, 용량은 활성 화합물의 화학적 및 물리적 특성 뿐만 아니라 대상체의 임상 특성, 예컨대, 연령, 체중, 및 동반질환에 따라 변할 수 있다. 일반적으로, 용량은 치료학적 유효량이어야 한다. 약제학적 조성물의 유효량은 임상의 또는 다른 자격을 갖춘 관찰자가 주목한 바와 같이 객관적으로 확인가능한 개선을 제공하는 것이다. 예를 들면, 장애, 질환 또는 상태의 증상의 완화.

약제학적 조성물은 임의의 목적한 경로(예컨대, 폐, 흡입, 비강내, 경구, 볼내, 설하, 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 복강내, 흉골내, 수막내, 경피, 경점막, 직장 등)에 의해 투여하기에 임의로 적합한 형태(예컨대, 액체(liquid), 에어로졸제, 액제(solution), 흡입제, 연무제(mist), 스프레이제; 또는 고체, 산제, 연고제, 페이스트제, 크림제, 로션제, 겔제, 패치제(patch) 등)를 취할 수 있다. 구현예에서, 약제학적 조성물은 경구적으로 허용되는 투여형, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는, 캡셀제, 정제, 볼내 형태, 트로키제(troch), 로젠지

제(lozenge), 및 유제, 수성 현탁제, 분산제 또는 액제의 형태의 경구 액체이다. 캡셀제는 부형제, 예를 들면, 불활성 충전제 및/또는 희석제, 예를 들면, 전분(예컨대, 옥수수, 감자 또는 타피오카 전분), 당, 인공 감미제, 분말 셀룰로즈, 예를 들면, 결정성 및 미세결정성 셀룰로즈, 밀가루, 젤라틴, 검 등을 함유할 수 있다. 경구용 정제의 경우에, 일반적으로 사용되는 담체는 락토즈 및 옥수수 전분을 포함한다. 윤활제, 예를 들면, 스테아르산마그네슘을 또한 가할 수 있다.

구현예에서, 약제학적 조성물은 정제의 형태이다. 정제는 불활성 희석제 또는 담체, 예를 들면, 당 또는 당 알코올, 예를 들면, 락토즈, 슈크로즈, 소르비톨 또는 만니톨과 함께 본원에 기술된 화합물의 단위 용량을 포함할 수 있다. 정제는 비-당 유래된 희석제, 예를 들면, 탄산나트륨, 인산칼슘, 탄산칼슘, 또는 셀룰로즈 또는 이의 유도체, 예를 들면, 메틸 셀룰로즈, 에틸 셀룰로즈, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로즈, 및 전분, 예를 들면, 옥수수 전분을 추가로 포함할 수 있다. 정제는 결합제 및 과립화제, 예를 들면, 폴리비닐피롤리돈, 붕해제(예컨대, 팽윤가능한 가교결합된 중합체, 예를 들면, 가교결합된 카복시메틸셀룰로즈), 윤활제(예컨대, 스테아레이트), 보존제(예컨대, 파라벤), 항산화제(예컨대, 부틸화된 하이드록시톨루엔), 완충제(예컨대, 포스페이트 또는 시트레이트 완충제), 및 비등제(effervescent agent), 예를 들면, 시트레이트/비카보네이트 혼합물을 추가로 포함할 수 있다. 정제는 코팅된 정제일 수 있다. 코팅은 보호성 필름 코팅(예컨대, 왁스 또는 바니쉬(varnish)) 또는 활성 화합물의 방출, 예를 들면, 지연된 방출(소화 후 예정된 지체 시간 후 활성물의 방출) 또는 위장관내 특수한 위치에서의 방출을 제어하도록 설계된 코팅일 수 있다. 후자는 예를 들면, 장 필름 코팅(enteric film coating), 예를 들면, 상표명 Eudragit<sup>®</sup> 하에 시판된 것을 사용하여 달성할 수 있다.

정제 제형은 통상의 압착, 습윤 과립화 또는 무수 과립화 방법에 의해 제조될 수 있으며 약제학적으로 허용되는 희석제, 결합제, 윤활제, 붕해제, 표면 개질제(계면활성제 포함), 현탁화제 또는 안정화제, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는 스테아르산마그네슘, 스테아르산, 활석, 나트륨 라우릴 설페이트, 미세결정성 셀룰로즈, 카복시메틸셀룰로즈 칼슘, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 알긴산, 아카시아 검, 크산탄 검, 시트르산나트륨, 복합체 실리케이트, 탄산칼슘, 글리신, 텍스트린, 슈크로즈, 소르비톨, 인산이칼슘, 황산칼슘, 락토즈, 카올린, 만니톨, 염화나트륨, 활석, 무수 전분 및 분말 당을 이용한다. 바람직한 표면 개질제는 비이온성 및 음이온성 표면 개질제를 포함한다. 표면 개질제의 대표적인 예는 폴록사머(poloxamer) 188, 벤즈알코늄 클로라이드, 스테아르산칼슘, 세토스테아릴 알코올, 세토마크로골 유화 왁스, 소르비탄 에스테르, 콜로이드성 이산화규소, 포스페이트, 나트륨 도데실 설페이트, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 및 트레탄올아민을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

구현예에서, 약제학적 조성물은 경질 또는 연질 젤라틴 캡셀제의 형태이다. 이러한 제형에 따라서, 본 발명의 화합물은 고체, 반-고체, 또는 액체형일 수 있다.

구현예에서, 약제학적 조성물은 비경구 투여용으로 적합한 멸균 수용액 또는 분산액의 형태이다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 비경구는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 동맥내, 활막내, 흉골내, 수막내, 병변내 및 두개골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

구현예에서, 약제학적 조성물은 직접 주사에 의한 또는 정맥내 주입을 위한 멸균 주입액에 대한 첨가에 의해 투여용으로 적합한 멸균 수용액 또는 분산액의 형태이며, 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜), 이의 적합한 혼합물, 또는 하나 이상의 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산매질을 포함한다. 액체 또는 현탁제는 공-용매 또는 계면활성제의 도움으로 물 속에서 제조될 수 있다. 적합한 계면활성제의 예는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-지방산 및 PEG-지방산 모노 및 디에스테르, PEG 글리세롤 에스테르, 알코올-오일 에스테르교환반응 생성물, 폴리글리세릴 지방산, 프로필렌 글리콜 지방산 에스테르, 스테롤 및 스테롤 유도체, 폴리에틸렌 글리콜 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 알킬 에테르, 당 및 이의 유도체, 폴리에틸렌 글리콜 알킬 페놀, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌(POE-POP) 블록 공중합체, 소르비탄 지방산 에스테르, 이온성 계면활성제, 지용성 비타민 및 이의 염, 수용성 비타민 및 이들의 양쪽성 유도체, 아미노산 및 이들의 염, 및 유기산 및 이들의 에스테르 및 무수물을 포함한다. 분산제는 또한 예를 들면, 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 또는 오일 속의 이들의 혼합물 속에서 제조될 수 있다.

구현예에서, 본원에 기술된 화합물 또는 조성물은 단독치료요법 또는 보조 치료요법으로서 투여될 수 있다. 구현예에서, 본원에 기술된 화합물 또는 조성물은 단독으로 또는 하나 이상의 추가의 치료제(즉, 추가의 API) 또는 예컨대, 식이 및 운동의 양태를 포함하는, 예를 들면 치료학적 요법의 일부로서 치료요법과 함께 투여될 수 있다. 구현예에서, 본원에 기술된 방법은 주요 치료요법으로서 ALPK1 효능제의 투여를 포함한다. 다른 구현예에서, ALPK1 효능제의 투여는 보조제 치료요법이다. 어느 경우에도, 본 발명의 방법은 본원에 기술된 바와 같은

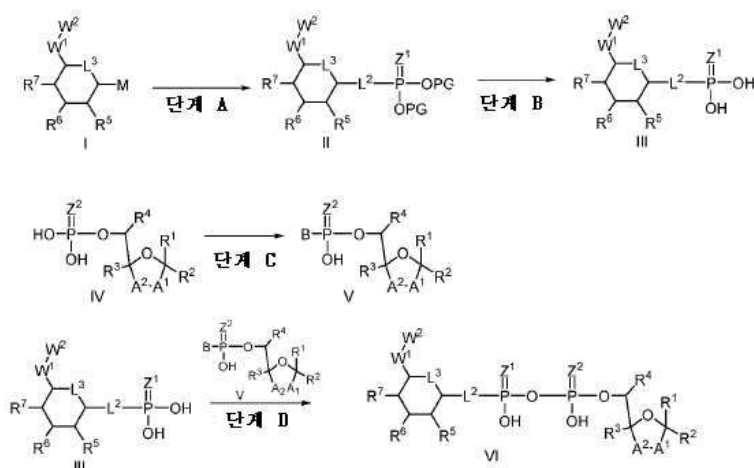
질환, 장애, 또는 상태의 치료 또는 예방을 위한 하나 이상의 추가의 치료제 및/또는 치료요법과 함께 ALPK1 효능제의 투여를 고려한다. 용어 "치료요법" 및 "치료요법들"은 질환, 장애, 또는 상태, 이의 하나 이상의 증상의 예방, 치료, 관리 또는 완화에 사용될 수 있는 임의의 방법, 프로토콜 및/또는 제제를 지칭한다.

본 개시내용은 또한 본원에 기술된 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물을 포함하는 패키징(packaging) 및 키트(kit)를 제공한다. 키트는 병, 바이알, 앰플(ampoule), 블리스터 팩(blister pack), 및 주사기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 키트는 사용하기 위한 하나 이상의 설명서, 하나 이상의 주사기, 하나 이상의 어플리케이터(applicator), 또는 본원에 기술된 화합물 또는 조성물을 재구성하기에 적합한 멸균 용액을 추가로 포함할 수 있다.

#### 화학식 I의 화합물 및 예시적인 화합물의 제조

$L^1$ 이 0인 화학식 I의 화합물(화합물 VI)은 반응식 1에 나타난 바와 같은 일반적인 합성 방법으로 제조될 수 있다. 화합물 II("PG"는 보호 그룹을 지칭한다)는 염기성 조건 하에서 보호된 포스포로클로리데이트 또는 미츠노부 반응 조건(Mitsunobu reaction condition) 하에서 적절한 보호된 인산염을 지닌 화합물 I(여기서 M은 OH이다)에 의해 수득될 수 있다. 화합물 II는 실리카 겔 크로마토그래피에서 분리될 수 있는 알파 및 베타 이성체의 혼합물로서 수득될 수 있다. 화합물 II의 베타 이성체는 Pd/C 또는  $PtO_2$ 에 의해 촉매된  $H_2$ 의 1 내지 4개의 원자 하에서 탈보호시켜 화합물 III을 수득한다. 화합물 IV와 모르폴린, 또는 다른 적합한 염기의, 적절한 용액, 예를 들면, t-BuOH/ $H_2O$  속에서 DCC에 의한 커플링으로 화합물 V를 수득한다. 피리딘과 같은 적절한 용매 속에서 화합물 III 및 화합물 V와 적절한 촉매, 예를 들면, 테트라졸의 실온 하에서 24 내지 72 시간 동안의 커플링으로 화합물 VI을 제공한다.

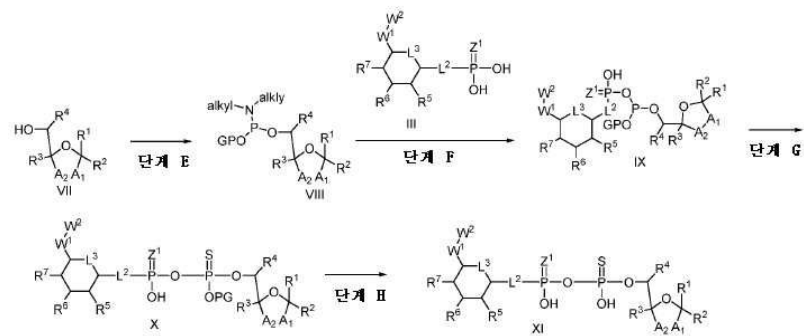
[반응식 1]



$Z^2$ 가 S인 화학식 I의 화합물( $L^1$ 은 0이다, 화합물 XI)은 반응식 II에 나타난 바와 같이 합성할 수 있다. 화합물 VIII("PG"는 보호 그룹을 지칭한다)은 화합물 VII 및 보호된 디알킬포스포르아미디트를 적합한 용매, 예를 들면, 디클로로메탄 속에서 및 -10 내지 25°C 범위의 온도에서 반응시켜 수득할 수 있다. 화학식 VIII 및 III의 커플링은 적합한 용매, 예를 들면, DMF 속에서 불활성 가스 시스템 하에 25°C 이하의 온도에서 달성하여 화합물 IX를 수득할 수 있으며, 이는 반응계내(in situ)에서 황으로 산화시켜 화합물 X를 수득할 수 있다. 화합물 X의 탈 보호로 최종 화합물 XI을 제공한다.

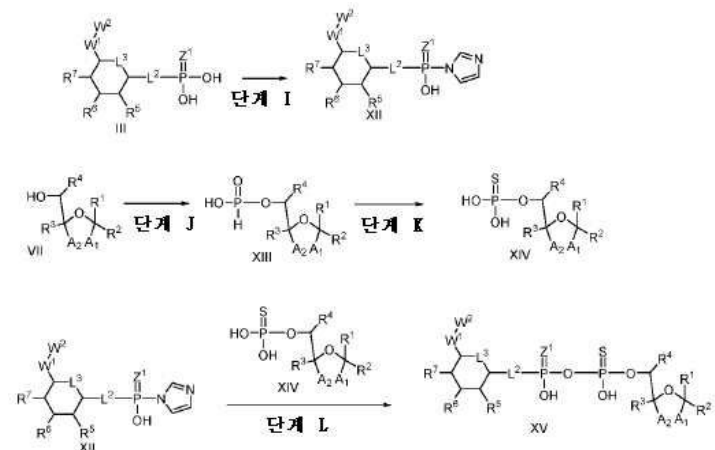


[반응식 II]



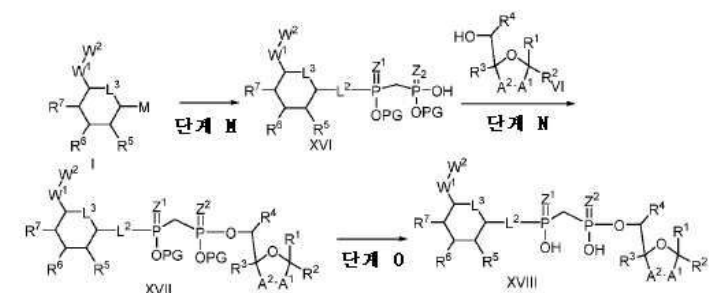
$Z^2$ 가 S인 화학식 I의 화합물( $L^1$ 은 O이다, 화합물 XV)은 반응식 III에 나타낸 바와 같은 대안적인 방법으로 합성할 수 있다. 화합물 III은 적합한 용매, 예를 들면, DMF 속에서 불활성 가스 시스템 하에 10 내지 40℃ 하에서 이미다졸 염을 형성시킴으로써 활성화시킬 수 있다. 화합물 VII은 페녹시포스포닐옥시벤젠과의 반응에 의한 도입된 포스페이트이다. 0 내지 10℃ 하에서 황으로 산화시킨 후, 화합물 XIV를 수득할 수 있다. DMF 불활성 가스 시스템과 같은 적합한 용매 속에서 0 내지 40℃와 같은 온화한 조건 하에서 화합물 XII 및 XIV를 루이스산의 촉매와 커플링시켜 최종 화합물 XV를 제공한다.

[반응식 III]



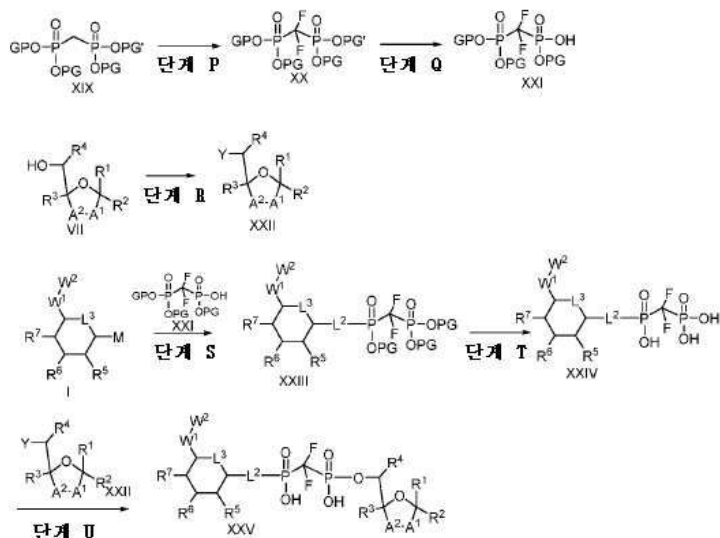
$L^1$ 이  $CH_2$ 인 화학식 I의 화합물(화합물 XVIII)은 반응식 IV에 나타낸 바와 같은 일반적인 합성 방법으로 제조할 수 있다. 30 내지 50℃에서 2 내지 4시간 동안 화합물 I( $M$ 이 OH인 경우) 및 보호된 메틸 디포스페이트의 미츠노부 반응으로 화합물 XVI("PG"는 보호 그룹을 지칭한다)을 수득한다. 화합물 XVI은 유사한 조건 하에서 화합물 VI과의 제2의 미츠노부 반응을 거쳐 화합물 XVII을 수득한다. 화합물 XVII의 탈보호 반응은 최종 화합물 XVIII을 제공한다.

[반응식 IV]



L<sup>1</sup>이 CF<sub>2</sub>인 화학식 I의 화합물(화합물 XXV)은 반응식 V에 나타낸 바와 같은 일반적인 합성 방법으로 제조할 수 있다. 화합물 XIX("PG"는 보호 그룹을 지칭한다)는 염기성 NaH 조건 하에서 -20℃ 내지 0℃의 저 반응 온도로부터 출발하여 적합한 용매 속에서 N-플루오로벤젠설폰아미드(NFSI)를 사용함으로써 보호된 디-플루오로메틸 디포스페이트 화합물 XX로 전환시킨다. 화합물 XX내 보호 그룹 중 하나의 선택적인 제거로 화합물 XXI을 수득한다. 화합물 VII은 하이드록실 그룹을 이탈 그룹, 예를 들면, OTs, OMs 또는 할로겐으로 전환시킴으로써 화합물 XXII로 전환시킨다. 30 내지 50℃에서 2 내지 4시간 동안 화합물 I(M이 OH인 경우) 및 화합물 XXI의 미즈노부 반응으로 화합물 XXIII를 수득한다. 화합물 XXIII의 탈보호로 화합물 XXIV를 수득한다. 적합한 용매, 예를 들면, CH<sub>3</sub>CN 속에서 화합물 XXIV를 화합물 XXII와 염기 Bu<sub>4</sub>N를 사용하여 커플링시켜 최종 화합물 XXV를 수득한다.

[반응식 V]



A<sup>1</sup>이 S인 화학식 IC의 화합물(화합물 XXXII)은 반응식 VI에 나타낸 바와 같은 일반적인 합성 방법으로 제조할 수 있다. 적합한 용매 속에서 화합물 XXVI와 2-옥소에틸 벤조에이트와 유사한 보호된 2-하이드록시아세트알데하이드의 반응으로 2개의 이성체의 혼합물로서 화합물 XXVII("PG"는 보호 그룹을 지칭한다)를 수득한다. 대안적으로, 적합한 용매, 예를 들면, THF 중 유기 염기(예컨대, 트리에틸아민), 페닐 아세테이트, 계면활성제-처리된 서브틸리신(STS), 및 칼스버그(Carlsberg)의 존재하에서 화합물 XXVI와 2-옥소에틸 벤조에이트의 반응으로 R 구조의 화합물 XXVII을 수득한다. STS 대신에 CAL B를 사용하여 S 구조의 화합물 XXVII을 수득할 수 있다(참고: Hu, L et al. Chem. Commun., 2013, 49, 10376 -10378). 화합물 XXVII은 적합한 용매 용액 속에서 SnCl<sub>4</sub>와 반응시켜 화합물 XXVIII을 수득한다. 화합물 XXVIII을 탈보호시켜 화합물 XXIX를 수득한다. 화합물 XXIX의 인산화는 이를 POCl<sub>3</sub> 및 피리딘과 적합한 용매 속에서 반응시켜 화합물 XXX를 수득함으로써 달성할 수 있다. 화합물 XXX를 최종 화합물 XXXII로 전환시키는 나머지 반응은 반응식 I에 기술된 바와 동일한 반응 과정으로 수행할 수 있다.

[반응식 VI]

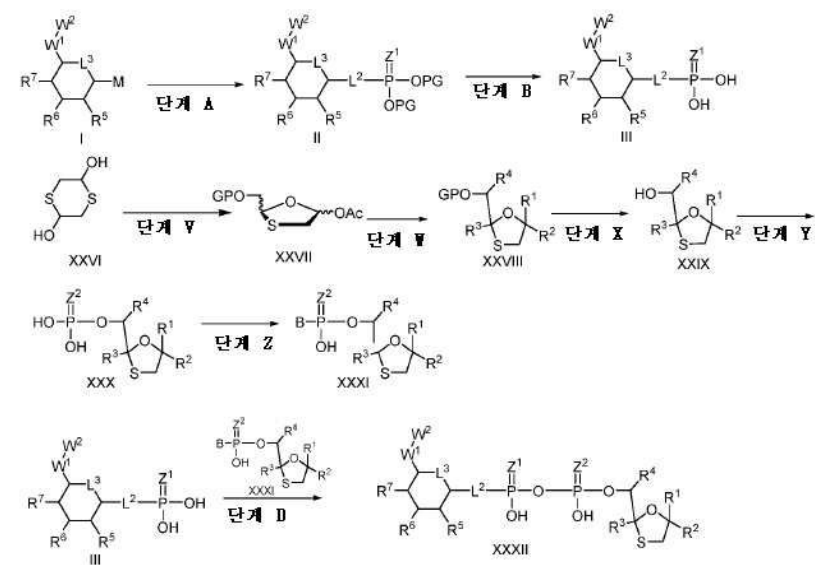
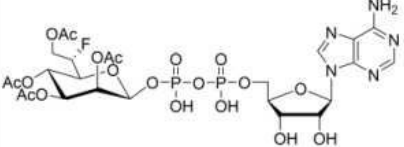
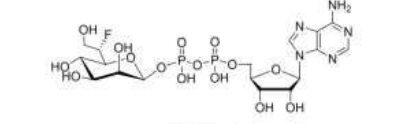
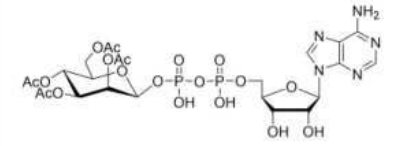
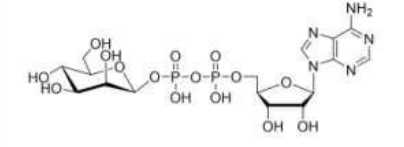
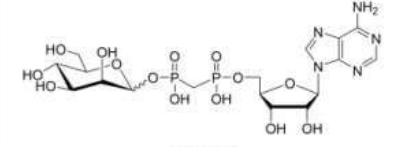
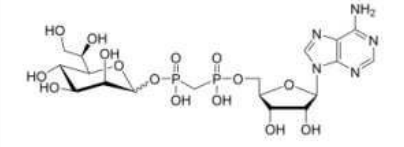


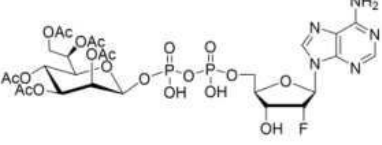
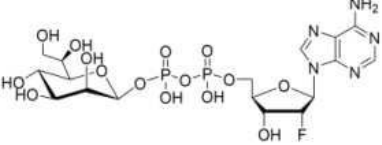
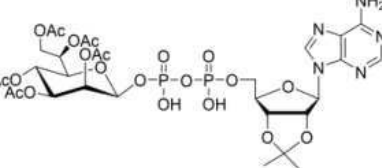
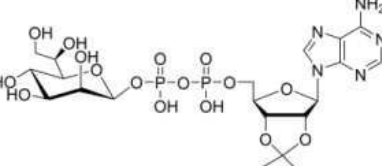
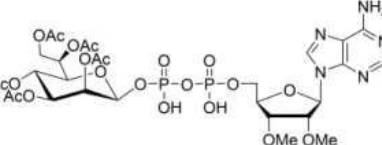
표 1은 본원에 기술된 바와 같은 과정에 따라 제조된 예시적인 화합물을 나타낸다.

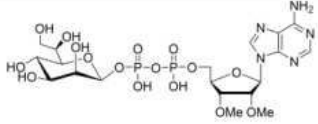
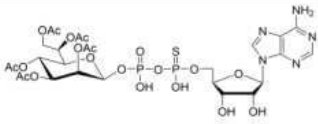
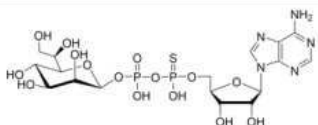
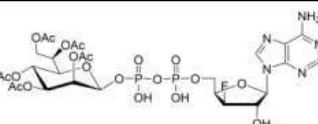
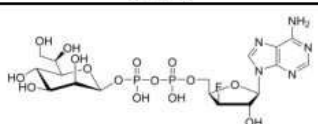
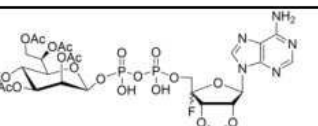
[표 1]

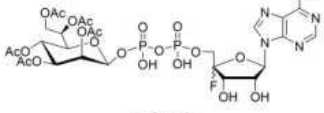
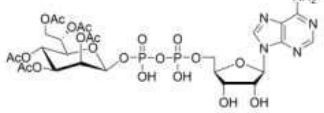
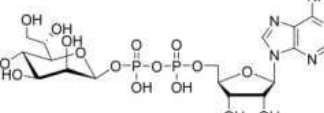
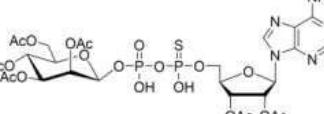
화학식 I의 예시적인 화합물

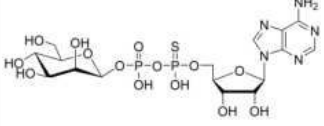
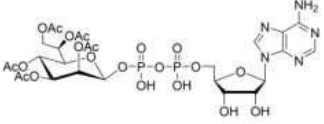
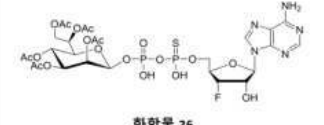
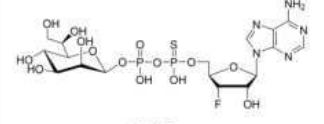
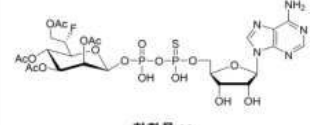
구조	화합물 명칭
<p>화합물 1</p>	((2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4S,5R)-5-(6-아미노-9H-푸란-9-일)-3-플루오로-4-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트
<p>화합물 2</p>	아데노신-3'-플루오로-5'-(D-글리세로-β-D-만노헵토피라노실) 디포스페이트

 <p style="text-align: center;"><b>화합물 3</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5S,6S)-2-((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)-6-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트</p>
 <p style="text-align: center;"><b>화합물 4</b></p>	<p>아데노신 - 5'-(L-글리세로-β-D-만노-6-플루오로-헵토피라노실) 디포스페이트</p>
 <p style="text-align: center;"><b>화합물 5</b></p>	<p>(2R,3R,4S,5S,6S)-2-(아세톡시메틸)-6-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트</p>
 <p style="text-align: center;"><b>화합물 6</b></p>	<p>아데노신 - 5'-(β-D-만노-헵토피라노실)디포스페이트</p>
 <p style="text-align: center;"><b>화합물 7</b></p>	<p>(3S,4S,5S,6R)-3,4,5-트리아이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-2-일 수소 (((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)메틸)포스포네이트</p>
 <p style="text-align: center;"><b>화합물 8</b></p>	<p>(3S,4S,5S,6R)-6-((R)-1,2-디하이드록시메틸)-3,4,5-트리아이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-일 수소 (((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)메틸)포스포네이트</p>

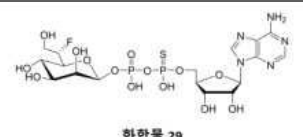
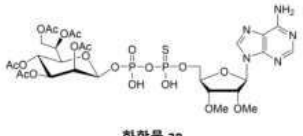
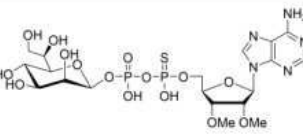
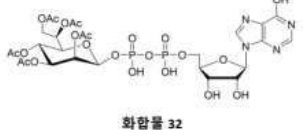
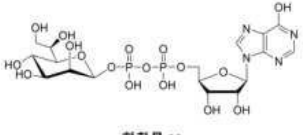
 <p><b>화합물 9</b></p>	<p>2-(((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-3-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트</p>
 <p><b>화합물 10</b></p>	<p>아데노신-2'-플루오로-5'-(D-글리세로-β-D-만노헵토피라노실) 디포스페이트</p>
 <p><b>화합물 11</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트</p>
 <p><b>화합물 12</b></p>	<p>((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메탄올 (D-글리세로-β-D-만노헵토피라노실) 디포스페이트</p>
 <p><b>화합물 13</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디메톡시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트</p>

 <p>화합물 14</p>	<p>아데노신 -2'3'-디메톡시-5'-(D-글리세로-β-D-만노헵토피라노실) 디포스페이트</p>
 <p>화합물 15</p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포티오일)-6-((R)-1,2-디아세톡시메틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트</p>
 <p>화합물 16</p>	<p>아데노신 -5'-(D-글리세로-β-D-만노-6-플루오로-헵토피라노실) (하이드록시)포스포로티오일 옥시포스페이트</p>
 <p>화합물 17</p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3R,4S,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3-플루오로-4-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포틸)옥시)(하이드록시)포스포틸)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시메틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트</p>
 <p>화합물 18</p>	<p>3'-(s)-플루오로-아데노신-5'-(D-글리세로-β-D-만노-헵토피라노실) 디포스페이트</p>
 <p>화합물 19</p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((3aS,4S,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메톡시)(하이드록시)포스포틸)옥시)(하이드록시)포스포틸)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시메틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트</p>

 <p style="text-align: center;"><b>화합물 20</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2S,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2-플루오로-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포닐)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트</p>
 <p style="text-align: center;"><b>화합물 21</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포닐)옥시)-6-((S)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트</p>
 <p style="text-align: center;"><b>화합물 22</b></p>	<p>아데노신 - 5'-(L-글리세로-β-D-만노헵토피라노실) 디포스페이트</p>
 <p style="text-align: center;"><b>화합물 23</b></p>	<p>(2R,3R,4S,5S,6S)-2-(아세톡시메틸)-6-((((((((2R,3R,4R,5R)-3,4-di 아세톡시-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트</p>

 <p><b>화합물 24</b></p>	<p>아데노신 - (5'-만노즈-피라노실) (하이드록시)포스포로티오일옥시포 스페이트</p>
 <p><b>화합물 25</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3S,4R,5R)- 5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4- 디하이드록시테트라하이드로푸란- 2- 일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥 시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6- ((R)-1,2- 디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H- 피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트</p>
 <p><b>화합물 26</b></p>	<p>2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3S,4S,5R)-5- (6-아미노-9H-푸린-9-일)-3-플루오로- 4-하이드록시테트라하이드로푸란-2- 일)메톡시)(하이드록시)포스포로티 오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥 시)-6-((R)-1,2- 디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H- 피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트</p>
 <p><b>화합물 27</b></p>	<p>아데노신-3'-플루오로-5'-(D- 글리세로-β-D-만노-헵토피라노실) (하이드록시)포스포로티오일옥시포 스페이트</p>
 <p><b>화합물 28</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5S,6S)-2-((S)-2-아세톡시-1- 플루오로에틸)-6-((((((2R,3S,4R,5R)-5- (6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4- 디하이드록시테트라하이드로푸란- 2- 일)메톡시)(하이드록시)포스포로티 오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥 시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-</p>



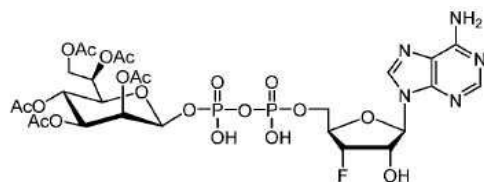
	트리일 트리아세테이트
	아데노신 -5'-(L-글리세로-β-D-만노-6-플루오로-헵토피라노실) (하이드록시)포스포티오일옥시포스페이트
	(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디메톡시테트라하이드로퓨란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포티오일)옥시)(하이드록시)포스포틸)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트
	아데노신 -2'3'-디메톡시-5'-(D-글리세로-β-D-만노헵토피라노실) (하이드록시)포스포티오일옥시포스페이트
	(2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-디아세톡시에틸)-6-((((((2R,3S,4R,5R)-3,4-디하이드록시-5-(6-하이드록시-9H-푸린-9-일)테트라하이드로퓨란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포틸)옥시)(하이드록시)포스포틸)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트
	이노신 -5'-(D-글리세로-β-D-만노헵토피라노실) 디포스페이트

## 화학식 I의 대표적인 화합물의 합성

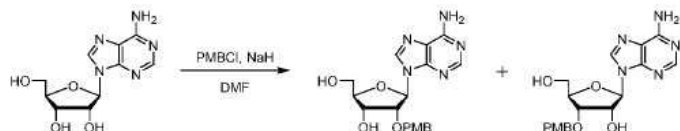
모든 습윤-민감성 반응을 Ar 하에서 주사기-격막 캡 기술(syringe-septum cap technique)을 사용하여 수행하였다. 분석적 박층 크로마토그래피(TLC)는 실리카 겔 60 F 254 플레이트(Qindao, 0.25 mm 두께) 상에서 수행하였다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼은 바리안(Varian)-400 광도계로 기록하고, 화학적 이동은 내부 테트라메틸실란 또는, 중수 소화된 용매의 잔류 양성자에 대해 (ppm) 값으로 기록하였다. <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼은 바리안-400 광도계로 기록하고, 화학적 이동은 내부 테트라메틸실란 또는, 중수소화된 용매의 잔류 양성자에 대해 δ (ppm) 값으로 기록하였다. <sup>31</sup>P-NMR 스펙트럼은 바이안-400 광도계로 기록하고, 화학적 이동은 외부 85% 인산에 대해 δ (ppm) 값으로 기록하였다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼은 다음과 같이 표로 만들었다: 화학적 이동, 다양성(multiplicity)(br = 광범위, s = 단일선(singlet), d = 이중선(doublet), t = 삼중선(triplet), q = 사중선(quartet), m = 다중선), 양성자의 수, 및 커플링 상수(들).

## 화합물 1

(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4S,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3-플루오로-4-하이드록시테트라하이드로퓨란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포틸)옥시)(하이드록시)포스포틸)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트

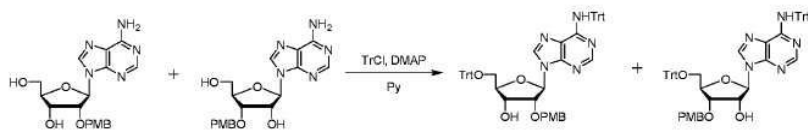


단계 1. 화합물 (2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2-((하이드록시메틸)-4-((4-메톡시벤질)옥시)테트라하이드로퓨란-3-올의 제조



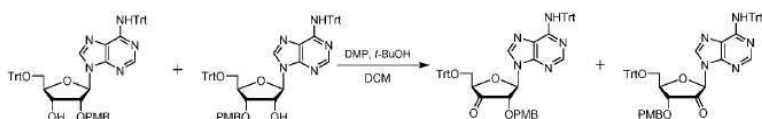
DMF(500 mL) 중 아데노신(40 g, 149.6 mmol)의 현탁액을  $-5^{\circ}\text{C}$ 로 냉각시켰다. NaH(8.0 g, 200.0 mmol, 60% 순도)를 혼합물에 가하고 당해 혼합물을 1시간 동안  $-5^{\circ}\text{C}$ 에서 교반하였다. 이후에 PMB-Cl(23.0 mL, 168.8 mmol)을 혼합물에 이러한 온도 하에서 1시간 동안 적가하였다. 첨가 후, 반응물을  $15^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 교반하였다. 반응물을 감압하에 농축시켜 용매를 제거하였다.  $\text{H}_2\text{O}$ (50 mL) 및 EA(100 mL)를 잔사에 가하고 유기 층을 분리하였다. 유기 층을 염수(50 mL)로 세척하고, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고 여과하고 감압하에 농축시켰다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피(DCM/MeOH: 20/1 내지 10/1)로 정제하여 목적한 화합물 및 이성체(27 g, 수율: 46.1%)의 혼합물을 백색 고체로서 수득하고 이를 다음 단계에서 추가의 분리없이 사용하였다.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.38 - 8.29 (m, 1H), 8.15 - 8.06 (m, 1H), 7.39 - 7.30 (m, 2H), 7.11 - 6.91 (m, 2H), 6.88 - 6.69 (m, 2H), 6.08 - 5.90 (m, 1H), 5.58 - 5.44 (m, 1H), 5.29 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 4.71 - 4.50 (m, 2H), 4.40 - 3.99 (m, 3H), 3.76 - 3.68 (m, 3H), 3.68 - 3.63 (m, 1H), 3.60 - 3.47 (m, 1H).

단계 2. 화합물 (2R,3R,4R,5R)-4-((4-메톡시벤질)옥시)-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)-2-((트리틸옥시)메틸)테트라하이드로퓨란-3-올의 제조



피리딘(20 mL) 중 단계 1의 생성물 및 상기 이의 이성체(10 g, 25.8 mmol)의 혼합물의 용액에 DMAP(2.5 g, 20.7 mmol) 및  $\text{TrtCl}$ (16.4 g, 59.0 mmol)을 가하였다. 이후에 반응물을  $80^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 동안 교반하였다. HCl(1N, 20 mL) 및 EA(50 mL)를 혼합물에 가하고 유기 층을 분리하였다. 유기 층을 HCl(1N, 20 mL x 3), 염수(100 mL)로 세척하고, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고, 여과하고 감압하에 농축시켰다. 조 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피(PE/ EA: 20/1 내지 1/1)로 정제하여 목적한 생성물 및 이의 이성체(총 18 g, 수율: 77.2%)를 백색 고체로서 수득하고 이를 다음 단계에서 추가의 분리없이 사용하였다.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.40 - 8.27 (m, 1H), 7.86 - 7.77 (m, 1H), 7.57 - 7.46 (m, 1H), 7.37 - 7.31 (m, 11H), 7.30 - 7.16 (m, 22H), 6.88 - 6.74 (m, 2H), 6.16 - 5.91 (m, 1H), 5.70 - 5.30 (m, 1H), 5.01 - 4.44 (m, 1H), 4.53 - 4.23 (m, 1H), 4.19 - 4.08 (m, 1H), 3.72 - 3.66 (m, 3H), 3.30 - 3.07 (m, 2H).

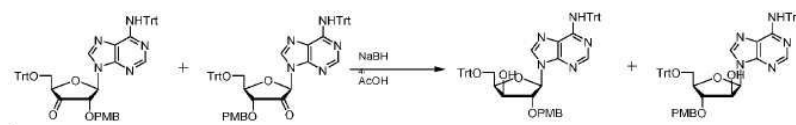
단계 3. 화합물 (2R,4S,5R)-4-((4-메톡시벤질)옥시)-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)-2-((트리틸옥시)메틸)디하이드로퓨란-3(2H)-온의 제조



DCM(30 mL) 중 상기 단계 2로부터의 생성물 및 이의 이성체(2.6 g, 2.98 mmol)의 혼합물의 용액에 DMP(2.54 g,

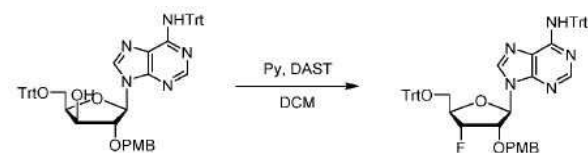
5.99 mmol) 및 t-BuOH(503.9 mg, 6.80 mmol, 650.17  $\mu$ L)를 가하였다. 혼합물을 25℃에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM(100 mL)으로 희석시키고, 포화된  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ /포화된  $\text{NaHCO}_3$ (1/1, 700 mL)로 킨칭(quenching)시켰다. 유기 층을 분리하고 수성 층을 DCM(100 mL x 3)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수(300 mL)로 세척하고, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고, 여과하고 농축시켜 잔사를 수득하였다. 목적한 생성물 및 이성체(2.79 g, 조 물질)를 담황색 고체로서 수득하고 이를 다음 단계로 추가의 정제없이 사용하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 870.4.

단계 4. 화합물 (2R,3S,4R,5R)-4-((4-메톡시벤질)옥시)-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)-2-((트리틸옥시)메틸)테트라하이드로푸란-3-올의 제조



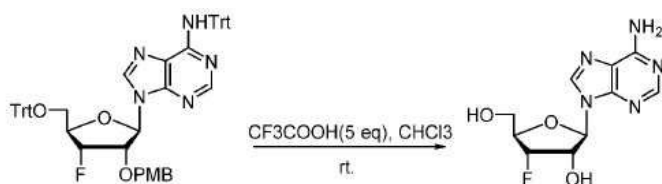
$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (25 mL) 중  $\text{NaBH}_4$ (565.3 mg, 14.94 mmol)의 용액을 15℃에서 10분 동안 교반한 다음 상기 단계 3의 생성물 및 이의 이성체(2 g, 2.30 mmol)의 혼합물에 가하였다. 혼합물을 25℃에서 20분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOH(50 mL x 2)로 증발시킨 다음, DCM(40 mL x 3)과  $\text{H}_2\text{O}$ (50 mL) 사이에 분배하고, 유기 층을 포화된  $\text{NaHCO}_3$ (60 mL), 염수(60 mL)로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고, 여과하고 농축시켜 잔사를 수득하였다. 2개의 이성체의 생성물을 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(PE: EA = 1:0 내지 2:1)로 정제하였다. 목적한 생성물(824 mg, 수율: 40.8%)은 백색 고체로서 수득하였다. 그리고 이성체(203mg, 수율: 10%)는 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 872.4. 목적한 생성물:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.85 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.44 - 7.09 (m, 32H), 7.03 (s, 1H), 6.85 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 5.73 (s, 1H), 4.63 (d,  $J$  = 11.2 Hz, 1H), 4.44 (d,  $J$  = 11.2 Hz, 1H), 4.32 (s, 1H), 4.28 - 4.16 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.56 - 3.44 (m, 2H).

단계 5. 9-((2R,3S,4R,5R)-4-플루오로-3-((4-메톡시벤질)옥시)-5-((트리틸옥시)메틸)테트라하이드로푸란-2-일)-N-트리틸-9H-푸린-6-아민의 제조



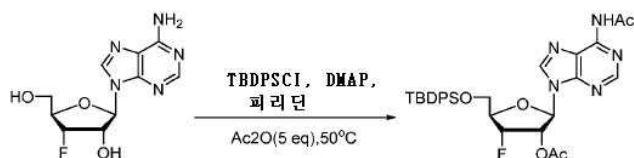
DCM(20 mL) 중 상기 단계 4의 출발 생성물(824 mg, 944.94  $\mu$ mol)의 용액에 피리딘(747.4 mg, 9.45 mmol, 762.70  $\mu$ L) 및 DAST(913.9 mg, 5.67 mmol, 749.08  $\mu$ L)에 가하였다. 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM(20 mL)으로 희석시키고, 포화된  $\text{NaHCO}_3$ (40 mL), 물(40 mL), 염수(40 mL)로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고, 여과하고 농축시켜 잔사를 수득하였다. 잔사를 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(PE: EA = 1:0 내지 2:1)로 정제하였다. 목적한 생성물(218 mg, 수율: 23.7%)은 무색 오일로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 874.4  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.91 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.42 - 7.15 (m, 30H), 7.09 (br d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 6.99 - 6.93 (m, 1H), 6.74 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 6.07 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 5.18 - 4.89 (m, 2H), 4.60 - 4.48 (m, 2H), 4.48 - 4.36 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.48 (dd,  $J$  = 4.6, 10.5 Hz, 1H), 3.30 (dd,  $J$  = 4.2, 10.5 Hz, 1H).

단계 6. (2R,3R,4R,5R)-2-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-5-(하이드록시메틸)테트라하이드로푸란-3-올의 제조



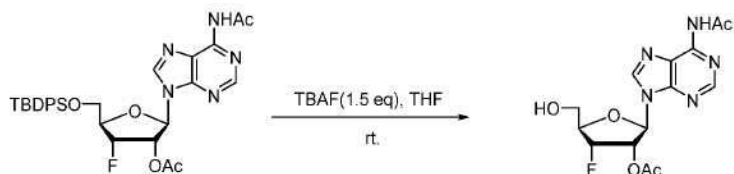
CHCl<sub>3</sub> 중 상기 단계 5의 생성물(1.2 g, 1.37 mmol)의 용액에 TFA(0.51 mL, 5 eq)를 실온에서 가하였다. 용액을 이러한 온도에서 2시간 동안 교반하였다. 용액을 감압하에 농축시켜 목적한 생성물을 오일성 잔사(360 mg, 1.34 mmol)로서 수득하고 이를 다음 단계에서 추가의 정제없이 사용하였다.

단계 7. (2R,3R,4S,5R)-2-(6-아세트아미도-9H-푸린-9-일)-5-(((3급-부틸디페닐실릴)옥시)메틸)-4-플루오로테트라하이드로푸란-3-일 아세테이트의 제조



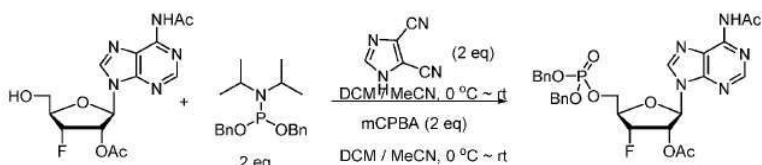
피리딘(10 mL) 중 상기 단계 6의 생성물(360 mg, 1.34 mmol)의 교반 용액에 DMAP(16 mg, 0.134 mmol)를 실온에서 가하였다. 용액을 50°C로 가열하였다. 이러한 온도에서 TBDPSCI(734 mg, 2.68 mmol)를 가하고 반응물을 이러한 온도에서 밤새 교반하였다. LC-MS는 SM이 남아있지 않음을 나타내었다. 용액을 Ac2O(633 μL, 6.7 mmol)에 적가하였다. 이러한 온도에서 5시간 동안 교반한 후, LC-MS는 목적한 화합물이 형성되었음을 나타내었다. 반응물을 DCM과 물 사이에 분배시켰다. 합한 추출물을 염수로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시켰다. 여액을 감압하에 농축시켜 목적한 생성물을 오일성 잔사(792 mg, 1.34 mmol)로서 수득하고 이를 다음 단계를 위해 추가의 정제없이 사용하였다.

단계 8. (2R,3R,4S,5R)-2-(6-아세트아미도-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-5-(하이드록시메틸)테트라하이드로푸란-3-일 아세테이트의 제조



THF(10 mL) 중 상기 단계 7의 생성물(792 mg, 1.34 mmol)의 교반 용액에 TBAF(THF 중 1 M, 2.00 mL, 2.00 mmol)를 실온에서 가하였다. 밤새 교반한 후, 반응물을 포화된 NH<sub>4</sub>Cl로 퀀칭시켰다. 반응물을 DCM과 물 사이에 분배하였다. 합한 추출물을 염수로 세척하고 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시켰다. 여액을 감압하에 농축시켜 오일성 잔사를 수득하고, 이를 DCM/MeOH(20:1)으로 용출시키는 실리카 겔 상에서 섬광 크로마토그래피로 정제하여 목적한 생성물을 무색 오일(254 mg, 0.72 mmol)로서 수득하였다.

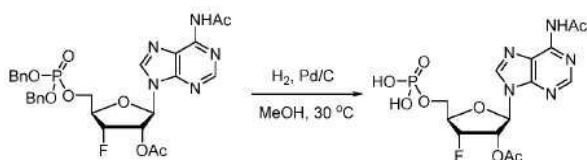
단계 9. (2R,3R,4S,5R)-2-(6-아세트아미도-9H-푸린-9-일)-5-(2-(비스(벤질옥시)포스포릴)에틸)-4-플루오로테트라하이드로푸란-3-일 아세테이트의 제조



25 mL들이 환저 플라스크에 상기 단계 8의 생성물(254 mg, 0.72 mmol) 및 1H-이미다졸-4,5-디카보니트릴(170 mg, 1.44 mmol)을 질소 대기 하에 충전(charging)시켰다. 무수 DCM 및 MeCN을 가하였다(DCM:MeCN = 5:1, v/v).

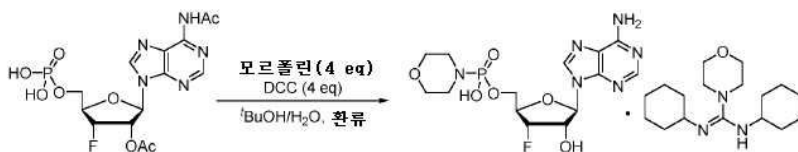
수득되는 용액을 빙-수 욕 속에서 냉각시키고 디벤질 디이소프로필포스포르아미디트(497 mg, 1.44 mmol)를 가하였다. 반응물을 실온으로 가온한 후, 이를 다른 1 내지 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 빙-수 욕 속에서 다시 냉각시키고 mCPBA(291 mg, 1.44 mmol)를 직접 가하였다. 이를 실온으로 가온시킨 후, 포화된  $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ 를 가하여 반응물을 퀀칭시키고 유기 상을 분리하였다. 수 상을 DCM으로 2회 추출하였다. 합한 추출물을  $\text{H}_2\text{O}$  및 염수로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시켰다. 여액을 감압하에 농축시켜 오일성 잔사를 수득하고, 이를 DCM/MeOH(30:1)로 용출시키는 실리카 겔 섬광 크로마토그래피로 정제하여 목적한 생성물(441 mg, 0.72 mmol)을 수득하였다.

단계 10. (2R,3R,4S,5R)-2-(6-아세타미도-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-5-((포스포노옥시)메틸)테트라하이드로푸란-3-일 아세테이트의 제조



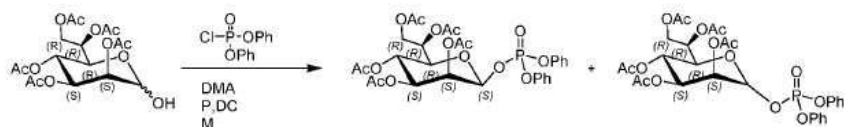
MeOH(4 mL) 중 상기 단계 9의 생성물(441 mg, 0.72 mmol) 및 Pd/C(132 mg)의 혼합물을 실온에서  $\text{H}_2$  하에 교반하였다. 밤새 교반한 후, 혼합물을 세공 크기(pore size)가 0.45 m인 Advantec PTFE 막 여과기를 통해 MeOH를 사용하여 여과하였다. 여액을 감압하에 농축시켜 목적한 생성물(233 mg, 0.54 mmol)을 수득하고, 이를 다음 단계를 위해 추가의 정제없이 사용하였다.

단계 11. ((2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3-플루오로-4-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메틸 하이드로겐 모르폴리노포스포네이트의 모르핀 DCC 염



t-부틸 알코올(5 mL) 중 DCC(445 mg, 2.16 mmol)의 용액에 t-BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$ (1:1, 10 mL), 및 정제된 모르폴린(188 mg, 2.16 mmol) 중 상기 단계 10의 생성물(233 mg, 0.54 mmol)의 환류 용액에 적가하였다. 첨가는 약 3시간 내에 완료하였으며, 혼합물은 TLC이 반응의 완료를 나타낼 때까지 밤새 환류시켰다. 혼합물은 실온으로 냉각시켰다. 여액을 t-BuOH가 거의 제거될 때까지 증발시키고, 나머지 수성 상을 에테르로 3회 추출하였다. 이후에 선명한 수용액을 동결 건조로 증발 건조시켜 목적한 생성물을 수득하고, 이를 다음 단계를 위해 추가의 정제없이 사용하였다.

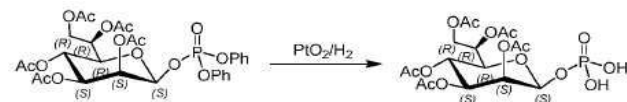
단계 12. (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-디아세톡시에틸)-6-((디페녹시포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



DCM(10 mL) 중 (2R,3R,4S,5S)-2-((R)-1,2-디아세톡시에틸)-6-하이드록시테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트(400 mg, 1 eq.; Shinsuke Inuki et al. Org. Lett. 2017, 19: 3079-3082; Alla Zamyatina et al., Carbohydrate Research, 2003, 338: 2571-2589) 및 DMAP(265.1 mg, 2.17 mmol, 2.28 eq)의 용액에, DCM(10 mL) 중 디페닐 포스포로클로리데이트(600.7 mg, 2.35 eq.)의 용액을 1시간 동안 주사기로 가하였다. 이후에, 반응물을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. 출발 물질은 TLC(PE: EA=2:1, 3회)로 부분 검출되어 남았다. DMAP(1.2 g)를 가한 다음 DCM(15 mL) 중 디페닐 포스포로클로리데이트(0.6 g)의 용액을 시스템에 적가한 다음 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 DCM(20 mL)으로 희석시키고, 포화된  $\text{NaHCO}_3$ (30 mL) 및 염수(30 mL)로 세척하였다. 유기 상을 농축시켜 잔사를 수득하였다. 잔사를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(PE: EA=10:1 내

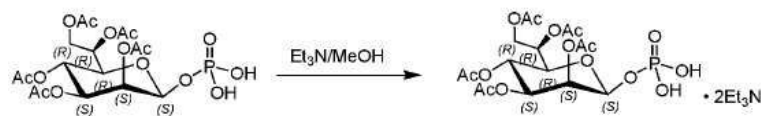
지 1:1)로 정제하여 이성체(알파 구조 70 mg, 수율: 11.3%) 및 목적인 생성물(베타 구조, 400 mg, 수율: 64.4%)를 둘 다 무색 오일로서 수득하였다. 베타 구조:  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.42 - 7.12 (m, 10H), 5.70 - 5.61 (m, 1H), 5.44 (br d,  $J=1.2$  Hz, 1H), 5.32 - 5.21 (m, 2H), 5.12 - 5.03 (m, 1H), 4.44 - 4.35 (m, 1H), 4.24 - 4.15 (m, 1H), 3.92 - 3.83 (m, 1H), 2.15 - 1.94 (m, 15H). 알파 구조:  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.42 - 7.30 (m, 4H), 7.29 - 7.15 (m, 6H), 5.85 (br d,  $J=6.4$  Hz, 1H), 5.41 - 5.26 (m, 3H), 5.19 - 5.11 (m, 1H), 4.37 (dd,  $J=3.7, 12.0$  Hz, 1H), 4.29 - 4.17 (m, 2H), 2.23 - 1.96 (m, 15H).

단계 13. 2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-디아세톡시에틸)-6-(포스포노옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



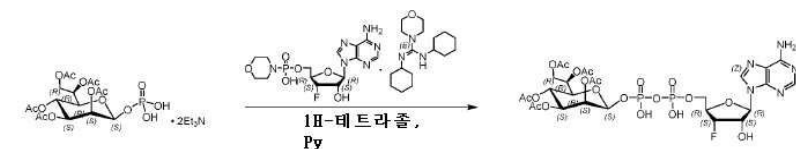
$\text{EtOAc}$  (4 mL) 및  $\text{EtOH}$  (4 mL) 중 상기 단계 12의 생성물 (400 mg, 1 eq.)로 이루어진 용액을  $\text{PtO}_2$  (69.60 mg, 0.5 eq)와 혼합하고  $25^\circ\text{C}$ 에서 16시간 동안 1 atm  $\text{H}_2$  대기 하에 교반하였다. 여과하고 여액을 농축시켜 잔사를 수득하였다. 목적인 생성물 (300 mg, 97.81% 수율)은 무색 오일로서 수득하였다. 생성물은 다음 단계에서 직접 사용하기에 충분히 순수하였다.  $^1\text{H NMR}$  (400MHz, 메탄올- $d_4$ )  $\delta$  5.52 - 5.44 (m, 2H), 5.25 - 5.18 (m, 3H), 4.44 (dd,  $J=3.4, 12.0$  Hz, 1H), 4.27 (dd,  $J=7.2, 12.1$  Hz, 1H), 4.01 - 3.95 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 2.10 - 2.02 (m, 9H), 1.98 - 1.94 (m, 3H).

단계 14. 2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-디아세톡시에틸)-6-(포스포노옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트 트리에틸암모늄 염의 제조



$\text{MeOH}$  (5 mL) 중 상기 단계 13의 생성물 (300 mg, 1 eq) 및  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.2 mL, 2.40 eq.)의 생성물의 용액을  $25^\circ\text{C}$ 에서 1.5 시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하게 제거하여 목적인 생성물의 트리에틸암모늄 염을 백색 고체 (340 mg, 수율: 80.69%, 2  $\text{Et}_3\text{N}$ 를 지님)로서 수득하였다. 생성물은 다음 단계에 직접 사용하였다.

단계 15. (2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3S,4S,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3-플루오로-4-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조

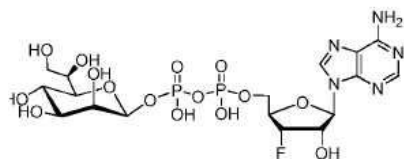


상기 단계 14의 생성물 (200 mg, 1 eq.) 및 상기 단계 9의 생성물의 화합물의 모르핀 DCC 염 (357.17 mg, 3 eq, DCC-모르폴린)의 혼합물을 무수 피리딘 (5 mL x 3)으로 건조시켰다. 이후에, 잔사를 피리딘 (3 mL) 속에 용해하고, 1H-테트라졸 (99.68 mg, 5 eq.)을 가하고  $25^\circ\text{C}$ 에서 32시간 동안 교반하였다. 반응물을 농축시켜 잔사를 수득하고 이를 실리카 겔 크로마토그래피 ( $\text{CHCl}_3$ :  $\text{MeOH}$ :  $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ :  $\text{H}_2\text{O}$  = 1:0:0:0 내지 50:50:1:1)로 정제하여 조 생성물 (300 mg)을 수득하고, 이를 제조-HPLC (컬럼: 물 Xbridge 150\*25  $5\mu$ , 조건: 물 (10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )-ACN, 3% 내지 33%)로 정제하여 거의 순수하지 않은 목적인 생성물의 부분 (15 mg, 수율: 3.9%, 61.6% 순도)를 백색 고체로서 및 순수한 목적 생성물 (18 mg, 수율: 7.16%, 94.1% 순도)를 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ ) $^+$ : 832.4.  $^1\text{H NMR}$  (400MHz, 메탄올- $d_4$ )  $\delta$  8.71 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 6.11 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 5.61 - 5.56 (br. s, 2H), 5.34 (br d,  $J=4.2$  Hz, 0.5H), 5.25 - 5.15 (m, 3.5H), 4.61 - 4.50 (m, 1H), 4.45 -

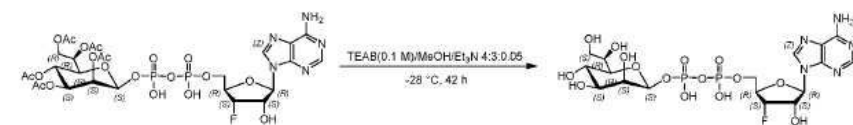
4.41 (m, 1H), 4.31 - 4.21 (m, 3H), 3.95 - 3.90 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.08 - 2.02 (m, 6H), 1.99 (s, 3H), 1.91 (s, 3H).

화합물 2

아데노신-3'-플루오로-5'-(D-글리세로-β-D-만노헵토피라노실)디포스페이트



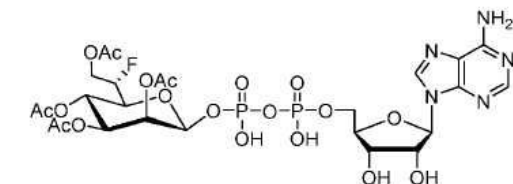
단계 1. 아데노신-3'-플루오로-5'-(D-글리세로-β-D-만노헵토피라노실)디포스페이트의 제조



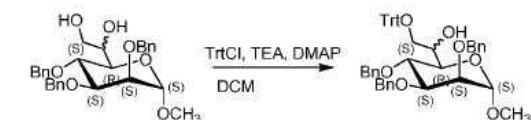
상기 화합물 1(15.0 mg, 1 eq)의 제조시 단계 15의 생성물의 화합물을 (TEAB (0.1 M):MeOH:Et3N = 4:3:0.05)로 이루어진 3 mL의 용매 속에 용해하고 -28℃에서 42 시간 동안 교반하였다. 이후에, 반응물을 동결 건조기로 동결건조시켜 백색 고체를 수득하였다. 수득되는 고체를 제조 HPLC(RP-C18, 트리에틸암모늄 아세테이트 완충제(pH 6.8)/2% 아세토니트릴과 등용매 용출) 및 증류된 H<sub>2</sub>O로 용출하는 G25 세파텍스 크로마토그래피에 의해 연속적으로 정제하여 목적한 화합물(6.1 mg, 수율: 54.4%)을 수득하였다. MS (ESI) m/z (M-H)<sup>-</sup>: 619.8.

화합물 3

(2S,3S,4S,5S,6S)-2-(((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)-6-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로피란-2-일)메톡시))(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조

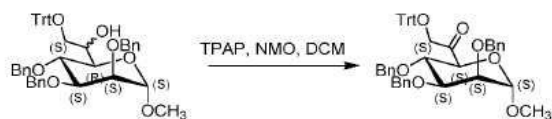


단계 1. 화합물 1-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-트리스(벤질옥시)-6-메톡시테트라하이드로-2H-피란-2-일)-2-(트리틸옥시)에탄-1-올의 제조



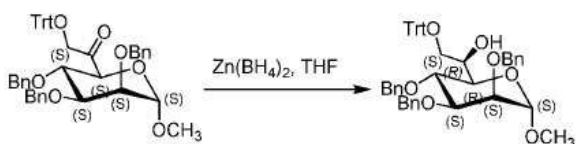
DCM(200 mL) 중 화합물 1-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-트리스(벤질옥시)-6-메톡시테트라하이드로-2H-피란-2-일)에탄-1,2-디올(17.4 g, 35.2 mmol; Tiehai Li et al., (2014) Bioorg. Med. Chem. 22: 1139-1147; Shinsuke Inuki et al., Org. Lett. (2017), 19: 3079-3082), TEA(7.1 g, 70.4 mmol, 9.8 mL) 및 DMAP(2.2 g, 17.6 mmol)의 용액에 TrtCl(19.6 g, 70.4 mmol)을 가하였다. 혼합물을 50℃에서 20시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 H<sub>2</sub>O(100 mL)로 퀀칭시킨 다음 분리하였다. 수성 층을 DCM(60 mL x 2)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수(150 mL)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고, 여과하고 농축시켜 잔사를 수득하였다. 잔사를 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(PE: EA=1:0 내지 1:1)로 정제하였다. 목적한 화합물(24.6 g, 수율: 95%, 93% 순도)은 담황색 오일로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 782.4.

단계 2. 화합물 1-((2S,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-트리스(벤질옥시)-6-메톡시테트라하이드로-2H-피란-2-일)-2-(트리틸옥시)에탄-1-올의 제조



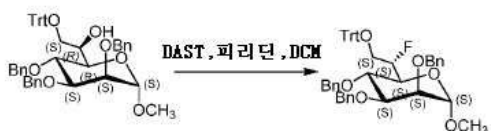
DCM(250 mL) 중 상기 단계 1로부터 수득된 생성물(24.6 g, 33.4 mmol), NMO(19.6 g, 166.9 mmol, 17.6 mL) 및 4A 분자 체(molecular sieve)(24 g, 33.4 mmol)의 혼합물을 25℃에서 0.5 시간 동안 교반하였다. 이후에, TPAP(1.17 g, 3.34 mmol)를 0℃에서 가하였다. 혼합물을 25℃에서 4시간 동안 교반하였다. 혼합물을 여과하고 DCM(50 mL x 3)으로 세척하였다. 여액을 진공하에 농축시켰다. 잔사를 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(PE: EA=1:0 내지 4:1)로 정제하였다. 목적한 생성물(21.7 g, 수율: 85.6%)은 담황색 오일로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 757.3. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.45-7.25 (m, 30H), 4.72-4.52 (m, 6H), 4.20-4.07 (m, 4H), 3.99 (s, 2H), 3.68-3.67 (m, 1H), 3.22 (s, 3H).

단계 3. (R)-1-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-트리스(벤질옥시)-6-메톡시테트라하이드로-2H-피란-2-일)-2-(트리틸옥시)에탄-1-올의 제조



THF(200 mL) 중 상기 단계 2로부터 수득된 생성물(21.7 g, 29.5 mmol)의 용액에 Zn(BH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(0.5 M, 66.7 mL)를 0℃에서 0.5 시간 동안 적가하였다. 반응물을 H<sub>2</sub>O(50 mL)로 주의깊게 퀀칭시켰다. 유기 상을 에틸 아세테이트(150 mL x 3)로 추출하였다. 유기 층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고 진공하에 농축시켰다. 잔사를 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(PE: EA=1:0 내지 7:1)로 정제하였다. 목적한 화합물(19.5 g, 수율: 88.27%, 98.5% 순도)은 무색 오일로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 759.3.

단계 4. 화합물 (2S,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-트리스(벤질옥시)-2-((S)-1-플루오로-2-(트리틸옥시)에틸)-6-메톡시테트라하이드로-2H-피란의 제조



DCM(100 mL) 중 상기 단계 3의 생성물의 화합물(9.5 g, 12.9 mmol)의 혼합물에 DAST(10.4 g, 64.5 mmol, 8.5 mL) 및 피리딘(10.2 g, 128.9 mmol, 10.4 mL)을 0℃에서 가하였다. 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응물을 포화된 NaHCO<sub>3</sub>(100 mL)로 조심스럽게 퀀칭시켰다. 혼합물을 DCM(100 mL x 3)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 2N HCl(150 mL)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고 진공하에 농축시켰다. 잔사를 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(PE: EA=1:0 내지 12:1)로 정제하였다. 목적한 화합물(4.2 g, 수율: 44.1%)은 담황색 오일로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.38-7.18 (m, 30H), 4.92-4.61 (m, 2H), 4.53-4.51 (m, 6H), 4.06-4.02 (m, 1H), 3.77-3.75 (m, 1H), 3.65-3.51 (m, 3H), 3.14-3.06 (m, 1H), 2.96 (s, 3H).

단계 5. 화합물 (S)-2-플루오로-2-((2S,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-트리스(벤질옥시)-6-메톡시테트라하이드로-2H-피란-2-일)에탄-1-올의 제조

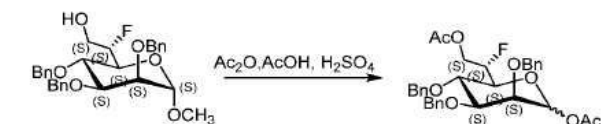




DCM(60 mL) 중 상기 단계 4의 생성물의 화합물(5.8 g, 7.9 mmol)의 용액에 TFA(13.9 g, 121.6 mmol, 9 mL)를 가하였다. 혼합물을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 혼합물에 포화된  $\text{NaHCO}_3$ (150 mL)를 가하였다. 혼합물을 DCM(100 mL x 3)으로 추출하였다. 합한 유기 층을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고 진공하에 농축시켰다. 잔사를 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(PE: EA=10:1 내지 1:1)로 정제하였다. 목적인 화합물(3.2 g, 수율: 79.7%, 96.2% 순도)은 무색 오일로서 수득하였다.

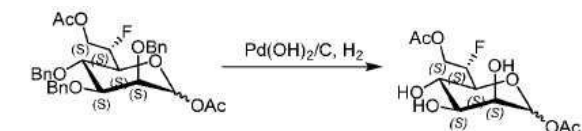
MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 519.1.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.35-7.28 (m, 15H), 4.99-4.96 (m, 2H), 4.73-4.65 (m, 4H), 4.60 (s, 2H), 4.14-4.10 (m, 3H), 3.77-3.76 (m, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.60-3.57 (m, 1H), 3.27 (s, 3H).  $^{19}\text{F}$  NMR  $\delta$  -207.84.

단계 6. 화합물 (3S,4S,5S,6S)-6-((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)-3,4,5-트리스(벤질옥시)테트라하이드로-2H-피란-2-일 아세테이트의 제조



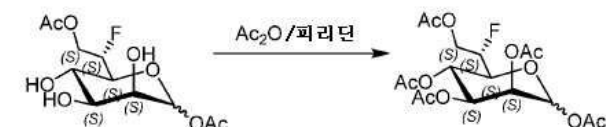
HOAc(15 mL) 및  $\text{Ac}_2\text{O}$ (15 mL) 중 상기 단계 5의 생성물의 화합물(3.2 g, 6.5 mmol)의 용액에  $\text{H}_2\text{SO}_4$ (2.8 g, 27.6 mmol, 1.5 mL, 98% 순도)를 가하였다. 혼합물을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응물을 메탄올(15 mL)로 0℃에서 쿼칭시켰다. 대부분의 용매를 진공하에 제거하였다. 30 mL의 포화된  $\text{NaHCO}_3$ 를 가하고 혼합물을 에틸 아세테이트(50 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수(50 mL)로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고 진공하에 농축시켰다. 목적인 화합물(3.9 g, 조 화합물)을 황색 오일로서 수득하고 이를 다음 단계에 직접 사용하였다.

단계 7. 화합물 (3S,4S,5S,6S)-6-((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)-3,4,5-트리하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-일 아세테이트의 제조



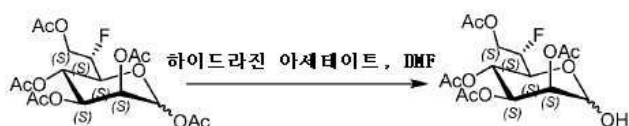
메탄올(20 mL), THF(10 mL),  $\text{H}_2\text{O}$ (2 mL) 및 HOAc(0.5 mL) 중 상기 단계 6의 생성물의 화합물(3.9 g, 6.9 mmol)의 혼합물에  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (0.6 g, 20% 순도)를 25℃에서 가하였다. 혼합물을 25℃에서 수소(50 psi) 하에 32시간 동안 교반하였다. 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고 메탄올(50 mL x 3)로 세척하였다. 여액을 수집하고 진공하에 농축시켰다. 목적인 화합물(2.5 g, 조 화합물)을 담황색 오일로서 수득하고 이를 다음 단계를 위해 직접 사용하였다.

단계 8. 화합물 (3S,4S,5S,6S)-6-((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)테트라하이드로-2H-피란-2,3,4,5-테트라일 테트라아세테이트의 제조



피리딘(20 mL) 중 상기 단계 7의 생성물의 화합물(2.5 g, 8.4 mmol)의 용액에  $\text{Ac}_2\text{O}$ (4.3 g, 42.2 mmol, 4.0 mL) 및 DMAP(515.5 mg, 4.2 mmol)를 가하였다. 혼합물을 25°C에서 0.5 시간 동안 교반하였다. 반응물을 메탄올(15 mL)로 퀀칭시켰다. 대부분의 피리딘을 진공하에 제거하였다. 1 N HCl(20 mL)을 잔사에 가하였다. 잔사를 에틸 아세테이트(30 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 2N HCl(30 mL)로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고 진공하에 농축시켰다. 잔사를 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(PE: EA=10: 1 내지 3:2)로 정제하였다. 목적한 화합물(1.6 g, 수율: 44.6%)을 무색 오일로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 445.0. <sup>1</sup>H NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.07 (s, 1H), 5.54-5.49 (m, 1H), 5.34-5.31 (m, 1H), 5.24-5.22 (m, 1H), 4.70-4.56 (m, 1H), 4.38-4.24 (m, 2H), 3.98-3.89 (m, 1H), 2.16 (d, J = 6.4Hz, 6H), 2.06 (d, J = 6.0Hz, 6H), 1.99 (s, 3H).

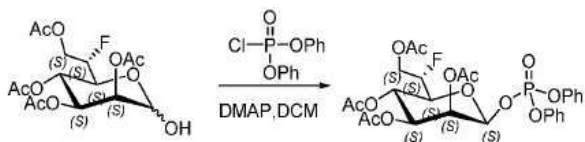
단계 9. 화합물 (2S,3S,4S,5S)-2-((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)-6-하이드록시테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



DMF(15 mL) 중 단계 8의 생성물의 화합물(1.6 g, 3.8 mmol)의 용액에 하이드라진 아세테이트(520.1 mg, 5.7 mmol)를 가하였다. 혼합물을 25°C에서 20분 동안 교반하였다. 반응물을  $\text{H}_2\text{O}$ (15 mL)로 퀀칭시켰다. 혼합물을 에틸 아세테이트(20 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 층을  $\text{H}_2\text{O}$ (20 mL x 3)로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고 진공하에 농축시켰다. 잔사를 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(PE: EA=10: 1 내지 1:1)로 정제하였다. 목적한 화합물(860 mg, 수율: 60.1%)을 무색 오일로서 수득하였다.

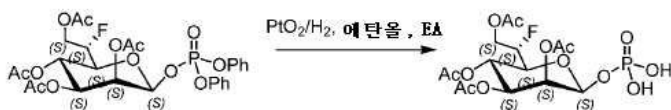
<sup>1</sup>H NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.52-5.47 (m, 1H), 5.42-5.39 (m, 1H), 5.26-5.25 (m, 2H), 4.75-4.60 (m, 1H), 4.39-4.31 (m, 2H), 4.14-4.05 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.99 (s, 3H).

단계 10. 화합물 (2S,3S,4S,5S,6S)-2-((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)-6-((디페녹시포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



DCM(50 mL) 중 [클로로(페녹시)포스포릴]옥시벤젠(2.1 g, 7.7 mmol, 1.6 mL)을 DCM(50 mL) 중 상기 단계 9의 생성물의 화합물(970 mg, 2.6 mmol) 및 DMAP(1.6 g, 12.8 mmol)의 용액에 25°C에서 3.5 시간 동안 적가하였다. 혼합물을 25°C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응물을 포화된  $\text{NaHCO}_3$ (50 mL)로 퀀칭시켰다. 혼합물을 DCM(80 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 층을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고 진공하에 농축시켰다. 잔사를 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(PE: EA=10:1 내지 3:2)로 정제하였다. 목적한 화합물(1.21 g, 수율: 77.5%, 100% 순도)을 무색 오일로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 658.1. <sup>1</sup>H NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.35-7.13 (m, 10H), 5.54 (d, J = 6.8Hz, 1H), 5.50-5.46 (m, 2H), 5.07-5.04 (m, 1H), 4.72-4.57 (m, 1H), 4.30-4.26 (m, 1H), 4.23-4.19 (m, 1H), 3.74-3.65 (m, 1H), 2.10(s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.98 (s, 3H). <sup>19</sup>F NMR  $\delta$ -205.5.

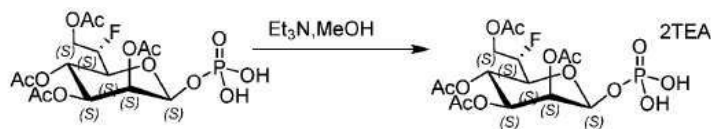
단계 11. 화합물 (2S,3S,4S,5S,6S)-2-((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)-6-(포스포노옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



에탄올(10 mL) 및 에틸 아세테이트(10 mL) 중 상기 단계 10의 생성물의 화합물(600 mg, 979.6  $\mu\text{mol}$ )의 혼합물

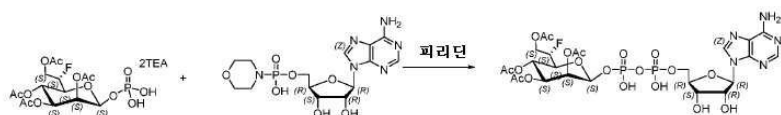
에  $\text{PtO}_2$ (150 mg)를 가하였다. 혼합물을  $25^\circ\text{C}$ 에서 수소(15 psi) 하에 20시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트(celite)를 통해 여과하고 메탄올(20 mL x 4)로 세척하였다. 여액을 수집하고 진공하에 농축시켰다. 목적한 화합물(450 mg, crude)을 백색 고체로서 수득하였다. 화합물은 다음 단계를 위해 직접 사용하였다.

단계 12. 화합물 (2S,3S,4S,5S,6S)-2-((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)-6-(포스포노옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트 트리에틸 아민 염의 제조



단계 11의 생성물의 화합물(980 mg, 2.1 mmol)을 메탄올(10 mL) 속에 용해시켰다. TEA(646.3 mg, 6.4 mmol, 889  $\mu\text{L}$ )를 혼합물에 가하고 혼합물을  $25^\circ\text{C}$ 에서 0.5 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 진공하에 농축시켰다. 목적한 염(950 mg, 수율: 96.9%)을 담황색 발포체로서 수득하였다. 화합물은 다음 단계를 위해 직접 사용하였다.

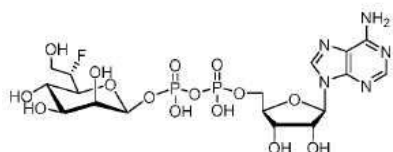
단계 13. 화합물 (2S,3S,4S,5S,6S)-2-((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)-6-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로퓨란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포틸)옥시)(하이드록시)포스포틸)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



상기 단계 12의 생성물의 화합물(300 mg, 651.8  $\mu\text{mol}$ , TEA 염) 및 화합물 AMP-모르폴리데이트(4'-모르폴린-N'-N'-디사이클로헥실카복사미디닐 염)(693.9 mg, 977.6  $\mu\text{mol}$ )를 피리딘(4 mL)으로 2회 탈수시켰다. 이후 1H-테트라졸(228.3 mg, 3.3 mmol, 289.0  $\mu\text{L}$ )을 가하고 잔사를 피리딘(5 mL) 속에 용해하였다. 혼합물을  $25^\circ\text{C}$ 에서 질소 하에 40시간 동안 교반하였다. 혼합물을 진공하에 농축시켰다. 잔사를 메탄올(30 mL) 속에 용해하였다. 혼합물을 여과하고 고체를 경사제거하였다. 여액을 진공하에 농축시켰다. 잔사를 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(DCM: 메탄올:  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  = 20:1:0.05 내지 1:1:0.05)로 정제하여 240 mg의 조 생성물을 무색 오일로서 수득하였다. 조 화합물을 제조-HPLC(중성 조건, 컬럼: 물s Xbridge 150\*25 5u; 이동상: [물(10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )-ACN]; B%: 0% 내지 30%, 10분)로 정제하였다. 목적한 화합물(75.1 mg, 수율: 14.5%, 99.2% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ : 790.1.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.60 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.08 (d, J = 6.8Hz, 1H), 5.57 - 5.55 (m, 2H), 5.36 - 5.21 (m, 2H), 4.74 - 4.72 (m, 1H), 4.64 - 4.37 (m, 4H), 4.23 - 4.22 (m, 3H), 3.86 - 3.78 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.91 (s, 3H).

#### 화합물 4

아데노신- 5'-(L-글리세로- $\beta$ -D-만노-6-플루오로-헵토피라노실)디포스페이트



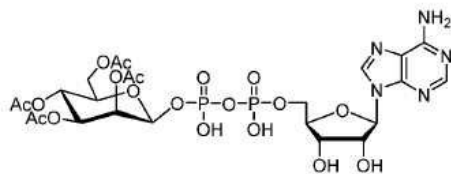
단계 1. 화합물 아데노신- 5'-(L-글리세로- $\beta$ -D-만노-6-플루오로-헵토피라노실)디포스페이트의 제조

상기 화합물 3의 제조시 단계 13의 생성물의 화합물(24 mg, 30.4  $\mu\text{mol}$ , 1 eq)을 TEAB/MeOH/TEA(0.3 mL, v/v/v=1/1/1) 속에 용해시켰다. 혼합물을  $-28^\circ\text{C}$ 에서 48시간 동안 교반하였다. 반응물을  $\text{CH}_3\text{CN}$ (2 mL)로 희석시키고 동결건조시켰다. 목적한 화합물(15.3 mg, 수율 61.1%, 2Et<sub>3</sub>N)을 백색 고체로서 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.34 (s, 1H), 8.08-8.07 (m, 1H), 5.97-5.96 (m, 1H), 5.05 (d, J = 9.6Hz, 1H), 4.61-4.58 (m, 2H), 4.37-4.35 (m, 1H), 4.23-4.22 (m, 1H), 4.07-4.04 (m, 2H), 3.92-3.91(m, 1H), 3.83-3.60 (m, 3H),

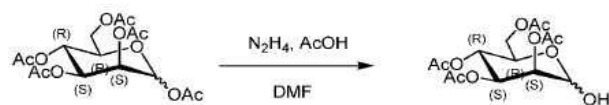
3.53-3.50 (m, 1H), 3.25 (dd, J = 10.4Hz, 26.8Hz, 1H), 3.05-3.00 (m, 12H), 1.09 (t, J = 7.6Hz, 18H).

#### 화합물 5

(2R,3R,4S,5S,6S)-2-(아세톡시메틸)-6-((((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-다하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트

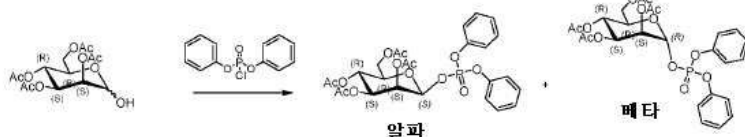


#### 단계 1. (2R,3R,4S,5S)-2-(아세톡시메틸)-6-하이드록시테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



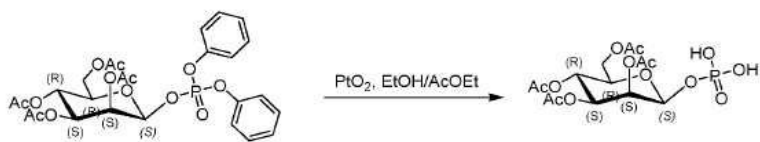
AcOH(6.92 g, 115.28 mmol, 6.59 mL, 1.5 eq)를 DMF(60 mL) 중  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (5.60 mL, 115.28 mmol)의 용액에 0 °C에서 가하고 0.5 시간 동안 교반하였다. (3S,4S,5R,6R)-6-(아세톡시메틸)테트라하이드로-2H-피란-2,3,4,5-테트라일 테트라아세테이트(30 g, 76.86 mmol)를 시스템에 가하고 25 °C에서 1.5 시간 동안 교반하였다. 반응물을  $\text{H}_2\text{O}$ (200 mL)로 희석시키고 EtOAc(150 mL x 3)로 추출하였다. 유기 상을 합하고 염수(150 mL x 3)로 세척하고, 농축시켜 잔사를 수득하였다. 잔사를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(PE:EA= 1:0 내지 1:1)로 정제하여 목적한 화합물(26 g, 수율: 97.1%)을 무색 오일로서 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.45 - 5.20 (m, 3H), 4.30 - 4.10 (m, 4H), 2.20 - 2.00 (m, 12H).

#### 단계 2. (2R,3R,4S,5S,6S)-2-(아세톡시메틸)-6-((디페녹시포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



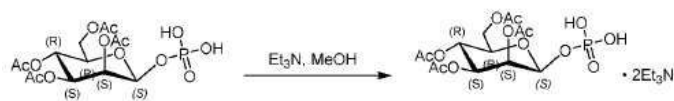
DCM(10 mL) 중 상기 단계 1의 생성물(864.4 mg, 2.48 mmol) 및 DMAP(3.03 g, 24.82 mmol)의 혼합물에, DCM(40 mL) 중 디페닐 포스포클로리데이트(5 g, 18.61 mmol)의 용액을 적가하고 25 °C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응물을 DCM(50 mL)으로 희석시키고, 포화된  $\text{NaHCO}_3$ (50 mL) 및 염수(50 mL)로 세척하고, 농축시켜 잔사를 수득하였다. 잔사를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(PE:EA=1:0 내지 1:1)로 정제하여 알파 구조 화합물(750 mg, 수율: 52.1%) 및 목적한 베타 구조 화합물(380 mg, 수율: 26.4%)을 수득하였으며 이들 둘 다는 황색 오일로서 수득하였다. 알파 구조 화합물:  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.42 - 7.11 (m, 10H), 5.59 (dd, J = 1.1, 7.2 Hz, 1H), 5.48 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 5.25 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 5.07 (dd, J = 3.4, 9.8 Hz, 1H), 4.27 (dd, J = 5.6, 12.2 Hz, 1H), 4.17 - 4.08 (m, 1H), 3.84 - 3.74 (m, 1H), 2.16 - 1.95 (m, 12H). 베타 구조 화합물:  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.43 - 7.14 (m, 11H), 5.87 (dd, J = 1.6, 6.7 Hz, 1H), 5.42 - 5.26 (m, 3H), 4.25 - 4.02 (m, 3H), 3.92 (dd, J = 2.1, 12.3 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.08 - 1.94 (m, 9H).

#### 단계 3. 화합물 (2R,3R,4S,5S,6S)-2-(아세톡시메틸)-6-(포스포노옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



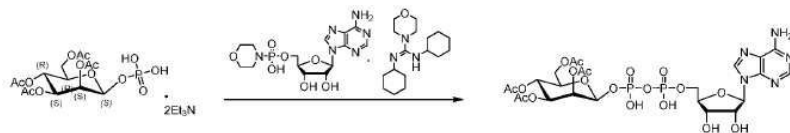
EtOAc(4 mL) 및 EtOH(4 mL) 중 상기 단계 2의 생성물의 화합물(400 mg, 689.09  $\mu$ mol) 및  $\text{PtO}_2$ (15.65 mg, 68.91  $\mu$ mol)의 혼합물을 25℃에서 16시간 동안  $\text{H}_2$  대기(1 atm) 하에 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고 여과기 케이크(filter cake)를 EtOAc/EtOH(5 mL/5 mL)로 세척하였다. 여액을 농축시켜 표적 화합물(300 mg, 조 화합물)을 무색 오일로서 수득하였다. 조 생성물을 다음 단계에서 직접 사용하였다.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 메탄올- $\text{d}_4$ )  $\delta$  5.54 - 5.48 (m, 2H), 5.27 - 5.22 (m, 2H), 4.38 - 4.31 (m, 1H), 4.17 (dd, J = 2.5, 12.5 Hz, 1H), 3.97 - 3.90 (m, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.07 - 2.05 (m, 3H), 1.98 (s, 3H).

단계 4. (2R,3R,4S,5S,6S)-2-(세톡시메틸)-6-(포스포노옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트 디트리에틸암모늄 염의 제조



MeOH(10 mL) 중 상기 생성물 3의 화합물(300 mg, 700.47  $\mu$ mol) 및  $\text{Et}_3\text{N}$ (0.2 mL, 1.40 mmol)의 혼합물을 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 용매를 제거하여 트리에틸 암모늄 염(450 mg, 조 화합물, 2  $\text{Et}_3\text{N}$ 을 지님)을 무색 오일로서 수득하였다. 조 생성물을 다음 단계에서 직접 사용하였다.

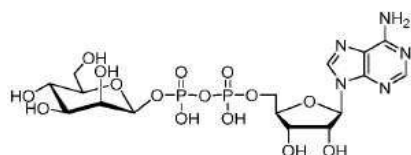
단계 5. (2R,3R,4S,5S,6S)-2-(아세톡시메틸)-6-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



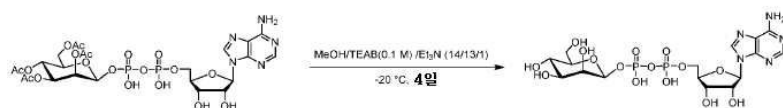
상기 단계 4의 생성물(56.44 mg, 135.57  $\mu$ mol) 및 화합물 AMP-모르폴리데이트(4'-모르폴린-N'-N'-디사이클로헥실카복사아미디늄 염)(50 mg, 70.4  $\mu$ mol)의 혼합물을 무수 피리딘(5 mL x 3)으로 건조시켰다. 이후에, 혼합물을 피리딘(1 mL)으로 용해시키고, 1H-테트라졸(16.66 mg, 237.84  $\mu$ mol)을 가하고 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 용매를 제거하여 잔사를 수득하고, 이를 제조-HPLC(컬럼: 물s Xbridge 150\*25 5u, 이동 상: 물(10mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )-CAN, B%: 5% 내지 25%. 구배 시간(분): 7, 100% B 체류 시간(분): 0.5. 유동 속도(mL/min): 25)으로 정제하여 목적한 화합물(5.5 mg, 수율: 2.7 %)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H) $^+$ : 758.2.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, D2O)  $\delta$  8.43 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 6.05 (d, J=5.8 Hz, 1H), 5.43 (d, J=2.5 Hz, 1H), 5.37 (d, J=9.5 Hz, 1H), 5.06 - 4.96 (m, 2H), 4.64 - 4.58 (m, 2H), 4.42 - 4.37 (m, 1H), 4.31 - 4.25 (m, 1H), 4.19 (dd, J=3.1, 12.7 Hz, 1H), 4.14 - 4.07 (m, 2H), 3.94 (dd, J=2.0, 12.5 Hz, 1H), 3.58 (br d, J=9.0 Hz, 1H), 2.10 (s, 3H), 1.96 (d, J=10.3 Hz, 6H), 1.88 (s, 3H).

화합물 6

아데노신 5'-( $\beta$ -D-만노-헵토피라노실)디포스페이트



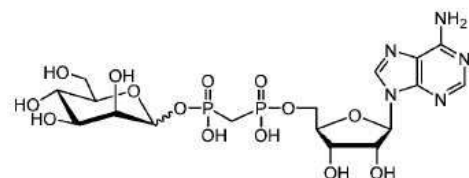
단계 1. 아데노신 5'-(β-D-만노-헵토피라노실)디포스페이트의 제조



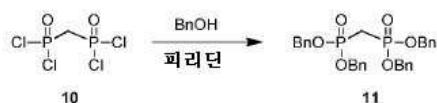
상기 화합물 5의 제조시 단계 5의 생성물의 화합물(2.5 mg, 3.30 μmol)을 0.3 mL의 용액(이는 TEAB (0.1 M)/MeOH/TEA (13/14/1)로 이루어졌다)에 용해하고 -20℃에서 4일 동안 교반하였다. 반응물을 동결건조시켜 목적한 화합물(0.9 mg, 수율: 17.5%, Et<sub>3</sub>N 염으로서)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M-H)<sup>-</sup>: 587.8.

화합물 7

(3S,4S,5S,6R)-3,4,5-트리하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-2-일 하이드로젠  
(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)  
포스포릴)메틸)포스포네이트

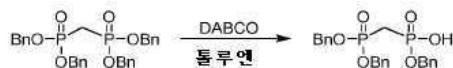


단계 1. 테트라벤질 메틸렌비스(포스포네이트)의 제조



무수 페닐메탄올(6.2 g, 57.3 mmol, 6.0 mL) 및 무수 피리딘(4.2 g, 52.5 mmol, 4.2 mL)의 혼합물을 30분에 걸쳐 주사기 펌프로 무수 톨루엔(10 mL) 중 메틸렌비스(포스포닉 디클로라이드)(3.45 g, 13.8 mmol)의 현탁액에 0℃에서 가하였다. 첨가가 완료된 후, 반응물이 20℃에 도달하도록 하고 추가로 3시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 고체를 여과에 의해 제거하고 톨루엔(2 x 20 mL)으로 2회 세척하였다. 여액을 2 M NaOH(2 x 15 mL) 및 물(15 mL)로 2회 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고, 여과하고 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 컬럼(PE: EA = 1:0 내지 1:1)으로 정제하여 목적한 화합물(3 g, 수율: 40.5%, 99.9% 순도)을 무색 오일로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.31 (s, 20H), 4.96 - 5.09 (m, 8H), 2.44 - 2.59 (m, 2H).

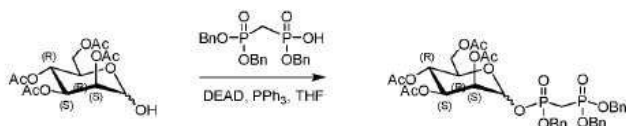
단계 2. 벤질 하이드로젠((비스(벤질옥시)포스포릴)메틸)포스포네이트의 제조



DABCO(627 mg, 5.59 mmol, 615 μL)를 톨루엔(50 mL) 중 테트라벤질 메틸렌비스(포스포네이트)(상기 단계 1의 생성물)(3 g, 5.59 mmol)의 용액에 가하였다. 수득되는 혼합물을 110℃에서 3시간 동안 교반하였다. 휘발물을 진공하에 제거하고 잔사를 수성 HCl(37%, 1.2 mL)로 적가 처리하였다. 혼합물을 EtOAc(20 mL)로 추출하고 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고 감압하에 증발시켜 목적한 화합물(2.2 g, 조 화합물)을 황색 오일로서 수득하였다. 생성물을 다음 단계에서 직접 사용하였다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.27 - 7.36 (m, 15H), 4.99 - 5.10 (m, 6H), 2.51 - 2.64 (m, 2H)

단계 3. (2R,3R,4S,5S)-2-(아세톡시메틸)-6-(((벤질옥시)((비스(벤질옥시)포스포릴)메틸)포스포릴)옥시)테트라

# 하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



PPh<sub>3</sub>(360.0 mg, 1.4 mmol) 및 DEAD(239.5 mg, 1.4 mmol, 250  $\mu$ L)를 THF(5 mL) 중 상기 단계 2의 생성물(200 mg, 448.1  $\mu$ mol) 및 (2R,3R,4S,5S)-2-(아세톡시메틸)-6-하이드록시테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트(225 mg, 574.9  $\mu$ mol)의 용액에 순차적으로 가하였다. 수득되는 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 제조-HPLC(컬럼: Boston Green ODS 150\*30 5 $\mu$ ; 이동 상: [물(0.075%TFA)-ACN]; B%: 55%-75%, 9분)로 정제하여 목적한 화합물(130 mg, 수율: 36.6%, 98.0% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+Na)<sup>+</sup>: 799.1. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.20 - 7.33 (m, 15H), 4.86 - 5.76 (m, 10H), 3.50 - 4.29 (m, 3H), 2.40 - 2.62 (m, 2H), 1.88 - 2.09 (m, 12H)

단계

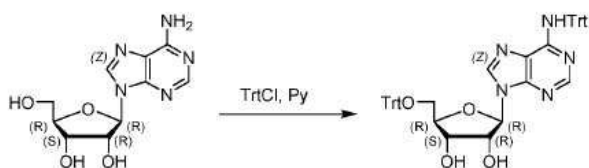
4.

## (2R,3R,4S,5S)-2-(아세톡시메틸)-6-(((벤질옥시) (((벤질옥시) (하이드록시) 포스포릴) 메틸) 포스포릴) 옥시) 테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



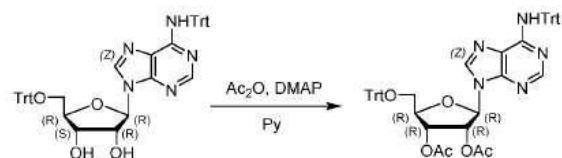
DABCO(40.0 mg, 356.6  $\mu$ mol, 39.2  $\mu$ L)를 톨루엔(6 mL) 중 상기 단계 3의 생성물(250 mg, 321.9  $\mu$ mol)의 용액에 가하였다. 수득되는 혼합물을 120℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 용매를 감압하에 제거하고 잔사를 EtOAc(20 mL) 속에 용해하고 1N 수성 HCl(10 mL)로 추출하였다. 수성 상을 EtOAc(20 mL)로 추출하고 합한 유기 층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고, 여과하며, 감압하에 증발시켜 목적한 화합물(220 mg, 조 화합물)을 황색 시럽으로서 수득하였다. 생성물을 다음 단계에서 직접 사용하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 686.9

## 단계 5. (2R,3R,4S,5R)-2-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)-5-((트리틸옥시)메틸)테트라하이드로푸란-3,4-디올의 제조



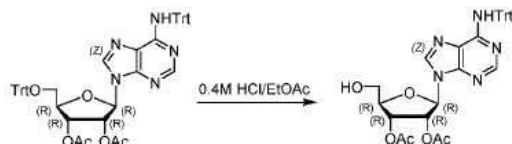
피리딘(100 mL) 중 아데닌의 용액에 TrtCl(38.5 g, 138.0 mmol) 및 DMAP(5.9 g, 48.6 mmol)를 가하였다. 혼합물을 80℃에서 20시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시켜 잔사를 수득하였다. 잔사를 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(PE:EA = 1:0 내지 0:1, EA: MeOH = 1:0 내지 20:1)로 정제하여 목적한 화합물(25.9 g, 수율: 53.5%)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 752.3. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.08 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.44 - 7.03 (m, 30H), 6.67 (br s, 1H), 5.89 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 4.78 (br t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.44 (br s, 1H), 4.30 (br d, J = 4.4 Hz, 1H), 3.49 (dd, J = 3.4, 10.5 Hz, 1H), 3.18 (dd, J = 2.9, 10.8 Hz, 1H).

## 단계 6. (2R,3R,4R,5R)-2-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)-5-((트리틸옥시)메틸)테트라하이드로푸란-3,4-디일 디아세테이트의 제조



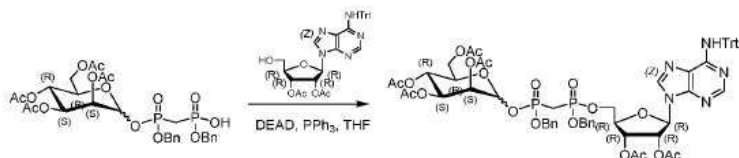
Ac<sub>2</sub>O(545.0 mg, 5.34 mmol, 500  $\mu$ L) 및 DMAP(52 mg, 425.6  $\mu$ mol)를 피리딘(5 mL) 중 상기 단계 5의 생성물(1.6 g, 2.13 mmol)의 용액에 가하였다. 수득되는 혼합물을 15 내지 20℃에서 24시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응물을 MeOH(2 mL)를 가하여 킨칭시키고; 혼합물을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 에틸 아세테이트(30 mL) 속에 용해시키고 수성 1N HCl(20 mL)로 추출하였다. 유기 상을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고, 여과하며, 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 컬럼(PE: EA = 1:0 내지 1:1)으로 정제하여 목적한 화합물(1.43 g, 수율: 77.0% 수율, 95.8% 순도)을 백색 발포체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 836.4. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8.39 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.21 - 7.35 (m, 30H), 6.22 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 6.12 - 6.17 (m, 1H), 5.68 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.26 (q, J = 4.4 Hz, 1H), 3.28 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 2.06 (s, 3H), 2.03 (s, 3H).

단계 7. (2R,3R,4R,5R)-2-(하이드록시메틸)-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-3,4-디일 디아세테이트의 제조



EtOAc(76.5 mL) 중 상기 단계 6의 생성물(1.9 g, 2.3 mmol)의 용액에 HCl/EtOAc(4 M, 8.50 mL)를 가하고 반응 혼합물을 15℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응을 완료한 후, pH를 Et<sub>3</sub>N를 사용하여 7로 조절하고 반응 혼합물을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(10 mL) 속에 용해하고 포화된 NaHCO<sub>3</sub>(5 mL) 및 염수(5 mL)로 세척하였다. 유기 층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고, 여과하고, 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 크로마토그래피(PE : EA = 1:0 내지 1:1)로 정제하여 목적한 화합물(735 mg, 수율: 49.6%, 91% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 594.1. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8.50 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.39 - 7.16 (m, 9H), 6.21 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 6.02 - 5.88 (m, 1H), 5.65 - 5.34 (m, 2H), 4.26 - 4.12 (m, 1H), 3.76 - 3.50 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.99 (s, 3H).

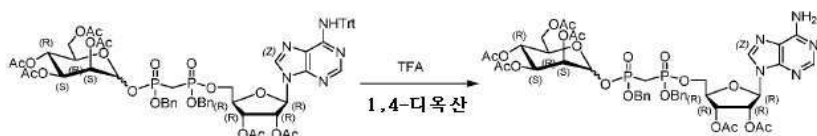
단계 8. 2R,3R,4S,5S)-2-(아세톡시메틸)-6-(((벤질옥시)(((벤질옥시)(((2R,3R,4R,5R)-3,4-디아세톡시-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)포스포릴)메틸)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



PPh<sub>3</sub>(221.7 mg, 845.1  $\mu$ mol) 및 DEAD(145.6 mg, 836.1  $\mu$ mol, 152.0  $\mu$ L)를 THF(3 mL) 중 상기 단계 4의 생성물(190 mg, 276.7  $\mu$ mol) 및 상기 단계 7의 생성물(171.0 mg, 288.1  $\mu$ mol)의 용액에 순차적으로 가하였다. 수득되는 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 제조-HPLC(컬럼: Boston Green ODS 150 30 5 $\mu$ ; 이동 상: [물(0.075%TFA)-ACN]; B%: 70%-80%, 9분)로 정제하여 목적한 화합물(120 mg, 수율: 28.2% 수율, 82.0% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 1262.3.

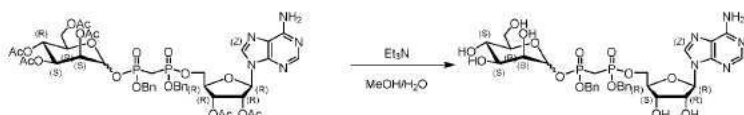


단계 9. (2R,3R,4S,5S)-2-(아세톡시메틸)-6-(((벤질옥시) (((2R,3R,4R,5R)-3,4-디아세톡시-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일) 테트라하이드로푸란-2-일) 메톡시) 포스포릴) 메틸) 포스포릴) 옥시) 테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



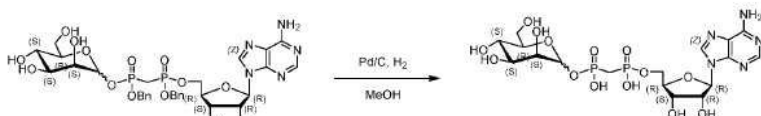
TFA(616.0 mg, 5.4 mmol, 400.0  $\mu$ L)를 1,4-디옥산(1.6 mL) 중 상기 단계 8의 생성물(120 mg, 95.1  $\mu$ mol)의 용액에 가하였다. 혼합물을 25 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 EA(30 mL)로 희석시키고 포화된  $\text{NaHCO}_3$ (20 mL x 2)로 세척하고, 유기 상을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고, 여과하며, 감압하에 농축시켜 목적한 화합물(110 mg, 조 화합물)을 황색 시럽으로서 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다. MS (ESI)  $m/z$  (M+H) $^{+}$ : 1020.5

단계 10. 벤질 (((3S,4S,5S,6R)-3,4,5-트리하이드록시-6-(하이드록시메틸) 테트라하이드로-2H-피란-2-일) (((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시 테트라하이드로푸란-2-일) 메톡시) (벤질옥시) 포스포릴) 메틸) 포스포네이트의 제조



MeOH(1.4 mL),  $\text{Et}_3\text{N}$ (0.6 mL) 및  $\text{H}_2\text{O}$ (0.2 mL) 중 상기 단계 9의 생성물(30 mg, 29.4  $\mu$ mol)의 용액을 25 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 제조-HPLC(컬럼: Boston Green ODS 150 30 5u; 이동 상: [물(0.075%TFA)-ACN]; B%: 24%-44%, 9분)로 정제하여 목적한 화합물(8 mg, 수율: 35.4% 수율, 99.9% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  (M-H) $^{-}$ : 517.1/604.2.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 메탄올- $d_4$ )  $\delta$  8.71 (br s, 1H), 8.24 (br s, 1H), 7.27 - 7.32 (m, 10H), 6.04 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 5.26 - 5.31 (m, 1H), 4.99 - 5.16 (m, 6H), 4.91 - 4.92 (m, 1H), 4.49 - 4.64 (m, 1H), 4.37 - 4.44 (m, 1H), 4.26 - 4.36 (m, 1H), 4.16 - 4.26 (m, 2H), 3.60 - 3.94 (m, 3H), 2.56 - 2.76 (m, 2H).

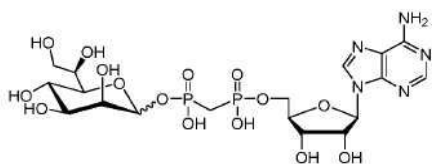
단계 11. (3S,4S,5S,6R)-3,4,5-트리하이드록시-6-(하이드록시메틸) 테트라하이드로-2H-피란-2-일 하이드로겐 (((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시 테트라하이드로푸란-2-일) 메톡시) (하이드록시) 포스포릴) 메틸) 포스포네이트의 제조



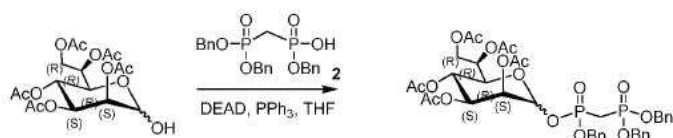
MeOH(2 mL) 중 상기 단계 10의 벤질 생성물(6 mg, 7.8  $\mu$ mol)의 용액에 무수 Pd/C(10 mg, 10% 순도)를  $\text{N}_2$  하에 가하였다. 현탁액을 진공 하에 탈기시키고  $\text{H}_2$ 로 수회 퍼징(purging)시켰다. 혼합물을  $\text{H}_2$ (15 psi) 하에 25 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 여과하고, 여액을 감압하에 농축시켜 목적한 화합물(4 mg)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  (M-H) $^{-}$ : 337.0120/424.0460; MS (ESI)  $m/z$  (M+H) $^{+}$ : 426.0591.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.38 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 5.97 (d, J = 5.87 Hz, 1H), 5.14 (d, J = 1.00 Hz, 1H), 4.79 - 4.91 (m, 1H), 4.38 - 4.44 (m, 1H), 4.17 - 4.28 (m, 2H), 3.97 - 4.05 (m, 2H), 3.60 - 3.74 (m, 5H), 1.99 - 2.04 (m, 2H).

화합물 8

(3S,4S,5S,6R)-6-((R)-1,2-디하이드록시에틸)-3,4,5-트리하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-일 하이드로겐 (((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)메틸)포스포네이트



단계 1. (3S,4S,5R,6R)-2-(((벤질옥시)((비스(벤질옥시)포스포릴)메틸)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



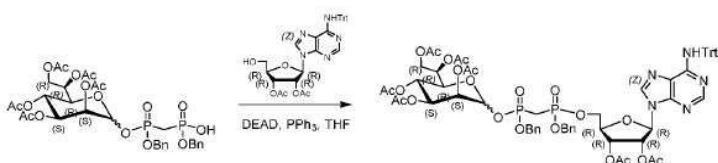
PPh<sub>3</sub>(540.0 mg, 2.1 mmol) 및 DEAD(367.9 mg, 2.1 mmol, 384.0  $\mu$ L)를 THF(10 mL) 중 상기 화합물 7(300 mg, 672.1  $\mu$ mol)의 제조시 단계 2의 생성물 및 (2R,3R,4S,5S)-2-((R)-1,2-디아세톡시에틸)-6-하이드록시테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트(300.0 mg, 713.7  $\mu$ mol)의 생성물의 용액에 순차적으로 가하였다. 수득되는 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 제조-HPLC(컬럼: Boston Green ODS 150 30 5u; 이동 상: [물 (0.075%TFA)-ACN]; B%: 58%-74%, 8분)로 정제하여 목적한 화합물(188 mg, 수율: 28.6% 수율, 87.0% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+Na)<sup>+</sup>: 871.5

단계 2. (3S,4S,5R,6R)-2-(((벤질옥시)((벤질옥시)(하이드록시)포스포릴)메틸)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



DABCO(36.4 mg, 324.0  $\mu$ mol)를 톨루엔(6 mL) 중 상기 단계 1의 생성물(250 mg, 294.6  $\mu$ mol)의 용액에 가하였다. 수득되는 혼합물을 120°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 용매를 진공하에 제거하고 잔사를 EtOAc(20 mL) 속에 용해하고 1N 수성 HCl(10 mL)로 세척하였다. 수성 상을 EtOAc(20 mL)로 추출하고 합한 유기 층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고, 여과하며, 감압하에 증발시켜 목적한 화합물(220 mg, 조 화합물)을 황색 시럽으로서 수득하였다. 조 생성물을 다음 단계에서 직접 사용하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 759.5

단계 3. 3S,4S,5R,6R)-2-(((벤질옥시)((벤질옥시)((2R,3R,4R,5R)-3,4-디아세톡시-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)포스포릴)메틸)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



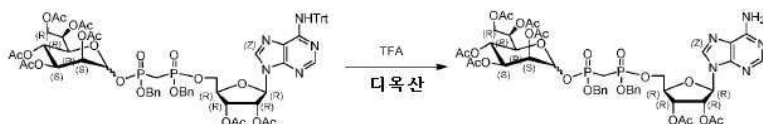
PPh<sub>3</sub>(210.0 mg, 800.6  $\mu$ mol) 및 DEAD(143.7 mg, 825.1  $\mu$ mol, 150.0  $\mu$ L)를 THF(5 mL) 중 상기 화합물 7의 제

조 시 단계 7의 생성물(172.2 mg, 290.0  $\mu$ mol) 및 상기 단계 2의 생성물(200 mg, 263.6  $\mu$ mol)의 용액에 순차적으로 가하였다. 수득되는 혼합물을 40℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 예비-HPLC(컬럼: Boston Green ODS 150\*30 5u; 이동 상: [물 (0.075%TFA)-ACN]; B%: 71%-85%, 9분)로 정제하여 목적한 화합물(117 mg, 수율: 29.9%, 90.0% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 1334.3

단계

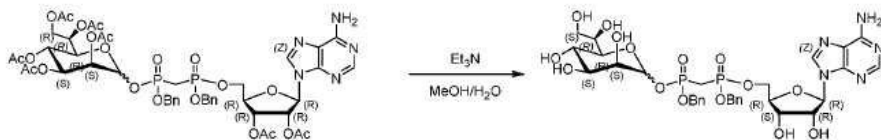
4.

(3S,4S,5R,6R)-2-(((벤질옥시) (((벤질옥시) (((2R,3R,4R,5R)-3,4-디아세톡시-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일) 테트라하이드로푸란-2-일) 메톡시) 포스포릴) 메틸) 포스포릴) 옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸) 테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



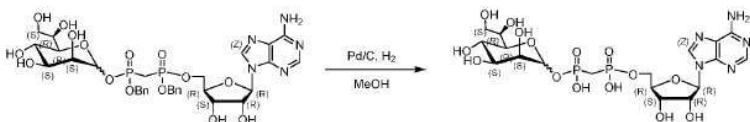
TFA(1.23 g, 10.8 mmol, 800  $\mu$ L)를 디옥산(1.2 mL) 중 상기 단계 3의 생성물(113 mg, 84.7  $\mu$ mol)의 용액에 가하였다. 혼합물을 40℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 EA(30 mL)로 희석시키고, 포화된 NaHCO<sub>3</sub>(20 mL x 2)로 세척하고, 유기 상을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고, 여과하며 감압하에 농축시켜 목적한 화합물(110 mg, 조 화합물)을 백색 고체로서 수득하였다. 조 생성물을 다음 단계에서 직접 사용하였다. MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 1092.2

단계 5. 벤질 ((3S,4S,5S,6R)-6-((R)-1,2-디하이드록시에틸)-3,4,5-트리하이드록시 테트라하이드로-2H-피란-2-일) (((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시 테트라하이드로푸란-2-일) 메톡시) (벤질옥시) 포스포릴) 메틸) 포스포네이트의 제조



MeOH(3.5 mL) 중 상기 단계 4의 생성물(105 mg, 96.2  $\mu$ mol), Et<sub>3</sub>N(0.5 mL) 및 H<sub>2</sub>O(0.5 mL)의 용액을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 제조-HPLC(컬럼: Boston Green ODS 150\*30 5u; 이동 상: [물 (0.075%TFA)-ACN]; B%: 30% 내지 50%, 7.5분)로 정제하여 목적한 화합물(16 mg, 20.0  $\mu$ mol, 수율: 20.7%, 99.4% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup>: 547.1/604.1

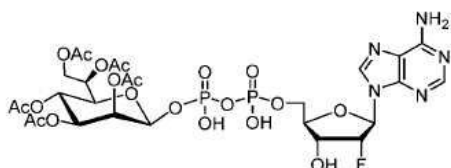
단계 6. (3S,4S,5S,6R)-6-((R)-1,2-디하이드록시에틸)-3,4,5-트리하이드록시 테트라하이드로-2H-피란-2-일 하이드로젠 (((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시 테트라하이드로푸란-2-일) 메톡시) (하이드록시) 포스포릴) 메틸) 포스포네이트의 제조



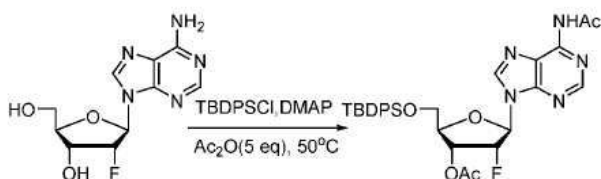
MeOH(2.5 mL) 중 상기 단계 5의 생성물(14 mg, 17.6  $\mu$ mol)의 용액에 무수 Pd/C(20 mg, 10% 순도)를 N<sub>2</sub> 하에 가하였다. 현탁액을 진공하에 탈기시키고 H<sub>2</sub>로 수회 퍼징시켰다. 혼합물을 H<sub>2</sub>(15 psi) 하에 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 여과하고, 여액을 감압하에 농축시켜 목적한 화합물(10 mg, 16.2  $\mu$ mol)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup>: 366.4/423.8

화합물 9

2-(((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-3-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트

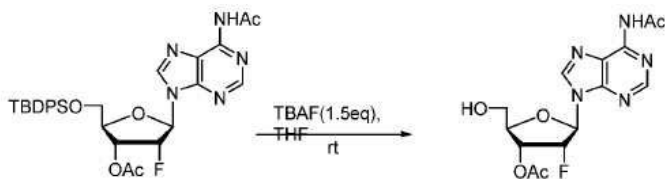


단계 1. (2R,3R,4R,5R)-5-(6-아세트아미도-9H-푸린-9-일)-2-(((3급-부틸디페닐실릴)옥시)메틸)-4-플루오로테트라하이드로푸란-3-일 아세테이트의 제조



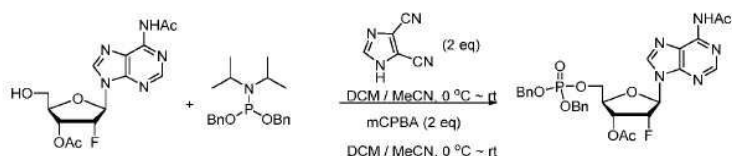
피리딘 (3 mL) 중 (2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-2-(하이드록시메틸)테트라하이드로푸란-3-올-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-2-(하이드록시메틸)테트라하이드로푸란-3-올 (389 mg, 1.44 mmol)의 교반 용액에 DMAP (18 mg, 0.14 mmol)를 실온에서 가하였다. 용액을 50°C로 가열하였다. 이러한 온도에서 TBDPSCI (594 mg, 2.16 mmol)를 가하고 반응물을 당해 온도에서 밤새 교반하였다. LC-MS는 SM이 남아있지 않음을 나타내었다. 용액을 Ac<sub>2</sub>O (642 L, 6.85 mmol)에 적가하였다. 당해 온도에서 5시간 동안 교반한 후, LC-MS는 목적한 화합물이 형성되었음을 나타내었다. 반응물을 DCM과 물 사이에 분배하였다. 합한 추출물을 H<sub>2</sub>O 및 염수로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시켰다. 여액을 감압하에 농축시켜 목적한 화합물을 백색 발포체 (531 mg, 0.90 mmol)로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 592.

단계 2. (2R,3S,4S,5R)-5-(6-아세트아미도-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-2-(하이드록시메틸)테트라하이드로푸란-3-일 아세테이트의 제조



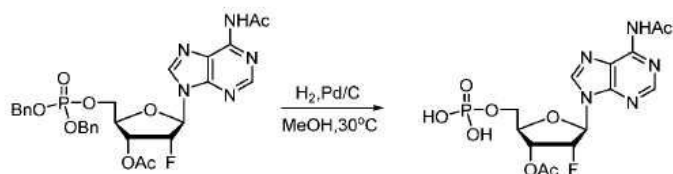
THF (4 mL) 중 상기 단계 1의 생성물의 화합물 (531 mg, 0.90 mmol)의 교반 용액에 TBAF (THF 중 1 M, 1.4 mL, 1.35 mmol)를 실온에서 가하였다. 밤새 교반한 후, 반응물을 포화된 NH<sub>4</sub>Cl로 퀀칭시켰다. 반응물을 DCM과 물 사이에 분배하였다. 합한 추출물을 염수로 세척하고 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시켰다. 여액을 감압하에 농축시켜 오일성 잔사를 수득하고, 이를 실리카겔 상에서 DCM/MeOH (20:1)로 용출시키는 섬광 크로마토그래피로 정제하여 목적한 화합물을 백색 발포체 (96 mg, 0.27 mmol)로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 354.

단계 3. (2R,3R,4R,5R)-5-(6-아세트아미도-9H-푸린-9-일)-2-(((비스(벤질옥시)포스포릴)옥시)메틸)-4-플루오로테트라하이드로푸란-3-일 아세테이트의 제조



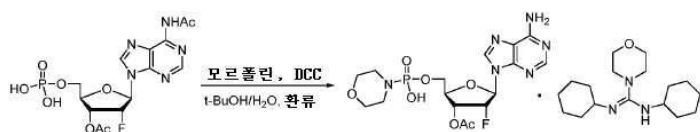
25mL 들이의 환저 플라스크에 상기 단계 2로부터의 생성물의 화합물(96 mg, 0.27 mmol) 및 1H-이미다졸-4,5-디카보니트릴(64 mg, 0.54 mmol)을 질소 대기하에 충전시켰다. 무수 DCM 및 MeCN을 가하였다(DCM:MeCN = 5:1, v/v). 수득되는 용액을 빙-수 욕(ice-water bath) 속에서 냉각시키고 디벤질 디이소프로필포스포르아미디트(188 mg, 0.54 mmol)를 가하였다. 반응물이 실온으로 가온된 후, 이를 다른 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 빙-수 욕 속에서 다시 냉각시키고 mCPBA(110 mg, 0.54 mmol)를 직접 가하였다. 이것이 실온으로 가온된 후, LC-MS는 주요 생성물로서 목적인 화합물의 형성을 나타내었다. 포화된  $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ 를 가하여 반응물을 퀀칭시키고 유기 상을 분리하였다. 수상을 DCM으로 2회 추출하였다. 합한 추출물을  $\text{H}_2\text{O}$  및 염수로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시켰다. 여액을 감압하에 농축시켜 오일을 수득하고, 이를 실리카 겔 섬광 크로마토그래피 상에서 정제하여 목적인 화합물(126 mg, 0.21 mmol)을 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>: 612.

단계 4. (2R,3S,4S,5R)-5-(6-아세트아미도-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-2-((포스포노옥시)메틸)테트라하이드로푸란-3-일 아세테이트의 제조



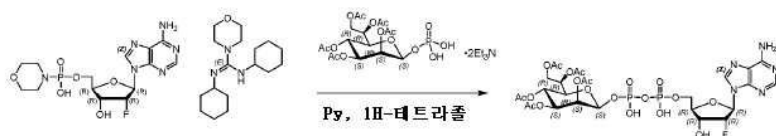
MeOH(4 mL) 중 상기 단계 3의 생성물의 화합물(126 mg, 0.21 mmol) 및 Pd/C(132 mg)의 혼합물을 실온에서  $\text{H}_2$  하에 교반하였다. 밤새 교반한 후, 혼합물을 세공 크기가 0.45 m인 Advantec PTFE 막 여과기를 통해 MeOH를 사용하여 여과하였다. 여액을 감압하에 농축시켜 목적인 화합물(90 mg, 0.21 mmol)을 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>: 434.

단계 5. 모르핀 DCC 염 (2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-2-(((하이드록시(모르폴리노)포스포릴)옥시)메틸)테트라하이드로푸란-3-일 아세테이트의 제조



t-부틸 알코올(5 mL) 중 DCC(173 mg, 0.84 mmol)의 용액을 t-BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$ (1:1)(10 mL), 및 정제된 모르폴린(113 mg, 1.30 mmol)의 혼합물 중 상기 단계 4의 생성물의 화합물(90 mg, 0.21 mmol)의 환류 용액에 적가하였다. 첨가는 3시간내에 완료하였고, 혼합물은 TLC가 반응의 완료를 나타낼 때까지 밤새 환류시켰다. 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 여액을 t-BuOH가 크게 제거될 때까지 증발시키고, 나머지 수성 상을 에테르로 3회 추출하였다. 선명한 수용액을 이후 증발 건조시켜 목적인 화합물을 DCC 염(133 mg, 90% 수율)으로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>: 419.

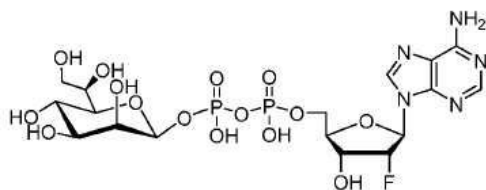
단계 6. (2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-3-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



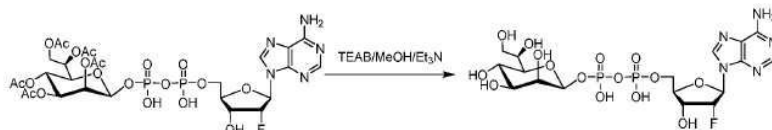
상기 단계 5의 생성물의 화합물(152 mg, 213  $\mu\text{mol}$ ) 및 상기 화합물 1의 제조시 단계 14의 생성물의 화합물(100 mg, 142  $\mu\text{mol}$ )의 혼합물을 무수 피리딘(3 mL x3)을 사용한 공비 탈수 반응에 적용시켰다. 이후에 용매를 피리딘(2 mL) 속에 용해하고, 2H-테트라올(49.84 mg, 711.52  $\mu\text{mol}$ )을 가하였다. 반응 혼합물을 25°C에서 3일 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 제거하였다. 잔사를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피( $\text{CHCl}_3$ :  $\text{MeOH}$ :  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  =1:0:0 내지 50:50:1)로 정제하여 조 생성물(200 mg)을 수득하고, 이를 제조-HPLC(컬럼: 물 Xbridge 150<sup>®</sup> 25 5u, 물 (10mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )-ACN, 0% 내지 30%)로 정제하여 표제 화합물(35 mg, 28.2% 수율, 95.2% 순도)을 담황색 고체로서 수득하였다. MS(ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 832.2. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 메탄올- $d_4$ )  $\delta$  8.60 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 6.36 - 6.26 (m, 1H), 5.62 - 5.52 (m, 2H), 5.38 - 5.33 (m, 0.5H), 5.24 - 5.21 (m, 0.5H), 5.20 - 5.15 (m, 3H), 4.72 - 4.63 (m, 1H), 4.46 - 4.38 (m, 2H), 4.32 - 4.20 (m, 3H), 3.94 - 3.89 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.90 (s, 3H).

화합물 10

아데노신 -2'-플루오로- 5'-(D-글리세로- $\beta$ -D-만노헵토피라노실) 디포스페이트



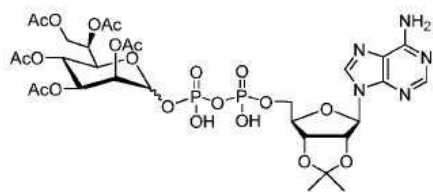
단계 1. 아데노신 -2'-플루오로- 5'-(D-글리세로- $\beta$ -D-만노헵토피라노실) 디포스페이트의 제조



3 mL의 용매(TEAB(0.1 M, 16.00 mL),  $\text{MeOH}$ (12 mL) 및  $\text{Et}_3\text{N}$ (145 mg, 1.44 mmol, 200  $\mu\text{L}$ )으로 이루어짐) 중 상기 화합물 9의 제조시 단계 6의 생성물의 화합물(10 mg, 12.0  $\mu\text{mol}$ )을 -28°C에서 40 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 동결 건조기에서 직접 동결건조시켜 목적한 화합물(7 mg, 수율: 38.5%, 54.5% 순도, 2  $\text{Et}_3\text{N}$  염으로서)을 담황색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M-H$ )<sup>-</sup>: 619.8. <sup>1</sup>H NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.28 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 6.30 - 6.24 (m, 1H), 5.36 - 5.30 (m, 1H), 5.23 - 5.17 (m, 1H), 5.06 - 5.00 (m, 1H), 4.56 - 4.51 (m, 3H), 4.47 - 4.42 (m, 1H), 4.2- 4.18 (m, 2H), 4.14 - 4.04 (m, 3H), 3.85 - 3.80 (m, 1H).

화합물 11

(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2,2-디메틸테트라하이드로프로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트

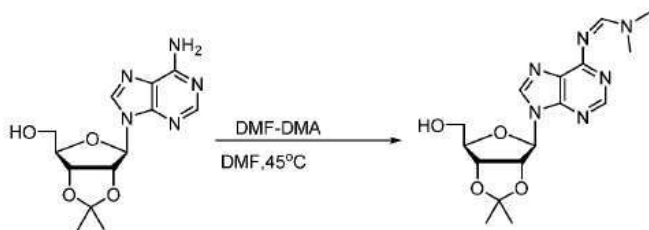


단계 1. ((3aS,4R,6R,6aS)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메탄올의 제조



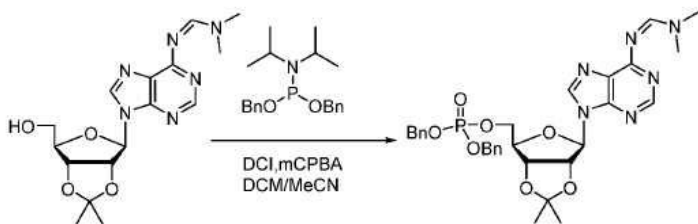
아데노신(2.5 g, 9.36 mmol)을 p-톨루엔설폰산 일수화물(8 g, 42.1 mmol)을 함유하는 무수 아세톤(100 mL) 속에 현탁시켰다. 이후에 트리메틸 오르토포르메이트(6.6 mL, 60.8 mmol)를 1시간의 기간에 걸쳐 주위 온도에서 격렬히 교반하면서 가하여 선명한 용액을 수득한 다음 잠시 후 백색 고체를 형성시켰다. 혼합물을 밤새 교반하였다. 혼합물을 포화된 수성 탄산칼륨을 사용하여 pH = 8로 조절하였다. 침전물을 여과 제거하고, 여액을 증발시키고 잔사를 EA로 추출하였다. 합한 유기 상을 포화된 수성 탄산칼륨 및 물로 세척하고, 건조 및 농축시켰다. 조 생성물을 연마(PE:EA = 10:1)하여 목적한 화합물(2.6 g, 8.47 mmol)을 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 308.

단계 2. (Z)-N'-(9-((3aS,4R,6R,6aS)-6-(하이드록시메틸)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)-9H-푸린-6-일)-N,N-디메틸포름이미드아미드의 제조



DMF(2 mL) 중 상기 단계 1의 생성물의 화합물(1 g, 3.26 mmol)의 교반 용액에 DMF-DMA(1.64 mL, 12.04 mmol)를 실온에서 가하였다. 용액을 45°C로 1시간 동안 가열하였다. LC-MS는 목적한 화합물이 형성되었음을 나타내었다. 이후에, 용매를 진공하에 제거하고 잔사를 DCM으로 흡수시키고, 염수로 세척하고, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고, 여과하며, 증발 건조시켰다. 건조된 생성물을 실리카 겔 섬광 크로마토그래피 상에서 정제하여 목적한 화합물(750 mg, 2.07 mmol)을 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 363.

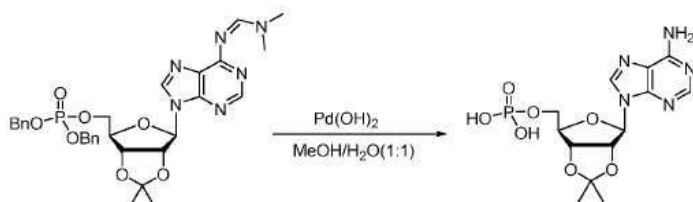
단계 3. 디벤질(((3aS,4R,6R,6aS)-6-(6-((Z)-(디메틸아미노)메틸렌)아미노)-9H-푸린-9-일)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메틸)포스페이트의 제조



DCM/MeCN(6 mL) 중 상기 단계 2의 생성물의 화합물(400 mg, 1.10 mmol)의 교반 용액에 DCI(260 mg, 2.20

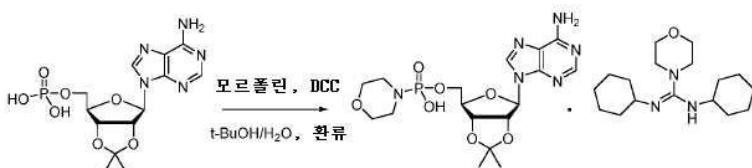
mmol), mCPBA(447 mg, 2.20 mmol) 및 디벤질 디이소프로필포스포르아미디트(760 mg, 2.20 mmol)를 0℃에서 가하였다. 이후에, 반응물을 실온에서 밤새 교반하였다. LC-MS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 반응 혼합물을 농축시키고, 잔사를 DCM/MeOH(30:1)로 용출시키는 실리카 겔 상에서 섬광 크로마토그래피로 정제하여 목적한 화합물을 무색 검(609 mg, 0.98 mmol)으로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 623.

단계 4. ((3aS,4R,6R,6aS)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메틸 디하이드로젠 포스페이트의 제조



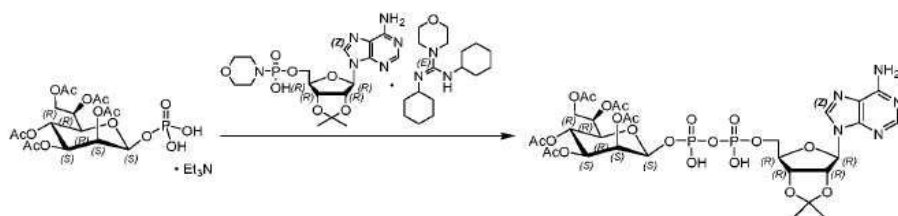
MeOH/H<sub>2</sub>O(10 mL) 중 상기 단계 3의 화합물(609 mg, 0.98 mmol) 및 Pd(OH)<sub>2</sub>(200 mg)의 혼합물을 실온에서 H<sub>2</sub>에 교반하였다. 밤새 교반한 후, 혼합물을 세공 크기가 0.45 m인 Advantec PTFE 막 여과기를 통해 MeOH를 사용하여 여과하였다. 여액을 감압하에 농축시켜 목적한 화합물(383 mg, 0.99 mmol)을 수득하였다. MS(ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 388.

단계 5. ((3aS,4R,6R,6aS)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메틸 디하이드로젠 포스페이트의 모르폴린 DCC 염의 제조



t-부틸 알코올(20 mL) 중 DCC(825 mg, 4.00 mmol)의 용액을 t-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1)(20 mL)의 혼합물 중 상기 단계 4의 생성물의 화합물(383 mg, 0.99 mmol), 및 정제된 모르폴린(384 mg, 4.00 mmol)의 환류하는 용액에 적가하였다. 첨가는 약 3시간내에 완료하고, 혼합물을 TLC가 반응의 완료를 나타낼 때까지 밤새 환류시켰다. 혼합물을 실온으로 냉각하였다. 여액을 t-BuOH가 크게 제거될 때까지 증발시키고, 나머지 수성 상을 에테르로 3회 추출하였다. 이후에 선명한 수용액을 동결 건조로 증발 건조시켜 목적한 생성물을 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 457.

단계 6. (2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



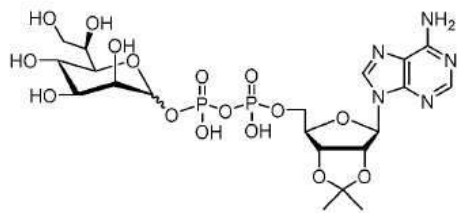
상기 화합물 1의 제조시 단계 14의 생성물의 화합물(200 mg, 284.61  $\mu$ mol, 2 Et<sub>3</sub>N으로서) 및 상기 단계 5의 생성물(389.68 mg, 853.82  $\mu$ mol)의 혼합물을 무수 피리딘("Py")(5 mL x 3)으로 건조시켰다. 이후에 잔사를 피리딘(5 mL) 속에 용해하고 1H-테트라졸(99.69 mg, 1.42 mmol)과 혼합하고, 25℃에서 72시간 동안 교반하였다. 용매를 제거하여 잔사를 수득하고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(DCM: MeOH:NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 1:0:0 내지 30:50:1)로 정제하여 순수하지 않은 생성물(200 mg)을 수득하고 이를 제조-HPLC(컬럼: 물 Xbridge 150\*25 5 $\mu$ , 조건: 물



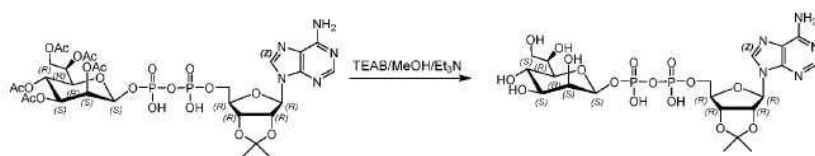
(10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )-ACN, 3% 내지 33%)로 정제하여 목적한 화합물(50 mg, 수율: 19.6%)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 870.3. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 메탄올- $d_4$ )  $\delta$  8.59 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 6.22 (d,  $J=3.4$  Hz, 1H), 5.58 - 5.52 (m, 2H), 5.27 (dd,  $J=3.3, 6.0$  Hz, 1H), 5.22 - 5.14 (m, 4H), 4.53 (br s, 1H), 4.41 (dd,  $J=3.4, 12.0$  Hz, 1H), 4.27 - 4.13 (m, 3H), 3.91 (dd,  $J=2.9, 9.8$  Hz, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.03 (d,  $J=3.7$  Hz, 6H), 1.99 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.39 (s, 3H).

#### 화합물 12

((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메탄올 (D-글리세로- $\beta$ -D-만노헵토피라노실)디포스페이트



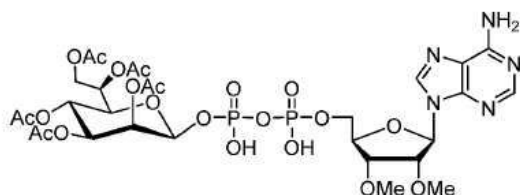
단계 1. ((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메탄올 (D-글리세로- $\beta$ -D-만노헵토피라노실)디포스페이트의 제조



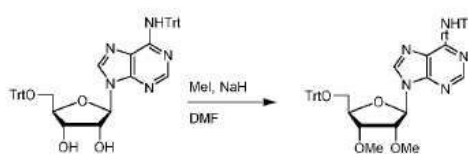
상기 화합물 11의 제조시 단계 6의 생성물의 화합물(10 mg, 11.50  $\mu\text{mol}$ )을 TEAB(8 mL), MeOH(6 mL) 및  $\text{Et}_3\text{N}$ (0.1 mL)로 이루어진 2 mL의 혼합된 용매 속에 용해하였다. 수득된 용액을  $-28^\circ\text{C}$ 에서 46시간 동안 교반하였다. 반응물을 동결 건조기 상에서 동결건조시켰다. 목적한 화합물(9 mg, 수율: 70.84%, a2.6  $\text{Et}_3\text{N}$  염으로서)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M-H$ )<sup>-</sup>: 657.9. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.28 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 6.13 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H), 5.23 (br d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 5.13 - 4.97 (m, 2H), 4.01 (br s, 2H), 3.92 - 3.78 (m, 1H), 3.66 - 3.42 (m, 4H), 3.33 - 3.23 (m, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.29 (s, 3H).

#### 화합물 13

(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디메톡시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트



단계 1. 9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-디메톡시-5-((트리틸옥시)메틸)테트라하이드로푸란-2-일)-N-트리틸-9H-푸린-6-아민의 제조



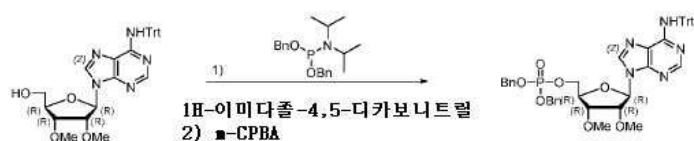
DMF(100 mL) 중 상기 화합물 7의 제조시 단계 5의 생성물(20 g, 18.62 mmol)의 용액에 NaH(1.71 g, 42.83 mmol, 60%)를, 0℃에서 30분 동안 교반한 후 가하고, CH<sub>3</sub>I(7.85 g, 55.31 mmol, 3.44 mL)를 0℃에서 가하였다. 혼합물을 25℃에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 H<sub>2</sub>O(200 mL)로 0℃에서 킁칭시키고, EA(100 mL x 3)로 추출하고, 합한 유기 층을 염수(200 mL)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고, 여과하고 농축시켜 잔사를 수득하였다. 잔사를 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(PE: EA = 1:0 내지 2:1)로 정제하였다. 목적한 화합물(7.3 g, 수율: 39.57%)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 780.3.

단계 2. ((2R,3R,4R,5R)-3,4-디메톡시-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메탄올의 제조



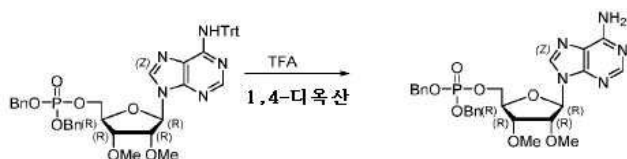
EtOAc(126 mL) 중 상기 단계 1의 생성물(3.81 g, 3.85 mmol)의 용액에 HCl/EtOAc(4 M, 14 mL)를 가하였다. 반응 혼합물을 20℃에서 0.5 시간 동안 교반하였다. pH를 Et<sub>3</sub>N(5 mL)을 사용하여 7로 조절하고 반응 혼합물을 감압하에 농축시켰다. 잔사를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(30 mL) 속에 용해하고 포화된 NaHCO<sub>3</sub>(20 mL x 3) 및 염수(20 mL x 2)로 세척하였다. 유기 층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고, 여과하며, 감압하에 농축시켰다. 조 생성물을 실리카 겔 컬럼(PE:EA = 1:0 내지 1:1, 이후에 PE:EA = 0:1)으로 정제하여 목적한 화합물(1.23 g, 2.25 mmol, 58.62% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 538.3.

단계 3. 디벤질(((2R,3R,4R,5R)-3,4-디메톡시-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메틸)포스페이트의 제조



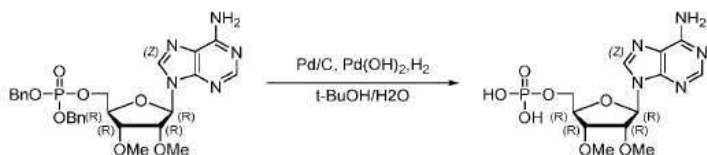
DCM(40 mL) 및 CH<sub>3</sub>CN(8 mL) 중 상기 단계 2의 생성물(2.03 g, 3.78 mmol) 및 1H-이미다졸-4,5-디카보니트릴(892 mg, 7.55 mmol, 2 eq)의 혼합물에 디벤질 디이소프로필포스포르아미디트(2.61 g, 7.55 mmol, 2.53 mL)를 0℃에서 질소 하에 가하였다. 혼합물을 0℃에서 5분 동안 교반한 다음 25℃로 가온하고 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 0℃로 냉각시키고 m-CPBA(1.63 g, 7.55 mmol, 80% 순도)를 0℃에서 한번에 가하였다. 첨가 후, 혼합물을 25℃에서 25시간 동안 교반하였다. 35 mL의 포화된 NaHCO<sub>3</sub>를 가하고 혼합물을 DCM(40 mL x 3)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고 진공하에 농축시켰다. 잔사를 실리카 겔 크로마토그래피(200-300 메쉬, 20~55% 에틸 아세테이트/석유 에테르 구배의 용출물)로 정제하였다. 목적한 화합물(2.54 g, 수율: 79.92%)을 무색 검으로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 798.2. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.00-7.98 (m, 2H), 7.33-7.25 (m, 25H), 6.97 (s, 1H), 6.03-6.02 (m, 1H), 5.07-5.01 (m, 4H), 4.51(t, J = 4.4Hz, 1H), 4.31-4.24 (m, 3H), 4.00-3.97 (m, 1H), 3.37 (s, 3H), 3.35 (s, 3H).

단계 4. ((2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디메톡시테트라하이드로푸란-2-일)메틸 디벤질 포스페이트의 제조



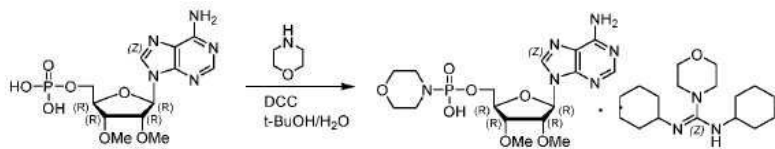
상기 단계 3의 생성물(2.54 g, 3.18 mmol)을 디옥산(15 mL) 속에 용해하였다. TFA(5 mL, 67.53 mmol)를 가하고 혼합물을 40℃에서 6시간 동안 교반하였다. 포화된  $\text{NaHCO}_3$ (~50 mL)를 pH=8이 될 때까지 혼합물에 가하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트(50 mL x 4)로 추출하였다. 합한 유기 층을  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고 진공하에 농축시켰다. 잔사를 섬광 실리카 겔 크로마토그래피(ISCO®; 4 g SepaFlash® Silica Flash 컬럼, 0~10% 메탄올/에틸 아세테이트 구배의 용출제 @ 35 mL/분)로 정제하였다. 목적한 화합물(1.75 g, 수율: 98.95%)을 무색 오일로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 556.1. <sup>1</sup>H NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.30 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.34-7.31 (m, 10H), 6.08-6.02 (m, 2H), 5.07-5.02 (m, 4H), 4.48-4.20 (m, 5H), 4.00-3.97 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.38 (s, 3H).

단계 5. ((2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디메톡시테트라하이드로푸란-2-일)메틸 디하이드로겐 포스페이트의 제조



상기 단계 4의 생성물(500 mg, 900.0  $\mu\text{mol}$ )의 혼합물을 t-BuOH(20 mL) 및  $\text{H}_2\text{O}$ (20 mL) 속에 용해하고, Pd/C(100 mg, 10% 순도) 및  $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (126 mg, 89.72  $\mu\text{mol}$ , 10% 순도)를 가하고 혼합물을 25℃에서 16시간 동안  $\text{H}_2$  대기(50 psi) 하에 교반하였다. 여과하고 여액을 농축시켜 목적한 화합물(400 mg, 조 화합물)을 무색 오일로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.56 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 6.14 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 4.60 - 4.50 (m, 1H), 4.35 - 4.25 (m, 1H), 4.20 - 4.10 (m, 1H), 4.09 - 3.95 (m, 2H), 3.49 (s, 3H), 3.39 (s, 3H).

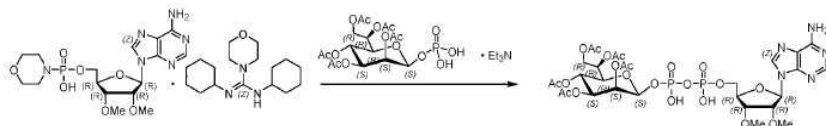
단계 6. ((2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디메톡시테트라하이드로푸란-2-일)메틸 하이드로겐 모르폴리노포스포네이트의 제조



t-BuOH(12 mL) 중 DCC(836 mg, 4.05 mmol)를  $\text{H}_2\text{O}$ (12 mL) 및 t-BuOH(12 mL) 중 상기 단계 5의 생성물(380 mg, 1.01 mmol) 및 모르폴린(353 mg, 4.05 mmol)의 의 환류 용액(110℃)에 적가하였다. 혼합물을 110℃에서 12시간 동안 교반하였다. 용액을 실온으로 냉각하였다. 고체를 여과 제거하였다. 여액을 수집하고 유기 용매를 진공하에 제거하였다. 나머지 수성 상을 수집하고, MTBE(10 mL x 3)로 세척하였다. 수성 상을 수집하고 진공하에 농축시켜 목적한 화합물(440 mg, 조 화합물)을 담황색 점성 오일로서 수득하고, 이를 다음 단계에서 추가의 정제없이 사용하였다.

단계 7. (2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디메톡시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이

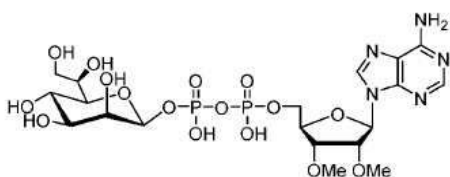
트로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



상기 화합물 1의 제조시 단계 14의 생성물(130 mg, 309.3  $\mu\text{mol}$ ) 및 상기 단계 6의 생성물(390 mg, 878.3  $\mu\text{mol}$ )을 피리딘(4 mL x 3)으로 별도로 건조시켰다. 잔사를 피리딘(4 mL) 속에 재-용해하고 1H-테트라졸(108 mg, 1.55 mmol)을 가하였다. 용액을 30°C에서 12시간 동안 교반하였다. 용매를 진공하에 제거하였다. 잔사를 MeOH(10 mL) 속에 재-용해하였다. 용액을 여과하였다. 여액을 수집하고 농축시켰다. 잔사를 컬럼(DCM: (MeOH: NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O = 50:1) = 1:1)으로 정제하여 조 생성물(80 mg)을 수득하고, 이를 제조-HPLC(컬럼: Waters Xbridge 150\*25 5u; 이동상: [물 (10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%: 0%-30%, 10분)로 정제하여 목적한 화합물(30 mg, 수율 11.21%)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 858.4. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.65 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 6.15 - 6.12 (m, 1H), 5.60 - 5.56 (m, 2H), 5.22 - 5.17 (m, 3H), 4.55 - 4.12 (m, 7H), 3.92 - 3.89 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.88 (s, 3H).

화합물 14

아데노신-2'3'-디메톡시-5'-(D-글리세로-β-D-만노헵토피라노실) 디포스페이트



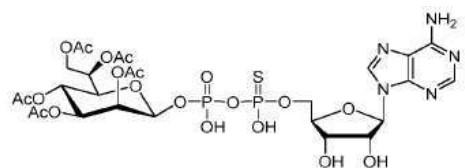
단계 1. 아데노신-2'3'-디메톡시-5'-(D-글리세로-β-D-만노헵토피라노실) 디포스페이트의 제조



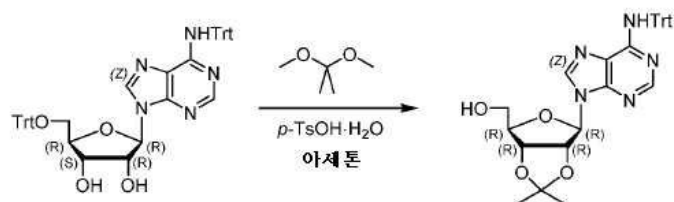
4 mL의 완충액(TEAB (12 mL):MeOH(9 mL):TEA(0.15 mL)) 중 상기 화합물 13의 제조시 단계 7의 생성물(8.4 mg, 9.79  $\mu\text{mol}$ )의 용액을 -20°C에서 24시간 동안 유지시켰다. 용액을 동결건조하에 건조시켜 목적한 화합물(8 mg, 수율: 65.85%)을 백색 점성 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M-H)<sup>+</sup>: 645.9.

화합물 15

(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)((하이드록시)포스포로티오일)옥시)((하이드록시)포스포틸)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트

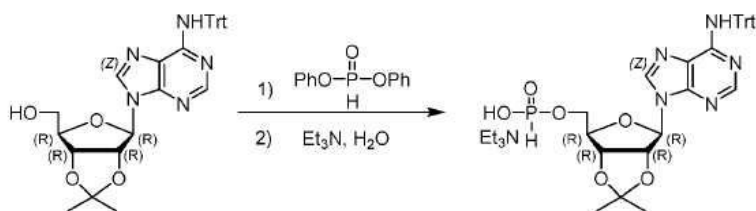


단계 1. 화합물 ((3aR,4R,6R,6aR)-2,2-디메틸-6-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로프로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메탄올의 제조



아세톤(100 mL) 중 상기 화합물 7의 화합물의 제조시 단계 5의 생성물(37.4 g, 49.8 mmol) 및 2,2-디메톡시프로판(51.8 g, 497 mmol, 61.0 mL)의 용액에 p-TsOH·H<sub>2</sub>O(11.4 g, 59.7 mmol)를 가하였다. 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 0℃로 냉각시키고 포화된 NaHCO<sub>3</sub>(300 mL)로 퀀칭시켰다. 반응 혼합물을 EA(200 mL x 3)로 추출하고, 합한 유기 층을 염수(200 mL)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고, 여과하고 농축시켜 잔사를 수득하고, 이를 실리카 겔 컬럼(PE:EA = 1:0 내지 2:3)으로 정제하여 목적한 화합물(9.96 g, 수율: 35.57%)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>=550.1. <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.44 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.34 - 7.18 (m, 15H), 6.12 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 5.34 (dd, J = 2.8, 6.2 Hz, 1H), 5.14 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 4.93 (dd, J = 2.7, 6.1 Hz, 1H), 4.25 - 4.15 (m, 1H), 3.60 - 3.42 (m, 2H), 1.52 (s, 3H), 1.30 (s, 3H).

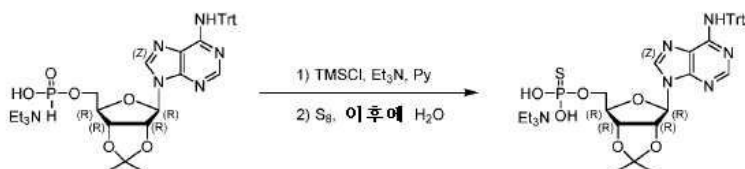
단계 2. 화합물 ((3aR,4R,6R,6aR)-2,2-디메틸-6-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메틸 하이드로젠 포스포네이트 트리에틸아민 염의 제조



페녹시포스포노일옥시벤젠(3.41 g, 14.6 mmol)을 피리딘(20 mL) 중 상기 단계 1의 생성물(2 g, 3.64 mmol)의 용액에 가하였다. 수득되는 혼합물을 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 이후에, Et<sub>3</sub>N(2.21 g, 21.8 mmol, 3.04 mL) 및 H<sub>2</sub>O(786.9 mg, 43.7 mmol)를 가하였다. 수득되는 혼합물을 25℃에서 0.5 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 감압하에 직접 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 컬럼(DCM:MeOH = 1:0 내지 10:1, 0.5% Et<sub>3</sub>N를 첨가함)으로 정제하여 목적한 화합물(2 g, 2.55 mmol, 70.0% 수율, 78% 순도)을 황색 시럽으로서 수득하였다.

MS(ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 614.1

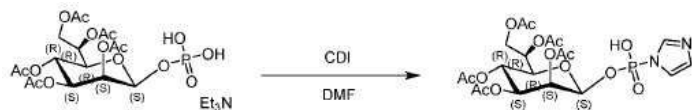
단계 3. O-(((3aR,4R,6R,6aR)-2,2-디메틸-6-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메틸)포스포로티오에이트 트리에틸아민 염의 제조



피리딘(6 mL) 및 Et<sub>3</sub>N(6 mL) 중 상기 단계 2의 생성물(1.5 g, 2.40 mmol)의 용액에 TMSCl(2.4 mL, 19.1 mmol)을 15분에 걸쳐 N<sub>2</sub> 대기 하에 적가하였다. 혼합물을 0℃에서 다른 45분 동안 교반한 다음, S(730 mg, 22.7 mmol)를 가하였다. 혼합물을 0℃에서 다른 45분 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응물을 H<sub>2</sub>O(10 mL)로 퀀

칭시키고 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 크로마토그래피(DCM:MeOH = 20:1 내지 10:1) 및 제조-HPLC(컬럼: Boston Prime C18 150\*30mm 5um; 이동상: [물 (0.05% 수산화암모니아 v/v)-ACN]; B%: 15%-45%, 9분)로 정제하여 목적한 화합물(700 mg, 수율 44.4%, 86% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 646.1. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO) δ 8.71 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.39 - 7.12 (m, 15H), 6.12 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 5.28 (dd, J = 3.3, 5.8 Hz, 1H), 5.07 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 4.39 (br s, 1H), 3.95 - 3.84 (m, 1H), 3.73 (td, J = 5.6, 10.9 Hz, 1H), 1.56 - 1.48 (s, 3H), 1.31 (s, 3H)

단계 4. (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-디아세톡시에틸)-6-((하이드록시(1H-이미다졸-1-일)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



CDI(945 mg, 5.83 mmol)를 무수 DMF(15 mL) 중 상기 화합물 1의 제조시 단계 14의 생성물의 화합물(350 mg, 0.58 mmol)의 용액에 N<sub>2</sub> 대기 하에 가하였다. 수득되는 혼합물을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, MeOH(0.2 mL)를 가하여 반응물을 퀀칭시키고, 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 목적 생성물(1 g, 조 화합물)을 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다.

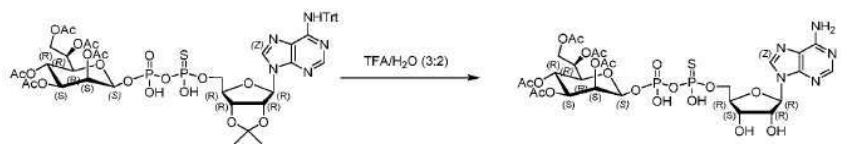
단계 5. 화합물 (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-디아세톡시에틸)-6-((((((3aR,4R,6R,6aR)-2,2-디메틸-6-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



ZnCl<sub>2</sub>(1 g, 7.34 mmol)를 무수 DMF(15 mL) 중 상기 단계 4로부터의 생성물(320 mg, 0.58 mmol) 및 상기 단계 3의 생성물(500 mg, 0.67 mmol)의 용액에 N<sub>2</sub> 대기 하에 가하였다. 수득되는 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 컬럼(DCM:MeOH = 10:1, 0.5% Et<sub>3</sub>N을 가함)으로 정제하여 목적한 화합물(600 mg, 조 화합물)을 담황색 고체로서 수득하고, 이를 다음 단계에서 추가의 정제없이 사용하였다.

MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 1128.6.

단계 6. 화합물 (2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조

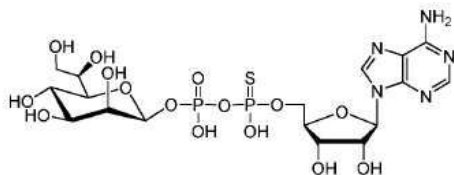


TFA(0.3 mL, 4.05 mmol)를 H<sub>2</sub>O(2 mL) 중 상기 단계 5의 생성물의 화합물(200 mg, 조 화합물)의 용액에 가하였다. 혼합물을 25℃에서 0.5 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응물을 Et<sub>3</sub>N을 가함으로써 pH = 7로 조절하였다. 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 제조-HPLC(컬럼: Waters Xbridge 150\*25 5u; 이동상: [물 (10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%: 0%-30%, 10QNS)로 정제하여 목적한 화합물(18.6 mg, 99% 순

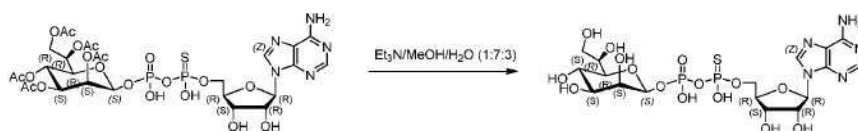
도)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 846.3. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 메탄올-d<sub>4</sub>)  $\delta$  = 8.78 (s, 0.5H), 8.71 (s, 0.5H), 8.21 (s, 1H), 6.13 (dd,  $J$  = 2.0, 6.0 Hz, 1H), 5.76 - 5.60 (m, 2H), 5.26 - 5.16 (m, 3H), 4.74 - 4.68 (m, 1H), 4.53 - 4.42 (m, 2H), 4.37 - 4.21 (m, 4H), 4.01 - 3.89 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.10 - 2.06 (m, 6H), 2.04 (s, 1.5H), 2.02 (s, 1.5H), 1.96 (s, 3H)

화합물 16

아데노신-5'-(D-글리세로-β-D-만노-6-플루오로-헵토피라노실)포스포티오닐옥시포스페이트



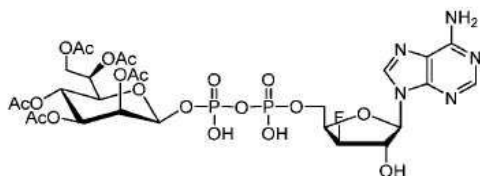
단계 1. 아데노신-5'-(D-글리세로-β-D-만노-6-플루오로-헵토피라노실)(하이드록실)포스포티오닐옥시포스페이트의 제조



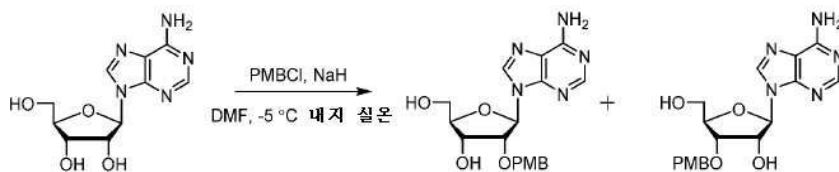
7:3:1 비의 MeOH/물/Et<sub>3</sub>N(2 mL) 중 상기 기술된 화합물 15의 제조시 단계 6의 생성물의 화합물(4 mg, 4.73 μmol)의 용액을 25℃에서 5시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 농축시키고 물로부터 동결건조시켜 목적한 화합물(3.2 mg, 수율: 80.6%, 2Et<sub>3</sub>N 염)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M-H$ )<sup>+</sup>: 634.1. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.46 (s, 0.5H), 8.43 (s, 0.5 H), 8.08 (s, 0.5 H), 8.06 (s, 0.5H), 5.96 (dd,  $J$  = 5.9, 10.0 Hz, 1H), 5.38 - 5.28 (m, 0.5H), 5.13 - 5.03 (m, 0.5H), 4.45 - 4.31 (m, 2H), 4.23 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H), 4.14 - 4.03 (m, 1H), 3.96 - 3.87 (m, 2H), 3.85 - 3.76 (m, 1H), 3.66 - 3.47 (m, 4H), 3.34 - 3.24 (m, 1H), 3.02 (q,  $J$  = 7.3 Hz, 12H), 1.09 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 18H)

화합물 17

(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3R,4S,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3-플루오로-4-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트

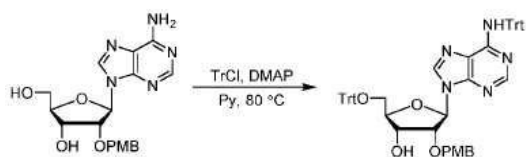


단계 1. 화합물 (2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2-(하이드록시메틸)-4-((4-메톡시벤질)옥시)테트라하이드로푸란-3-올 및 (2R,3R,4S,5R)-2-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-5-(하이드록시메틸)-4-((4-메톡시벤질)옥시)테트라하이드로푸란-3-올의 제조



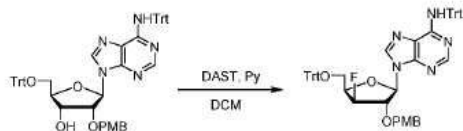
DMF(900 mL) 중 아데노신(25 g, 93.55 mmol)의 현탁액을  $-5^{\circ}\text{C}$ 로 냉각시켰다. NaH(4.86 g, 121.61 mmol, 60% 순도)를 용액에 가하였다. 혼합물을 추가로 1시간 동안  $-5^{\circ}\text{C}$ 에서 교반하였다. PMBCl(17.58 g, 112.26 mmol, 15.29 mL)을 현탁액에 1시간 동안 적가하였다. 첨가가 완료된 후, 반응물을  $25^{\circ}\text{C}$ 에 도달하도록 두고, 16시간 동안 교반하였다. 40 mL의 포화된  $\text{NaHCO}_3$  용액을 혼합물에  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 가하고 실온에서 10분 동안 교반하였다. 고체를 여과 제거하고 여액을 감압하에 농축시켜 잔사를 수득하였다. 잔사를 섬광 크로마토그래피 컬럼(DCM 중 0-2% MeOH로 용출시킴)으로 정제하였다. 화합물 (2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2-(하이드록시메틸)-4-((4-메톡시벤질)옥시)테트라하이드로푸란-3-올(22 g, 59.70 mmol, 63.8% 순도, 96.37% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다. 목적한 2개의 이성체의 혼합물(12 g)을 백색 고체로서 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.29 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.35 (s, 2H), 7.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.70 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.01 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 5.47 (dd,  $J = 4.4, 7.2$  Hz, 1H), 5.29 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 4.65 - 4.42 (m, 2H), 4.39 - 4.20 (m, 2H), 4.00 (q,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.71-3.61 (m, 1H), 3.58 - 3.47 (m, 1H).

단계 2. 화합물 (2R,3R,4R,5R)-4-((4-메톡시벤질)옥시)-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)-2-(트리틸옥시)메틸)테트라하이드로푸란-3-올의 제조



상기 단계 1의 생성물의 화합물(15.00 g, 38.72 mmol)을 피리딘(10 mL x 2)과 2회 공-증발시키고 피리딘(300 mL) 속에 용해하였다. TrtCl(26.99 g, 96.80 mmol) 및 DMAP(3.78 g, 30.98 mmol)를 가하였다. 혼합물을  $80^{\circ}\text{C}$ 에서  $\text{N}_2$  하에 15시간 동안 교반하였다. 혼합물을 EA(800 mL)로 희석시키고 포화된  $\text{NaHCO}_3$  용액(200 mL x 2) 및 염수(200 mL x 2)로 세척하였다. 유기 층을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고, 여과하고 감압하에 농축시켜 잔사를 수득하였다. 잔사를 섬광 컬럼 크로마토그래피(PE 중 0-40% EA로 용출시킴)로 정제하였다. 목적한 화합물(22.6 g, 66.9% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) = 872.4

단계 3. 화합물 9-((2R,3S,4S,5R)-4-플루오로-3-((4-메톡시벤질)옥시)-5-((트리틸옥시)메틸)테트라하이드로푸란-2-일)-N-트리틸-9H-푸린-6-아민의 제조



DCM(50 mL) 중 상기 단계 2의 생성물의 화합물(5 g, 5.73 mmol)의 용액에 DAST(3.85 mL, 29.1mmol) 및 피리딘(4.6 mL, 57.2 mmol)에 가하였다. 혼합물을  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 교반하였다. 반응물을 포화된  $\text{NaHCO}_3$ (30 mL)로 퀀칭시키고 유기 층을 분리하였다. 수성 층을 DCM(50 mL x 2)으로 추출하고, 합한 유기 층을 HCl(50 mL), 염수(50 mL)로 세척하고, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고, 여과하고 감압하에 농축시켰다. 잔사를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(PE/EA: 20/1 내지 2/1)로 정제하여 목적한 화합물(2.1 g, 수율 42.0%)을 황색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 874.4  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.99 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.56 (s, 1H),



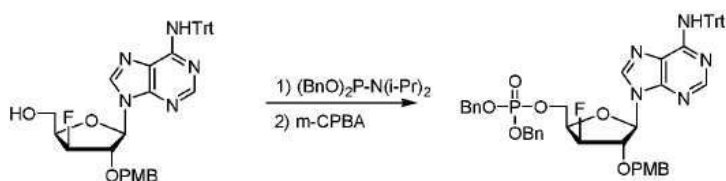
7.44 - 7.18(m, 32H), 6.84 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.16 - 6.10 (m, 1H), 5.50 - 5.28 (m, 1H), 4.81 - 4.70 (m, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.57 - 4.43 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.42 - 3.37 (m, 1H), 3.31 - 3.24 (m, 1H).

단계 4. 화합물 ((2R,3S,4S,5R)-3-플루오로-4-((4-메톡시벤질)옥시)-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메탄올의 제조



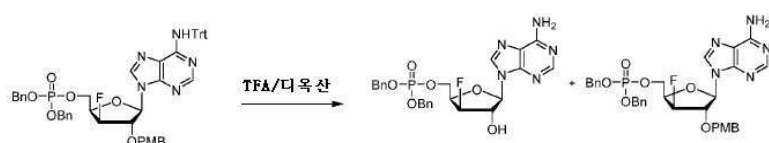
HCl/디옥산(20 mL) 중 상기 단계 3의 생성물의 화합물(2.7 g, 3.09 mmol)의 용액을 28℃에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화된  $\text{NaHCO}_3$ 로 pH = 7이 될 때까지 중화시킨 다음 이를 EtOAc(50 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수(50 mL)로 세척하고, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고, 여과하고 감압하에 농축시켜 잔사를 수득하고 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 20:1 내지 3:1)로 정제하였다. 목적한 화합물(3 g, 수율: 76.9%)을 황색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup> = 631.2, 632.2.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8.20 (s, 1 H), 7.94 (s, 1 H), 7.52 (s, 1 H), 7.37 - 7.18 (m, 17 H), 6.90 - 6.83 (m, 2 H), 6.12 - 6.05 (m, 1 H), 5.41 - 5.25 (m, 1 H) 5.10 - 5.05 (m, 1 H), 4.81 - 4.74 (m, 1 H), 4.70 - 4.62 (m, 2 H), 4.34 - 4.22 (m, 1 H) 3.81 - 3.73 (m, 1 H) 3.72 (s, 3 H).

단계 5. 화합물 디벤질 (((2R,3S,4S,5R)-3-플루오로-4-((4-메톡시벤질)옥시)-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메틸)포스페이트의 제조



$\text{H}_2\text{Cl}_2$ (20 mL) 및  $\text{CH}_3\text{CN}$ (4 mL) 중 상기 단계 4의 생성물의 화합물(1.5 g, 2.37 mmol) 및 H-이미다졸-4, 5-디카보니트릴(560 mg, 4.75 mmol)의 용액에  $(\text{BnO})_2\text{P-N}(\text{i-Pr})_2$ (1.64 g, 4.75 mmol)를 0℃에서 가하였다. 혼합물을 0℃에서 10분 동안 교반한 다음 25℃로 가온하였다. 수득되는 혼합물을 다른 1시간 동안 교반하고 0℃로 다시 냉각시켰다. m-CPBA(1.02 g, 4.75 mmol, 80% 순도)를 직접 가한 후, 반응물을 25℃로 가온시키고 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응물을 DCM(20 mL)으로 희석시키고, 포화된  $\text{NaHCO}_3$ (30 mL x 2) 및 염수(30 mL)로 세척하였다. 유기 상을 농축시켜 조 생성물을 수득하였다. 조 생성물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(PE:EA=1: 0 내지 1:1)로 정제하였다. 목적한 화합물(2.2 g, 수율: 81.0% 수율, 78% 순도)을 황색 오일로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 892.3.

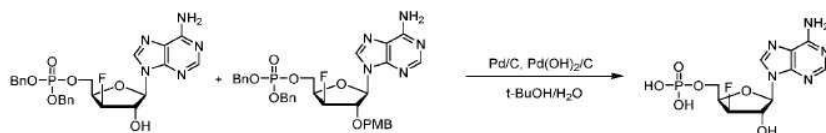
단계 6. 화합물 ((2R,3R,4S,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3-플루오로-4-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메틸 디벤질 포스페이트 및 ((2R,3S,4S,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3-플루오로-4-((4-메톡시벤질)옥시)테트라하이드로푸란-2-일)메틸 디벤질 포스페이트의 제조



DCM(18 mL) 중 상기 단계 5의 생성물의 화합물(2.2 g, 2.47 mmol) 및 TFA(562 mg, 4.93 mmol, 365  $\mu\text{L}$ )의 용액

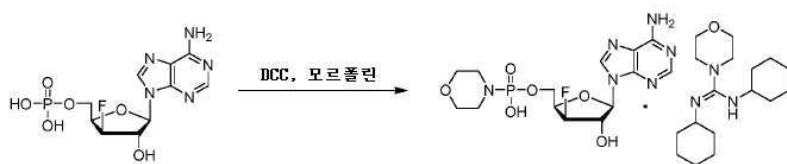
을 25 내지 30℃에서 4시간 동안 교반하였다. 반응물을 포화된 NaHCO<sub>3</sub>(40 mL)로 pH ~8-9로 조정하고 DCM(50 mL x 2)으로 추출하였다. 합한 유기 상을 염수(50 mL)로 세척하고 농축시켜 조 생성물을 수득하였다. 조 생성물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(PE:EA=1:0 내지 0:1)로 정제하였다. 2개의 화합물(1.1 g, 수율: 76.7%)의 혼합물을 황색 오일로서 수득하고 이를 추가의 단계를 위해 정제없이 사용하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup> = 530.1, 650.1.

단계 7. 화합물 ((2R,3R,4S,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3-플루오로-4-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메틸 디하이드로젠 포스페이트의 제조



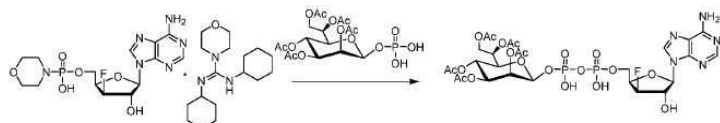
t-BuOH(15 mL) 및 H<sub>2</sub>O(15 mL) 중 상기 단계 6의 생성물의 화합물(1.1 g, 1.69 mmol)의 혼합물에 Pd/C(0.2 g) 및 Pd(OH)<sub>2</sub>(0.2 g)를 가하였다. 혼합물을 25℃에서 수소 대기(50 psi)하에 36시간 동안 교반하였다. 혼합물을 여과하고 여액을 감압하에 농축시켜 조 화합물을 수득하였다. 조 화합물을 다음 단계를 위해 추가의 정제없이 사용하였다. 목적한 화합물(0.45 g, 조 화합물)을 회색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.17 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.34 (br s, 2H), 5.96 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 5.34 - 4.95 (m, 1H), 4.76 (br d, J = 15.6 Hz, 1H), 4.63 - 4.42 (m, 1H), 4.20 - 3.93 (m, 2H).

단계 8. ((2R,3R,4S,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3-플루오로-4-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메틸 하이드로젠 모르폴리노포스포네이트(4'-모르폴린-N,N'-디사이클로헥실카복사아미디늄 염)



t-BuOH(4 mL) 중 DCC(354.50 mg, 1.72 mmol, 347.5 μL)를 H<sub>2</sub>O(4 mL) 및 t-BuOH(4 mL) 중 상기 단계 7의 생성물의 화합물(150 mg, 430 μmol) 및 모르폴린(150 mg, 1.72 mmol)의 환류된(110℃) 용액에 15분의 기간에 걸쳐 적가하였다. 혼합물을 100℃에서 N<sub>2</sub> 하에 12시간 동안 교반하였다. 용액을 여과하였다. 여액을 수집하고 농축시켰다. 잔사를 H<sub>2</sub>O(30 mL)로 희석시키고, TBME(20 mL x 2)로 세척하였다. 수성 상을 수집하고 진공하에 농축시켰다. 목적한 화합물(290 mg, 조 화합물)을 황색 오일로서 수득하고, 이를 다음 단계를 위해 추가의 정제없이 직접 사용하였다. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.11 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 6.01 - 5.98 (m, 1H), 5.22 - 5.07 (m, 1H), , 4.80 - 4.73 (m, 1H), 4.55 - 4.48 (m, 1H), 4.09 - 4.02 (m, 1H), 4.00 - 3.92 (m, 1H), 3.44 - 3.39 (m, 4H), 2.85 - 2.80 (m, 4H). <sup>31</sup>P NMR δ 7.5.

단계 9. 화합물 (2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3R,4S,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3-플루오로-4-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세이트의 제조

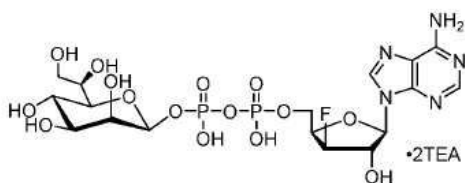


상기 단계 8의 생성물의 화합물(150 mg, 299.79 μmol) 및 상기 화합물 1의 제조시 단계 14의 생성물의 화합물(290 mg, 693.25 μmol)을 피리딘(3 mL x 3)으로 건조시켰다. 잔사를 피리딘(5 mL) 속에 재-용해하고, 1H-테트라졸(105.01 mg, 1.50 mmol, 132.92 μL)을 가하였다. 용액을 30℃에서 20시간 동안 교반하였다. 휘발물을 진

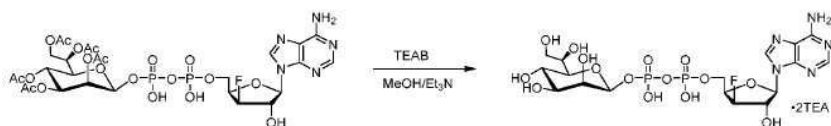
공하에 제거하였다. 잔사를 MeOH(5 mL) 속에 용해하고 여과하였다. 여액을 수집하였다. 용액을 컬럼(DCM:(MeOH: NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O = 50:1) = 1.2:1)으로 정제하여 조 생성물(120 mg)을 수득하였다. 조 생성물을 제조-HPLC(컬럼: Waters Xbridge 150\*25 5u; 이동상: [물 (10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%: 0%-30%, 12분)로 정제하여 목적한 화합물(46.9 mg, 순도: 90.6%, 18% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 832.2. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.25 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.60 - 5.50 (m, 2H), 5.25 - 5.09 (m, 4H), 4.80 - 4.71 (m, 1H), 4.69 - 4.62 (m, 1H), 4.47 - 4.31 (m, 3H), 4.27 - 4.18 (m, 1H), 3.92 - 3.88 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.92 (s, 3H). MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>= 832.2.

#### 화합물 18

3'-(s)-플루오로-아데노신-5'-(D-글리세로-β-D-만노-헵토피라노실) 디포스페이트



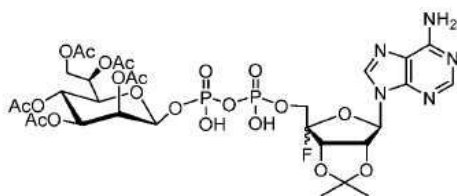
단계 1. 화합물 3'-(s)-플루오로-아데노신-5'-(D-글리세로-β-D-만노-헵토피라노실)디포스페이트의 제조



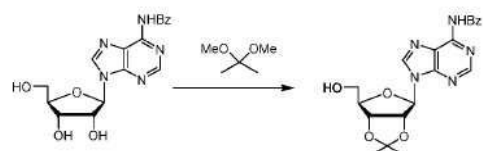
(MeOH(9 mL), TEA(0.15 mL) 및 TEAB(12 mL))로 이루어진 4 mL의 용액 중 상기 화합물 17의 제조의 단계 9의 생성물의 화합물(6 mg, 7.22 μmol)의 용액을 -20℃에서 36시간 동안 유지시켰다. 용액을 동결건조시켰다. 목적한 화합물(4 mg, 6.44 μmol)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M-H)<sup>+</sup>: 620.2. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.13 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 6.03 - 5.99 (m, 1H), 5.22 - 5.21 (m, 1H), 5.08 - 4.96 (m, 3H), 4.27 - 4.10 (m, 2H), 4.00 - 3.95 (m, 1H), 3.90 - 3.85 (m, 1H), 3.82 - 3.75 (m, 1H), 3.56 - 3.38 (m, 3H), 3.26 - 3.17 (m, 1H), 2.97 - 2.86 (m, 15H), 1.12 - 0.97 (m, 23H).

#### 화합물 19

(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((3aS,4S,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-2,2-디메틸테트라하이드로 푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트

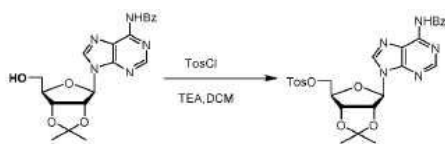


단계 1. N-(9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(하이드록시메틸)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)-9H-푸린-6-일)벤즈아미드의 제조



N-(9-((2R,3R,4S,5R)-3,4-디하이드록시-5-(하이드록시메틸)테트라하이드로푸란-2-일)-9H-푸린-6-일)벤즈아미드 (23.0 g, 61.9 mmol) 및 2,2-디메톡시프로판(64.5 g, 619.3 mmol)을 아세톤(400 mL) 속에 용해하였다. 이후에, p-TsOH.H<sub>2</sub>O(12.8 g, 74.3 mmol)를 가하였다. 반응 혼합물을 25℃에서 4시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 0℃로 냉각시키고 포화된 NaHCO<sub>3</sub> 용액(200 mL)으로 킁칭시켰다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트(250 mL)로 희석시키고 유백색의 수성 층을 에틸 아세테이트(250 mL x 2)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수(250 mL)로 세척하고, 건조시키며, 진공하에 농축시켜 목적인 화합물(25.0 g, 조 화합물)을 담황색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.19 (br, 1H), 8.74 (s, 1 H), 8.65 (s, 1 H), 8.03 - 7.99 (m, 2H), 7.64 - 7.60 (m, 1H), 7.54 - 7.50 (m, 2H), 6.25 - 6.24 (m, 1H), 5.41 (dd, J = 6.4Hz, 2.4 Hz, 1 H), 5.11 (t, J = 5.2 Hz, 1 H), 4.99 - 4.97 (m, 1H), 4.26 - 4.23 (m, 1H), 3.56 - 3.50 (m, 2H), 1.54 (s, 3 H), 1.32 (s, 3 H).

단계 2. ((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-벤즈아미도-9H-푸린-9-일)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메틸 4-메틸벤젠설포네이트의 제조



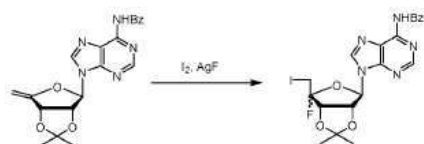
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50 mL) 중 TosCl(15.0 g, 79.0 mmol)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(250 mL) 중 상기 단계 1에서 수득된 화합물(25.0 g, 60.7 mmol), DMAP(1.4 g, 12.1mmol) 및 TEA(12.3 g, 121.5 mmol)의 용액에 0℃에서 가하였다. 반응 혼합물을 25℃에서 6시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 0℃로 냉각시키고 포화된 NaHCO<sub>3</sub> 용액(200 mL)으로 킁칭시켰다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트(200 mL)로 희석시키고 유백색 수성 층을 에틸 아세테이트(200 mL x 2)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수(200 mL)로 세척하고, 건조시키고, 진공하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고 이를 실리카 겔 컬럼(석유 에테르:에틸 아세테이트=1:0 내지 0:1)으로 정제하여 목적인 화합물(35.0 g, 수율: 76.7%, 75.3 % 순도)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 566.0

단계 3. N-(9-((3aR,4R,6aS)-2,2-디메틸-6-메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)-9H-푸린-6-일)벤즈아미드의 제조



t-BuOK(15.7 g, 139 mmol)를 THF(400 mL) 중 상기 단계 2의 생성물의 화합물(35.0 g, 46.6 mmol)의 용액에 가하였다. 수득되는 혼합물을 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 수성 NH<sub>4</sub>Cl(200 mL)에 가하고 에틸 아세테이트(200 mL x 2)로 추출하였다. 유기 상을 건조시키고(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 진공하에 농축시켜 조 생성물을 수득하였다. 조 생성물을 실리카 겔 컬럼(석유 에테르:에틸 아세테이트 = 1:0 내지 0:1)으로 정제하여 목적인 화합물(9.7 g, 52.9% 수율)을 담황색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.24 (s, 1 H), 8.72 (s, 1 H), 8.58 (s, 1 H), 8.02 - 8.00 (m, 2H), 7.64 - 7.60 (m, 1H), 7.54 - 7.50 (m, 2H), 6.58 (s, 1H), 5.63 - 5.61 (m, 1H), 5.43 - 5.41 (m, 1H), 4.46 (s, 1H), 4.38 - 4.37 (m, 1H), 1.47 (s, 3 H), 1.35 (s, 3 H).

단계 4. 화합물 N-(9-((3aR,4R,6R,6aS)-6-플루오로-6-(요오도메틸)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)-9H-푸린-6-일)벤즈아미드의 2개의 이성체의 제조



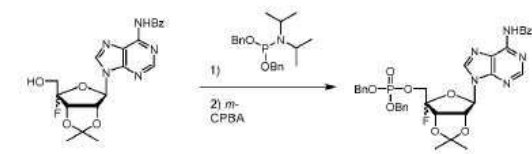
I<sub>2</sub>(18.0 g, 71.1 mmol)를 CH<sub>3</sub>CN(300 mL) 중 상기 단계 3의 생성물의 화합물(7 g, 17.7 mmol)의 용액에 -20℃에서 가하였다. CH<sub>3</sub>CN(300 mL) 중 AgF(2.26 g, 17.7 mmol)의 용액을 가하였다. 혼합물을 -20℃ 내지 -25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고 감압하에 농축시킨 다음, 에틸 아세테이트(300 mL)를 가하고 수성 탄산수소나트륨(100 mL)으로 세척하고, 유기 상을 염수(100 mL)로 세척하고, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과하고 진공하에 농축시켰다. 조 생성물을 실리카 겔 컬럼(석유 에테르:에틸 아세테이트 = 1:0 내지 0:1)으로 정제하여 목적인 화합물의 2개의 이성체(4.00 g, 수율: 40.4% 수율, 97.1% 순도)의 혼합물을 담황색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 540.0. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.25 (br, 1 H), 8.78 - 8.75 (m, 1H), 8.64 - 8.52 (m, 1H), 8.03 - 8.01 (m, 2H), 7.66 - 7.61 (m, 1H), 7.55 - 7.51 (m, 2H), 6.66 - 6.53 (m, 1H), 5.88 - 5.86 (m, 0.5H), 5.44 - 5.37 (m, 1H), 5.29 - 5.26 (m, 0.5H), 3.65 - 3.48 (m, 2H), 1.55 (s, 1.5H), 1.52 (s, 1.5H), 1.37 (s, 1.5H), 1.32 (s, 1.5H).

단계 5. N-(9-((3aR,4R,6S,6aS)-6-플루오로-6-(하이드록시메틸)-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)-9H-푸린-6-일)벤즈아미드의 2개의 이성체의 제조



TFA(3.80 g, 33.3 mmol) 및 테트라(n-부틸)암모늄 하이드록사이드(5.19 g, 19.9 mmol)를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(80 mL) 중 상기 단계 4로부터 수득된 2개의 이성체(3.70 g, 6.66 mmol)의 혼합물의 용액에 가한 다음, m-CPBA(6.76 g, 33.3 mmol, 85% 순도)를 25℃에서 가하였다. 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화된 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 용액(20 mL) 및 수성 NaHCO<sub>3</sub> 용액(20 mL)으로 세척하였다. 유기 층을 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고, 저압에서 농축시켰다. 조 생성물을 실리카 겔 컬럼(석유 에테르:에틸 아세테이트 = 1:0 내지 0:1)으로 정제하여 목적인 2개의 이성체(1.20 g, 수율: 39.8%, 94.9% 순도)의 혼합물을 담황색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 430.0. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.23 (br. s, 1H), 8.79 - 8.73 (m, 1H), 8.62 (s, 0.3H), 8.54 - 8.48 (m, 0.7H), 8.05 - 7.98 (m, 2H), 7.65 - 7.59 (m, 1H), 7.56 - 7.49 (m, 2H), 6.63 (s, 0.3H), 6.48 (s, 0.7H), 5.81 - 5.75 (m, 1H), 5.41 - 5.32 (m, 1H), 5.21 - 5.14 (m, 1H), 3.80 - 3.54 (m, 2H), 1.52 (s, 1H), 1.50 (s, 2H), 1.36 (s, 2H), 1.32 (s, 1H).

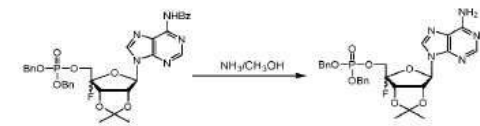
단계 6. ((3aS,4S,6R,6aR)-6-(6-벤즈아미도-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메틸 디벤질 포스페이트의 2개의 이성체의 제조



CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50 mL) 및 CH<sub>3</sub>CN(17 mL) 중 상기 단계 5에서 수득된 2개의 이성체(850 mg, 1.98 mmol) 및 1H-이미다졸-4,5-디카보니트릴(467 mg, 3.96 mmol)의 혼합물에 N-디벤질옥스포스파닐-N-이소프로필-프로판-2-아민(1.37 g, 3.96 mmol)을 0℃에서 가하였다. 반응 혼합물을 10분 동안 교반한 다음 25℃로 가온시켰다. 수득되는 혼합물을 다른 2시간 동안 교반하고 0℃로 다시 냉각시켰다. m-CPBA(803 mg, 3.96 mmol, 85% 순도)를 직접 가하고, 반응물을 25℃로 서서히 가온시키고 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 포화된 NaHCO<sub>3</sub>(50 mL)로 퀀칭시키고 유기 상을 분리하였다. 수 상을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(50 mL x 2)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 위에서 건조시키고, 여과하고 감압하에 농축시켰다. 조 생성물을 실리카 겔 컬럼(석유 에테르:에틸 아세테이트 = 1:0 내지 0:1)으로 정제하여 목적인 2개의 이성체(1.10 g, 수율: 73.2%, 90.8% 순도)를 담황색 고체로 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 690.1. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.25 (br. s, 1H), 8.75 (s, 0.7H), 8.64 (s, 0.3H), 8.61 (s, 0.3H), 8.54 (s, 0.7H), 8.01 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.66 - 7.58 (m, 1H), 7.56 - 7.48 (m, 2H), 7.36 - 7.24

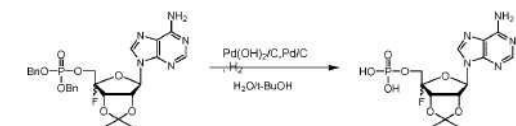
(m, 10H), 6.73 (s, 0.3H), 6.57 (s, 0.7H), 5.85 (d, J = 5.6 Hz, 0.7H), 5.51 - 5.42 (m, 0.3H), 5.41 - 5.37 (m, 0.3H), 5.30 (t, J = 6.0 Hz, 0.7H), 5.05 - 4.94 (m, 4H), 4.37 - 4.14 (m, 2H), 1.51 (s, 1H), 1.46 (s, 2H), 1.34 (s, 2H), 1.32 (s, 1H).

단계 7. ((3aS,4S,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메틸 디벤질 포스페이트의 2개의 이성체의 제조



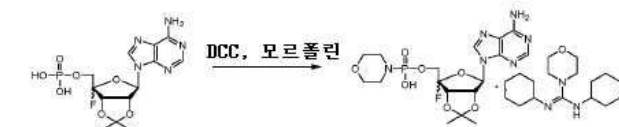
상기 단계 6으로부터 수득된 2개의 이성체(1.10 g, 1.45 mmol)를  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$ (20 mL, 7M) 속에 용해하였다. 반응 혼합물을 25°C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고 이를 실리카 겔 컬럼(석유 에테르:에틸 아세테이트=1:0 내지 0:1에 이어  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ =10:2)으로 정제하여 목적한 이성체(710 mg, 수율: 77.5%, 92.7% 순도)를 담황색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>=586.1.

단계 8. ((3aS,4S,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메틸 디하이드로젠 포스페이트의 2개의 이성체의 제조



t-BuOH(20 mL) 및  $\text{H}_2\text{O}$ (20 mL) 중 상기 단계 7로부터 수득된 2개의 이성체(600 mg, 1.02 mmol)의 혼합물을  $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (300 mg, 427.23  $\mu\text{mol}$ , 20%) 및  $\text{Pd/C}$ (50 mg, 1.02 mmol, 10%)와 혼합한 다음, 반응 혼합물을 25°C에서 16시간 동안  $\text{N}_2$  대기(45 psi)하에 교반하였다. 여과하고 여액을 농축시켜 목적한 이성체(200 mg, 조 화합물)를 담황색 고체로서 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.26 - 8.17 (m, 2H), 6.59 - 6.46 (m, 1H), 5.68 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.57 - 5.45 (m, J = 11.7 Hz, 1H), 5.37 - 5.30 (m, 1H), 4.21 - 4.06 (m, 2H), 1.80 - 1.52 (m, 3H), 1.49 - 1.35 (m, 3H).

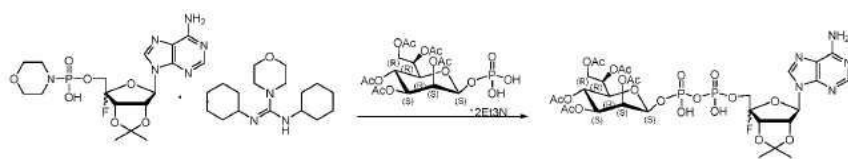
단계 9. ((3aS,4S,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-2,2-디메틸테트라하이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메틸 하이드로젠 모르폴리노포스포네이트 DCC 모르폴린 염의 제조



t-BuOH(10 mL) 중 DCC(407 mg, 1.97 mmol)의 용액을  $\text{H}_2\text{O}$ (10 mL) 및 t-BuOH(10 mL) 중 상기 단계 8로부터 수득된 2개의 이성체(200 mg, 493  $\mu\text{mol}$ ) 및 모르폴린(171 mg, 1.97 mmol)의 용액에 80 내지 90°C에서 적가하였다. 용액을 80 내지 90°C에서 16시간 동안  $\text{N}_2$  하에 교반하였다. 반응물을 실온으로 냉각시키고 용매를 제거하여 잔사를 수득하였다. 잔사를  $\text{H}_2\text{O}$ (10 mL) 속에 용해하고 TBME(10 mL x 2)로 추출하고, 수성 상을 감압하에 농축시켜 목적한 이성체(310 mg, 조 화합물)를 담황색 고체로서 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.41 - 8.17 (m, 2H), 6.70 - 6.50 (m, 1H), 5.81 - 5.68 (m, 1H), 5.62 - 5.46 (m, 1H), 5.42 - 5.28 (m, 1H), 4.34 - 4.09 (m, 1H), 4.07 - 4.00 (m, 1H), 3.88 - 3.74 (m, 5H), 3.73 - 3.55 (m, 2H), 3.51 - 3.22 (m, 8H), 3.07 - 3.02 (m, 1H), 2.96 - 2.91 (m, 1H), 2.87 - 2.78 (m, 2H), 1.90 (br s, 4H), 1.81 - 1.70 (m, 4H), 1.68 - 1.57 (m, 5H), 1.51 - 1.44 (m, 3H), 1.39 - 1.26 (m, 8H), 1.19 - 1.08 (m, 2H).

단계 10. (2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((3aS,6R,6aR)-6-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-4-플루오로-2,2-디메틸테트라하

이드로푸로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 2개의 이성체의 제조



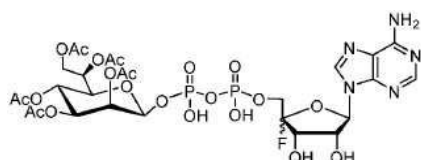
상기 단계 9로부터 수득된 2개의 이성체(310 mg, 403  $\mu$ mol) 및 상기 화합물 1의 제조시 단계 14로부터의 생성물(226 mg, 322  $\mu$ mol)을 무수 피리딘(10 mL x 3) 위에서 건조시켰다. 혼합물을 피리딘(15 mL)으로 용해시켰다. 1H-테트라졸(94.2 mg, 1.35 mmol)을 가하고 25°C에서 72시간 동안 교반하였다. 용매를 제거하여 잔사를 수득하였다. 잔사를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(DCM:MeOH(2%  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  포함) = 1:0 내지 1:1)로 정제하여 조 목적 생성물(170 mg, 조 화합물)을 백색 고체로서 수득하였다. 조 생성물(60 mg)을 제조-HPLC(컬럼: Waters Xbridge 150\*25 5 $\mu$ ; 이동상: [물 (10mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )-ACN]; B%: 0%-35%, 10분)로 정제하여 **이성체 1**(17 mg) 및 **이성체 2**(7 mg)를 수득하였다.

이성체 1:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.24 - 8.11 (m, 2 H), 6.46 (s, 1 H), 5.41 (dd, J = 11.7, 6.6 Hz, 1 H), 5.35 - 5.23 (m, 2 H), 5.19 (d, J = 6.4 Hz, 1 H), 5.09 - 4.85 (m, 3 H), 4.26 - 3.97 (m, 3 H), 3.91 (dd, J = 12.1, 7.2 Hz, 1 H), 3.77 (br d, J = 9.8 Hz, 1 H), 1.98 (s, 3 H), 1.91 (s, 3 H), 1.89 (s, 3 H), 1.82 (s, 3 H), 1.78 (s, 3 H), 1.47 (s, 3 H), 1.25 (s, 3 H).

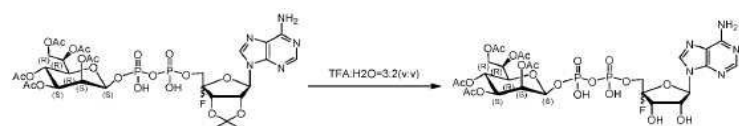
이성체 2:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.24 - 8.07 (m, 2 H), 6.50 - 6.36 (m, 1 H), 5.57 (d, J = 5.6 Hz, 1 H), 5.47 - 5.24 (m, 2 H), 5.23 - 5.13 (m, 1 H), 5.09 - 4.85 (m, 4 H), 4.24 - 4.10 (m, 2 H), 4.03 (dd, J = 12.0, 7.1 Hz, 1 H), 3.80 (dd, J = 10.0, 2.7 Hz, 1 H), 1.98 (s, 3 H), 1.95 (s, 3 H), 1.93 (s, 3 H), 1.84 (s, 3 H), 1.77 (s, 3 H), 1.44 (s, 3 H), 1.27 (s, 3 H).

화합물 20

(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2S,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2-플루오로-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트



단계 1. 화합물 (2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-2-플루오로-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조

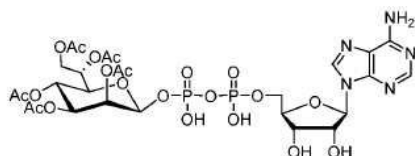


TFA(0.6 mL) 및  $\text{H}_2\text{O}$ (0.4 mL) 중 상기 화합물 19의 제조의 단계 10으로부터 수득된 2개의 이성체(80.0 mg, 90.1  $\mu$ mol)의 용액을 25°C에서 0.5 시간 동안 교반하였다. 혼합물을  $\text{Et}_3\text{N}$ 를 사용하여 pH = 7로 조절하고 농축시켜 조 생성물을 수득하였다. 조 생성물을 제조-HPLC(컬럼: Waters Xbridge 150\*25 5 $\mu$ ; 이동상: [물 (10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )-ACN]; B%: 0%-35%, 9분)로 정제하여 하나의 이성체(10 mg, 11.8  $\mu$ mol, 13.1% 수율)를 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ ) $^+$ : 848.2  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 메탄올- $d_4$ )  $\delta$  8.37 (s, 1 H), 8.13 (s, 1 H), 6.26 (br s, 1 H),

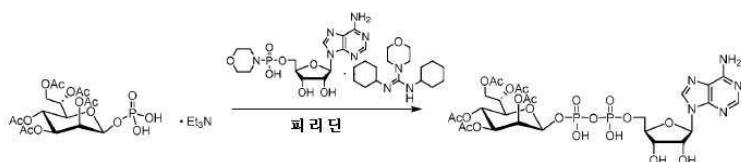
5.55 - 5.37 (m, 2 H), 5.08 (br s, 3 H), 4.86 - 4.70 (m, 1H), 4.44 (d, J = 5.8 Hz, 1 H), 4.32 (br d, J = 12.0 Hz, 1 H), 4.23 - 4.04 (m, 3 H), 3.84 (br s, 1 H), 3.22 - 3.16 (m, 7 H), 2.01 (s, 3 H), 1.93 (s, 3 H), 1.88 (s, 3 H), 1.80 (s, 3 H), 1.72(s, 3 H).  $^{19}\text{F}$   $\delta$ -123.7,  $^{31}\text{P}$   $\delta$ -13.22 및 -15.21.

#### 화합물 21

(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((S)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트



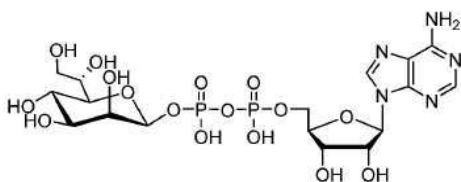
단계 1. (2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((S)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



화합물 (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((S)-1,2-디아세톡시에틸)-6-(포스포노옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트 트리메틸아민 염(200 mg, 399.72  $\mu\text{mol}$ ; Inuki et al. Org. Lett. 2017, 19, 3079-3082; Zamyatina et al. Carbohydrate Research (2003), 338: 2571-2589) 및 화합물 AMP-모르폴리데이트(4'-모르폴린-N,N'-디사이클로헥실카복사아미디늄 염)(360 mg, 864.71  $\mu\text{mol}$ )의 혼합물을 피리딘(5 mL x 3) 속에서 건조시켰다. 이후에 잔사를 피리딘(5 mL) 속에 재용해시켰다. 1H-테트라졸(100 mg, 1.43 mmol)을 가하였다. 용액을 30℃에서 24시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 하에 제거하였다. 잔사를 MeOH(5 mL) 속에 용해하였다. 고체를 여과 제거하였다. 여액을 수집하고 농축시켰다. 잔사를 컬럼(DCM:(MeOH:NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O 50:1) = 1:0 ~ 1:1.2)으로 정제하여 조 생성물을 수득하고 이를 제조-HPLC(컬럼: Waters Xbridge 150\*25 5u; 이동상: [물 (10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%: 0%-35%, 10분)로 정제하여 목적한 화합물(68 mg, 수율: 20.24%)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 830.2.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.59 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.08 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.62 - 5.57 (m, 1H), 5.55 - 5.47 (m, 1H), 5.28 - 5.22 (m, 1H), 5.19 - 5.12 (m, 2H), 4.65 - 4.57 (m, 1H), 4.49 - 4.39 (m, 2H), 4.33 - 4.15 (m, 4H), 3.94 - 3.84 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.89 (s, 3H).

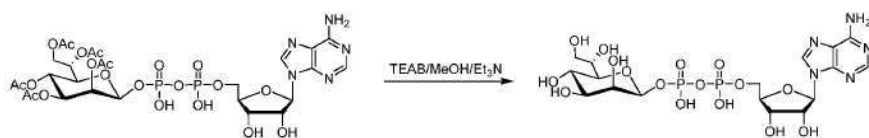
#### 화합물 22

아데노신-5'-(L-글리세로- $\beta$ -D-만노헵토피라노실) 디포스페이트





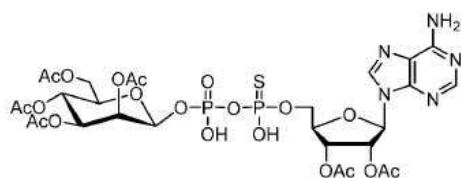
단계 1. 아데노신-5'-(L-글리세로-β-D-만노헵토피라노실)디포스페이트의 제조



2 mL의 (0.1 M TEAB(8 mL), MeOH(6 mL) 및 TEA(0.1 mL) 중 상기 화합물 21의 제조시 단계 1의 생성물의 화합물 (14.4 mg, 17.36 μmol)을 -20℃에서 56시간 동안 교반하였다. 용액을 진공하에 동결 건조시켜 목적한 화합물을 트리메틸아민 염(8 mg, 수율: 30.51%)으로서, 백색 점성 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  (M-H)<sup>+</sup>: 617.9. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.30 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 6.00 - 5.92 (m, 1H), 5.04 - 4.99 (m, 1H), 4.58 - 4.54 (m, 1H), 4.25 - 4.33 (m, 1H), 4.23 - 4.15 (m, 1H), 4.09 - 3.97 (m, 3H), 3.91 - 3.85 (m, 1H), 3.76 - 3.67 (m, 1H), 3.55 - 3.42 (m, 3H), 3.17 - 3.10 (m, 1H), 3.00 - 2.94 (m, 14H), 1.08 - 1.03 (m, 22H).

화합물 23

(2R,3R,4S,5S,6S)-2-(아세톡시메틸)-6-((((((2R,3R,4R,5R)-3,4-디아세톡시-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트

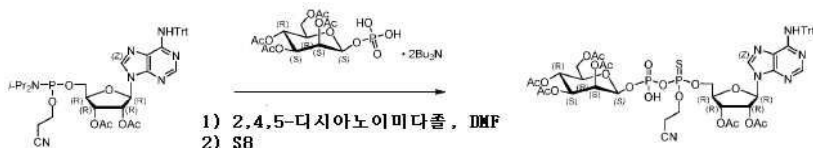


단계 1. ((2-시아노에톡시)((((2R,3R,4R,5R)-3,4-디아세톡시-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)포스포닐)디프로필아민의 제조



CH<sub>3</sub>CN(1.5 mL) 중 1*H*-테트라졸(71 mg, 1.01 mmol)을 DCM(7.5 mL) 중 상기 화합물 7의 제조시 단계 7의 화합물 (300 mg, 0.51 mmol) 및 3-비스(다이소프로필아미노)포스포닐옥시프로판트릴(304 mg, 1.01 mmol, 320 μL)의 용액에 N<sub>2</sub> 대기하에 0℃에서 적가하였다. 수득되는 혼합물을 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 여과하고 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 컬럼(PE: EA = 1:0 내지 1:1)으로 정제하여 목적한 화합물(80 mg, 수율: 19.0%, 89% 순도)을 무색 오일로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 711.1 (가수분해된 덩어리).

단계 2. (2R,3R,4S,5S,6S)-2-(아세톡시메틸)-6-((((((2-시아노에톡시)((((2R,3R,4R,5R)-3,4-디아세톡시-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



4,5-디시아노이미다졸(24 mg, 203 μmol)을 DMF(3 mL) 중 상기 단계 1의 생성물의 화합물(80 mg, 0.10 mmol)

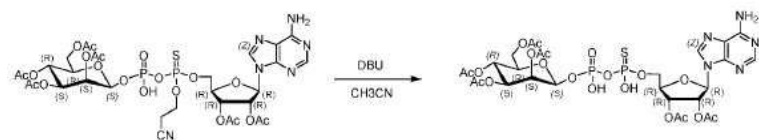
및 화합물 5의 제조시 단계 4의 생성물의 화합물(121 mg, 151  $\mu\text{mol}$ )의 용액에  $\text{N}_2$  대기하에 가하였다. 수득되는 혼합물을  $25^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 교반하였다. 이후에 황(5 mg, 151  $\mu\text{mol}$ )을 가하였다. 수득되는 혼합물을  $25^\circ\text{C}$ 에서 다른 0.5 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 제조-HPLC(컬럼: Waters Xbridge 150\*25 5u; 이동상: [물 (10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )-ACN]; B%: 38%-64.25%, 7분)로 직접 정제하여 목적한 화합물(23 mg, 수율: 15.8%, 80% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>: 1153.5.

단계 3. 화합물 (2R,3R,4S,5S,6S)-2-(아세톡시메틸)-6-((((2-시아노에톡시) (((2R,3R,4R,5R)-3,4-디아세톡시-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



TFA(616 mg, 5.40 mmol, 0.4 mL)를 디옥산(0.6 mL) 중 상기 단계 2의 생성물의 화합물(5 mg, 4.34  $\mu\text{mol}$ )의 용액에 가하였다. 수득되는 혼합물을  $40^\circ\text{C}$ 에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 에틸 아세테이트(10 mL)로 희석시키고, 포화된  $\text{NaHCO}_3$ (10 mL)로 세척하였다. 유기 상을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고, 여과하고 감압하에 농축시켜 화합물 G-3(6 mg, 조 화합물)을 담황색 시럽으로서 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>: 909.9.

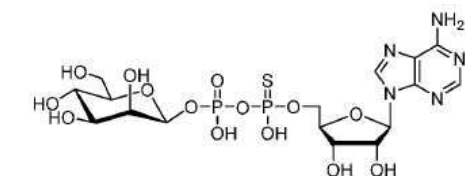
단계 4. 화합물 (2R,3R,4S,5S,6S)-2-(아세톡시메틸)-6-((((((((2R,3R,4R,5R)-3,4-디아세톡시-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



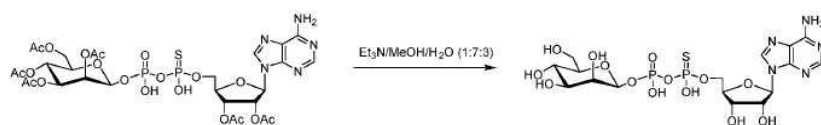
DBU(3.30 mg, 21.7  $\mu\text{mol}$ , 3.3  $\mu\text{L}$ )를  $\text{CH}_3\text{CN}$ (0.5 mL) 중 상기 단계 3의 화합물(5 mg, 4.34  $\mu\text{mol}$ )의 용액에 가하였다. 수득되는 혼합물을  $25^\circ\text{C}$ 에서 0.5 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 에틸 아세테이트(10 mL)로 희석시키고, 1N HCl(10 mL)로 세척하였다. 유기 상을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고, 여과하고 감압하에 농축시켜 목적한 조 화합물(7 mg)을 담황색 시럽으로서 수득하고, 이를 제조-HPLC(컬럼: Boston Green ODS 150\*30 5u; 이동상: [물(0.075%TFA)-ACN]; B%: 30%-50%, 7.5분)로 정제하여 목적한 화합물을 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>: 858.5.

화합물 24

아데노신-(5'-(만노즈-피라노실)(하이드록시)포스포로티오일옥시)포스페이트



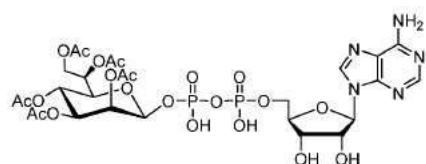
단계 1. 아데노신-(5'-(만노즈-피라노실)(하이드록시)포스포티오일옥시)포스페이트의 제조



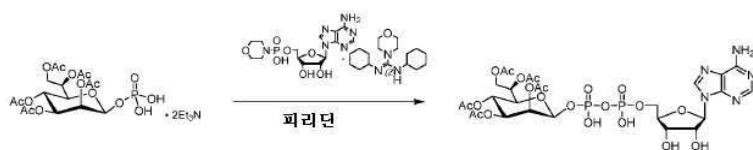
상기 화합물 23의 제조시 단계 4의 생성물의 화합물의 용액을 7:3:1 비의 MeOH/물/Et<sub>3</sub>N 용액 속에 용해하고 25℃에서 10시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 농축시키고 물로부터 동결건조시켜 목적한 화합물을 수득하였다.

화합물 25

(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포틸)옥시)(하이드록시)포스포틸)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트



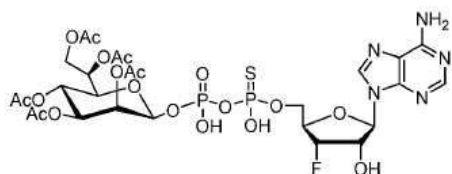
단계 1. (2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포틸)옥시)(하이드록시)포스포틸)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



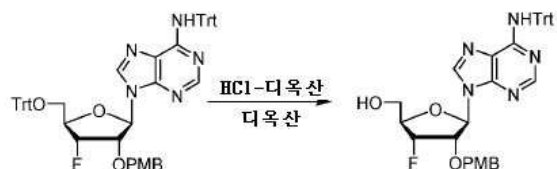
상기 화합물 1의 제조시 단계 14의 생성물의 화합물(220 mg, 439.70 μmol) 및 AMP-모르폴리테이트(4'-모르폴린-N,N'-디사이클로헥실카복스아미디늄 염)(549.2 mg, 1.32 mmol)의 혼합물을 피리딘(5 mL x 3) 속에서 건조시켰다. 이후에 잔사를 피리딘(5 mL) 속에 재용해하고, 1H-테트라졸(154.01 mg, 2.20 mmol)을 가하였다. 용액을 30℃에서 48시간 동안 교반하였다. 용매를 진공하에 제거하였다. 잔사를 MeOH(10 mL) 속에 용해하였다. 고체를 여과 제거하였다. 여액을 수집하고 농축시켰다. 잔사를 컬럼(DCM: (MeOH:NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O = 50:1) = 1:0 ~ 1.2:1)으로 정제하여 조 생성물(140 mg)을 수득하고, 이를 제조-HPLC 컬럼: Waters Xbridge 150\*25 5u; 이동상: [물 (10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%: 0%-35%, 10분)로 재-정제하여 목적한 화합물(50 mg, 수율 13.6%)을 백색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 메탄올-d<sub>4</sub>) δ 8.58 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 6.07 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.53 - 5.56 (br. s, 2H), 5.16-5.22 (m, 3H), 4.60 - 4.63 (m, 1H), 4.40 - 4.46 (m, 2H), 4.19 - 4.24 (m, 4H), 3.87 - 3.89 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.04 2.03 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.92 (s, 3H). MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 830.4.

화합물 26

(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4S,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3-플루오로-4-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포티오일)옥시)(하이드록시)포스포틸)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트

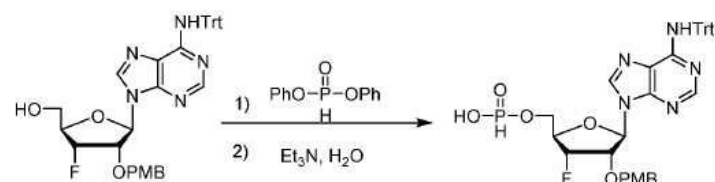


단계 1. 화합물 ((2R,3R,4S,5R)-3-플루오로-4-((4-메톡시벤질)옥시)-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메탄올의 제조



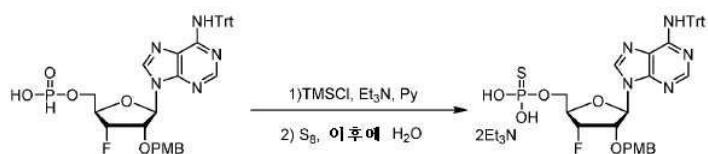
디옥산(100 mL) 중 실시예 1에서 단계 5의 생성물의 화합물(4.1 g, 4.6 mmol)의 혼합물에 HCl-디옥산(4 M, 10 mL)을 적가하였다. 혼합물을 26℃에서 30분 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 EA(500 mL)로 희석시키고 포화된  $\text{NaHCO}_3$ (100 mL x 3) 및 염수(100 mL x 3)로 세척하였다. 유기 층을 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  위에서 건조시키고, 여과하고 감압하에 농축시켜 잔사를 수득하였다. 잔사를 컬럼 크로마토그래피(PE:EA = 1:0 내지 1:1)로 정제하여 목적한 화합물(1.8 g, 수율: 60.7%)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 646.1. <sup>1</sup>H NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.42 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.34 - 7.19 (m, 15H), 7.03 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 6.74 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 6.06 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 5.58 - 5.52 (m, 1H), 5.46 - 5.22 (m, 1H), 4.98 - 4.89 (m, 1H), 4.57 - 4.26 (m, 4H), 3.70 (s, 3H), 3.63 - 3.60 (m, 2H).

단계 2. 화합물 ((2R,3R,4S,5R)-3-플루오로-4-((4-메톡시벤질)옥시)-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메틸 하이드로젠 포스포네이트의 제조



피리딘(6 mL) 중 상기 단계 1의 생성물의 화합물(1.8 g, 2.8 mmol)의 용액에 페녹시포스포노일옥시벤젠(1.65 mL, 8.6 mmol)을 가하였다. 혼합물을 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 이후에, TEA(1.45 g, 14.37 mmol, 2 mL) 및  $\text{H}_2\text{O}$ (515  $\mu\text{L}$ , 28.5 mmol)를 혼합물에 가하였다. 혼합물을 25℃에서 다른 0.5 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 감압하에 농축시켰다. 조 생성물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(DCM:MeOH = 20:1 내지 10:1, 0.5%  $\text{Et}_3\text{N}$ 를 가함)로 정제하여 목적한 화합물(2 g, 수율: 90%)을 담황색 오일로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 696.2.

단계 3. 화합물 0-(((2R,3R,4S,5R)-3-플루오로-4-((4-메톡시벤질)옥시)-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메틸) 0,0-디하이드로젠 포스포로티오에이트 트리에틸 아민 염의 제조



피리딘(5 mL) 및  $\text{Et}_3\text{N}$ (5 mL) 중 상기 단계 2의 생성물의 화합물(2 g, 2.8 mmol)의 용액에 TMSCl(1.82 mL, 14.3

mmol)을 15분에 걸쳐  $N_2$  대기하에 교반하였다. 혼합물을 0℃에서 다른 45분 동안 교반한 다음, 황(555 mg, 17.3 mmol)을 가하였다. 혼합물을 0℃에서 다른 45분 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응물을  $H_2O$ (10 mL)로 퀀칭시키고 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 크로마토그래피(DCM:MeOH = 20:1 내지 10:1, 0.5%  $Et_3N$ 를 첨가함)로 정제하여 목적한 화합물(900 mg, 수율 43%)을 황색 시럽으로서 수득하였다.

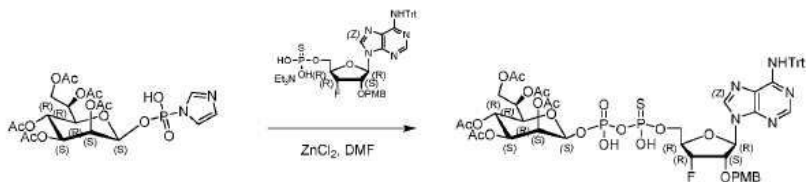
MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 728.3.  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.60 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.37 - 7.23 (m, 15H), 7.08 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.75 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.05 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.60 - 5.35 (m, 1H), 5.14 - 4.96 (m, 1H), 4.63 - 4.34 (m, 3H), 4.11 - 3.82 (m, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.12 - 2.89 (m, 12H), 1.19 (t, J=7.3 Hz, 18H).

단계 4. 화합물 (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-디아세톡시에틸)-6-(((하이드록시(1H-이미다졸-1-일)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



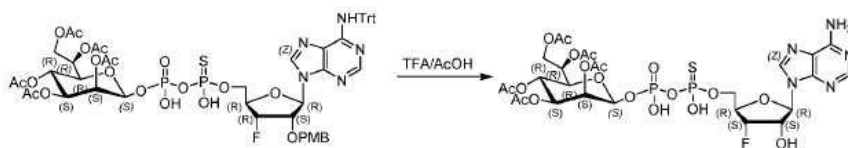
CDI(943 mg, 5.8 mmol)를 무수 DMF(15 mL) 중 실시예 1에서 단계 14의 생성물의 화합물(350 mg, 581.8  $\mu$ mol,  $Et_3N$ 의 용액에  $N_2$  대기하에 가하였다. 수득되는 혼합물을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, MeOH(0.28 mL)를 가하여 반응물을 퀀칭시키고, 혼합물을 감압하에 농축시켜 목적한 화합물(1 g, 조 화합물)을 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다.

단계 5. 화합물 (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-디아세톡시에틸)-6-((((((((2R,3R,4S,5R)-3-플루오로-4-((4-메톡시벤질)옥시)-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포틸)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



$ZnCl_2$ (1.1 g, 8.2 mmol)을 무수 DMF(10 mL) 중 상기 단계 4의 생성물의 화합물(380 mg, 690.4  $\mu$ mol) 및 상기 단계 3의 생성물의 화합물(580 mg, 699.7  $\mu$ mol)의 용액에  $N_2$  대기하에 가하였다. 수득되는 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 컬럼(DCM:MeOH = 10:1, 0.5%  $Et_3N$ 를 가함)으로 정제하여 목적한 화합물(350 mg, 수율: 40%)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 1210.5

단계 6. 화합물 (2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((((2R,3S,4S,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3-플루오로-4-하이드록시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포틸)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



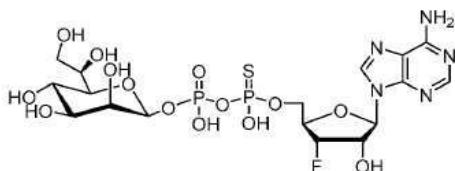
DCM(1 mL) 및 TFA(0.2 mL, 2.7 mmol) 중 상기 단계 5의 생성물의 화합물(350 mg, 289  $\mu$ mol)의 용액을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을  $Et_3N$ 을 가함으로써 pH = 7로 조정하였다. 반응물을 감

압하에 농축시켰다. 생성물을 제조-HPLC(물 (10mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )-ACN]; B%: 0%-30%, 10분)로 정제하여 목적한 화합물 (70 mg, 수율 39.9%)을 백색 고체로서 수득하였다.

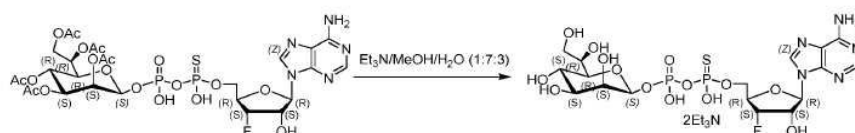
MS (ESI)  $m/z$  ( $M+H$ )<sup>+</sup>: 848.2 <sup>1</sup>H NMR (400MHz, MeOD)  $\delta$  8.83 (s, 0.5H), 8.75 (s, 0.5H), 8.20 (s, 1H), 6.27 - 6.06 (m, 1H), 5.76 - 5.61 (m, 2H), 5.30 - 5.16 (m, 3H), 5.09 - 4.93 (m, 2H), 4.60 - 4.12 (m, 5H), 3.97 - 3.95 (m, 1H), 2.15 (s, 1.5H), 2.14 (s, 1.5H), 2.08 - 2.04 (m, 6H), 2.02 (s, 1.5H), 2.00 (s, 1.5H), 1.95 (s, 1.5H), 1.94 (s, 1.5H).

화합물 27

아데노신-3'-플루오로-5'-(D-글리세로-β-D-만노-헵토피라노실) (하이드록시)포스포로티오일옥시포스페이트



단계 1. 아데노신-3'-플루오로-5'-(D-글리세로-β-D-만노-헵토피라노실) (하이드록시)포스포로티오일옥시포스페이트

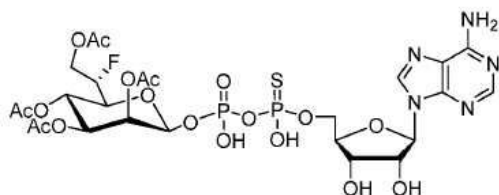


MeOH/물/ $\text{Et}_3\text{N}$ (7:3:1, 1.1 mL)의 용액 중 실시예 26에서 단계 6의 생성물의 화합물(10 mg, 11.8  $\mu\text{mol}$ )을 20℃에서 5시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 농축시키고 물로부터 동결건조시켜 목적한 화합물을 트리메틸아민 염(8 mg, 수율 91.8%)으로서 백색 고체로 수득하였다.

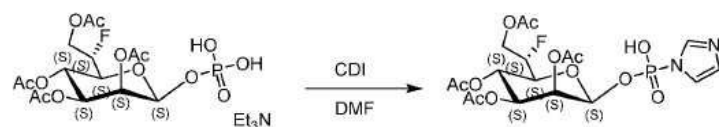
MS (ESI)  $m/z$  ( $M-H$ )<sup>-</sup>: 636.0. <sup>1</sup>H NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.67 - 8.49 (m, 1H), 8.15 (s, 1H), 6.16 - 6.02 (m, 1H), 5.45 - 5.18 (m, 1H), 4.97 - 4.82 (m, 1H), 4.32 - 4.18 (m, 1H), 4.15 - 3.87 (m, 4H), 3.75 - 3.53 (m, 5H), 3.44 - 3.35 (m, 1H), 2.97 (q,  $J = 7.2$  Hz, 12H), 1.12 (t,  $J = 7.2$  Hz, 18H).

화합물 28

(2S,3S,4S,5S,6S)-2-((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)-6-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로피란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트

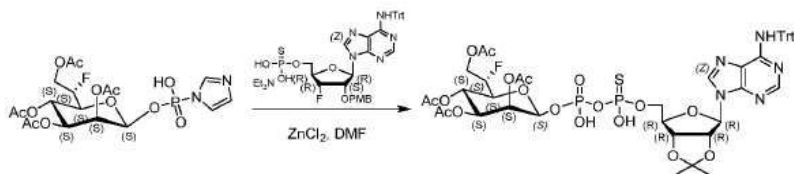


단계 1. 화합물 (2S,3S,4S,5S,6S)-2-((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)-6-((하이드록시(1H-이미다졸-1-일)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



DMF(8 mL) 중 실시예 3에서 단계 12의 생성물의 화합물(420 mg, 748.01  $\mu$ mol,  $\text{Et}_3\text{N}$ )의 혼합물에 CDI(1.2 g, 7.5 mmol)를 가하였다. 혼합물을 25°C에서 4시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, MeOH(0.3 mL)를 가하여 반응물을 퀀칭시키고, 혼합물을 감압하에 농축시켜 목적한 화합물(1.3 g, 조 화합물)을 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다.

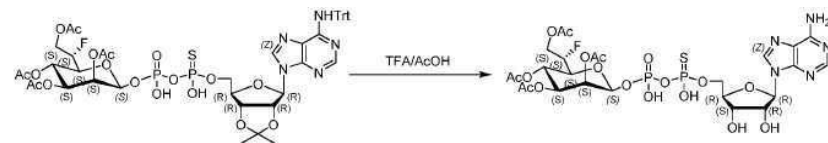
단계 2. 화합물 (2S,3S,4S,5S,6S)-2-((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)-6-((((((3aR,4R,6R,6aR)-2,2-디메틸-6-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로프로[3,4-d][1,3]디옥솔-4-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



$\text{ZnCl}_2$ (1.2 g, 8.5 mmol)를 무수 DMF(10 mL) 중 상기 단계 1의 생성물의 화합물(1.3 g, 2.6 mmol) 및 실시예 26에서 단계 3의 생성물의 화합물(530 mg, 709  $\mu$ mol,  $\text{Et}_3\text{N}$ )의 용액에  $\text{N}_2$  대기하에 가하였다. 수득되는 혼합물을 25°C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 컬럼(DCM:MeOH = 20:1, 1%  $\text{Et}_3\text{N}$ 를 가함)으로 정제하여 목적한 화합물(380 mg, 수율: 47.5%)을 백색 고체로서 수득하였다.

MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 1088.7.

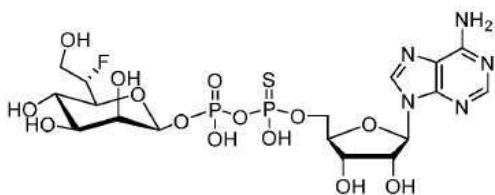
단계 3. 화합물 (2S,3S,4S,5S,6S)-2-((S)-2-아세톡시-1-플루오로에틸)-6-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디하이드록시테트라하이드로피란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



TFA(0.6 mL, 8.10 mmol)를  $\text{H}_2\text{O}$ (0.4 mL) 중 상기 단계 2에서 수득된 화합물(370 mg, 340.1  $\mu$ mol)의 용액에 가하였다. 혼합물을 25°C에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 반응물은  $\text{Et}_3\text{N}$ 를 가하여 pH = 7로 조정하였다. 혼합물을 감압하에 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 제조-HPLC(컬럼: Waters Xbridge 150\*25 5 $\mu$ ; 이동상: [물 (10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )-ACN]; B%: 0%-30%, 10분)로 정제하여 목적한 화합물(44.5 mg, 수율: 16.0%, 98.5% 순도)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 806.1.  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.68 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.11 - 6.09 (m, 1H), 5.72 - 5.57 (m, 2H), 5.37 - 5.32 (m, 1H), 5.22 - 5.20 (m, 1H), 4.77 - 4.73 (m, 1H), 4.69 - 4.60 (m, 2H), 4.52 - 4.45 (m, 2H), 4.26 - 4.24 (m, 3H), 3.91-3.83 (m, 1H), 2.13(s, 3H), 2.03(s, 3H), 2.02(s, 3H), 1.92(s, 3H).

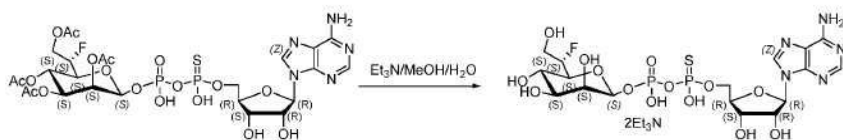
화합물 29

아데노신-5'-(L-글리세로- $\beta$ -D-만노-6-플루오로-헵토피라노실)(하이드록시)포스포로티오일옥시포스페이트



단계 1. 화합물 아데노신-5'-(L-글리세로- $\beta$ -D-만노-6-플루오로-헵토피라노실)(하이드록시)포스포로티오일옥시

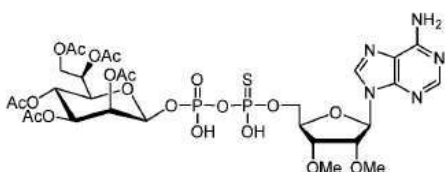
# 포스페이트의 제조



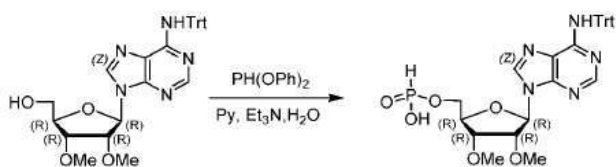
MeOH/물/ $\text{Et}_3\text{N}$ (7:3:1, 2 mL)의 용액 중 실시예 28에서 단계 3의 생성물의 화합물(16.1 mg, 10.0  $\mu\text{mol}$ )의 용액을 25℃에서 3.5 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 농축시키고 물로부터 동결건조시켜 목적한 화합물(14.3 mg, 수율: 85.2%,  $2\text{Et}_3\text{N}$ )을 백색 무정형 고체로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>+</sup>: 636.1. <sup>1</sup>H NMR (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.47 (s, 0.3H), 8.43 (s, 0.7H), 8.07 (s, 0.7H), 8.06 (s, 0.3H), 5.98 - 5.95 (m, 1H), 5.41 - 5.11(m, 1H), 4.86 - 4.73 (m, 1H), 4.39 - 4.37 (m, 1H), 4.26 - 4.24 (m, 1H), 4.12 - 4.10 (m, 2H), 4.00 - 3.94(m, 1H), 3.83 - 3.64 (m, 4H), 3.54 - 3.51(m, 1H), 3.33 - 3.21(m, 1H), 3.02 (q, J = 7.2Hz, 12H), 1.10 (t, J = 7.2Hz, 18H).

## 화합물 30

(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디메톡시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포틸)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트

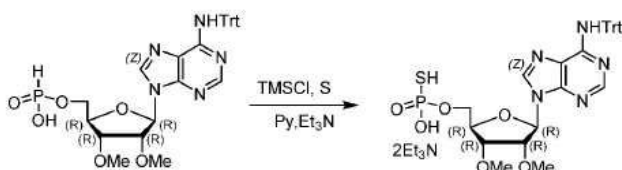


단계 1. 화합물 ((2R,3R,4R,5R)-3,4-디메톡시-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메틸 하이드로젠 포스포네이트의 제조



$\text{PH}(\text{OPh})_2$ (1.35 g, 5.75 mmol)를 피리딘(10 mL) 중 실시예 13에서 단계 2의 생성물의 화합물(1 g, 1.86 mmol)의 용액에 가하였다. 수득되는 혼합물을 25℃에서 2시간 동안 교반하였다. 이후에,  $\text{Et}_3\text{N}$ (1.33 mL, 9.52 mmol) 및  $\text{H}_2\text{O}$ (0.37 mL, 20.42 mmol)를 가하였다. 수득되는 혼합물을 25℃에서 0.5 시간 동안 교반하였다. 용매를 제거하여 조 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 크로마토그래피(DCM:MeOH=1:0 내지 10:1, 0.5%  $\text{Et}_3\text{N}$ 를 가함)로 정제하여 목적한 화합물(1.5 g, 수율: 94.7%,  $\text{Et}_3\text{N}$ )을 담황색 오일로서 수득하였다. MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>: 602.1.

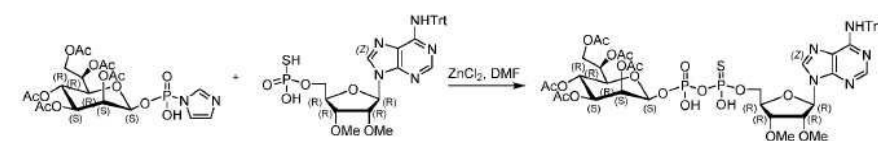
단계 2. 화합물 0-(((2R,3R,4R,5R)-3,4-디메톡시-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메틸) 0,5-디하이드로젠 포스포티오에이트의 제조





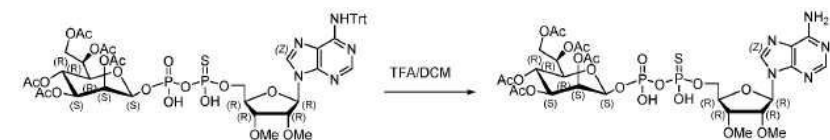
TMSCl(2.00 mL, 15.7 mmol)을 피리딘(15 mL) 및 Et<sub>3</sub>N(15 mL) 중 상기 단계 1의 생성물의 화합물(1.3 g, 1.85 mmol, Et<sub>3</sub>N)에 가하였다. 혼합물을 25℃에서 0.5 시간 동안 교반한 다음 황(758 mg, 23.6 mmol)을 가하였다. 수득되는 혼합물을 다른 1시간 동안 교반하였다. 이후에 H<sub>2</sub>O(3.79 mL, 210 mmol)를 가하였다. 혼합물을 다른 0.5 시간 동안 교반하였다. 반응물을 여과하고 여액을 농축시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 크로마토그래피 컬럼(DCM:MeOH=1:0 내지 10:1, 0.5% Et<sub>3</sub>N을 가함)으로 정제하였다. 목적한 화합물(400 mg, 수율: 33.1%, 2Et<sub>3</sub>N)을 황색 오일로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 634.1. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.37 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.40 - 7.35 (m, 2H), 7.34 - 7.27 (m, 8H), 7.23 - 7.15 (m, 5H), 6.14 - 6.05 (m, 1H), 4.49 - 4.42 (m, 1H), 4.37 - 4.28 (m, 2H), 4.24 - 4.10 (m, 2H), 3.45 - 3.41 (m, 6H), 3.03 (q, J = 7.2 Hz, 12H), 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 18H).

단계 3. 화합물 (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-디아세톡시에틸)-6-(((((((2R,3R,4R,5R)-3,4-디메톡시-5-(6-(트리틸아미노)-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



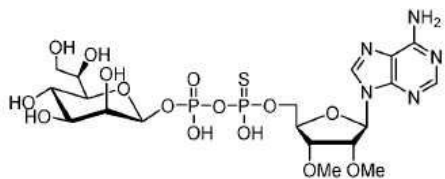
ZnCl<sub>2</sub>(516 mg, 3.79 mmol)를 DMF(10 mL) 중 실시예 26에서 단계 4의 생성물의 화합물(191 mg, 293 μmol, Et<sub>3</sub>N) 및 상기 단계 2의 생성물의 화합물(400 mg, 315 μmol)의 용액에 가하였다. 혼합물을 25℃에서 24시간 동안 Ar 대기하에 교반하였다. 용매를 제거하여 조 생성물을 수득하였다. 잔사를 실리카 겔 크로마토그래피 컬럼(DCM:MeOH = 1:0 내지 10:1, 1% Et<sub>3</sub>N를 가함)으로 정제하였다. 목적한 화합물(400 mg, 수율: 95.4%)을 무색 오일로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 1116.5.

단계 4. 화합물 (2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-(아미노-9H-푸린-9-일)-3,4-디메톡시테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포로티오일)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)-6-((R)-1,2-디아세톡시에틸)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조

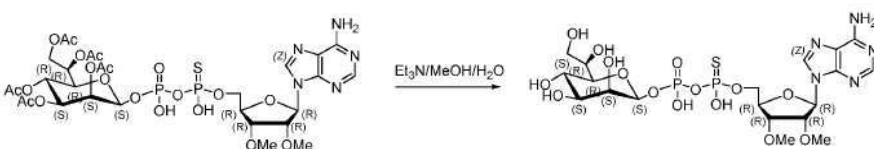


DCM(5 mL) 중 상기 단계 3의 생성물의 화합물(400 mg, 358 μmol)과 TFA(1 mL)의 혼합물을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 Et<sub>3</sub>N을 사용하여 pH = 7로 조정하고, 용매를 제거하고 잔사를 제로-HPLC(Waters Xbridge 150\* 25 5u, 물 (10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>CN, 0~30%)로 정제하여 목적한 화합물(20 mg, 수율: 6.4%)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 874.2. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.77 (s, 0.4H), 8.71 (s, 0.6H), 8.17 (s, 1H), 6.18 - 6.12 (m, 1H), 5.76 - 5.59 (m, 2H), 5.21 - 5.13 (m, 3H), 4.61 - 4.53 (m, 2H), 4.45 - 4.32 (m, 3H), 4.27 - 4.20 (m, 2H), 3.95 - 3.90 (m, 1H), 3.51 (s, 3H), 3.42 (s, 1.4H), 3.41 (s, 1.6H), 2.11(s, 3H), 2.06 - 2.02 (m, 6H), 1.99 (s, 1.6H), 1.97 (s, 1.4H), 1.91 (s, 3H).  
화합물 31

아데노신-2'3'-디메톡시-5'-(D-글리세로-β-D-만노헵토피라노실) (하이드록시)포스포로티오일옥시포스페이트



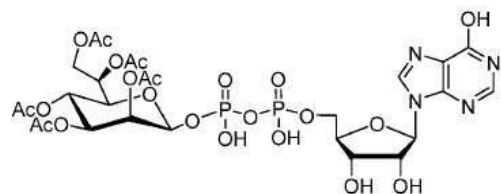
단계 1. 화합물 아데노신-2'3'-디메톡시-5'-(D-글리세로-β-D-만노헵토피라노실) (하이드록시)포스포로티오일옥시포스페이트의 제조



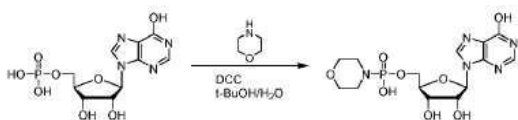
MeOH(0.7 mL), H<sub>2</sub>O(0.3 mL) 및 Et<sub>3</sub>N(0.1 mL) 중 실시예 30에서 단계 4의 생성물의 화합물(8 mg, 9.16 μmol)의 혼합물을 15 내지 20℃에서 3시간 동안 교반하였다. 이후에, 용액을 동결 건조기 속에서 동결건조시켰다. 목적한 화합물(6 mg, 수율: 76%, 2Et<sub>3</sub>N)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI) m/z (M-H)<sup>-</sup> = 662.1. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.47 (s, 0.4H), 8.45 (s, 0.6H), 8.10 (s, 1H), 6.02 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 5.13 - 5.05 (m, 1H), 4.50 - 4.42 (m, 2H), 4.40 - 4.36 (m, 1H), 4.28 - 4.19 (m, 1H), 4.20 - 4.10 (m, 2H), 4.00 - 3.92 (m, 1H), 3.85 - 3.80 (m, 1H), 3.59 - 3.55 (m, 2H), 3.52 - 3.41 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.27 (s, 3H), 3.02 (q, J = 7.3 Hz, 12H), 1.10 (t, J = 7.3 Hz, 18H).

화합물 32

(2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-디아세톡시에틸)-6-((((((2R,3S,4R,5R)-3,4-디하이드록시-5-(6-하이드록시-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트

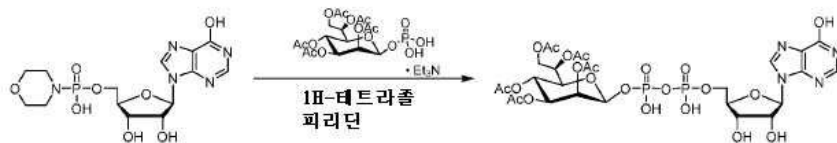


단계 1. 화합물 ((2R,3S,4R,5R)-3,4-디하이드록시-5-(6-하이드록시-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메틸 하이드로겐 모르폴리노포스포네이트의 제조



t-BuOH(6 mL) 중 DCC(1.19 g, 5.74 mmol)를 t-BuOH(6 mL) 및 H<sub>2</sub>O(6 mL) 중 화합물 ((2R,3S,4R,5R)-3,4-디하이드록시-5-(6-하이드록시-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메틸 디하이드로겐 포스페이트(500 mg, 1.44 mmol) 및 모르폴린(500 mg, 5.74 mmol)의 환류된 용액(110℃)에 N<sub>2</sub> 하에 가하였다. 용액을 110℃에서 N<sub>2</sub> 하에 12시간 동안 교반하였다. 혼합물이 완료된 후, 용액을 20℃로 냉각시키고, 고체를 여과 제거하였다. 여액을 수집하고, 유기 용매를 진공하에 제거하였다. 잔사를 H<sub>2</sub>O(10 mL)로 희석시키고, TBME(20 mL x 3)로 세척하였다. 수성 상을 수집하고 진공하에 농축시켜 목적한 화합물을 DCC 염(810 mg, 조 화합물)으로서 및 담황색 오일로서 수득하고, 이를 추가의 정제없이 다음 단계를 위해 직접 사용하였다.

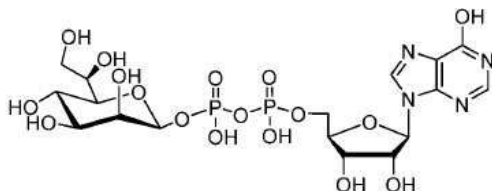
단계 2. 화합물 (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-디아세톡시에틸)-6-((((((2R,3S,4R,5R)-3,4-디하이드록시-5-(6-하이드록시-9H-푸린-9-일)테트라하이드로푸란-2-일)메톡시)(하이드록시)포스포릴)옥시)(하이드록시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-3,4,5-트리일 트리아세테이트의 제조



상기 단계 1의 생성물의 화합물(250 mg, 500  $\mu$ mol) 및 실시예 14에서 단계 14의 화합물(810 mg, 1.94 mmol)을 피리딘(5 mL x 3)과 함께 건조시켰다. 잔사를 무수 피리딘(5 mL) 속에 용해시키고, 1H-테트라올(175 mg, 2.50 mmol)을 가하였다. 용액을 20℃에서 12시간 동안 교반하였다. 이후에, 용액을 30℃ 이하로 가온시키고 12시간 동안 계속 교반하였다. 용매를 진공하에 제거하였다. 잔사를 EtOH(20 mL) 속에 용해하였다. 고체를 여과제거하였다. 여액을 수집하고 진공하에 농축시켰다. 잔사를 실리카 겔 컬럼(DCM: (MeOH:NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O = 50:1) = 1:0 내지 1:1.2)으로 정제하여 조 생성물(80 mg)을 수득하고, 이를 제조-HPLC(컬럼: Waters Xbridge 150\*25 5 $\mu$ ; 이동상: [물 (10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%: 0%-30%, 10분)로 재정제하여 목적한 화합물(20 mg, 수율: 4.82%)을 백색 고체로 수득하였다. MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 831.4. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.53 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 6.07 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5.48 - 5.47 (m, 1H), 5.34 - 5.32 (m, 1H), 5.22 - 5.19 (m, 3H), 4.66 - 4.58 (m, 1H), 4.47 - 4.43 (m, 2H), 4.25 - 4.19 (m, 4H), 3.89 - 3.88 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.92 - 1.90 (m, 3H).

#### 화합물 33

이노신-5'-(D-글리세로- $\beta$ -D-만노헵토피라노실) 디포스페이트

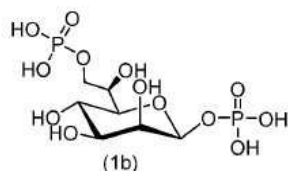


단계 1. 화합물 이노신-5'-(D-글리세로- $\beta$ -D-만노헵토피라노실) 디포스페이트의 제조

2 mL의 (0.1 M TEAB(8 mL), MeOH(6 mL) 및 TEA(0.1 mL) 중 상기 실시예 32에서 단계 2의 생성물의 화합물을 -20℃에서 2일 동안 교반하였다. 용액을 진공하에 동결 건조시켜 목적한 화합물을 트리메틸아민 염으로서 수득하였다.

#### HBP의 전구약물

화학식 1b로 하기 나타낸 HBP는 매우 친수성이며, 이는 분자가 세포질성 단백질인, ALPK1에 도달하기 위해 세포막을 침투하는 것을 어렵게 한다.



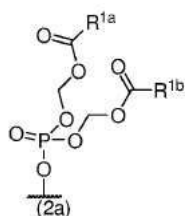
따라서, 본 개시내용은 혈장막의 침투를 가능하도록 하기 위해 조정된 HBP의 다양한 전구약물을 제공한다. 구현예에서, 전구약물은 HBP의 포스페이트 모이어티(moiety) 중 하나 이상에서 하나 이상의 생분해성 보호 그룹을 포함한다. 구현예에서, 하나 이상의 생분해성 보호 그룹은 에스테르 연결을 통해 HBP의 하나 이상의 포스페이트 모이어티에 연결된다. 이러한 방식으로 부착될 수 있는 예시적인 보호 그룹은 예를 들면, 카보닐옥시메틸(예컨대, POM, POC), 사이클로살리게닐(예컨대, cycloSal), 사이클릭 1-아릴-1,3-프로판일 에스테르(예컨대,

HepDirect), 아릴옥시 아미노산 포스포르아미데이트 또는 포스폰아미데이트(예컨대, ProTide), 및 메틸아릴 할로알킬아미데이트를 포함한다. 추가의 예는 S-아실-2-티오에틸(SATE), S-[(2-하이드록시에틸)설퍼딜]-2-티오에틸(DTE), 알킬옥시알킬(예컨대, HDP, ODE), 아미노산 포스포르아미데이트 또는 포스폰아미데이트 모노에스테르, 비스(아미노산) 포스포르아미데이트 또는 포스폰아미데이트, 및 디- 또는 트리-포스포네이트를 포함한다.

#### 제I형: 카보닐옥시메틸

카보닐옥시메틸은 포스페이트 보호 그룹의 부류이다. 일부 구현예에서, 카보닐옥시메틸 보호 그룹은 화학식 2a를 갖는다:

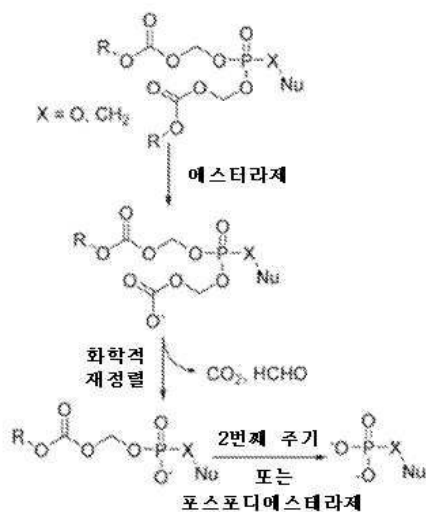
[화학식 2a]



여기서  $R^{1a}$  및  $R^{1b}$ 는 각각 독립적으로  $C_{1-12}$  알킬 또는  $C_{1-12}$  알콕시이고, 파선은 분자의 나머지에 대한 부착점을 나타낸다. 일부 구현예에서,  $R^{1a}$  및  $R^{1b}$ 는 각각 독립적으로  $C_{1-8}$  알킬 또는  $C_{1-8}$  알콕시이다.

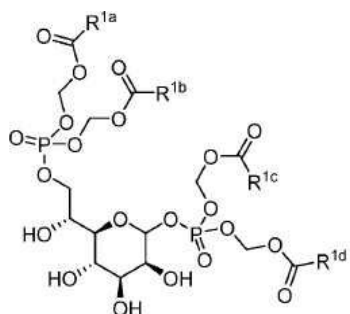
어떠한 특수 이론에 얽매이지 않고, 카보닐옥시메틸 모이어티에 의해 보호된 포스페이트 그룹은 하기 반응식 I에 기술된 일련의 화학적 전환을 통해 생체내에서 탈보호되는 것으로 여겨진다.

[반응식 I]



일부 구현예에서, HBP의 전구약물은 화학식 3a를 갖는다:

[화학식 3a]



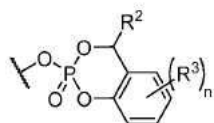
여기서  $R^{1a}$ ,  $R^{1b}$ ,  $R^{1c}$ , 및  $R^{1d}$ 는 각각 독립적으로  $C_{1-12}$  알킬 또는  $C_{1-12}$  알콕시이다. 일부 구현예에서,  $R^{1a}$ ,  $R^{1b}$ ,  $R^{1c}$ , 및  $R^{1d}$ 는 각각 독립적으로  $C_{1-8}$  알킬 또는  $C_{1-8}$  알콕시이다.

HBP의 카보닐옥시메틸 전구약물은 문헌: Hwang, Y. and Cole, P. A. Organic Letters 2004, 6, 1555; Inuki, S. et al., Fujimoto, Y. Organic Letters 2017, 19, 3079에 기술된 방법, 또는 유사한 방법을 사용하여 제조할 수 있다.

#### 제II형: 사이클로살리게닐(사이클로Sal)

사이클로살리게닐(사이클로Sal)은 포스페이트 보호 그룹의 부류이다. 일부 구현예에서, 사이클로Sal 보호 그룹은 화학식 2b를 갖는다:

[화학식 2b]

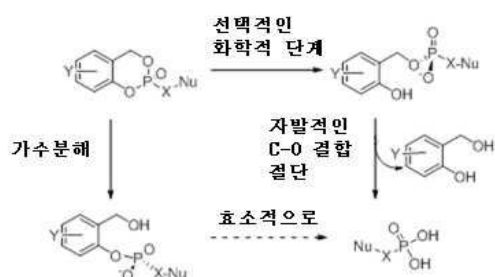


상기식에서

$R^2$ 는 H,  $C_{1-8}$  알킬, 또는 할로겐이고;  $R^3$ 은 H,  $C_{1-8}$  알킬, 또는 할로겐이며; 첨자 n은 1 내지 3의 정수이고; 파선은 분자의 나머지에 대한 부착점을 나타낸다. 일부 구현예에서,  $R^2$ 는 H 또는  $C_{1-8}$  알킬이다. 일부 구현예에서,  $R^3$ 은  $C_{1-8}$  알킬이다. 일부 구현예에서, 첨자 n은 1이다.

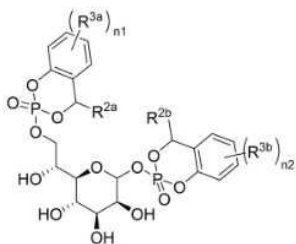
어떠한 특수 이론에 얽매이지 않고, 하나 이상의 사이클로Sal 모이어티에 의해 보호된 포스페이트 그룹은 하기 반응식 II에 기술된 하나 이상의 경로를 통해 생체내에서 탈보호된다.

#### [반응식 II]



일부 구현예에서, HBP의 전구약물은 화학식 3b를 갖는다:

[화학식 3b]



여기서  $R^{2a}$  및  $R^{2b}$ 는 각각 독립적으로 H,  $C_{1-8}$  알킬, 또는 할로젠이고;  $R^{3a}$  및  $R^{3b}$ 는 각각 독립적으로 H,  $C_{1-8}$  알킬, 또는 할로젠이며; 첨자 n1 및 n2는 각각 독립적으로 1 내지 3의 정수이다. 일부 구현예에서,  $R^{2a}$  및  $R^{2b}$ 는 각각 독립적으로 H 또는  $C_{1-8}$  알킬이다. 일부 구현예에서,  $R^{3a}$  및  $R^{3b}$ 는 각각 독립적으로  $C_{1-8}$  알킬이다. 일부 구현예에서, 첨자 n1 및 n2는 각각 1이다.

HBP의 사이클로Sal 전구약물은 문헌:

Spáčilová, P. *et al.*, *ChemMedChem* 2010, 5, 1386; Inuki, S. *et al.*, *Organic Letters* 2017, 19,

3079

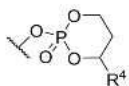
에 기술된 방법, 또는 유

사한 방법을 사용하여 제조할 수 있다.

제III형: 사이클릭 1-아릴-1,3-프로판닐 에스테르(HepDirect)

사이클릭 1-아릴-1,3-프로파닐 에스테르(HepDirects)는 포스페이트 보호 그룹의 부류이다. 일부 구현예에서, HepDirect 보호 그룹은 화학식 2c를 갖는다:

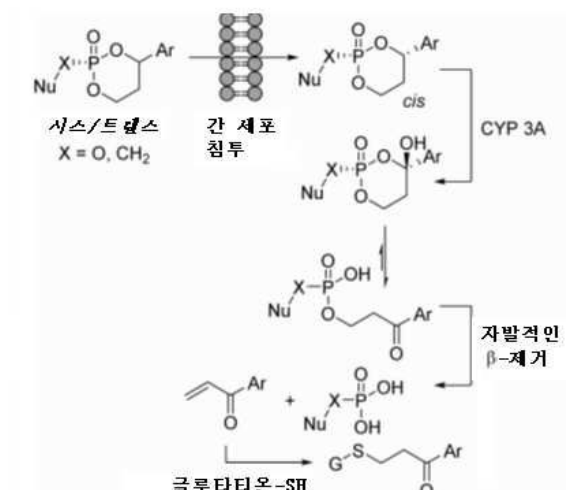
[화학식 2c]



여기서  $R^4$ 는 아릴 또는 5- 또는 6-원 헤테로아릴이고, 여기서 헤테로아릴 그룹은 O, N, 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자 환 정점을 갖고; 파선은 분자의 나머지에 대한 부착점을 나타낸다. 일부 구현예에서,  $R^4$ 는 아릴 또는 6-원 헤테로아릴이다. 일부 구현예에서  $R^4$ 는 페닐 또는 피리딜이다.

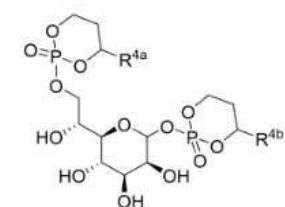
어느 특수한 이론에 얽매이지 않고도, HepDirect 모이어티에 의해 보호된 포스페이트 그룹은 하기 반응식 III에 기술된 경로를 통해 생체내에서 탈보호된다.

[반응식 III]



일부 구현예에서, HBP의 전구약물은 화학식 3c를 갖는다:

[화학식 3c]



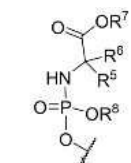
여기서  $R^{4a}$  및  $R^{4b}$ 는 각각 독립적으로 아릴 또는 5- 또는 6-원 헤테로아릴이고, 헤테로아릴 그룹은 O, N, 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자 정점을 가진다. 일부 구현예에서,  $R^{4a}$  및  $R^{4b}$ 는 각각 독립적으로 아릴 또는 6-원 헤테로아릴이다. 일부 구현예에서  $R^{4a}$  및  $R^{4b}$ 는 각각 독립적으로 페닐 또는 피리딜이다.

HBP의 HepDirect 전구약물은 문헌: Reddy, K. R. et al., Tetrahedron Letters 2005, 46, 4321; Inuki, S. et al., Organic Letters 2017, 19, 3079에 기술된 방법, 또는 유사한 방법을 사용하여 제조할 수 있다.

제IV형: 아릴옥시 아미노산 아미데이트(프로타이드(Protide))

아릴옥시 아미노산 아미데이트(프로타이드)는 포스페이트 보호 그룹의 부류이다. 일부 구현예에서 펩타이드 보호 그룹은 화학식 2d를 갖는다:

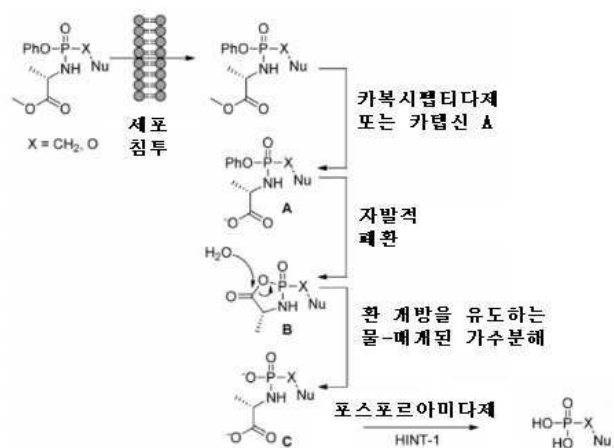
[화학식 2d]



여기서  $R^5$  및  $R^6$ 는 각각 독립적으로 H 또는 C<sub>1-8</sub> 알킬이고;  $R^7$ 은 C<sub>1-8</sub> 알킬이며;  $R^8$ 은 아릴이고; 파선은 분자의 나머지 부분에 대한 부착점을 나타낸다. 일부 구현예에서,  $R^7$ 은 메틸 또는 이소프로필이다. 일부 구현예에서,  $R^8$ 은 페닐이다.

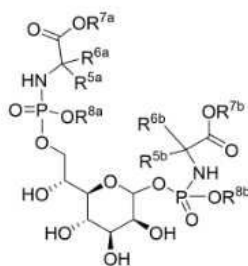
어떠한 특수한 이론에 얽매이지 않고도, 펩타이드 모이어티에 의해 보호된 포스페이트 그룹은 하기 반응식 IV에 기술된 경로를 통해 생체내에서 탈보호된다.

[반응식 IV]



일부 구현예에서, HBP의 전구약물은 화학식 3d를 갖는다:

[화학식 3d]



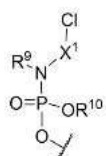
여기서  $R^{5a}$ ,  $R^{5b}$ ,  $R^{6a}$ , 및  $R^6$ 은 각각 독립적으로 H 또는  $C_{1-8}$  알킬이고;  $R^{7a}$  및  $R^{7b}$ 는 각각 독립적으로  $C_{1-8}$  알킬이며;  $R^{8a}$  및  $R^{8b}$ 는 각각 독립적으로 아릴이다. 일부 구현예에서,  $R^{7a}$  및  $R^{7b}$ 는 각각 독립적으로 메틸 또는 이소프로필이다. 일부 구현예에서,  $R^{8a}$  및  $R^{8b}$ 는 각각 페닐이다.

HBP의 펩타이드 전구약물은 문헌: van Boom, J. H. et al., Tetrahedron 1975, 31, 2953; Inoue, J.-i. and Fujimoto, Y. Organic Letters 2017, 19, 3079에 기술된 방법, 또는 유사한 방법을 사용하여 제조할 수 있다.

제V형: 메틸아릴 할로알킬아미데이트

메틸아릴 할로알킬아미데이트는 포스페이트 보호 그룹의 부류이다. 일부 구현예에서 메틸아릴 할로알킬아미데이트 보호 그룹은 화학식 2e를 갖는다:

[화학식 2e]



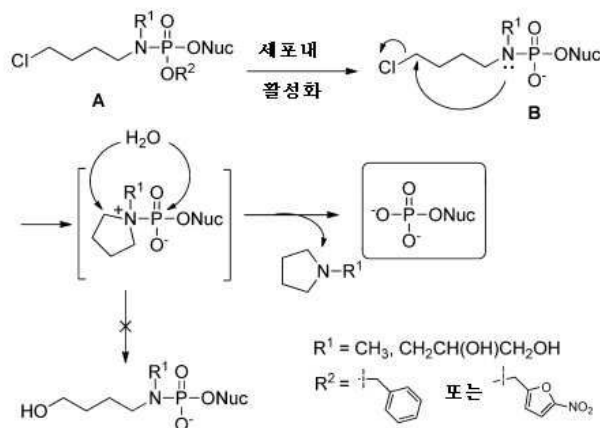
상기식에서  $R^9$ 은  $C_{1-8}$  알킬이고;  $X^1$ 은  $C_{3-5}$  알킬렌이며;  $R^{10}$ 은 아릴, 헤테로아릴, 아릴 $C_{1-4}$ 알킬렌, 또는 헤테로아릴  $C_{1-4}$ 알킬렌이고, 헤테로아릴 그룹은 O, N, 및 S로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자 환경 점을 갖는 5 또는 6원 환이다. 일부 구현예에서,  $R^9$ 은  $C_{1-4}$  알킬이다. 일부 구현예에서,  $X^1$ 은  $C_4$  알킬렌이다. 일부 구현예에서,  $R^{10}$ 은 아릴 또는 아릴 $C_{1-4}$ 알킬렌이다. 일부 구현예에서,  $R^{10}$ 은 페닐이다. 일부 구현예에서,  $R^{10}$ 은



벤질이다.

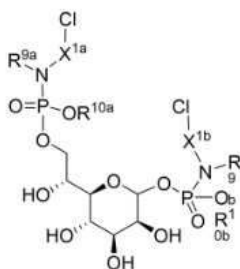
어떠한 특수 이론에 얽매이지 않고도, 메틸아릴 할로알킬아미데이트 모이어티에 의해 보호된 포스페이트 그룹은 하기 반응식 V에 기술된 일련의 화학적 전환을 통해 생체내에서 탈보호된다.  $R^9$  및  $R^{10}$ 에 대해 정의된 그룹은 예시적이며 제한되는 것으로 의도되지 않음이 이해된다.

[반응식 V]



일부 구현예에서, HBP의 전구약물은 화학식 3e를 갖는다:

[화학식 3e]

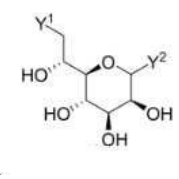


여기서  $R^9$  및  $R^{10}$ 는 각각 독립적으로  $C_{1-8}$  알킬이고;  $X^{1a}$  및  $X^{1b}$ 는 각각 독립적으로  $C_{3-5}$  알킬렌이며;  $R^{10a}$  및  $R^{10b}$ 는 각각 독립적으로 아릴, 헤테로아릴, 아릴 $C_{1-4}$ 알킬렌, 또는 헤테로아릴 $C_{1-4}$ 알킬렌이고, 헤테로아릴 그룹은 O, N 및 S로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자 환 정점을 갖는 5 또는 6원 환이다. 일부 구현예에서,  $R^{9a}$  및  $R^{9b}$ 는 각각 독립적으로  $C_{1-4}$  알킬이다. 일부 구현예에서,  $X^{1a}$  및  $X^{1b}$ 는 각각 독립적으로  $C_4$  알킬렌이다. 일부 구현예에서,  $R^{10a}$  및  $R^{10b}$ 는 각각 독립적으로 아릴 또는 아릴 $C_{1-4}$ 알킬렌이다. 일부 구현예에서,  $R^{10a}$  및  $R^{10b}$ 는 각각 독립적으로 페닐이다. 일부 구현예에서,  $R^{10a}$  및  $R^{10b}$ 는 각각 독립적으로 벤질이다.

HBP의 메틸아릴 할로알킬아미데이트 전구약물은 문헌: Wu, W. et al., Journal of Medicinal Chemistry 2007, 50, 3743; Inoue, J.-i. and Fujimoto, Y. Organic Letters 2017, 19, 3079에 기술된 방법, 또는 유사한 방법을 사용하여 제조할 수 있다.

당해 분야의 기술자는 HBP의 2개의 포스페이트 모이어티 각각은 상기 기술된 방법을 사용하여 제I형 내지 제V형 보호 그룹 중 어느 것으로 독립적으로 보호할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, HBP의 보호 그룹은 화학식 3으로 나타낸다:

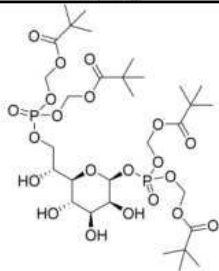
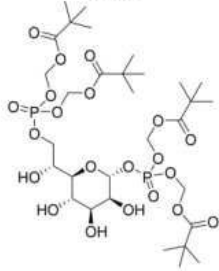
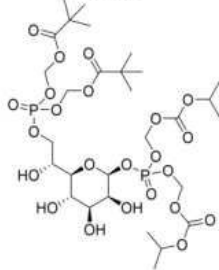
[화학식 3]

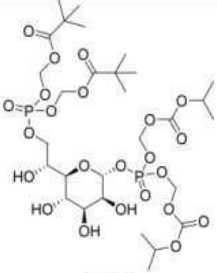
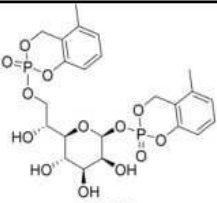
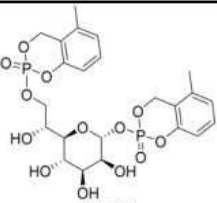
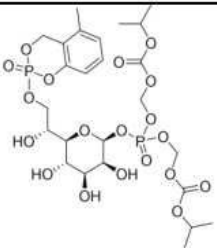


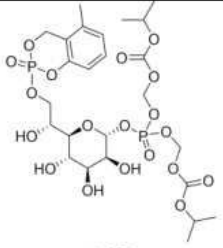
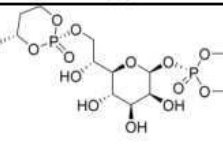
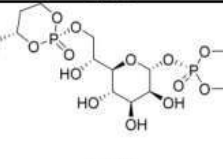
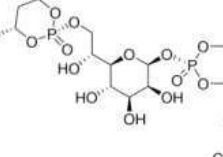
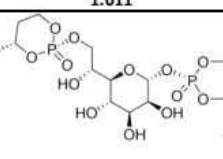
여기서 Y<sup>1</sup> 및 Y<sup>2</sup>는 각각 독립적으로 포스페이트, 화학식 2a, 화학식 2b, 화학식 2c, 화학식 2d, 또는 화학식 2e의 화합물이고, 단 Y<sup>1</sup> 및 Y<sup>2</sup>는 둘 다 포스페이트는 아니다.

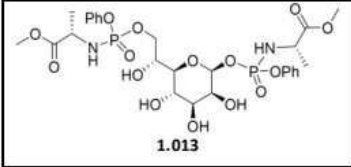
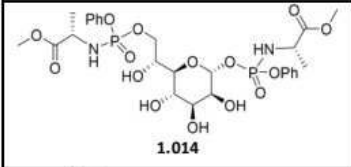
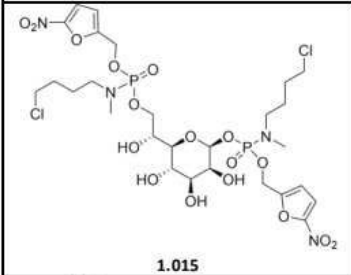
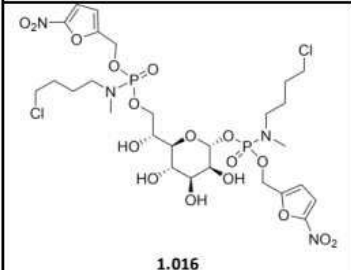
일부 구현예에서 HBP의 전구약물은 표 1의 화합물이다.

[표 1]

화합물	화학명
 1.001	(R)-2-((2R,3S,4S,5S,6S)-6-((비스(피발옥시메톡시)포스포릴)옥시)-3,4,5-트리하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-일)-2-하이드록시에틸 비스(피발옥시메틸) 포스페이트
 1.002	(R)-2-((2R,3S,4S,5S,6R)-6-((비스(피발옥시메톡시)포스포릴)옥시)-3,4,5-트리하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-일)-2-하이드록시에틸 비스(피발옥시메틸) 포스페이트
 1.003	(R)-2-((2R,3S,4S,5S,6S)-6-((비스(메틸이소프로필카보네이트)메틸포스포릴)옥시)-3,4,5-트리하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-일)-2-하이드록시에틸 비스(피발옥시메틸) 포스페이트

 <p>1.004</p>	<p>(R)-2-((2R,3S,4S,5S,6R)-6-((비스(메틸이소프로필카보네이트)메틸포스포릴)옥시)-3,4,5-트리하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-일)-2-하이드록시에틸비스(피발옥시메틸) 포스페이트</p>
 <p>1.005</p>	<p>2-((2R)-2-하이드록시-2-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-트리하이드록시-6-(5-메틸-2-옥시도-4H-벤조[d][1,3,2]다옥사포스피닌-2-일)옥시)테트라하이드로-2H-피란-2-일)에톡시)-5-메틸-4H-벤조[d][1,3,2]다옥사포스피닌 2-옥사이드</p>
 <p>1.006</p>	<p>2-((2R)-2-하이드록시-2-((2R,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-트리하이드록시-6-(5-메틸-2-옥시도-4H-벤조[d][1,3,2]다옥사포스피닌-2-일)옥시)테트라하이드로-2H-피란-2-일)에톡시)-5-메틸-4H-벤조[d][1,3,2]다옥사포스피닌 2-옥사이드</p>
 <p>1.007</p>	<p>2-((2R)-2-하이드록시-2-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-트리하이드록시-6-((비스(메틸이소프로필카보네이트)메틸포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-2-일)에톡시)-5-메틸-4H-벤조[d][1,3,2]다옥사포스피닌 2-옥사이드</p>

 <p>1.008</p>	<p>2-((2R)-2-하이드록시-2-((2R,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-트리하이드록시-6-((비스(메틸이소프로필카보네이트)메틸포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-2-일)에톡시)-5-메틸-4H-벤조[d][1,3,2]다옥사포스피린 2-옥사이드</p>
 <p>1.009</p>	<p>(2R,4S)-2-((R)-2-하이드록시-2-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-트리하이드록시-6-(((2R,4R)-2-옥시도-4-(피리딘-4-일)-1,3,2-다옥사포스피란-2-일)옥시)테트라하이드로-2H-피란-2-일)에톡시)-4-(피리딘-4-일)-1,3,2-다옥사포스피란 2-옥사이드</p>
 <p>1.010</p>	<p>(2R,4S)-2-((R)-2-하이드록시-2-((2R,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-트리하이드록시-6-(((2R,4R)-2-옥시도-4-(피리딘-4-일)-1,3,2-다옥사포스피란-2-일)옥시)테트라하이드로-2H-피란-2-일)에톡시)-4-(피리딘-4-일)-1,3,2-다옥사포스피란 2-옥사이드</p>
 <p>1.011</p>	<p>(2R,4R)-4-(3-클로로페닐)-2-(((2S,3S,4S,5S,6R)-6-((R)-2-((2R,4S)-4-(3-클로로페닐)-2-옥시도-1,3,2-다옥사포스피란-2-일)옥시)-1-하이드록시에틸)-3,4,5-트리하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)-1,3,2-다옥사포스피란 2-옥사이드</p>
 <p>1.012</p>	<p>(2R,4R)-4-(3-클로로페닐)-2-(((2R,3S,4S,5S,6R)-6-((R)-2-((2R,4S)-4-(3-클로로페닐)-2-옥시도-1,3,2-다옥사포스피란-2-일)옥시)-1-하이드록시에틸)-3,4,5-트리하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)-1,3,2-다옥사포스피란 2-옥사이드</p>

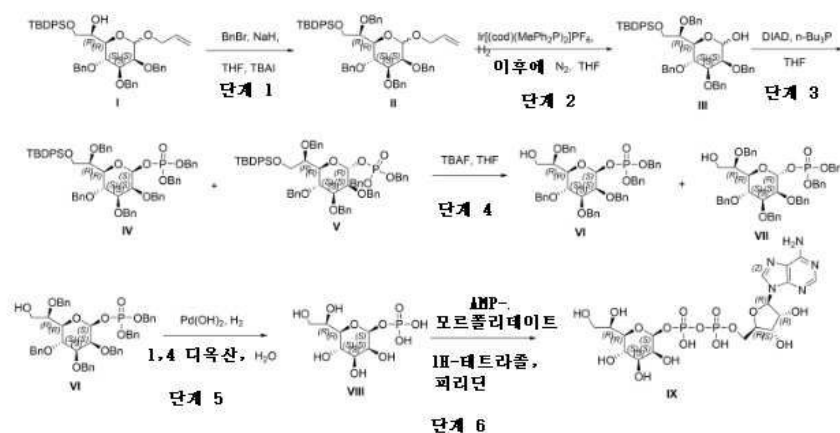
 <p>1.013</p>	<p>메틸 (((2R)-2-하이드록시-2-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-트라이하이드록시-6-(((S)-1-메톡시-1-옥소프로판-2-일)아미노)(페녹시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-2-일)에톡시(페녹시)포스포릴)-L-알라니네이트</p>
 <p>1.014</p>	<p>메틸 (((2R)-2-하이드록시-2-((2R,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-트라이하이드록시-6-(((S)-1-메톡시-1-옥소프로판-2-일)아미노)(페녹시)포스포릴)옥시)테트라하이드로-2H-피란-2-일)에톡시(페녹시)포스포릴)-L-알라니네이트</p>
 <p>1.015</p>	<p>(2R)-2-((2R,3S,4S,5S,6S)-6-(((4-클로로부틸)(메틸)아미노)(5-니트로푸란-2-일)메톡시)포스포릴)옥시)-3,4,5-트라이하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-일)-2-하이드록시에틸 ((5-니트로푸란-2-일)메틸) (4-클로로부틸)(메틸)포스포르아미데이트</p>
 <p>1.016</p>	<p>(2R)-2-((2R,3S,4S,5S,6R)-6-(((4-클로로부틸)(메틸)아미노)(5-니트로푸란-2-일)메톡시)포스포릴)옥시)-3,4,5-트라이하이드록시테트라하이드로-2H-피란-2-일)-2-하이드록시에틸 ((5-니트로푸란-2-일)메틸) (4-클로로부틸)(메틸)포스포르아미데이트</p>

## H1b-ADP 및 HMP-1bP의 합성

D-글리세로-D-만노-헵토즈-1β-ADP("H1b-ADP", 화합물 IX) 및 D-글리세로-D-만노-헵토즈-1β-P(HMP-1bP, 화합물 VIII)

H1b-ADP의 합성은 화합물 I로부터 진행되었으며, 이는 문헌: Inuki, et al., Organic Letters (2017), 19: 3079-3082에 따라 합성되었다. 하기 화합물 IX는 문헌: Zamyatina et al., Angewandte Chemie, Int' l Ed. (2000), 39(22): 4150-4153에 따라 합성하였다.

[합성식]

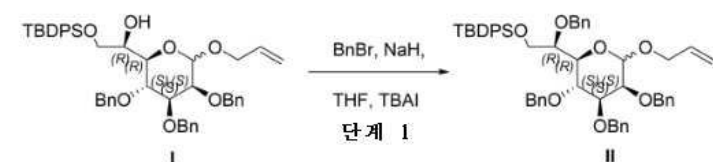


모든 습윤-민감성 반응을 Ar 하에 주사기-격막 캡 기술(syringe-septum cap technique)을 사용하여 수행하였다. 분석적 박층 크로마토그래피(TLC)를 실리카 겔 60 F 254 플레이트(Qindao, 0.25 mm 두께) 상에서 수행하였다.

<sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼을 Varian-400 분광기를 사용하여 기록하고, 화학적 이동(chemical shift)은 내부 테트라메틸실

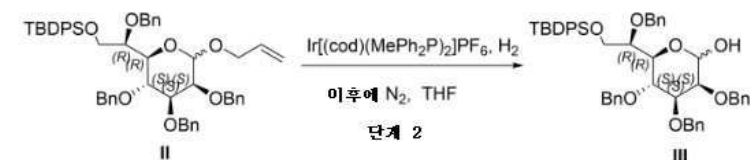
란 또는 중수소화된 용매의 잔류 양성자에 대해 상대적인 값(ppm)으로 기록하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼을 Varian-400 분광기를 사용하여 기록하고, 화학적 이동은 내부 테트라메틸실란 또는 중수소화된 용매의 잔류 양성자에 대해 상대적인  $\delta$  (ppm) 값으로 기록하였다.  $^{31}\text{P}$ -NMR 스펙트럼은 Varian-400 분광기를 사용하여 기록하였고, 화학적 이동은 외부 85% 인산에 대해 상대적인  $\delta$  (ppm) 값으로 기록하였다.  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼은 다음과 같이 표로 작성하였다: 화학적 이동, 다중도(br = 광범위, s = 단일선, d = 이중선, t = 삼중선, q = 사중선, m = 다중선), 양성자의 수, 및 커플링 상수(들).

단계 1. 화합물 II의 합성:



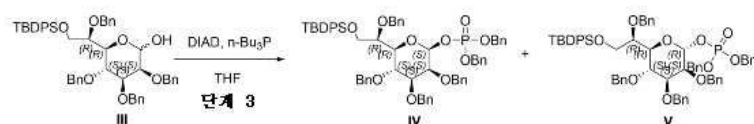
DMF(270 mL) 중 화합물 I(17.93 g, 23.65 mmol), TBAI(0.9 g, 2.365 mmol) 및 BnBr(7.1 mL, 59.14 mmol)의 교반된 혼합물에 NaH(60% 오일 분산액, 2.4 g, 59.14 mmol)를 0°C에서 가하였다. 밤새 교반한 후, 반응물을  $\text{H}_2\text{O}$ 로 퀀칭시켰다. 전체 혼합물을 PE/EtOAc(1:9)로 추출하였다. 추출물을  $\text{H}_2\text{O}$  및 염수로 세척하고,  $\text{MgSO}_4$  위에서 건조시켰다. 여액을 감압하에 농축시켜 오일성 잔사를 수득하고, 이를 PE-EtOAc(5:1)를 사용하는 실리카 겔 위에서 섬광 크로마토그래피로 정제하여 화합물 II(6.3407 g, 32% 수율)를 무색 오일로서 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm):  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) 1.04 (s, 9H); 3.75~3.77(m, 1H); 3.84~3.96(m, 5H); 2.44~2.47(d, 1H); 4.05~4.14(m, 3H); 4.56~4.86 (m, 8H); 5.10~5.21(m, 2H); 5.79~5.84(m, 1H); 7.02~7.05(m, 2H), 7.16~7.38(m, 24H); 7.60~7.67 (m, 4H)

단계 2. 화합물 III의 합성:



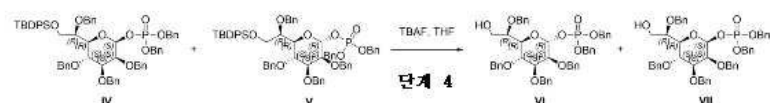
THF(35 mL) 중  $\text{Ir}[(\text{cod})(\text{MePh}_2\text{P})_2]\text{PF}_6$ (210 mg, 253 mmol)의 용액을 실온에서 1 atm  $\text{H}_2$  대기 하에 연황색 용액이 생성될 때까지 교반한 다음,  $\text{N}_2$ 를 용액을 통해 버블링(bubbling)하여 임의의 잔류 수소 가스를 제거하였다. Ir 촉매의 수득되는 용액을 THF(35 mL) 중 화합물 II(1.0741 g, 1.27 mmol)의 교반 용액에 실온에서 가하였다. 당해 온도에서 6시간 동안 교반한 후,  $\text{H}_2\text{O}$ (22 mL) 및  $\text{I}_2$ (650 mg, 2.56 mmol)를 교반 혼합물에 실온에서 가하였다. 당해 온도에서 1시간 동안 교반한 후, 반응물을 포화된  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 로 퀀칭시켰다. 전체 혼합물을 EtOAc로 추출하였다. 추출물을 포화된  $\text{NaHCO}_3$ 로 세척하고  $\text{MgSO}_4$  위에서 건조시켰다. 여액을 감압하에 농축시켜 오일성 잔사를 수득하고, 이를 PE-EtOAc(1:1)를 사용한 실리카 겔 위에서 섬광 크로마토그래피로 정제하여 화합물 III(0.68 g, 66.3% 수율)을 무색 오일로서 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 1.03 (s, 9H), 3.72 (s, 1H); 3.93~4.05 (m, 6H); 4.23~4.45 (m, 1H); 4.55~4.80 (m, 7H); 5.13 (br, 1H); 7.02~7.07 (m, 2H); 7.21~7.37 (m, 24H); 7.62~7.68 (m, 4H).

단계 3. 화합물 IV 및 V의 합성:



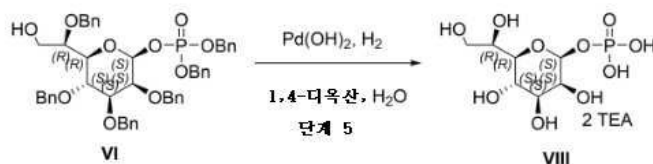
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(20 mL) 중 화합물 III(680 mg, 0.842 mmol), 디벤질 포스페이트(702 mg, 2.53 mmol), n-Bu<sub>3</sub>P(0.51 g, 2.53 mmol) 및 MS 5 Å(500 mg)의 교반 혼합물에 Et<sub>3</sub>N(0.71 mL, 5.06 mmol)을 실온에서 가하였다. 당해 온도에서 30분 동안 교반한 후, DIAD(0.51 g, 2.53 mmol)를 실온에서 가하였다. 밤새 교반한 후, 혼합물을 감압하여 농축시켜 오일성 잔사를 수득하였다. 조 생성물을 PE-EtOAc(7:3)를 사용하는 실리카 겔 위에서 섬광 크로마토그래피로 정제하여 화합물 IV 및 V(0.966 g, 100 %)의 혼합물을 수득하고 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다.

단계 4. 화합물 VI 및 VII의 합성:

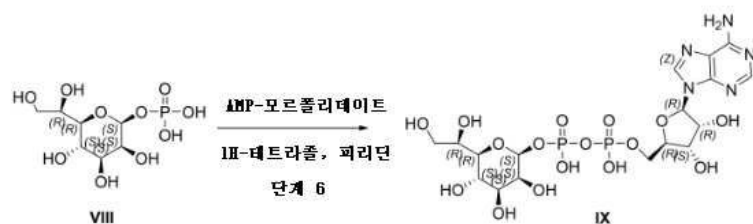


THF(20 mL) 중 화합물 IV 및 V(0.966 g, 0.904 mmol)의 혼합물의 교반 용액에 TBAF(THF 중 1 M, 1.4 mL, 1.4 mmol)를 실온에서 가하였다. 밤새 교반한 후, 반응물을 포화된 NH<sub>4</sub>Cl로 퀀칭하였다. 전체 혼합물을 EtOAc로 추출하였다. 추출물을 포화된 NaHCO<sub>3</sub>로 세척하고 MgSO<sub>4</sub> 위에서 건조시켰다. 여액을 감압하여 농축시켜 오일성 잔사를 수득하고, 이를 석유/EtOAc(3:1)를 사용하여 섬광 크로마토그래피로 정제함으로써 화합물 VI(169.7 mg, 22.6 %) 및 화합물 VII(225 mg, 30 %)을 무색 오일로서 수득하였다. 화합물 VI: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ (ppm): 3.52~3.54 (m, 1H); 3.67~3.73 (m, 2H), 3.84~3.87 (dd, 1H); 3.97~3.99(m, 1H); 4.04~4.07 (m, 1H); 4.47~4.50 (m, 1H); 4.58~4.60 (m, 1H); 4.71~4.74 (m, 1H); 4.87~4.89 (m, 1H); 4.93~5.03 (m, 9H); 5.70~5.72 (dd, 1H); 7.19~7.33 (m, 30H). <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ -2.60. 화합물 VII: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 3.56~3.59 (dd, 1H); 3.65~3.68 (m, 2H); 3.81~3.84 (m, 2H); 4.02~4.07 (m, 1H); 4.52~4.56 (m, 1H); 4.59~4.61 (m, 1H); 4.68~4.78 (m, 3H); 4.86~4.88 (m, 1H); 4.95~5.11 (m, 7H); 5.24~5.26 (d, 1H); 7.18~7.39 (m, 30H). <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ -2.50

단계 5. 화합물 VIII(D-글리세로-D-만노-헵토즈-1β-P)의 합성:



1,4-디옥산/H<sub>2</sub>O(5 mL, 4:1) 중 화합물 VI(105 mg, 0.126 mmol) 및 20 % w/w Pd(OH)<sub>2</sub>/C(21 mg, 0.03 mmol)의 혼합물을 실온에서 H<sub>2</sub>(1 atm) 하에 2일 동안 교반하였다. 혼합물을 세공 크기가 0.5 m인 Advantech PTFE 막 여과기를 통해 H<sub>2</sub>O를 사용하여 여과하였다. 여액을 0℃로 냉각시키고 TEA(53 uL, 0.378 mmol)에 가하고 당해 온도에서 3시간 동안 교반하였다. 수득되는 혼합물을 동결건조시켜 화합물 VIII · 2Et<sub>3</sub>N을 백색 고체(74.3 mg, quant.)로서 수득하였다.

단계 6. 화합물 IX (D-글리세로-D-만노-헵토스-1 $\beta$ -ADP)의 합성:

화합물 VIII(28.6 mg, 0.058 mmol)을 무수 피리딘 속에 용해하고 진공하에 농축시켰다. 이러한 공비(azeotropic)를 3회 반복하여 잔류하는 물을 제거하였다. AMP-모르폴리데이트(97 mg, 0.233 mmol) 및 1H-테트라졸(32 mg, 0.453 mmol)을 무수 화합물 VIII에 가하였다. 무수 피리딘(2 mL)을 가하고, 혼합물을 N<sub>2</sub> 대기하에 78 시간 동안 교반하였다. 농축 후, 잔사를 침전시키고 에틸 아세테이트로 세척하였다. 수득되는 고체를 이동상으로서 물(용매 A) 및 아세트니트릴(용매 B) 중 10 mM NH<sub>4</sub>COOCH<sub>3</sub>을 사용하고, 용출 구배로서 5% 내지 85%(용매 B)를 3분에 걸쳐 사용한 다음 85% 내지 95%(용매 B)를 0.5 분에 걸쳐 사용하고 95%에서 1분 동안 0.4 ml/min의 유동 속도로; 컬럼: HSS T3 1.8  $\mu$ m, 2.1 $\times$ 100mm, 컬럼 40 C) 유지시킴으로써 제조 HPLC(RP-C18)로 정제하여 화합물 IX 및 화합물 VIII의 혼합물을 수득하였다. 혼합물을 세파텍스 G-15 컬럼 상에서 다시 정제하여 화합물 IX를 백색 고체(3.5 mg, 10%)로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR 및 <sup>31</sup>P NMR 데이터는 문헌에 기록된 바와 일치하였다.

본 발명을 다음의 비-제한적인 실시예에 의해 추가로 기술하고 예시한다.

HBP는 세균 ADP 헵토스 생합성 경로에서 대사 중간체이다. HBP는 세균 균주에 따라, HIdA 효소 또는 HIdE 효소의 키나제 도메인에 의해 D-글리세로-D-만노-헵토스-7-포스페이트로부터 생성되며, 세균 효소 GmhB에 의해 D-글리세로- $\beta$ -D-만노-헵토스-1-포스페이트(HMP-1bP)로 전환된다. HMP-1bP는 궁극적으로 세균 효소 HIdC에 의해 또는 일부 세균 세포의 경우 HIdE의 ADP 트랜스퍼라제 도메인에 의해 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 $\beta$ -ADP(H1b-ADP)로 전환된다. H1b-ADP는 이후 HIdD(GmhD)에 의해 L-글리세로-D-만노-헵토스-1 $\beta$ -ADP(H1b-ADP-6L)로 전환된다. 경로 및 관련 효소의 개략도에 대해서는 도 16을 참고한다.

다른 것을 유전적 접근법에 사용하여 이러한 생합성 경로에서 HBP의 상부 및 하부 둘 다에서 다양한 효소를 녹아웃(knock out)시킴으로써 선천성 면역 반응을 유도하는데 있어 HBP의 역할을 명확히 하였는데, 특히 이는 ALPK1-TIFA-TRAF6을 통해 감염-유도된 NF $\kappa$ B 활성화에 관련되기 때문이다. 예컨대, 문헌: Gaudet et al., Science 348:1251 2015; Milivojevic et al., PLOS Pathogens 13(2) e1006224 2017; 및 Zimmermann et al., Cell Reports 20:2384 2017를 참고한다. 가우데트(Gaudet)는 "에스케리키아 콜라이 또는 엔. 메닝기티디스(*N. meningitidis*)에서 HBP의 상부의 ADP-헵토스 경로의 파괴가 NF- $\kappa$ B 활성화를 없애므로" NF $\kappa$ B 활성화가 "HBP의 존재에 직접 기여할 수 있었다"고 결론지었다(참고: Gaudet at p. 1252). 밀리보제비치(Milivojevic)는 HIdE 유전자에 대해 결실된 에스. 티피무리움(*S. typhimurium*) 세포를 이용하였으며 HBP를 합성할 수 없는 이러한 세포가 감염된 및 방관자 세포(bystander cell) 둘 다에서 IL-8 생산을 유도하는데 실패하였지만, HBP, GmhB 또는 WaaC의 하부에서 작용하는 효소가 결핍된 세포는 강력한 IL-8 발현을 유도하였음을 나타내었다(참고: Milivojevic at p. 12).

선천성 면역성을 유도하기 위한 주요 분자로서 HBP를 지적하는 이러한 선행 연구의 측면에서, 본 발명자들은 놀랍게도 HBP 이외의 분자, 예를 들면, HMP-1bP 및 H1b-ADP가 화학적으로 합성된 HBP, HMP-1bP, 및 H1b-ADP(실시예 1)를 사용하는 ALPK1-의존적인 방식으로 세포내에서 IL-8 및 TNF $\alpha$  mRNA 발현을 유도할 수 있었음을 발견하였다. 더욱이, 및 심지어 보다 놀랍게도, 본 발명자들은 H1b-ADP가 이러한 검정에서 사이토킨 발현을 유도하는데 있어서 HBP 또는 HMP-1bP보다 훨씬 더 강력함을 발견하였다. 본 발명자들은 또한 예상치 못하게, 화학적으로 합성된 HBP가 열 이동 검정에서 ALPK1에 결합할 수 없었음을 발견하였고(실시예 2), 추가로 ALPK1 자가인산화를 유도할 수 없음을 발견하였다(실시예 3). 대신에, 본 발명자들은 예상치 못하게 H1b-ADP 만이 ALPK1에 결합할 수 있으며 이러한 검정에서 이의 자가인산화를 유도하였음을 발견하였다. 추가의 실험에서, 본 발명자들은 H1b-ADP가 I $\kappa$ B의 인산화를 통해 ALPK1-의존성 NF $\kappa$ B 경로 신호전달을 활성화시킬 수 있음을 발견하였다(실시예 4). 또한, 본 발명자들은 H1b-ADP-6L이 또한 이의 하부 기질인, TIFA의 ALPK1-의존성 인산화를 활성화시킬 수 있음을 발견하였다(실시예 5). 최종적으로, 쥐 종양 모델에서, 본 발명자들은 H1b-ADP가 강력한 항-종양 활성을 가졌으



나, HBP 또는 HMP-1bP는 그렇지 않음을 발견하였으며(실시예 7 및 실시예 8) 이러한 활성은 체크포인트 억제제(항-PD-1 항체) 및 면역 공-자극 분자의 효능제(항-OX40 효능제 항체) 둘 다의 항-종양 활성을 상승적으로 향상시켰음을 발견하였다.

이와 함께, 본원에 제공된 데이터는 HBP 외에 세균 대사산물, 즉, HMP-1bP, H1b-ADP, 및 H1b-ADP-6L이 선천성 면역성의 유도과 관련된 ALPK1-의존성 신호전달을 유도할 수 있으며 이러한 분자들 중 적어도 하나인, H1b-ADP가 또한 단독으로 및 다른 면역 조절인자와 함께 놀랍고도 예측하지 못한 항-종양 활성을 가짐을 나타낸다. 이러한 분자는 TLR-9 효능제로서 인식되었으며(나가타(Nagata) 등에 의한 US 20100016250, Kyowa Hakko Kirin Co.), 일반적으로 알레르기, 종양, 감염성 질환을 치료하기 위해, 및 면역자극제로서 유용함을 제시하는 기준으로, 본 결과는 최초로 ALPK1-의존성 신호전달에서 이의 활성을 입증하고 최초로 동물 모델에서 항-종양 활성을 입증하는 것이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 실시예

**실시예 1: 화학적으로 합성된 HBP, HMP-1bP, 및 H1b-ADP 각각은 ALPK1 의존적 방식으로 293HEK 세포내에서 IL-8 및 TNF mRNA 발현을 유도한다.**

HBP, HMP-1bP, 및 H1b-ADP이 ALPK1 의존적 방식으로 사이토킨 발현을 유도시킬 수 있는지를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 ALPK1-지시된 작은 방해(small interfering) RNA(siRNA)를 사용하여 HEK293 세포내에서 ALPK1 발현을 사일런싱(silencing)시켰다. 세포를 96-웰 플레이트(well plate) 내로 플레이트팅( $1 \times 10^4$ 개의 세포/웰)하고 제조업자의 프로토콜(Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMax<sup>TM</sup>, Invitrogen 13778075)에 따라 대조군 siRNA 또는 ALPK1-지시된 siRNA로 형질감염시켰다. 배양 2일 후에, (1) HBP(500 uM, 100 uM, 20 uM, 도 2a-2b) (2) HMP-1bP(500 uM, 100 uM, 도 3a-3b), (3) H1b-ADP(100 nM, 20 nM, 4 nM, 0.8 nM, 도 4a-4b)를 배양 배지에 가하고 세포를 4시간 후에 수확(harvesting)하였다. 총 RNA를 단리하고(TRIZOL<sup>TM</sup>, ThermoFisher) cDNA를 합성하고(PrimeScript<sup>TM</sup> RT 시약 키트(Takara) 증폭시켰다(AceQ<sup>TM</sup> qPCR SYBR<sup>TM</sup> Green Master Mix, 제조업자의 프로토콜에 따라 QuantStudio<sup>TM</sup> 7 Flex 실시간 PCR 시스템을 사용하는 Vazyme Biotech(ThermoFisher)). IL-8 및 TNF  $\alpha$  mRNA 발현은 둘 다 ALPK1-지시된 siRNA의 존재하에서 사이토킨 둘 다의 발현시 감소에 의해 입증되는 바와 같이, ALPK1-의존적 방식으로 증가되었다. 이러한 결과는 각각의 HBP, HMP-1bP, 및 H1b-ADP가 ALPK1을 통해 IL-8 및 TNF  $\alpha$  유전자 발현을 활성화시킴을 시사한다.

놀랍게도, H1b-ADP는 이러한 검정에서 다른 분자보다 유의적으로 더 강력하였다. 도 5에 나타낸 바와 같이, IL-8 및 TNF  $\alpha$  mRNA 발현 둘 다는 나노몰 농도(10 nM)에서 H1b-ADP에 의해 유도되었지만 100 uM의 HBP 또는 HMP-1bP가 필요하였다. 이는 놀랍게도, 상기 논의된 바와 같이, 2개의 그룹에 의한 앞서의 기록이, 이의 하부 대사 물질, 예를 들면, HMP-1bP 및 H1b-ADP가 아닌 HBP가 ALPK1-TIFA 경로를 통해 IL-8 유도에 관여하기 때문이다(Gaudet et al., Science 348:1251 2015; Milivojevic et al., PLOS Pathogens 13(2) e1006224 2017).

**실시예 2: H1b-ADP는 ALPK1에 결합하나, HBP 또는 HMP-1bP는 이에 결합하지 않는다.**

열 이동 검정은 목적인 단백질에 대한 분자의 결합을 측정하기 위해 광범위하게 사용된다. 이러한 검정은 다른 분자가 단백질에 결합하는 단백질의 변성에 필요한 열 에너지에 있어서의 증가를 기반으로 한다. SYPRO 오렌지(Orange)는 열 이동의 검출시 사용된 형광성 화합물이다. SYPRO 오렌지는 단백질의 소수성 표면에 결합하며, 물은 이의 형광성을 강력하게 퀀칭시킨다. 단백질이 폴딩되지 않는 경우, 노출된 소수성 표면은 염료에 결합하여, 형광성을 증가시킨다. 다른 분자가 단백질에 결합된 경우, 단백질의 비폴딩에 필요한 온도의 증가가 관찰된다.

이러한 검정 시스템을 사용하여 화학적으로 합성된 HBP, HMP-1bP, 및 H1b-ADP가 ALPK1에 직접 결합하는지 여부를 측정하였다. 도 6은 1 uM, 5 uM, 25 uM, 또는 125 uM의 각각의 HBP, HMP-1bP, 및 H1b-ADP의 부재 또는 존재 하에서 항온처리된 ALPK1(1000x SYPRO 오렌지와 혼합된 7uM)의 열 이동을 나타낸다. HBP 또는 HMP-1bP는 열 이동을 유도할 수 없었다. H1b-ADP 만이 시험한 3개의 최대 농도, 5 uM, 25 uM, 및 125 uM 각각에서 1도 이상의 이동을 유도하였다. 이러한 결과는 H1b-ADP이 ALPK1에 직접 결합할 수 있지만, HBP 또는 HMP-1bP는 결합할 수 없음을 나타낸다.

본 발명자들은 HBP를 사용하는 이러한 검정에서 HBP 결합된 ALPK1이 이의 전구체, D-글리세로-D-만노-헵토즈-7-P(HMP)로부터 효소 촉매작용에 의해 시험관내(in vitro)에서 생산하였음을 이미 발견하였다. 이러한 연구에서, HBP의 시험관내 생산에 사용된 효소는 당(sugar) 키나제 HIda이었으며, 이는 야생형 이. 콜라이 세포로부터 정

제되었다. 하기 실시예 9에서 하기 논의된 바와 같이, 본 발명자들은 정제된 HIda 효소가 추가의 효소, 아마도 GmhB 및 H1dE로 오염되었으며, 이는 앞서의 검정에서 HBP 중 적어도 일부를 H1b-ADP로 전환시킨 것으로 여기고 있다.

[0070] 실시예 3: H1b-ADP는 ALPK1 자가인산화를 유도하나, HBP 또는 HMP-1b는 이를 유도하지 않는다.

[0071] ALPK1 활성화는 이의 자가인산화를 생성한다. 따라서, 본 발명자들은 다음에 ALPK1에 대한 H1b-ADP의 결합이 ALPK1 자가인산화를 유도하는데 충분하였는지를 질의하였다. 인산화 검정을 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. 요약하면, ALPK1을 ATP 및 화학적으로 합성된 HBP, HMP-1bP, 또는 H1b-ADP가 들어있는 검정 완충액(20  $\mu$ l, 25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 2 mM DTT, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) 속에서 항온 처리(2 nM, 25°C, 1 h)한 다음 겔 전기영동으로 변성시키고 항-포스포-트레오닌 항체(CST)를 사용하여 웨스턴 분석함으로써 ALPK1의 자가인산화를 검출하였다. 도 7에 나타난 바와 같이, ALPK1의 인산화는 H1b-ADP(10 nM, 1 nM, 및 0.2 nM)의 존재하에서만 검출되었으며, 이는 H1b-ADP가 ATP-의존성 자가인산화 및 ALPK1의 활성화를 유도하였지만 HBP 또는 HMP-1bP는 이를 유도하지 않았음을 나타낸다. 이러한 검정에서 사용된 HBP 및 HMP-1bP의 농도의 범위(1 nM, 10 nM, 100 nM)는 H1b-ADP에 대해 사용된 것보다 10배 더 높았다.

[0072] 본 발명자들은 HBP가 이의 전구체, D-글리세로-D-만노-헵토즈-7-P(HMP)로부터 효소적 촉매작용에 의해 시험관내에서 생산된 HBP를 사용하는 이러한 검정에서 ALPK1 자가인산화를 유도할 수 있었음을 이미 발견하였다. 이러한 연구에서, HBP의 시험관내 생산을 위해 사용된 효소는 당 키나제 HIda이었으며, 이는 야생형 이. 콜라이 세포로부터 정제되었다. 실시예 9에서 하기 논의된 바와 같이, 본 발명자들은 현재 정제된 HIda 효소가 앞서의 검정에서 HBP의 적어도 일부를 H1b-ADP로 전환시킨 추가의 효소로 오염된 것으로 여기고 있다.

[0073] 실시예 4: H1b-ADP는 I $\kappa$ B의 ALPK1 의존성 인산화를 유도한다

[0074] NF $\kappa$ B RelA(p65)는 세포질로부터 핵으로 전좌하여야만 하는 전사 인자이며 핵에서 이는 다수의 표적 유전자의 프로모터 영역과 상호작용하여 이들의 전사를 조절한다. NFB RelA의 표적 유전자는 예를 들면, 염증성 사이토킨, 예를 들면, IL-8, TNF $\alpha$ , CXCL1, 및 CXCL3을 포함한다. p65의 핵 전좌가 일어나기 위해서는, 이것이 체류하는 세포질성 복합체가 먼저 분해되어야만 한다. 이러한 과정은 I $\kappa$ B의 인산화 및 후속적인 활성화에 의해 개시된다. 따라서, I $\kappa$ B 인산화는 NF $\kappa$ B 활성화에 대한 마커로서 사용될 수 있다.

[0075] 본 발명자들은 다음에 ALPK1의 H1b-ADP-유도된 자가인산화가 이러한 활성을 위한 마커로서 I $\kappa$ B의 인산화를 사용하여 NF $\kappa$ B를 활성화하는데 효과적인지를 시험하였다. 인산화 검정을 표준 프로토콜에 따라 수행하고 인산화된 단백질을 겔 전기영동 및 인산화된 I $\kappa$ B를 검출하는 항체를 사용하는 웨스턴 블롯팅에 의해 검출하였다. 요약하면, 검정을 ATP, 또는 ALPK1 단독 또는 H1b-ADP 단독의 존재 또는 부재하에서, ATP의 존재 둘 다에서, 2 nM ALPK1 및 H1b-ADP(어느 정도)를 함유하는 검정 완충액(25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 2 mM DTT, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) 중 20  $\mu$ l의 용적으로 25°C에서 수행하였다. 1시간 항온처리 후, 반응물을 단백질 전기영동을 위해 변성 겔에 로딩(loading)하고 웨스턴을 수행하여 p-I $\kappa$ B 항체(Abcam)를 사용한 I $\kappa$ B의 인산화를 검출하였다.

[0076] 도 9에 나타난 바와 같이, I $\kappa$ B 인산화는 ATP의 존재하에서 ALPK1 및 H1b-ADP 둘 다의 존재하에서만 검출하였다. 이러한 결과는 ALPK1의 HBP-유도된 자가인산화가 NF $\kappa$ B 경로를 활성화시킴을 나타낸다.

[0077] 실시예 5: H1b-ADP-6L은 TKFA의 ALPK1 의존성 인산화를 유도한다.

[0078] L-글리세로-D-만노-헵토즈-1 $\beta$ -ADP(H1b-ADP-6L)는 HBP, HMP-1bP, 및 H1b-ADP와 동일한 생합성 경로에서 다른 세균성 대사물질이다. 이는 H1b-ADP로부터 세균 HIdD(GmhD) 효소의 작용에 의해 형성된다. 본 발명자들은 H1b-ADP와 구조적으로 매우 유사한 이러한 분자가 ALPK1 생물학적 활성을 가지는지의 여부를 질의하였다.

[0079] 본 발명자들은 50  $\mu$ M ATP를 함유하는 키나제 완충액 속에서 ALPK1 단백질(2 nM), 및 TIFA 단백질(1.6  $\mu$ M)과 함께 H1b-ADP 및 H1b-ADP-6L을 사용한 시험관내 키나제 검정을 수행하였다. TIFA 인산화는 변성 겔 전기영동에 이어 항-포스포트레오닌 항체를 사용하는 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. H1b-ADP 또는 H1b-ADP-6L은 2 nM, 0.4 nM, 80pM, 16 pM, 및 3 pM에서 가하였다. 도 10에 나타난 바와 같이, H1b-ADP-6L은 H1b-ADP와 유사한 방식으로 ALPK1-의존성 신호전달을 활성화시켰다.

[0080] 실시예 6: H1b-ADP 종양내 주사는 종양 성장을 지연시키고 종양 조직내에서 염증성 유전자 과발현을 유도하지만, HMP-1bP 종양내 주사는 그렇지 않다

- [0081] 본 발명자들은 H1b-ADP의 항-암 활성을 시험하기 위해 CT26 종양 이종이식체 모델을 사용하였다. 종양 세포(100  $\mu$ L의 CT26 세포당  $2 \times 10^5$  개)를 BALB/c 마우스의 우측 옆구리내로 피하 접종하였다. 6일째에, 종양이 직경이 3 내지 5 mm에 이르는 마우스를 무작위처리하고 3개 그룹(각 그룹당 n=8), 대조군, HMP-1bP(580  $\mu$ g), 및 H1b-ADP(1.2  $\mu$ g)로 그룹화하였다. 주사를 접종 후 6, 8, 10, 12, 및 14일째에 20  $\mu$ L의 총 용적을 사용하여 수행하였다. 종양 용적은 식  $(L \times W^2)/2$ (여기서 L은 보다 긴 측정이다)을 사용하여 종양 치수의 캘리퍼(caliper) 측정으로부터 2일마다 계산하였다. 도 11에 나타난 바와 같이, H1b-ADP는 이러한 모델 시스템에서 종양 성장을 감소시켰지만, HMP-1bP는 그렇지 않았으며, 이는 H1b-ADP가 종양 성장을 억제하는데 효과적인 항-종양 면역 반응을 유발할 수 있음을 나타낸다.
- [0082] 본 발명자들은 다음에 H1b-ADP가 종양내에서 전-염증성 사이토키인의 증가를 유발하였는지를 시험하였다. 종양 세포(100 L의 CT26 세포당  $2 \times 10^5$  개)를 BALB/c 마우스의 우측 옆구리내로 피하 접종하였다. 2.5 g(n = 2), 25ng(n = 2), 50 ng(n = 2)의 H1b-ADP 또는 대조군(n = 2)에게 접종 후 7일째에 종양내 주사(20  $\mu$ L)하였다. 주사 후 4시간 후에, 종양 조직물을 해부하여 수거하였다. 총 RNA를 단리(TRIzol™, ThermoFisher)하고, cDNA를 합성(PrimeScript™ RT 시약 키트, Takara)하며 제조업자의 프로토콜에 따라 증폭(AceQ™ qPCR SYBR™ Green Master Mix, QuantStudio™ 7 Flex 실시간 PCR 시스템을 사용하는 Vazyme Biotech(ThermoFisher))시켰다.
- [0083] 결과는 도 12에 나타낸다. 당해 실험에서, 염증성 사이토킨 IL-1b, Tnfa, Ifn 감마, 및 IL-6, 및 케모킨 Cxcl1의 mRNA 발현은 H1b-ADP 주사시 증가하였으며, 이는 염증이 종양내에서 활성화되었음을 나타낸다. 세포독성 T 세포 마커 CD8, T-헬퍼 세포 마커 CD4, 조절성 T 세포 마커 Foxp3 및 Th1 세포 마커 T-bet의 mRNA 발현은 H1b-ADP 주사시 증가하였으며, 이는 H1b-ADP 주사된 종양에서 세포독성 T, T-헬퍼 세포, 조절성 T 세포 및 Th1 세포의 수의 증가를 나타낸다. PD-1 및 PD-L1 발현은 H1b-ADP 주사된 종양내에서 증가하였으며, 이는 항-PD-1 또는 항-PD-L1 치료요법과 H1b-ADP 주사의 조합이 종양 성장을 지연시키는데 있어서 상승 효과를 가질 수 있음을 시사한다.
- [0084] 실시예 7: H1b-ADP 및 항-PD-1 항체는 종양 성장을 억제하는데 상승적으로 작용한다.
- [0085] B7 면역글로불린 초과(superfamily) 분자(CTLA-4, PD-1, 및 PD-L1)를 표적화하는 길항 항체는 다양한 유형의 암에서 항-종양 면역성 및 임상 반응을 생성한 면역 체크포인트 억제 접근법을 나타낸다. 그러나, 많은 환자는 이러한 항체 및 치료요법 후 많은 다른 재발을 기반으로 한 단독치료요법에 반응하지 않는다. 따라서, 면역 체크포인트 억제제 치료요법에 대한 제1 및 제2 내성에 초점을 맞춘 공-치료요법(co-therapy)에 대한 필요성이 존재한다.
- [0086] H1b-ADP가 체크포인트 억제제에 의한 항-종양 반응을 증가를 유발시킬 수 있는지를 시험하기 위해, 본 발명자들은 항-PD1 항체와의 공-투여의 효과를 시험하였다. 종양 세포(100 L의 CT26 세포당  $2 \times 10^5$  개)를 BALB/c 마우스의 좌측 및 우측 옆구리내로 피하 접종하였다. 7일째에, 종양이 직경이 5 mm에 도달한 마우스를 무작위처리하여 다음의 4개 그룹으로 그룹화(각각의 그룹 당 n=8)하였다: 항-PD1 항체; 랫트 IgG; H1b-ADP + 랫트 IgG; H1b-ADP + 항-PD1 항체, 본 발명자들은 항-PD1 항체로서 RMP1-14(10 mg/kg) 및 대조군 IgG로서 랫트 IgG 2a(2A3)를 활용하였다. 각각의 항-PD-1 항체 및 대조군 IgG를 접종 후 6, 10, 12, 및 17일째에 200 L의 용적으로 종양내 투여하였다. H1b-ADP(6.2 g)는 6, 8, 10, 12, 및 15일째에 20L 용적으로 종양내 주사하였다. 종양 용적은 식  $(L \times W^2)/2$ (여기서 L은 보다 긴 측정치이다)를 사용한 종양 치수의 캘리퍼 측정치로부터 2일마다 계산하였다. 결과는 주사된 종양에 대해 도 13a에 나타내고 먼 종양에 대해 도 13b에 나타낸다. 이러한 실험에서, H1b-ADP 또는 항-PD1 항체 단독의 투여는 종양 성장을 현저히, 및 유사한 정도까지 억제하였다. H1b-ADP 및 항-PD1 항체의 조합은 종양 성장을 억제할 뿐 아니라 수개의 종양이 사라지도록 하였다. 이러한 결과는 H1b-ADP 및 체크포인트-억제제, 예를 들면, 항-PD1 항체의 조합이 성장을 억제하고 심지어 생체내에서 종양 세포의 생존능을 억제하는데 효과적임을 나타낸다.
- [0087] 실시예 8: H1b-ADP 및 항-OX40 효능제 항체는 종양 성장을 억제하는데 상승적으로 작용한다.
- [0088] 본 발명자들은 다음에 항-OX40(CD134) 효능제 항체를 사용하여 유사한 실험을 수행하였다. OX40(CD134)은 활성화된 면역 세포에 의해 발현된 종양 괴사 인자 수용체 상과 공-자극성 수용체 분자이다. 상기 나타난 바와 같이, 체크포인트 억제제 치료요법에 대한 제1 및 제2 내성에 초점을 맞춘 공-치료요법에 대한 필요성이 존재하며 하나의 접근법은 면역 공-자극인자, 예를 들면, 항-OX40 효능제 항체를 투여하기 위한 것이다.

- [0089] 실험은 다음의 변화를 제외하고는 상기와 같이 수행하였다. 7일째에, 이의 종양이 직경 5 mm에 도달한 마우스를 무작위처리하고 다음의 4개 그룹으로 그룹화하였다: 항-OX40 항체; 랫트 IgG; H1b-ADP + 랫트 IgG; H1b-ADP + 항-OX40 항체. 본 발명자들은 항-OX40 항체로서 BE0031 및 대조군 IgG로서 랫트 IgG 2a(2A3)를 이용하였다. BE0031(2 ug), 랫트 IgG(2 ug), 및/또는 H1b-ADP(6.2 g)를 접종 후 7, 9, 및 11일째에 20 L의 용적으로 종양내 투여하였다. 결과는 도 14에 나타낸다.
- [0090] 실시예 9: 야생형 이. 콜라이로부터 정제된 HIdA 효소는 다른 세균 효소로 명백하게 오염되었다.
- [0091] 본 발명자들은 앞서 HBP가 이의 전구체, D-글리세로-D-만노-헵토즈-7-포스페이트로부터 효소적 촉매작용에 의해 시험관내에서 생산된 HBP를 사용하는 열 이동 검정에서 ALPK1에 결합할 수 있음을 발견하였다. 이러한 연구에서, HBP의 시험관내 생산을 위해 사용된 효소는 HIdA 발현 플라스미드로 형질감염된 야생형 이. 콜라이 세포로부터 정제된 당 키나제 HIdA이었다. 이. 콜라이 세포는 HIdA 또는 HIdC 효소를 발현하지 않으며, 대신 HIdE를 발현하고, 이는 키나제 도메인 및 ADP 트랜스퍼라제 도메인을 함유하는 융합 단백질이다. HIdE의 이러한 2개의 도메인은 HIdA의 키나제 도메인 및 HIdC의 ADP 트랜스퍼라제 도메인 각각에 대해 상동성이다. 동일한 시험관내 생산된 HBP를 사용하는 관련 연구에서, 본 발명자들은 ALPK1 자가인산화의 HBP 활성화 및 ALPK1 하부의 1kB의 인산화를 입증하였다.
- [0092] 본 발명자들은 본 발명에 이르러 이러한 실험에서 사용된 정제된 HIdA 효소가 이. 콜라이 효소, 예를 들면, HIdE로 오염되었으며, 이는 HBP의 적어도 일부를 H1b-ADP로 전환시켰다고 여기고 있다. HIdA 효소의 구조-기능 활성화에 대한 선행 보고는 HIdA 및 HIdE 효소의 키나제 도메인이 이량체화하여 이들의 공-정제(co-purification)를 야기할 수 있다고 시사하였다(문헌: Lee T.W. et al, J. Med.Chem. 2013 56:1405-17). 따라서, 일부 이. 콜라이 HIdE는 본 발명자들의 선행 연구에서 사용된 재조합 HIdA로 공-정제된 경향이 있다. 본 발명자들은 GmhB 및 HIdA가 또한 복합체를 형성함으로써 GmhB가 또한 재조합 HIdA와 함께 공-정제되었다고 추가로 추측한다. 이. 콜라이 GmhB 및 HIdE를 사용한 이러한 오염은 이들의 선행 연구에서 시험관내 생산된 HBP의 H1b-ADP로의 적어도 일부 전환을 야기하였다.
- [0093] 이를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 불활성화된 HIdE를 함유하는 이. 콜라이로부터 정제된 HBP 또는 HIdA의 존재하에서, 또는 선행 실험에서 사용된 동일한 HIdE 야생형 이. 콜라이로부터 정제된 HBP 및 HIdA의 존재하에서 ALPK1-의존성 TIFA 인산화에 대한 시험관내 키나제 반응을 수행하였다. 이러한 결과는 도 15에 나타낸다. 인산화된 TIFA(3개의 농축물, 1%, 0.2% 및 0.4%)를 변성 겔 전기영동에 이은 웨스턴 분석에 의해 상술한 바와 같이 검출하였다. 인산화된 TIFA는 야생형 이. 콜라이로부터 정제된 HIdA를 사용하는 검정에서만 검출되었으며, HIdE 돌연변이체 이. 콜라이 세포로부터 정제된 HIdA를 사용하는 검정에서는 검출되지 않았다.
- [0094] 오염되는 세균 효소로 인해 시험관내 생산된 HBP를 사용하여 수득된 비정상적인 결과를 피하기 위하여, 본 발명자들은 상기 실시예 1 내지 8 및 하기 실시예 10 내지 18에서 화학적으로 합성된 당 분자를 이용하였다.
- [0095] 실시예 10: H1b-ADP 및 항-PD-L1 항체는 종양 성장을 억제하는데 상승적으로 작용한다.
- [0096] 실험을 다음의 변화를 제외하고는 항-PD-1의 콤보 실험(combo experiment)으로서 수행하였다. 7일째에, 이의 종양이 직경 5 mm에 도달한 마우스를 무작위처리하고 다음의 4개의 그룹으로 그룹화하였다: 항-PD-L1 항체; 랫트 IgG; H1b-ADP + 랫트 IgG; H1b-ADP + 항-PD-L1 항체. 본 발명자들은 항-PD-L1 항체로서 BP0101 (BioxCell)를 및 대조군 IgG로서 랫트 IgG 2a(2A3)를 이용하였다. 각각의 항-PD-L1 항체(200 g) 및 대조군 IgG(200 g)를 접종 후 7, 9, 11, 및 15일째에 200 µL 용적으로 복강내 투여하였다. H1b-ADP(6.2 g)는 접종 후 7, 9, 11, 13, 15일째에 20 µL 용적으로 종양내 투여하였다. 결과는 주사된 종양에 대해 도 16a에 나타내고 먼 위치의 종양에 대해 도 16b에 나타낸다. 이러한 결과는 H1b-ADP와 체크포인트-억제제, 예를 들면, 항-PD-L1 항체의 조합이 성장을 억제하고 심지어 생체내에서 종양의 생존능을 억제하는데 효과적임을 나타낸다.
- [0097] 실시예 11: H1b-ADP 및 IFN α는 종양 성장을 억제하는데 상승적으로 작용한다.
- [0098] 실험을 다음의 변화를 제외하고는 항-PD-1의 콤보 실험으로서 수행하였다. 8일째에, 이의 종양이 직경 5 mm에 도달한 마우스를 무작위처리하고 다음의 4개의 그룹으로 그룹화하였다: INF α(752803, BioLegend); PBS; H1b-ADP; H1b-ADP + INF α. 각각의 IFN α(0.1 g) 및 H1b-ADP(6.2 g)를 접종 후 8, 10, 및 12일째에 20 µL 용적으로 종양내 투여하였다. 결과는 주사된 종양에 대해 도 17a에 나타내고 먼 위치의 종양에 대해 도 17b에 나타낸다. 이러한 결과는 H1b-ADP와 인터페론 경로 또는 JAK-STAT 경로 활성화인자, 예를 들면, IFN α의 조합이 성장을 억제하고 심지어 생체내에서 종양 세포의 생존능을 억제하는데 효과적임을 나타낸다.



- [0099] 실시예 12: H1b-ADP 및 항-CTLA-4 항체는 종양 성장을 억제하는데 상승적으로 작용한다.
- [0100] 실험을 다음의 변화를 제외하고는 항-PD-1의 콤보 실험으로서 수행하였다. 6일째에, 이의 종양이 직경 5 mm에 도달한 마우스를 무작위처리하고 다음의 4개의 그룹으로 그룹화하였다: 항-CTLA-4 항체; 랫트 IgG; H1b-ADP + 랫트 IgG; H1b-ADP + 항-CTLA-4 항체. 본 발명자들은 항-CTLA-4 항체로서 9D9(BioxCell) 및 대조군 IgG로서 랫트 IgG 2b 동형(MPC-11 클론, BE0086, BioXCell)을 이용하였다. 각각의 항-CTLA-4 항체(25 g) 및 대조군 IgG(25 g)를 접종 후 6 및 9일째에 200 L 용적으로 복강내 투여하였다. H1b-ADP(6.2 g)를 접종 후 6, 7, 9, 11 일째에 20 L 용적으로 복강내 투여하였다. 결과는 도 18에 나타낸다. 이러한 결과는 H1b-ADP와 체크포인트-억제제 또는 결실된 T-reg 세포, 예를 들면, 항-CTLA-4 항체의 조합이 성장을 억제하고 심지어 생체내에서 종양 세포의 생존능을 억제하는데 효과적임을 나타낸다.
- [0101] 실시예 13: H1b-ADP 및 STING 효능제는 종양 성장을 억제하는데 상승적으로 작용한다.
- [0102] 실험은 다음의 변화를 제외하고는 항-PD-1의 콤보 실험으로서 수행하였다. 6일째에, 이의 종양이 직경 5 mm에 도달한 마우스를 무작위처리하고 다음의 4개의 그룹으로 그룹화하였다: c-디-AM(PS)2; PBS; H1b-ADP; H1b-ADP + c-디-AM(PS)2. 본 발명자들은 STING 효능제로서 c-디-AM(PS)2를 이용하였다. 각각의 c-디-AM(PS)2(1 g) 및 H1b-ADP(6.2 g)를 접종 후 6, 7, 및 9일째에 20 L 용적으로 종양내 투여하였다. 결과는 도 19에 나타낸다. 이러한 결과는 H1b-ADP와 STING 효능제 및 선천성 면역성 효능제, 예를 들면, c-디-AM(PS)2의 조합이 성장을 억제하고 심지어 생체내에서 종양 세포의 생존능을 억제하는데 효과적임을 나타낸다.
- [0103] 실시예 14: H1b-ADP 및 항-CD4 항체는 종양 성장을 억제하는데 상승적으로 작용한다.
- [0104] 실험은 다음의 변화를 제외하고는 항-PD-1의 콤보 실험으로서 수행하였다. 6일째에, 이의 종양이 직경 5 mm에 도달한 마우스를 무작위처리하고 다음의 4개의 그룹으로 그룹화하였다: 항-CD4 항체(GK1.5 클론, BE0003-1, BioXcell); 랫트 IgG; H1b-ADP + 랫트 IgG; H1b-ADP + 항-CD4 항체. 각각의 항-CD4 항체(200 g) 및 대조군 IgG(200 g)를 접종 후 3, 4, 8일째에 200 μL 용적으로 복강내 투여하였다. H1b-ADP(6.2 g)는 접종 후 6, 8, 10, 12, 14일째에 20 μL 용적으로 종양내 투여하였다. 결과는 도 20에 나타낸다. 이러한 결과는 H1b-ADP와 CD4 또는 T-reg 결실 항체의 조합이 성장을 억제하고 심지어 생체내에서 종양 세포의 생존능을 억제하는데 효과적임을 나타낸다.
- [0105] 실시예 15: H1b-ADP 및 TLR 효능제는 종양 성장을 억제하는데 상승적으로 작용한다.
- [0106] 실험은 다음의 변화를 제외하고는 항-PD-1의 콤보 실험으로서 수행하였다. 6일째에, 이의 종양이 직경 5 mm에 도달한 마우스를 무작위처리하고 다음의 4개의 그룹으로 그룹화하였다: 레스퀴모드; PBS; H1b-ADP; H1b-ADP + 레스퀴모드. 레스퀴모드(10 g) 및 H1b-ADP(6.2 g)를 접종 후 6, 8, 11일째에 20 μL 용적으로 종양내 투여하였다. 이러한 결과는 H1b-ADP와 TLR 효능제의 조합이 성장을 억제하고 심지어 생체내에서 종양 세포의 생존능을 억제하는데 효과적임을 나타낸다. 결과는 도 21에 나타낸다.
- [0107] 실시예 16: H1b-ADP는 혈청 속에서 포스파타제에 의해 분해되고 포스파타제 억제제 및 AMP에 의해 보호될 수 있다.
- [0108] HEK293 세포내에서 ALPK1을 활성화시키는 H1b-ADP의 활성화는 세포를 소 태아(fetal bovine), 사람 또는 마우스 혈청과 함께 배양한 경우 현저하게 감소(도 22)되었으며, 이는 동물 혈청 속의 구성성분들이 H1b-ADP의 활성을 중화시킬 수 있음을 시사한다. H1b-ADP가 불활성 형태로 화학적으로 전환되는지를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 H1b-ADP와 FBS를 항온처리하고 LC-MS를 사용하여 생성물을 분석하였다. 본 발명자들은 항온처리 시간이 증가함에 따라, H1b-ADP 양이 감소되고 UV 254nm에서 유사한 흡수 강도를 지닌 신규 물질이 증가됨을 발견하였다. 물질은 표준 물질을 사용하여 AMP인 것으로 측정되며, 이는 H1b-ADP에서 P-O-P 포스페이트 무수물 결합이 혈청 속의 효소에 의해 가수분해됨을 시사한다. FBS는 110-352 μU/ml 알칼린 포스파타제를 함유한다. 알칼린 포스파타제는 다양한 분자, 예를 들면, 알코올, 아민, 피로포스페이트, 및 페놀 속에서 포스페이트 에스테르를 가수분해할 수 있는 광범위하게 사용된 탈인산화 시약이다. 포스파타제, 예를 들어, 알칼린 포스파타제는 H1b-ADP 가수분해에 관여할 수 있다. 본 발명자들은 H1b-ADP를 포스파타제 억제제 나트륨 오르토티바네이트( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )와 함께 FBS와 항온처리하기 전에 예비-혼합하였다. 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  처리는 H1b-ADP 가수분해를 효과적으로 억제하였으며(도 23), 이는 혈청 속의 포스파타제 활성이 이의 분해에 필요함을 나타낸다. 포스파타제 만으로 H1b-ADP를 가수분해하는데 충분한지를 측정하기 위하여, 본 발명자들은 H1b-ADP를 소 알칼린 포스파타제와 함께 항온처리하였으며 포스파타제 활성이  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 의 양을 증가시킴에 의해 차단되었음을 발견하였다. 본 발명자들은 혈청 속의

H1b-ADP 가수분해가 항온처리 시간이 지속됨에 따라 둔화되었음을 인식하였으며, 이는 점차적으로 하향-조절된 포스파타제 활성을 나타낸다. 본 발명자들은 가수분해 생성물 AMP의 축적이 포스파타제 활성을 억제할 수 있다고 가설을 세웠다. 혈청 항온처리 전 H1b-ADP와 AMP의 예비-처리하는 포스파타제 활성을 억제하였으며 억제는 AMP 용량-의존성이었다. 결과적으로, FBS-함유 배지에 대한  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ (도 24) 또는 AMP(도 25)의 첨가는 세포계 검정에서 H1b-ADP의 활성을 회복할 수 있었으며, FBS 속의 포스파타제가 H1b-ADP의 활성을 약화시키는데 관여함을 입증한다.

[0109] 실시예 17: H1b-ADP 유도체 화합물은 시험관내에서 ALPK1을 활성화시킨다.

[0110] 다수의 H1b-ADP 유도체 화합물을 본원에 기술된 바와 같이 제조하고 시험관내에서 ALPK1의 효능제로서의 생물학적 활성에 대해 시험하였다. 이러한 실험에서, 화합물의 일련의 희석물을 HEK293 세포의 조직 배양 배지에 도면에 나타낸 바와 같이, 10% FBS의 존재 하에서(도 27b, 도 28b, 도 29b) 또는 부재하에서(도 26, 도 27a, 도 28a, 도 29a) 가하였다. 4시간 후, 세포 상층액을 수집하고 ALPK1 활성화의 지표로서 IL8 ELISA(BD)를 사용하여 IL8 농도에 대해 분석하였다.

[0111] H1b-ADP 유도체 화합물 1 내지 3, 9 내지 17, 19, 20 내지 22, 26내지 32는 ALPK1 활성화 활성을 입증하였다. 시험한 화합물 중에서, 화합물 15는 또한 혈청 분해에 대한 예측하지 못한 내성을 나타내었다(도 27a 및 도 27b와 비교함).

[0112] 실시예 18: H1b-ADP 유도체 화합물은 종양 성장을 억제한다.

[0113] 본 발명자들은 CT26 종양 이종이식체 모델을 사용하여 H1b-ADP 유도체 화합물 1 및 2의 항-암 활성을 시험하였다. 종양 세포(100  $\mu\text{L}$ 의 CT26 세포당  $2 \times 10^5$ 개)를 BALB/c 마우스의 우측 옆구리내로 피하 접종하였다. 7일째에, 이의 종양이 직경 3 내지 5 mm에 도달한 마우스를 무작위처리하고 3개의 그룹(각각의 그룹 당  $n=9$ ), 대조군, 화합물 1(50 nmol), 및 화합물 2(50 nmol)으로 그룹화하였다. 주사는 접종 후 7, 9, 및 11일째에 20  $\mu\text{L}$ 의 총 용적을 사용하여 수행하였다. 종양 용적을 식  $(L \times W^2)/2$ (여기서 L은 보다 긴 측정치이다)을 사용하여 종양 치수의 캘리퍼 측정치로부터 2일마다 계산하였다. 도 30에 나타낸 바와 같이, 화합물 1 및 2는 이러한 모델 시스템에서 종양 성장을 감소시켰으며, 이는 H1b-ADP의 유도체가 종양 성장을 억제하는데 효과적인 항-종양 면역 반응을 유발할 수 있었음을 나타낸다.

[0114] 실시예 19: H1b-ADP는 극도로 낮은 농도에서 대식구를 활성화시킬 수 있다.

[0115] 이러한 실험에서, 마우스 골수-유래된 대식구를 0.4 nM 또는 2 nM H1b-ADP로 2.5시간 동안 처리하고 qPCR에 의해 Cxcl1의 mRNA 발현 분석을 위해 수거하였다. Cxcl1 mRNA 발현은 비-처리된 대조군보다 배 변화(fold change)로 나타나며 용량-의존적 반응을 나타내었다(도 31). 이러한 결과는 조직 잔류성 대식구가 세포외 H1b-ADP를 이용하여 국소 감염을 모니터할 수 있음을 시사한다. 따라서, 극소 용량의 H1b-ADP, 또는 이의 효능제를 사용하여 국소 조직내에서 면역 반응을 향상시키거나 강화시킬 수 있다.

[0116] 추가의 실험에서, 화합물 1을 7주령의 C57 마우스내로 2, 10, 50, 및 200 nmol의 농도에서 피하 주사하였다. 조직을 3시간 후 수확하고 RNA를 추출하였다. 정량적 PCR(qPCR)을 수행하여 마우스 간(도 32a) 및 폐(도 32b)에서 조직 발현 수준 Cxcl1, Cxcl11, IL1b, 및 IL6를 측정하였다. 추가의 케모킨 및 사이토킨을 폐 조직내에서 분석하였다. 데이터는 간 조직이 이러한 H1b-ADP 유도체에 의한 염증성 사이토킨 및 사이토킨의 활성화에 대해 매우 민감함을 나타낸다. 이러한 결과는 본원에 기술된 바와 같은 ALPK1 효능제를 사용한 간 질환 및 장애의 치료가 매우 낮은 용량의 H1b-ADP 및 이의 유도체, 예를 들면, 화합물 1에 의해 달성될 수 있음을 추가로 시사한다. 예를 들면, 이러한 데이터로부터 1 나노그램 내지 1 밀리그램/킬로그램 체중(1 ng/kg 내지 1 mg/kg), 바람직하게는 1 마이크로그램 내지 100 마이크로그램/킬로그램 체중(1  $\mu\text{g/kg}$  내지 100  $\mu\text{g/kg}$ )의 범위의 용량이 간 질환 및 장애를 치료하는데 사용될 수 있음이 예측된다.

[0117] 이. 콜라이 H1b-ADP 생합성 경로는 도 33에 나타낸다.

[0118] 당해 분야의 숙련가는 단지 통상의 실험을 사용하여, 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 구체적인 구현예에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 다음의 청구범위에 포함되는 것으로 의도된다.

[0119] 본원에 인용된 모든 참고문헌은 각각의 개개 공보 또는 특허 또는 특허권이 모든 목적을 위해 이의 전문이 참고로 포함되도록 나타낸 경우와 동일한 정도로 이의 전문이 참고로 및 모든 목적을 위해 본원에 포함된다.

[0120]

본 발명은 본원에 기술된 구체적인 구현예에 의해 영역이 한정되지는 않는다. 실제로, 본원에 기술된 것 외의 본 발명의 다양한 변형은 앞서의 설명 및 첨부된 도면으로부터 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 영역내에 속하는 것으로 의도된다.

## 도면

### 도면1a

#### ALPK1 동형 1

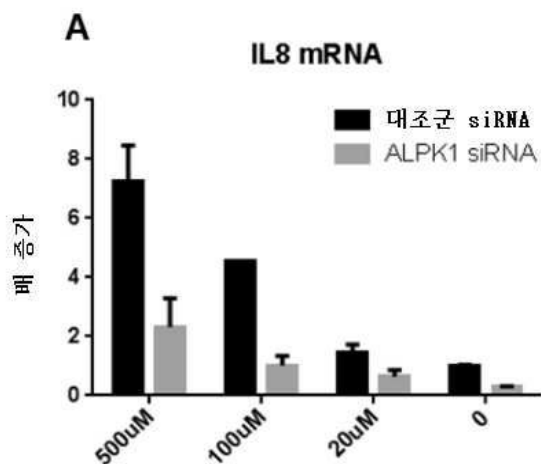
MNNQKVVAVL	LQECKQVLDQ	LLLEAPDVSE	EDKSEDQRCR	ALLPSELRTL	IQEAKEMKWP	60
FVPEKWQYKQ	AVGPEDKTNL	KDVIGAGLQQ	LLASLRASIL	ARDCAAAAI	VFLVDRFLYG	120
LDVSGKLLQV	AKGLHKLQPA	TPIAPQVVIR	QARISVNSGK	LLKAEYILSS	LISNNGATGT	180
WLYRNESDKV	LVQSVCIQIR	QIILQKLGW	YEAELIWAS	IVGYLALPQP	DKKGLSTSLG	240
ILADIFVSMS	KNDYEKFKNN	PQINLSLLKE	FDHLLLSAAE	ACKLAAAFSA	YTPLFVLTA	300
NIRGTCLLSY	SSSNDCPPEL	KNLHLCEAKE	AFEIGLLTKR	DDEPVTGKQE	LHSFVKAAPG	360
LTTVHRRLLH	ETGTVHAASQ	LCKEAMGKLY	NFSTSSRSQD	REALSQEVMS	VIAQVKEHLQ	420
VQSFSNVDDR	SYVPESFECD	LDKLILHGQG	DFQKILDITY	QHHTSVCEVF	ESDCGNKNKE	480
QKDAKTGVC	TALKTEIKNI	DTVSTTQEK	HCQRDTGISS	SLMGKNVQRE	LRRGRRNWT	540
HSDAFRVSLD	QDVETETEPS	DYSNGEGAVF	NKSLSGSQTS	SAWSNLGQFS	SSASWEEVNY	600
HVDDRSARKE	PGKEHLVDTP	CSTALSEELE	NDREGRAMHS	LHSQLHDLSL	QEPNNDNLEP	660
SQNQPQQQMP	LTPFSPHNTP	GIFLAPGAGL	LEGAPEGIQE	VRNMGPRTS	AHSRPSYRSA	720
SWSSDSGRPK	NMGTHPSVQK	EEAFEIIEVF	PETNCDVKDR	QKKEQGEEIS	ERGAGPTFKA	780
SPSWVDPEGE	TAESTEDAPL	DFHRVLHNSL	GNISMLPCSS	FTPNWPVQNP	DSRKSGGPVA	840
EQGIDPDAST	VDEEGQLLDS	MDVPCTNGHG	SHRLCILRQP	PGQRAETPNS	SVSGNILFPV	900
LSEDCCTTEE	GNQPGNMLNC	SQNSSSSSVW	WLKSPAFSSG	SSEGDSPWSY	LNSSGSSWVS	960
LPGKMRKEIL	EARTLQPDFF	EKLLAGVRHD	WLFQRLNTG	VFKPSQLHRA	HSALLLKYSK	1020
KSELWTAQET	IVYLG DYLT	V	V	V	V	1080
DVERQMTAQH	YVTEFNKRLY	EQNIPTQIFY	IPSTILLILE	DKTIKGCISV	EPYILGEFVK	1140
LSNNTKVVK	EYKATEYGLA	YGHFSYEFSN	HRDVVVDLQG	WVTGNGKGLI	YLTDPQIHSV	1200
DQKVFTTNFG	KRGIFYFFNN	QHVECNEICH	RLSLTRPSME	KPCT		

도면1b

ALPK1 동형 2

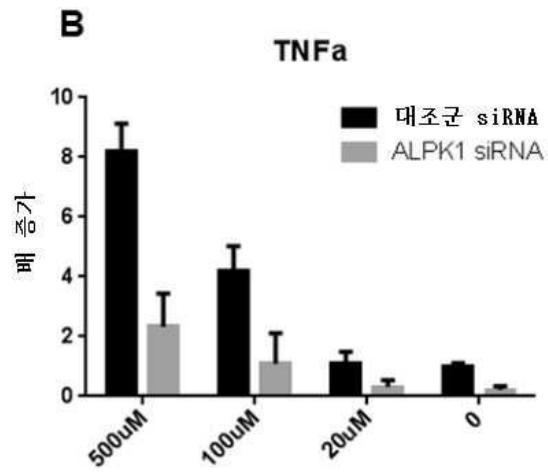
MCRKRTRART	SAAEASLRAS	ILARDCAAAA	AIVFLVDRFL	YGLDVSGKLL	QVAKGLHLKQ	60
PATPIAPQVV	IRQARISVNS	GKLLKAEYIL	SSLISNNGAT	GTWLYRNESD	KVLVQSVCIQ	120
IRGQILQKLG	MWYEAAELIW	ASIVGYLALP	QPDKKGLSTS	LGILADIFVS	MSKNDYEKFK	180
NNPQINLSLL	KEFDHLLLSA	AEACKLAAAF	SAYTPLFVLT	AVNIRGTCLL	SYSSSNDCPP	240
ELKNLHLCEA	KEAFEIGLLT	KRDDEPVTGK	QELHSFVKAA	FGLTTVHRRL	HGETGTVHAA	300
SQLCKEAMGK	LYNFSTSSRS	QDREALSQEV	MSVIAQVKEH	LQVQSFNSVD	DRSYVPESFE	360
CRLDKLLIHG	QGDFQKILDT	YSQHHTSVCE	VFESDCGNK	NEQKDAKTGV	CITALKTEIK	420
NIDTVSTTQE	KPHCQRDTGI	SSSLMGKNVQ	RELRRGGRN	WTHSDAFRVS	LDQDVETETE	480
PSDYSNGEGA	VFNKSLSGSQ	TSSAWSNLGS	FSSSASWEEV	NYHVDDRSAR	KEPGKEHLVD	540
TQCSTALSEE	LENDREGRAM	HSLHSQLHDL	SLQEPNNDNL	EPSQNQPQQQ	MPLTPFSPHN	600
TPGIFLAPGA	GLLEGAPEGI	QEVNMGPRN	TSASRPSYR	SASWSSDSGR	PKNMGTHPSV	660
QKEEAEPIIV	EFPETNCDVK	DRQGKEQGEE	ISERGAGPTF	KASPSWVDPE	GETAESTEDA	720
PLDFHRVLHN	SLGNISMLPC	SSFTPNWPFQ	NPDSRKSGGP	VAEQGIDPDA	STVDEEGQLL	780
DSMDVPCTNG	HGSHRLCILR	QPPGQRAETP	NSSVSGNILF	EVLSEDCITT	EENQPGNML	840
NCSQNSSSSS	VWMLKSPAFS	SGSSEGDSPW	SYLNSSGSSW	VSLPGKMRKE	ILEARTLQPD	900
DPEKLLAGVR	HDWLFQRLN	TGVFKPSQLH	RAHSALLLKY	SKKSELWTAQ	ETIVYLG DYL	960
TVKKKGRQRN	AFVWHHLHQE	EILGRYVGKD	YKEQKGLWHH	FTDVERQMTA	QHYVTEFNKR	1020
LYEQNIPTQI	FYIPSTILLI	LEDKTIKCCI	SVEPYILGEF	VKLSNNTKVV	KTEYKATEYG	1080
LAYGHFSYEF	SNHRDVVDL	QCWVTGNGKG	LIYLTDPQIH	SVDQKVFTTN	FGKRGIFYFF	1140
NNQHVECNEI	CHRLSLTRPS	MEKPCT				

도면2a

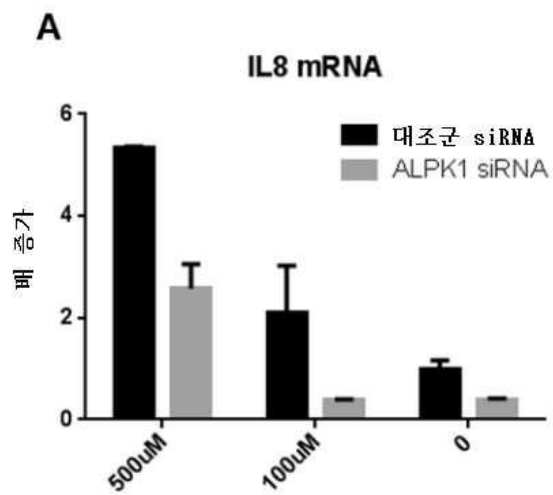




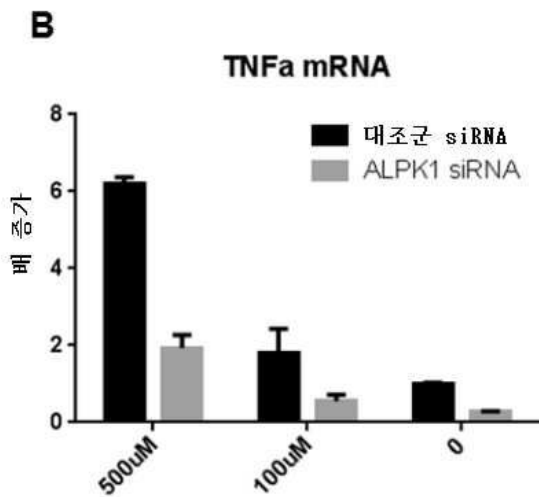
도면2b



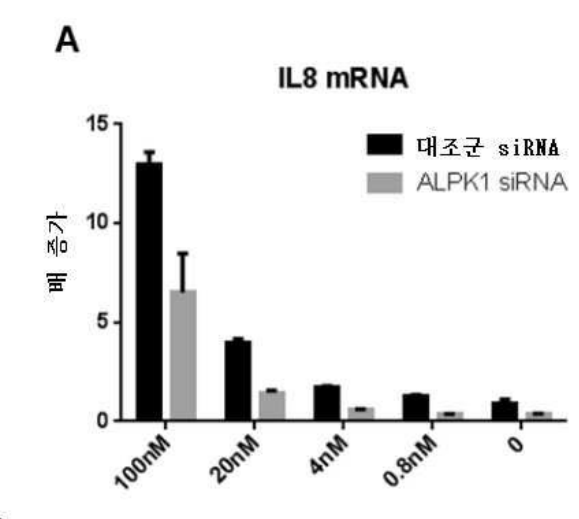
도면3a



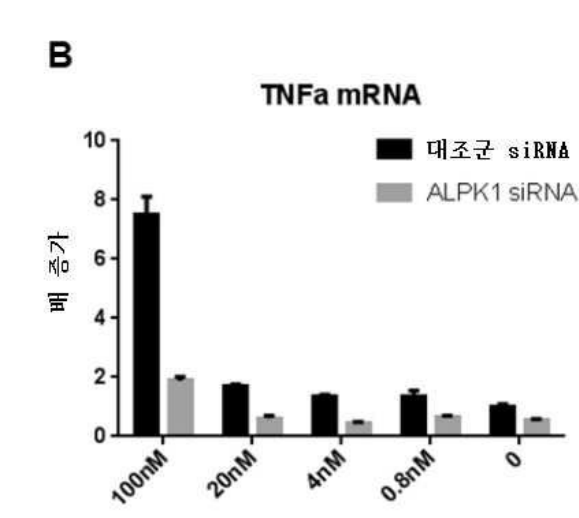
도면3b



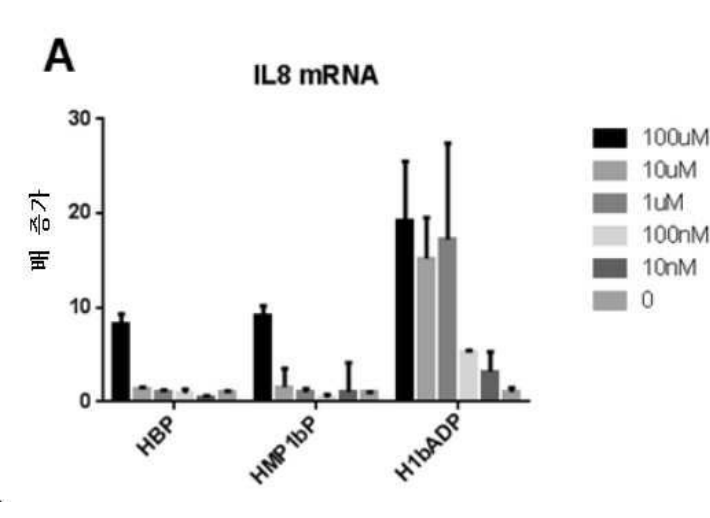
도면4a



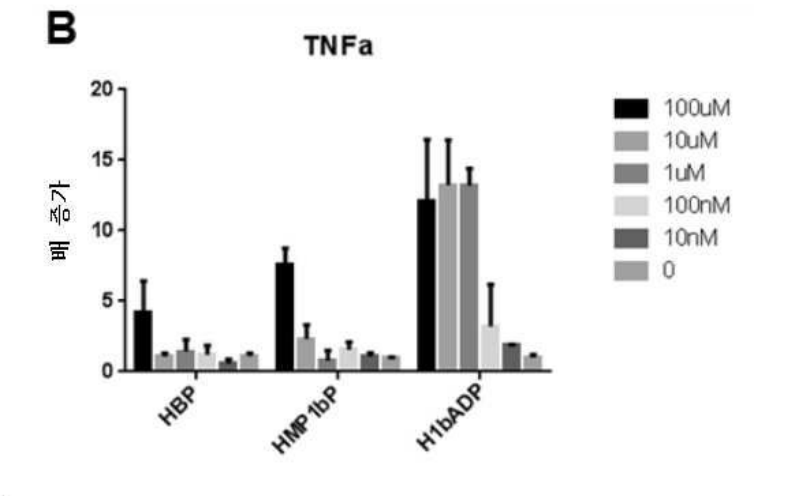
도면4b



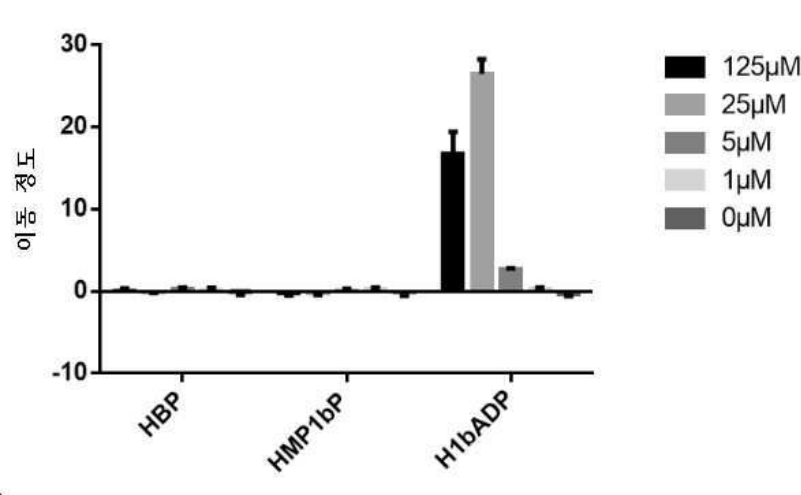
도면5a



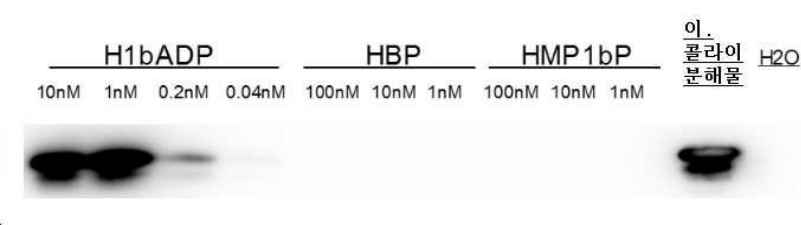
도면5b



도면6



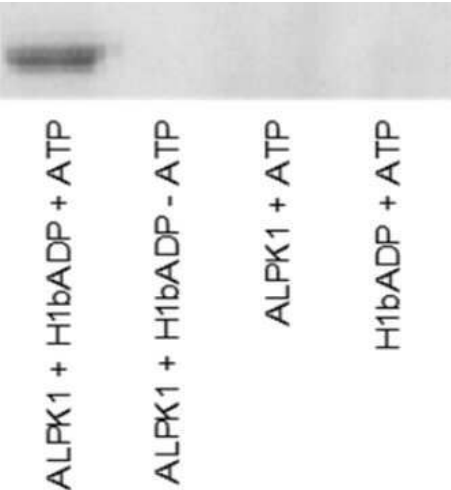
도면7



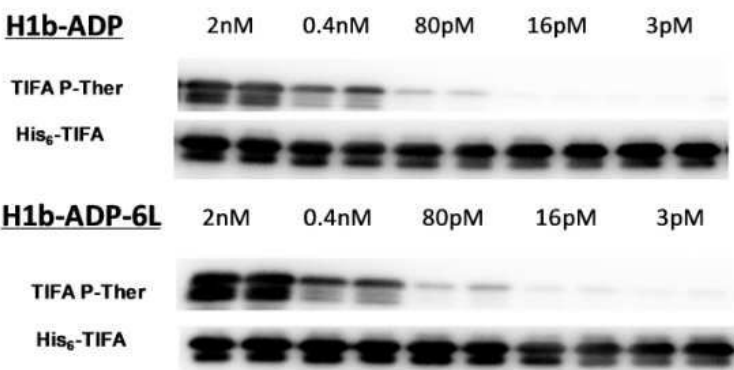
도면8



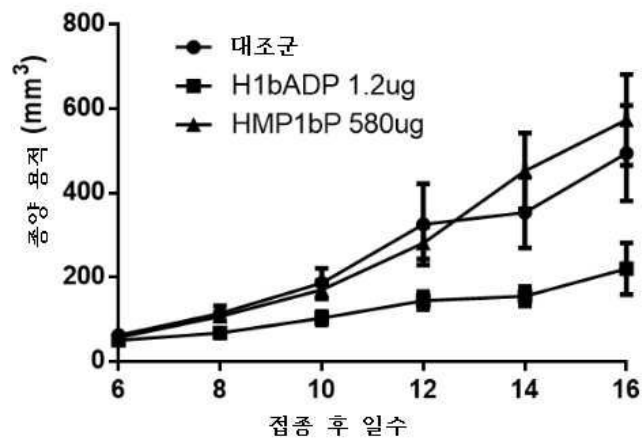
도면9



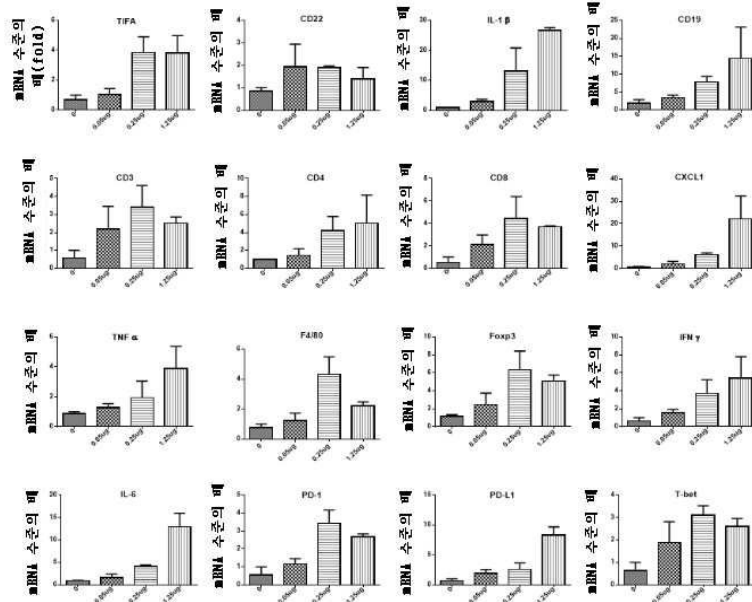
도면10



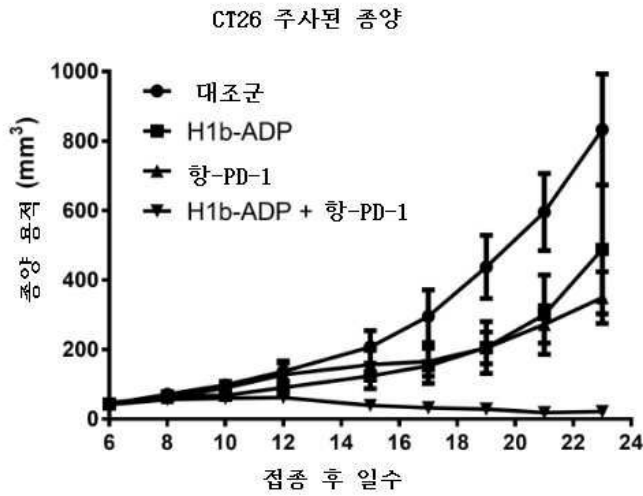
도면11



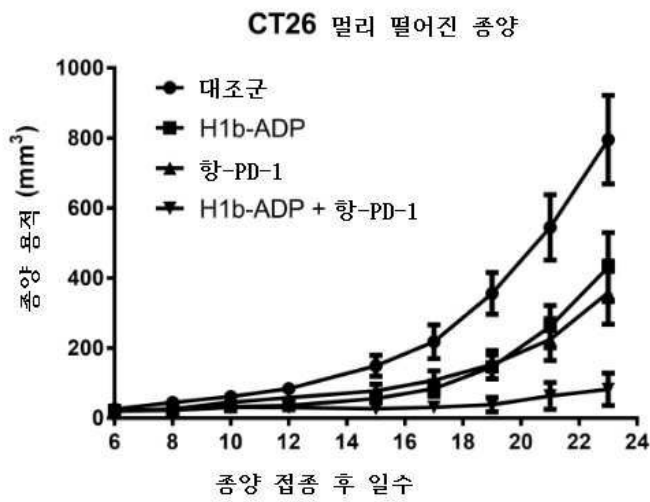
도면12



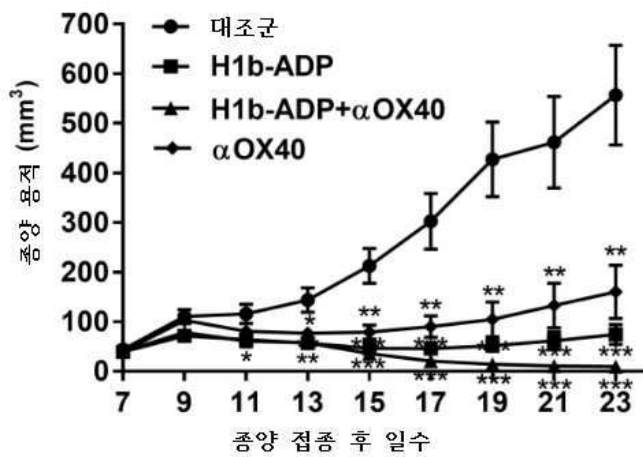
도면13a



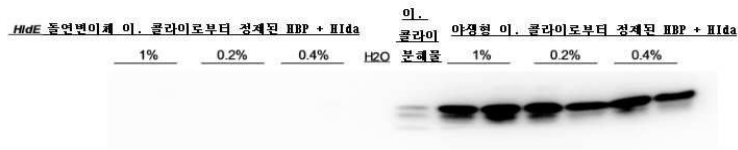
도면13b



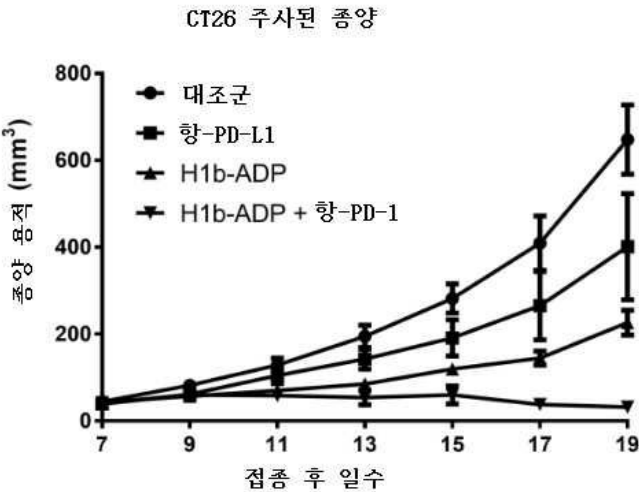
도면14



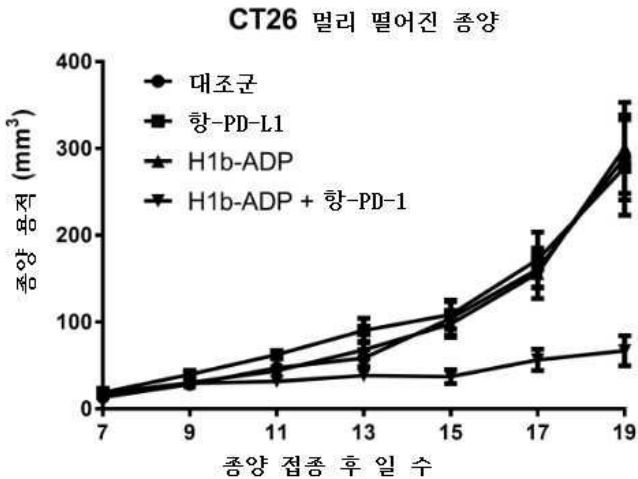
도면15



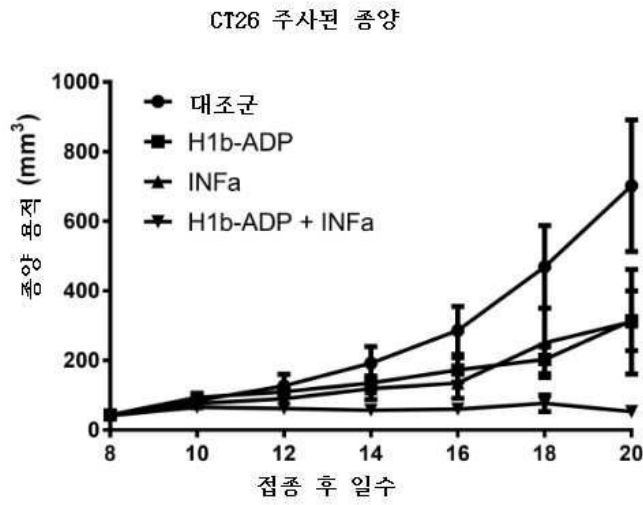
도면16a



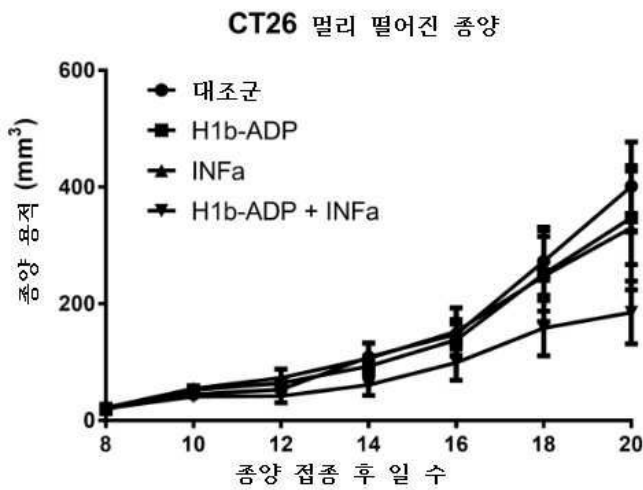
도면16b



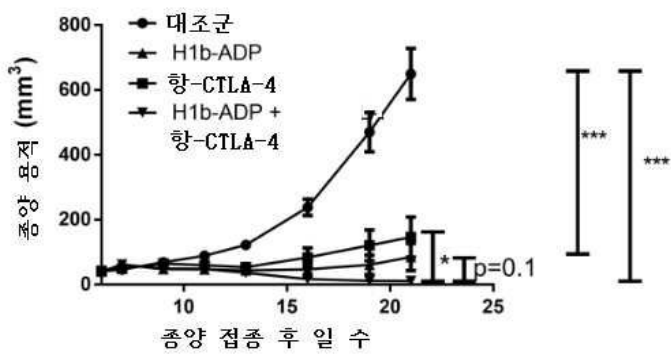
도면17a



도면17b

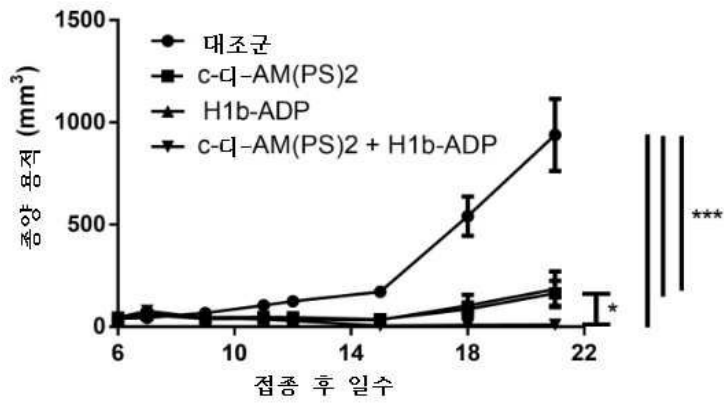


도면18

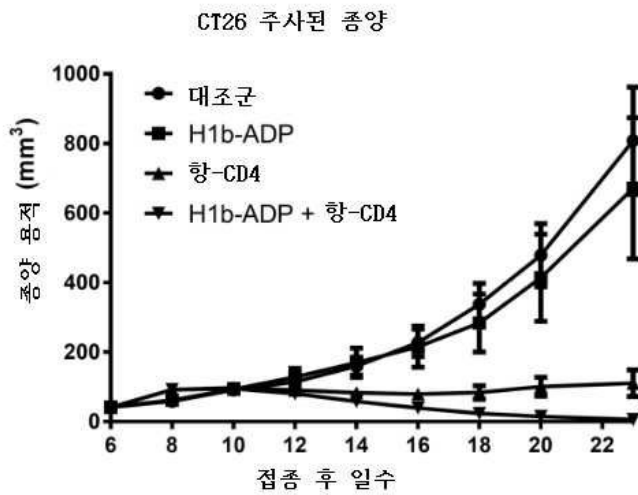




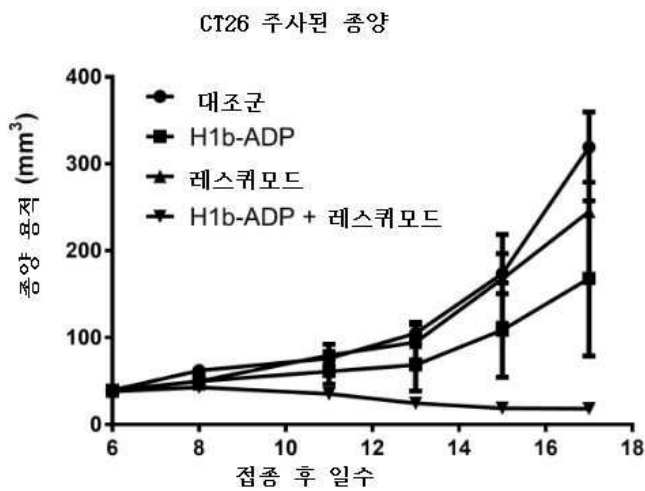
도면19



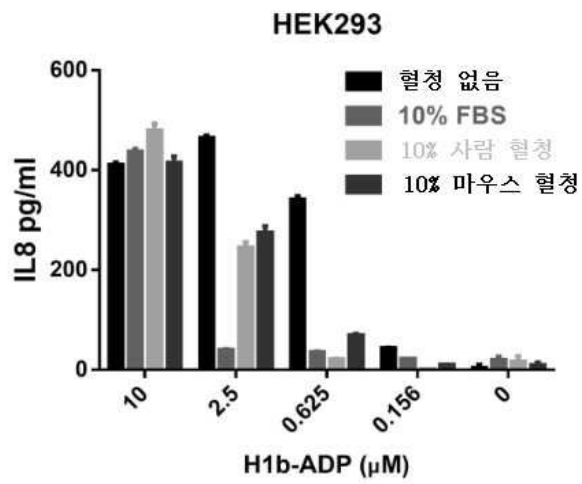
도면20



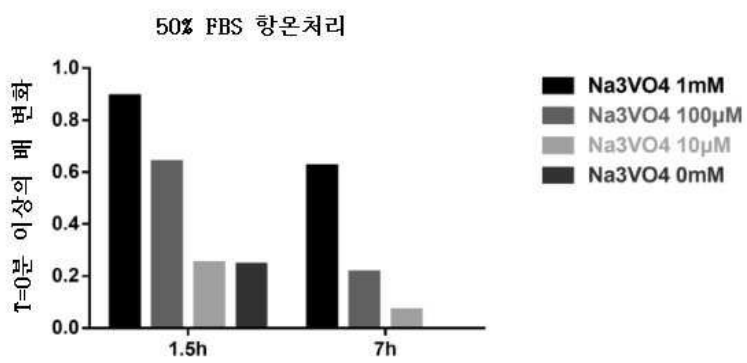
도면21



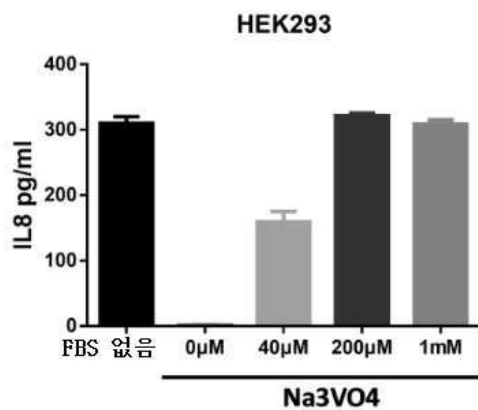
도면22



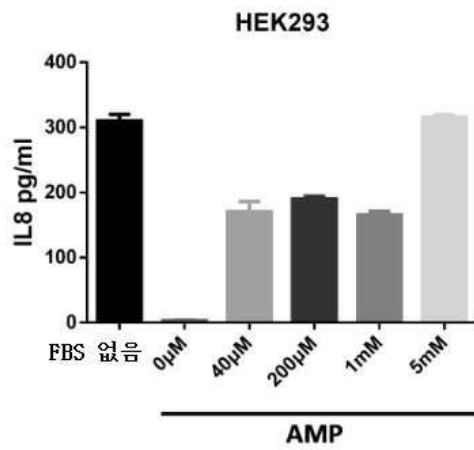
도면23



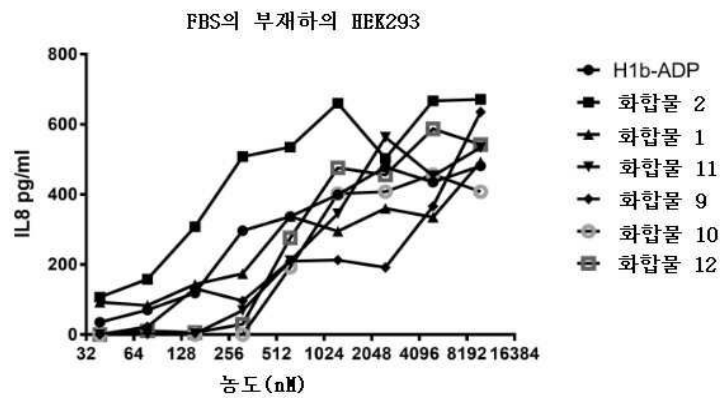
도면24



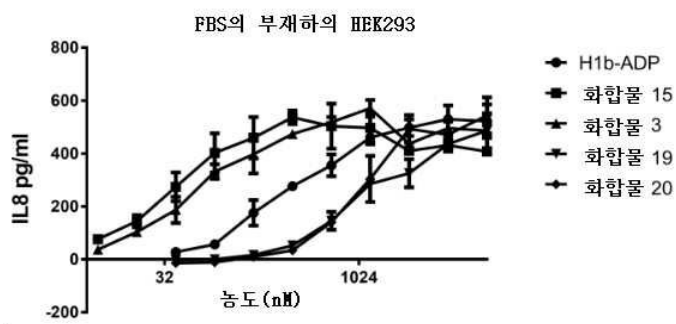
도면25



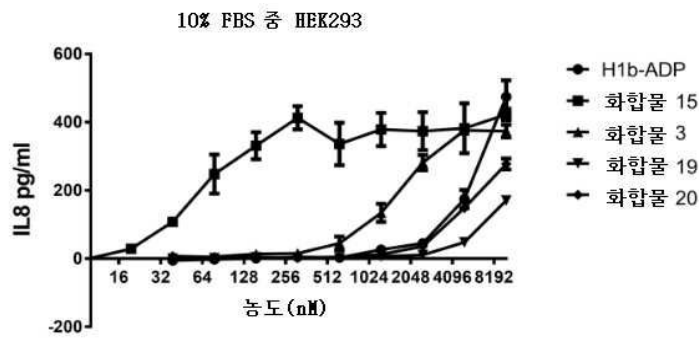
도면26



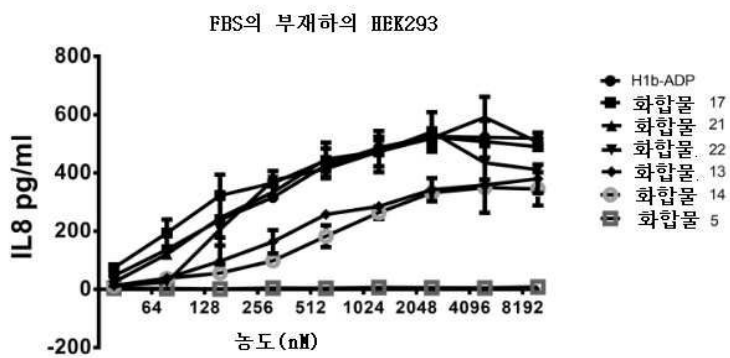
도면27a



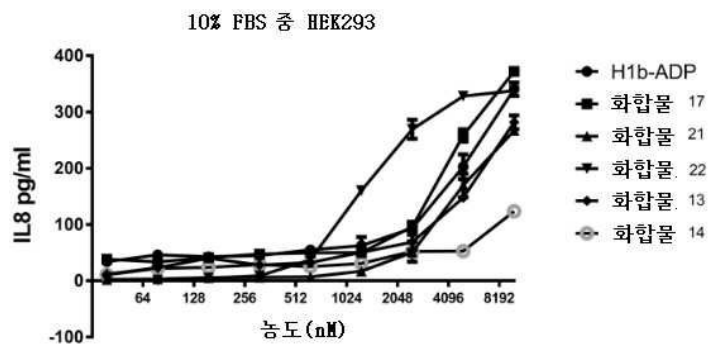
도면27b



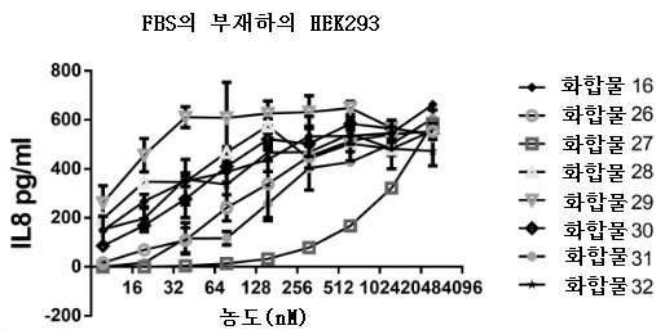
도면28a



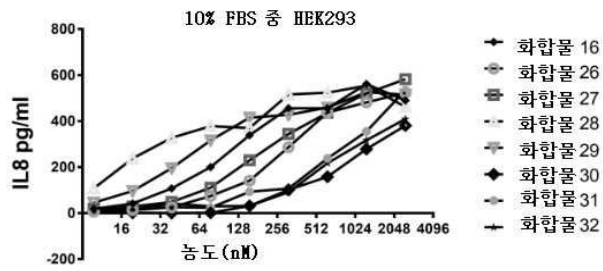
도면28b



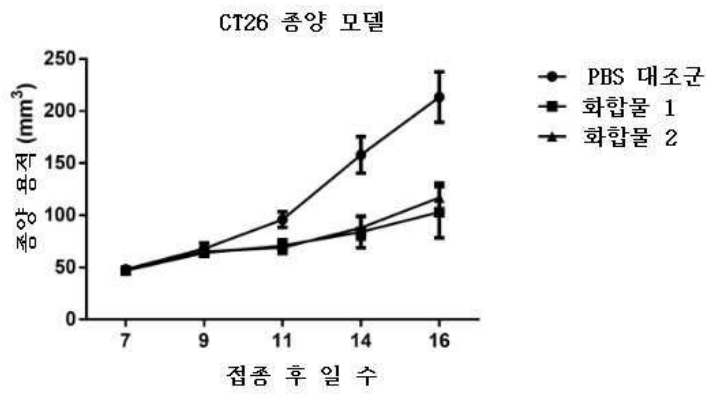
도면29a



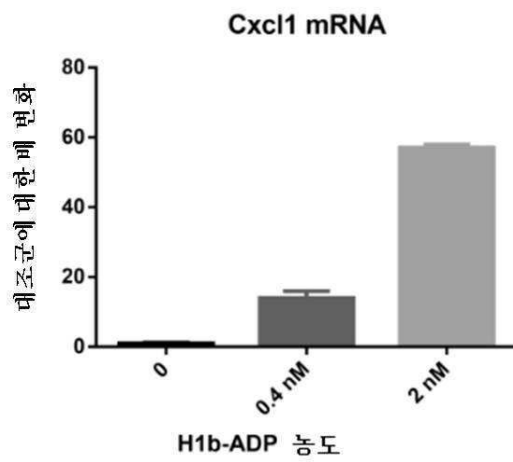
도면29b



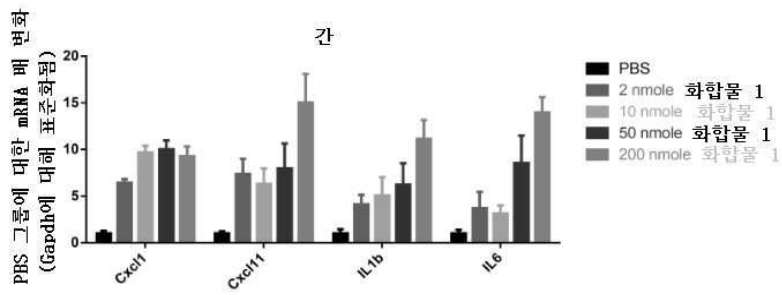
도면30



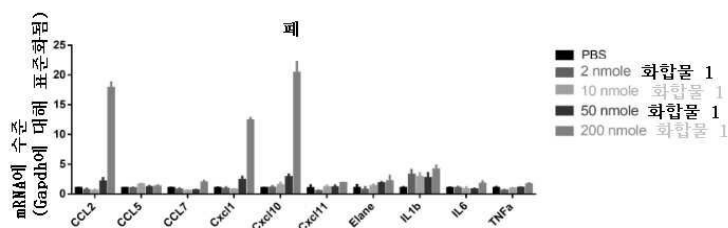
도면31



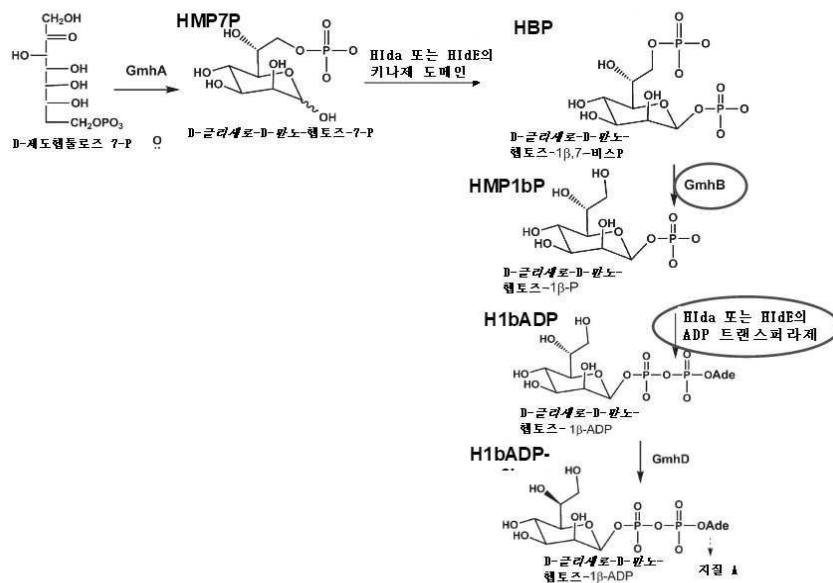
도면32a



도면32b



도면33



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> Shanghai Yao Yuan Biotechnology Co., Ltd

<120> COMPOSITIONS AND METHODS OF MODULATING THE IMMUNE RESPONSE BY  
ACTIVATING ALPHA PROTEIN KINASE 1

<130> 052772-502F03W0

<140> PCT/CN18/111885

<141> 2018-10-25

<150> PCT/CN18/100871

<151> 2018-08-16

<150> PCT/CN18/83153

<151> 2018-04-16

<150> PCT/CN17/107962

<151> 2017-10-27

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1244

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(1244)

<223> ALPK1 Isoform 1

<400> 1

Met Asn Asn Gln Lys Val Val Ala Val Leu Leu Gln Glu Cys Lys Gln

1 5 10 15

Val Leu Asp Gln Leu Leu Leu Glu Ala Pro Asp Val Ser Glu Glu Asp

20 25 30

Lys Ser Glu Asp Gln Arg Cys Arg Ala Leu Leu Pro Ser Glu Leu Arg

35 40 45

Thr Leu Ile Gln Glu Ala Lys Glu Met Lys Trp Pro Phe Val Pro Glu

50 55 60

Lys Trp Gln Tyr Lys Gln Ala Val Gly Pro Glu Asp Lys Thr Asn Leu

65 70 75 80

Lys Asp Val Ile Gly Ala Gly Leu Gln Gln Leu Leu Ala Ser Leu Arg

85 90 95

Ala Ser Ile Leu Ala Arg Asp Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ile Val Phe

100 105 110

Leu Val Asp Arg Phe Leu Tyr Gly Leu Asp Val Ser Gly Lys Leu Leu

115 120 125

Gln Val Ala Lys Gly Leu His Lys Leu Gln Pro Ala Thr Pro Ile Ala

130 135 140

Pro Gln Val Val Ile Arg Gln Ala Arg Ile Ser Val Asn Ser Gly Lys

145 150 155 160

Leu Leu Lys Ala Glu Tyr Ile Leu Ser Ser Leu Ile Ser Asn Asn Gly

165 170 175

Ala Thr Gly Thr Trp Leu Tyr Arg Asn Glu Ser Asp Lys Val Leu Val

180 185 190

Gln Ser Val Cys Ile Gln Ile Arg Gly Gln Ile Leu Gln Lys Leu Gly

195 200 205

Met Trp Tyr Glu Ala Ala Glu Leu Ile Trp Ala Ser Ile Val Gly Tyr

210 215 220

Leu Ala Leu Pro Gln Pro Asp Lys Lys Gly Leu Ser Thr Ser Leu Gly

225 230 235 240

Ile Leu Ala Asp Ile Phe Val Ser Met Ser Lys Asn Asp Tyr Glu Lys

245 250 255

Phe Lys Asn Asn Pro Gln Ile Asn Leu Ser Leu Leu Lys Glu Phe Asp

260 265 270

His His Leu Leu Ser Ala Ala Glu Ala Cys Lys Leu Ala Ala Ala Phe

275 280 285

Ser Ala Tyr Thr Pro Leu Phe Val Leu Thr Ala Val Asn Ile Arg Gly

290 295 300

Thr Cys Leu Leu Ser Tyr Ser Ser Ser Asn Asp Cys Pro Pro Glu Leu

305 310 315 320

Lys Asn Leu His Leu Cys Glu Ala Lys Glu Ala Phe Glu Ile Gly Leu

325 330 335

Leu Thr Lys Arg Asp Asp Glu Pro Val Thr Gly Lys Gln Glu Leu His

340 345 350

Ser Phe Val Lys Ala Ala Phe Gly Leu Thr Thr Val His Arg Arg Leu



355 360 365  
His Gly Glu Thr Gly Thr Val His Ala Ala Ser Gln Leu Cys Lys Glu

370 375 380  
Ala Met Gly Lys Leu Tyr Asn Phe Ser Thr Ser Ser Arg Ser Gln Asp  
385 390 395 400  
Arg Glu Ala Leu Ser Gln Glu Val Met Ser Val Ile Ala Gln Val Lys  
405 410 415  
Glu His Leu Gln Val Gln Ser Phe Ser Asn Val Asp Asp Arg Ser Tyr  
420 425 430  
Val Pro Glu Ser Phe Glu Cys Arg Leu Asp Lys Leu Ile Leu His Gly

435 440 445  
Gln Gly Asp Phe Gln Lys Ile Leu Asp Thr Tyr Ser Gln His His Thr  
450 455 460  
Ser Val Cys Glu Val Phe Glu Ser Asp Cys Gly Asn Asn Lys Asn Glu  
465 470 475 480  
Gln Lys Asp Ala Lys Thr Gly Val Cys Ile Thr Ala Leu Lys Thr Glu  
485 490 495  
Ile Lys Asn Ile Asp Thr Val Ser Thr Thr Gln Glu Lys Pro His Cys

500 505 510  
Gln Arg Asp Thr Gly Ile Ser Ser Ser Leu Met Gly Lys Asn Val Gln  
515 520 525  
Arg Glu Leu Arg Arg Gly Gly Arg Arg Asn Trp Thr His Ser Asp Ala  
530 535 540  
Phe Arg Val Ser Leu Asp Gln Asp Val Glu Thr Glu Thr Glu Pro Ser  
545 550 555 560  
Asp Tyr Ser Asn Gly Glu Gly Ala Val Phe Asn Lys Ser Leu Ser Gly

565 570 575  
Ser Gln Thr Ser Ser Ala Trp Ser Asn Leu Ser Gly Phe Ser Ser Ser  
580 585 590  
Ala Ser Trp Glu Glu Val Asn Tyr His Val Asp Asp Arg Ser Ala Arg  
595 600 605

Lys Glu Pro Gly Lys Glu His Leu Val Asp Thr Gln Cys Ser Thr Ala  
 610 615 620  
 Leu Ser Glu Glu Leu Glu Asn Asp Arg Glu Gly Arg Ala Met His Ser  
  
 625 630 635 640  
 Leu His Ser Gln Leu His Asp Leu Ser Leu Gln Glu Pro Asn Asn Asp  
 645 650 655  
 Asn Leu Glu Pro Ser Gln Asn Gln Pro Gln Gln Gln Met Pro Leu Thr  
 660 665 670  
 Pro Phe Ser Pro His Asn Thr Pro Gly Ile Phe Leu Ala Pro Gly Ala  
 675 680 685  
 Gly Leu Leu Glu Gly Ala Pro Glu Gly Ile Gln Glu Val Arg Asn Met  
  
 690 695 700  
 Gly Pro Arg Asn Thr Ser Ala His Ser Arg Pro Ser Tyr Arg Ser Ala  
 705 710 715 720  
 Ser Trp Ser Ser Asp Ser Gly Arg Pro Lys Asn Met Gly Thr His Pro  
 725 730 735  
 Ser Val Gln Lys Glu Glu Ala Phe Glu Ile Ile Val Glu Phe Pro Glu  
 740 745 750  
 Thr Asn Cys Asp Val Lys Asp Arg Gln Gly Lys Glu Gln Gly Glu Glu  
  
 755 760 765  
 Ile Ser Glu Arg Gly Ala Gly Pro Thr Phe Lys Ala Ser Pro Ser Trp  
 770 775 780  
 Val Asp Pro Glu Gly Glu Thr Ala Glu Ser Thr Glu Asp Ala Pro Leu  
 785 790 795 800  
 Asp Phe His Arg Val Leu His Asn Ser Leu Gly Asn Ile Ser Met Leu  
 805 810 815  
 Pro Cys Ser Ser Phe Thr Pro Asn Trp Pro Val Gln Asn Pro Asp Ser  
  
 820 825 830  
 Arg Lys Ser Gly Gly Pro Val Ala Glu Gln Gly Ile Asp Pro Asp Ala  
 835 840 845  
 Ser Thr Val Asp Glu Glu Gly Gln Leu Leu Asp Ser Met Asp Val Pro

850                      855                      860  
 Cys Thr Asn Gly His Gly Ser His Arg Leu Cys Ile Leu Arg Gln Pro  
 865                      870                      875                      880  
 Pro Gly Gln Arg Ala Glu Thr Pro Asn Ser Ser Val Ser Gly Asn Ile  
  
 885                      890                      895  
 Leu Phe Pro Val Leu Ser Glu Asp Cys Thr Thr Thr Glu Glu Gly Asn  
 900                      905                      910  
 Gln Pro Gly Asn Met Leu Asn Cys Ser Gln Asn Ser Ser Ser Ser Ser  
 915                      920                      925  
 Val Trp Trp Leu Lys Ser Pro Ala Phe Ser Ser Gly Ser Ser Glu Gly  
 930                      935                      940  
 Asp Ser Pro Trp Ser Tyr Leu Asn Ser Ser Gly Ser Ser Trp Val Ser  
  
 945                      950                      955                      960  
 Leu Pro Gly Lys Met Arg Lys Glu Ile Leu Glu Ala Arg Thr Leu Gln  
 965                      970                      975  
 Pro Asp Asp Phe Glu Lys Leu Leu Ala Gly Val Arg His Asp Trp Leu  
 980                      985                      990  
 Phe Gln Arg Leu Glu Asn Thr Gly Val Phe Lys Pro Ser Gln Leu His  
 995                      1000                      1005  
 Arg Ala His Ser Ala Leu Leu Leu Lys Tyr Ser Lys Lys Ser Glu  
  
 1010                      1015                      1020  
 Leu Trp Thr Ala Gln Glu Thr Ile Val Tyr Leu Gly Asp Tyr Leu  
 1025                      1030                      1035  
 Thr Val Lys Lys Lys Gly Arg Gln Arg Asn Ala Phe Trp Val His  
 1040                      1045                      1050  
 His Leu His Gln Glu Glu Ile Leu Gly Arg Tyr Val Gly Lys Asp  
 1055                      1060                      1065  
 Tyr Lys Glu Gln Lys Gly Leu Trp His His Phe Thr Asp Val Glu  
  
 1070                      1075                      1080  
 Arg Gln Met Thr Ala Gln His Tyr Val Thr Glu Phe Asn Lys Arg  
 1085                      1090                      1095

Leu Tyr Glu Gln Asn Ile Pro Thr Gln Ile Phe Tyr Ile Pro Ser  
1100 1105 1110

Thr Ile Leu Leu Ile Leu Glu Asp Lys Thr Ile Lys Gly Cys Ile  
1115 1120 1125

Ser Val Glu Pro Tyr Ile Leu Gly Glu Phe Val Lys Leu Ser Asn  
1130 1135 1140

Asn Thr Lys Val Val Lys Thr Glu Tyr Lys Ala Thr Glu Tyr Gly  
1145 1150 1155

Leu Ala Tyr Gly His Phe Ser Tyr Glu Phe Ser Asn His Arg Asp  
1160 1165 1170

Val Val Val Asp Leu Gln Gly Trp Val Thr Gly Asn Gly Lys Gly  
1175 1180 1185

Leu Ile Tyr Leu Thr Asp Pro Gln Ile His Ser Val Asp Gln Lys  
1190 1195 1200

Val Phe Thr Thr Asn Phe Gly Lys Arg Gly Ile Phe Tyr Phe Phe  
1205 1210 1215

Asn Asn Gln His Val Glu Cys Asn Glu Ile Cys His Arg Leu Ser  
1220 1225 1230

Leu Thr Arg Pro Ser Met Glu Lys Pro Cys Thr  
1235 1240

<210> 2

<211> 1166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(1166)

<223> ALPK1 Isoform 2

<400> 2

Met Cys Arg Lys Arg Thr Arg Ala Arg Thr Ser Ala Ala Glu Ala Ser

1 5 10 15

Leu Arg Ala Ser Ile Leu Ala Arg Asp Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ile

20 25 30

Val Phe Leu Val Asp Arg Phe Leu Tyr Gly Leu Asp Val Ser Gly Lys  
35 40 45

Leu Leu Gln Val Ala Lys Gly Leu His Lys Leu Gln Pro Ala Thr Pro  
50 55 60

Ile Ala Pro Gln Val Val Ile Arg Gln Ala Arg Ile Ser Val Asn Ser  
65 70 75 80

Gly Lys Leu Leu Lys Ala Glu Tyr Ile Leu Ser Ser Leu Ile Ser Asn  
85 90 95

Asn Gly Ala Thr Gly Thr Trp Leu Tyr Arg Asn Glu Ser Asp Lys Val  
100 105 110

Leu Val Gln Ser Val Cys Ile Gln Ile Arg Gly Gln Ile Leu Gln Lys  
115 120 125

Leu Gly Met Trp Tyr Glu Ala Ala Glu Leu Ile Trp Ala Ser Ile Val  
130 135 140

Gly Tyr Leu Ala Leu Pro Gln Pro Asp Lys Lys Gly Leu Ser Thr Ser  
145 150 155 160

Leu Gly Ile Leu Ala Asp Ile Phe Val Ser Met Ser Lys Asn Asp Tyr  
165 170 175

Glu Lys Phe Lys Asn Asn Pro Gln Ile Asn Leu Ser Leu Leu Lys Glu  
180 185 190

Phe Asp His His Leu Leu Ser Ala Ala Glu Ala Cys Lys Leu Ala Ala  
195 200 205

Ala Phe Ser Ala Tyr Thr Pro Leu Phe Val Leu Thr Ala Val Asn Ile  
210 215 220

Arg Gly Thr Cys Leu Leu Ser Tyr Ser Ser Ser Asn Asp Cys Pro Pro  
225 230 235 240

Glu Leu Lys Asn Leu His Leu Cys Glu Ala Lys Glu Ala Phe Glu Ile  
245 250 255

Gly Leu Leu Thr Lys Arg Asp Asp Glu Pro Val Thr Gly Lys Gln Glu  
260 265 270

Leu His Ser Phe Val Lys Ala Ala Phe Gly Leu Thr Thr Val His Arg

275	280	285	
Arg Leu His Gly Glu Thr Gly Thr Val His Ala Ala Ser Gln Leu Cys			
290	295	300	
Lys Glu Ala Met Gly Lys Leu Tyr Asn Phe Ser Thr Ser Ser Arg Ser			
305	310	315	320
Gln Asp Arg Glu Ala Leu Ser Gln Glu Val Met Ser Val Ile Ala Gln			
325	330	335	
Val Lys Glu His Leu Gln Val Gln Ser Phe Ser Asn Val Asp Asp Arg			
340	345	350	
Ser Tyr Val Pro Glu Ser Phe Glu Cys Arg Leu Asp Lys Leu Ile Leu			
355	360	365	
His Gly Gln Gly Asp Phe Gln Lys Ile Leu Asp Thr Tyr Ser Gln His			
370	375	380	
His Thr Ser Val Cys Glu Val Phe Glu Ser Asp Cys Gly Asn Asn Lys			
385	390	395	400
Asn Glu Gln Lys Asp Ala Lys Thr Gly Val Cys Ile Thr Ala Leu Lys			
405	410	415	
Thr Glu Ile Lys Asn Ile Asp Thr Val Ser Thr Thr Gln Glu Lys Pro			
420	425	430	
His Cys Gln Arg Asp Thr Gly Ile Ser Ser Ser Leu Met Gly Lys Asn			
435	440	445	
Val Gln Arg Glu Leu Arg Arg Gly Gly Arg Arg Asn Trp Thr His Ser			
450	455	460	
Asp Ala Phe Arg Val Ser Leu Asp Gln Asp Val Glu Thr Glu Thr Glu			
465	470	475	480
Pro Ser Asp Tyr Ser Asn Gly Glu Gly Ala Val Phe Asn Lys Ser Leu			
485	490	495	
Ser Gly Ser Gln Thr Ser Ser Ala Trp Ser Asn Leu Ser Gly Phe Ser			
500	505	510	
Ser Ser Ala Ser Trp Glu Glu Val Asn Tyr His Val Asp Asp Arg Ser			
515	520	525	

Ala Arg Lys Glu Pro Gly Lys Glu His Leu Val Asp Thr Gln Cys Ser  
530 535 540

Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Asn Asp Arg Glu Gly Arg Ala Met  
545 550 555 560

His Ser Leu His Ser Gln Leu His Asp Leu Ser Leu Gln Glu Pro Asn  
565 570 575

Asn Asp Asn Leu Glu Pro Ser Gln Asn Gln Pro Gln Gln Gln Met Pro  
580 585 590

Leu Thr Pro Phe Ser Pro His Asn Thr Pro Gly Ile Phe Leu Ala Pro  
595 600 605

Gly Ala Gly Leu Leu Glu Gly Ala Pro Glu Gly Ile Gln Glu Val Arg  
610 615 620

Asn Met Gly Pro Arg Asn Thr Ser Ala His Ser Arg Pro Ser Tyr Arg  
625 630 635 640

Ser Ala Ser Trp Ser Ser Asp Ser Gly Arg Pro Lys Asn Met Gly Thr  
645 650 655

His Pro Ser Val Gln Lys Glu Glu Ala Phe Glu Ile Ile Val Glu Phe  
660 665 670

Pro Glu Thr Asn Cys Asp Val Lys Asp Arg Gln Gly Lys Glu Gln Gly  
675 680 685

Glu Glu Ile Ser Glu Arg Gly Ala Gly Pro Thr Phe Lys Ala Ser Pro  
690 695 700

Ser Trp Val Asp Pro Glu Gly Glu Thr Ala Glu Ser Thr Glu Asp Ala  
705 710 715 720

Pro Leu Asp Phe His Arg Val Leu His Asn Ser Leu Gly Asn Ile Ser  
725 730 735

Met Leu Pro Cys Ser Ser Phe Thr Pro Asn Trp Pro Val Gln Asn Pro  
740 745 750

Asp Ser Arg Lys Ser Gly Gly Pro Val Ala Glu Gln Gly Ile Asp Pro  
755 760 765

Asp Ala Ser Thr Val Asp Glu Glu Gly Gln Leu Leu Asp Ser Met Asp

770	775	780	
Val Pro Cys Thr Asn Gly His Gly Ser His Arg Leu Cys Ile Leu Arg			
785	790	795	800
Gln Pro Pro Gly Gln Arg Ala Glu Thr Pro Asn Ser Ser Val Ser Gly			
	805	810	815
Asn Ile Leu Phe Pro Val Leu Ser Glu Asp Cys Thr Thr Thr Glu Glu			
	820	825	830
Gly Asn Gln Pro Gly Asn Met Leu Asn Cys Ser Gln Asn Ser Ser Ser			
	835	840	845
Ser Ser Val Trp Trp Leu Lys Ser Pro Ala Phe Ser Ser Gly Ser Ser			
	850	855	860
Glu Gly Asp Ser Pro Trp Ser Tyr Leu Asn Ser Ser Gly Ser Ser Trp			
865	870	875	880
Val Ser Leu Pro Gly Lys Met Arg Lys Glu Ile Leu Glu Ala Arg Thr			
	885	890	895
Leu Gln Pro Asp Asp Phe Glu Lys Leu Leu Ala Gly Val Arg His Asp			
	900	905	910
Trp Leu Phe Gln Arg Leu Glu Asn Thr Gly Val Phe Lys Pro Ser Gln			
	915	920	925
Leu His Arg Ala His Ser Ala Leu Leu Leu Lys Tyr Ser Lys Lys Ser			
	930	935	940
Glu Leu Trp Thr Ala Gln Glu Thr Ile Val Tyr Leu Gly Asp Tyr Leu			
945	950	955	960
Thr Val Lys Lys Lys Gly Arg Gln Arg Asn Ala Phe Trp Val His His			
	965	970	975
Leu His Gln Glu Glu Ile Leu Gly Arg Tyr Val Gly Lys Asp Tyr Lys			
	980	985	990
Glu Gln Lys Gly Leu Trp His His Phe Thr Asp Val Glu Arg Gln Met			
	995	1000	1005
Thr Ala Gln His Tyr Val Thr Glu Phe Asn Lys Arg Leu Tyr Glu			
1010	1015	1020	



Gln Asn	Ile Pro Thr	Gln Ile	Phe Tyr	Ile Pro Ser	Thr Ile Leu
1025		1030		1035	
Leu Ile	Leu Glu Asp	Lys Thr	Ile Lys Gly	Cys Ile	Ser Val Glu
1040		1045		1050	
Pro Tyr	Ile Leu Gly	Glu Phe	Val Lys Leu	Ser Asn	Asn Thr Lys
1055		1060		1065	
Val Val	Lys Thr Glu	Tyr Lys	Ala Thr Glu	Tyr Gly	Leu Ala Tyr
1070		1075		1080	

Gly His	Phe Ser Tyr	Glu Phe	Ser Asn His	Arg Asp	Val Val Val
1085		1090		1095	
Asp Leu	Gln Gly Trp	Val Thr	Gly Asn Gly	Lys Gly	Leu Ile Tyr
1100		1105		1110	
Leu Thr	Asp Pro Gln	Ile His	Ser Val Asp	Gln Lys	Val Phe Thr
1115		1120		1125	
Thr Asn	Phe Gly Lys	Arg Gly	Ile Phe Tyr	Phe Phe	Asn Asn Gln
1130		1135		1140	

His Val	Glu Cys Asn	Glu Ile	Cys His Arg	Leu Ser	Leu Thr Arg
1145		1150		1155	
Pro Ser	Met Glu Lys	Pro Cys	Thr		
1160		1165			

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

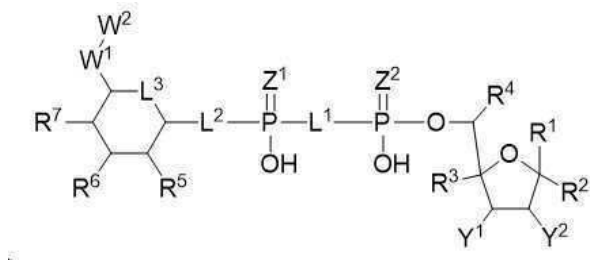
【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

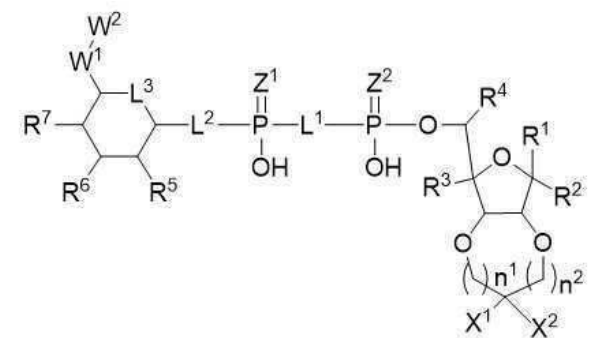
【변경전】

화학식 IA 또는 화학식 IB의 화합물 또는 이의 입체이성체, 호변이성체(tautomer) 또는 약제학적으로 허용되는 염:

[화학식 IA]



[화학식 IB]



상기 식에서,

$Y^1$  및  $Y^2$ 는 H, D, -OH, 할로젠,  $C_1$ - $C_4$  알킬,  $C_1$ - $C_4$  알콕실,  $C_1$ - $C_4$  할로알킬,  $C_1$ - $C_4$  할로알콕실,  $C_1$ - $C_4$  알카노일옥실 및  $C_2$ - $C_4$  알케닐옥실로부터 독립적으로 선택되고;

$n^1$  및  $n^2$ 는 각각 0이고;

$X^1$  및  $X^2$ 는 H, D, 및  $C_1$ - $C_4$  알킬로부터 독립적으로 선택되고;

$L^2$ 는 0이고;

$L^1$ 은 0 또는 S이고;

$L^3$ 은 0이고;

$Z^1$  및  $Z^2$ 는 O 및 S로부터 독립적으로 선택되고;

$W^1$ 은  $-(R^{10}R^{11})-$ 이고, 여기서  $R^{10}$ 은 할로젠이며  $R^{11}$ 은 H, D, -OH, 할로젠,  $C_1$ - $C_4$  알킬,  $C_1$ - $C_4$  알콕실,  $C_1$ - $C_4$  할로알킬,  $C_1$ - $C_4$ -할로알콕실,  $C_1$ - $C_4$  알카노일옥실 및  $C_2$ - $C_4$  알케닐옥실로부터 선택되고;

$W^2$ 는 H이거나, -OH 및  $R^{12}CO_2-$ 로부터 선택된 1개의 치환체로 임의로 치환되는  $C_1$ - $C_3$  알킬이고, 여기서  $R^{12}$ 는  $C_1$ - $C_3$  알킬이고;

$R^1$ 은 5 내지 10개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 헤테로아릴이고, 여기서  $R^1$ 은 D, 할로젠, -OH, =O, CN,  $NH_2$ ,  $C_1$ - $C_4$  알킬,  $C_1$ - $C_4$  알콕시,  $C_1$ - $C_4$  알킬아민,  $C_1$ - $C_4$  디알킬아민 및  $(R^{13}R^{14})NCO-$ 로부터 선택된 1 내지 3개의 치환체로 임의로 치환되고, 여기서  $R^{13}$  및  $R^{14}$ 는 H 및

C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬로부터 독립적으로 선택되고;

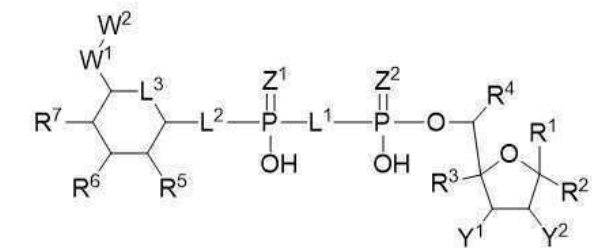
R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> 및 R<sup>4</sup>는 H, D, 할로젠 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬로부터 독립적으로 선택되며;

R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> 및 R<sup>7</sup>은 -OH 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알카노일옥실로 이루어진 그룹으로부터 각각 독립적으로 선택된다.

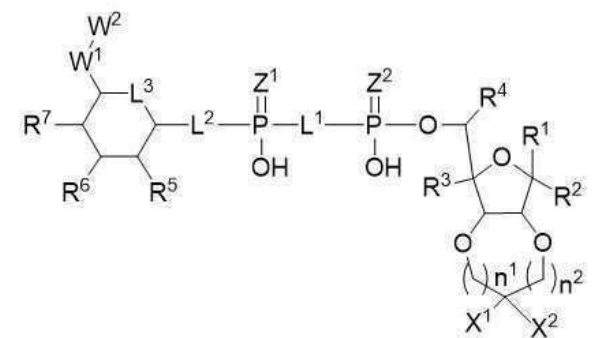
【변경후】

화학식 IA 또는 화학식 IB의 화합물 또는 이의 입체이성체, 호변이성체(tautomer) 또는 약제학적으로 허용되는 염:

[화학식 IA]



[화학식 IB]



상기 식에서,

Y<sup>1</sup> 및 Y<sup>2</sup>는 H, D, -OH, 할로젠, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 할로알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 할로알콕실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알카노일옥실 및 C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 알케닐옥실로부터 독립적으로 선택되고;

n<sup>1</sup> 및 n<sup>2</sup>는 각각 0이고;

X<sup>1</sup> 및 X<sup>2</sup>는 H, D, 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬로부터 독립적으로 선택되고;

L<sup>2</sup>는 0이고;

L<sup>1</sup>은 0이고;

L<sup>3</sup>은 0 또는 S이고;

Z<sup>1</sup> 및 Z<sup>2</sup>는 O 및 S로부터 독립적으로 선택되고;

W<sup>1</sup>은 -C(R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup>)-이고, 여기서 R<sup>10</sup>은 할로젠이며 R<sup>11</sup>은 H, D, -OH, 할로젠, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알콕실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 할로알킬, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-할로알콕실, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알카노일옥실 및 C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> 알케닐옥실로부터 선택되고;

$W^2$ 는 H이거나,  $-OH$  및  $R^{12}CO_2$ -로부터 선택된 1개의 치환체로 임의로 치환되는  $C_1-C_3$  알킬이고, 여기서  $R^{12}$ 는  $C_1-C_3$  알킬이고;

$R^1$ 은 5 내지 10개의 환 원자를 함유하고 환 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 헤테로아릴이고, 여기서  $R^1$ 은 D, 할로젠,  $-OH$ ,  $=O$ , CN,  $NH_2$ ,  $C_1-C_4$  알킬,  $C_1-C_4$  알콕시,  $C_1-C_4$  알킬아민,  $C_1-C_4$  디알킬아민 및  $(R^{13}R^{14})NCO$ -로부터 선택된 1 내지 3개의 치환체로 임의로 치환되고, 여기서  $R^{13}$  및  $R^{14}$ 는 H 및  $C_1-C_4$  알킬로부터 독립적으로 선택되고;

$R^2$ ,  $R^3$  및  $R^4$ 는 H, D, 할로젠 및  $C_1-C_4$  알킬로부터 독립적으로 선택되며;

$R^5$ ,  $R^6$  및  $R^7$ 은  $-OH$  및  $C_1-C_4$  알카노일옥실로 이루어진 그룹으로부터 각각 독립적으로 선택된다.