



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0049728  
(43) 공개일자 2020년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07C 251/62 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)  
A61K 31/12 (2006.01) C07C 249/04 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07C 251/62 (2013.01)  
A23L 33/10 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2020-0050118(분할)  
(22) 출원일자 2020년04월24일  
심사청구일자 2020년04월24일  
(62) 원출원 특허 10-2017-0109990  
원출원일자 2017년08월30일  
심사청구일자 2018년06월25일

(71) 출원인  
경희대학교 산학협력단  
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경  
희대학교 국제캠퍼스내)  
(72) 발명자  
김남중  
서울특별시 강남구 자곡로 260, 419동 203호(자곡  
동, 강남한양수자인아파트)  
인경수  
경기도 고양시 덕양구 서정마을로 42, 409동 701  
호(행신동)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
위병갑

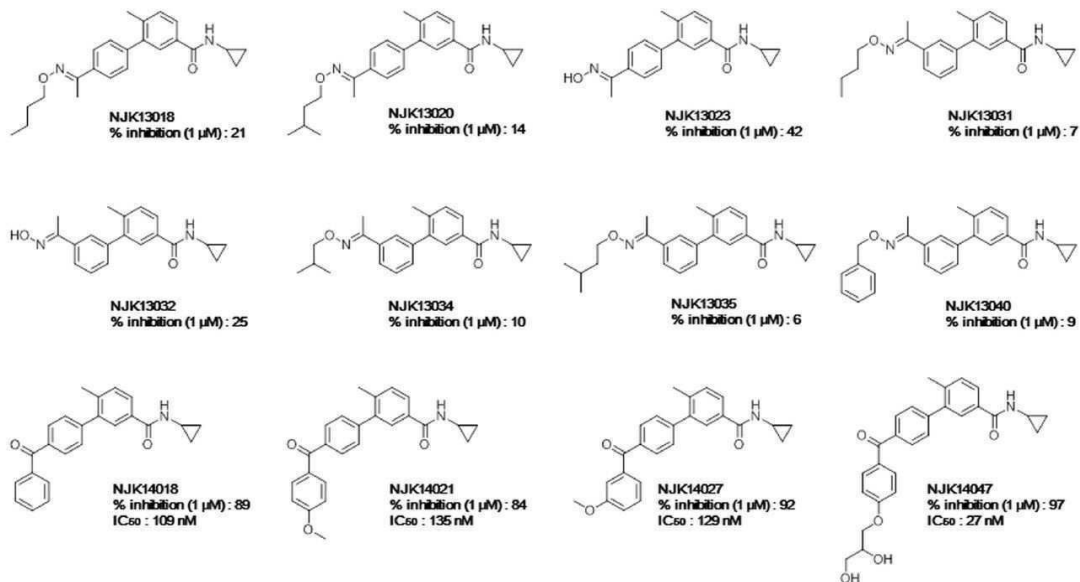
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 벤조페논 유도체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 B형간염 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 벤조페논 유도체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 B형간염 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물은 HBsAg분비 및 HBeAg 분비를 감소시키며, HBV바이러스 수준이 감소하는 효과가 있고, pgRNA생성 억제 및 cccDNA 생성을 억제하는 효과가 우수하므로, HBV 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 31/12** (2013.01)

**C07C 249/04** (2013.01)

**A23V 2002/00** (2013.01)

**A23V 2200/30** (2013.01)

(72) 발명자

**김상원**

경기도 남양주시 진접읍 금강로 1829-7, A동 304호(광릉아파트)

**김소영**

경기도 성남시 분당구 분당로263번길 24, 103동 706호(분당동, 장안타운 건영아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345247368

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원사업(일반연구)

연구과제명 호흡기융합바이러스와 숙주세포 자가포식작용(Autophagy)과의 상호작용 규명

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711089836

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원사업(중견연구)

연구과제명 염증병리상황 특이적으로 활성화되는 항염증 TPL2 저해제 개발에 관한 연구

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

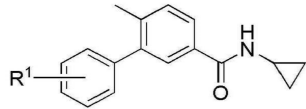
## 명세서

### 청구범위

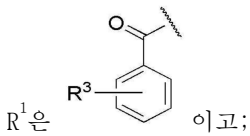
#### 청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 B형간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에 있어서,



R³은 C<sub>1-5</sub> 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고, 상기 C<sub>1-5</sub> 직쇄 또는 측쇄 알콕시는 하나 이상의 하이드록시기가 치환될 수 있다).

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

R³은 H, 또는 C<sub>1-4</sub> 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고, 상기 C<sub>1-4</sub> 직쇄 또는 측쇄 알콕시는 1 내지 4개의 하이드록시기가 치환될 수 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

R³은 H, 메톡시, 또는 2,3-다이하이드록시프로필인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물:

9)N-사이클로프로필-4'-(4-메톡시벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드;

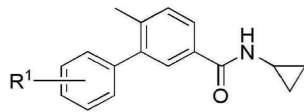
10)N-사이클로프로필-4'-(3-메톡시벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드; 및

11)N-사이클로프로필-4'-(4-(2,3-다이하이드록시프로폭시)벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드.

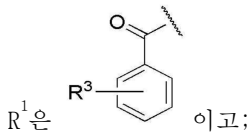
#### 청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 B형간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에 있어서,



R³은 C<sub>1-5</sub> 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고, 상기 C<sub>1-5</sub> 직쇄 또는 측쇄 알콕시는 하나 이상의 하이드록시기가 치환될 수 있다).

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 벤조페논 유도체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 B형간염 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] B형 간염바이러스(hepatitis B virus, HBV)는 1967년 Blumberg(1976년 이 공로로 노벨의학상을 받음)에 의해 발견된 이후 세계적으로 가장 높은 감염률로 인류에 피해를 주고 있는 바이러스 중의 하나로 알려져 있다.

[0003] 3.2kb의 HBV의 genome은 partial duplex DNA이며 4개의 open-reading frame (P, PreC/C, PreS1/S2/S, X)을 가지고 있다. HBV의 4개 유전자는 모두 overlap되어 있고 그 중 가장 긴 것이 바이러스의 polymerase를 발현하는 유전자이다. 원형으로 되어 있기 때문에 모든 유전자는 frame-shift에 의해 각기 다른 유전자가 발현된다. Covalently closed circular DNA(cccDNA)를 주형으로 하여 4개의 주요한 RNA, 즉, 3.5-, 2.4-, 2.1-, 0.7-kb를 만들어낸다. 이들 4개의 RNA는 HBV 고유의 enhancer II/basal core, large surface antigen(L), small surface antigen(S), 및 enhancer I/X promoter에 의해 각각 발현된다.

[0004] HBV는 감염 후 capsid의 해체가 이루어지고 유전자가 핵 내로 이동하여 숙주의 핵 내에서 double strand 바이러스 DNA가 cccDNA로 전환된다. 이는 episome 형태의 minichromosome으로서 HBV의 모든 RNA를 만들 뿐만 아니라 현재의 어떤 치료제로도 이를 없앨 수 없기 때문에 만성 감염을 일으키는 주요한 원인으로 알려져 있다.

[0005] 3.5 kb의 pregenomic RNA는 polymerase 및 core 단백질(HBcAg)을 만들고, 또 다른 3.5 kb의 precoreRNA는 e antigen(HBeAg)을 만든다. HBsAg는 2.4- 및 2.1-kb RNA로부터 만들어지며, X 단백질(HBx)은 0.7-kb RNA로부터 만들어진다. Pregenomic RNA는 단백질을 만드는 것 외에 생활사에 중요한 또 다른 역할을 수행한다.

[0006] 즉, 이는 polymerase와 함께 capsid 내부로 싸여 들어가서 reverse transcriptase에 의해 바이러스 genome으로 전환되는 주형으로 작용한다. HBV에 의한 만성 감염은 간기능의 손상, 간염, 간경화 및 간암과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다.

[0007] 백신의 개발로 B형 간염의 예방이 일부 가능해졌으나, 일단 HBV가 간세포 내로 침투한 후에는 환자의 간세포로 침투한 HBV를 완전히 제거할 수 있는 방법이 없어 B형 간염의 근본적인 완치는 현재로서는 매우 어렵다. 또한 B형 간염 환자가 건강한 간을 이식 받는 경우에 B형 간염의 재발률이 매우 높는데, 이는 완전히 제거되지 않고 남아있던 HBV가 이식받은 건강한 간세포 내로 침투하기 때문이다.

[0008] HBV가 간세포 내로 침투하면, 세포핵 내에 cccDNA(covalently closed circular DNA)를 형성하는데, 일단 형성된 cccDNA는 HBV 게놈 DNA 복제를 위한 주형으로 사용되어, 해당 간세포의 수명이 다 할 때까지 계속해서 HBV를 생산하게 된다. 현재 사용되는 치료법으로는 HBV 게놈 DNA 복제를 억제함으로써 혈액 내에 HBV 형성을 억제할

수는 있지만 HBV의 복제를 원천적으로 막을 수있도록 cccDNA를 제거할 수 있는 기술은 없다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2017-0006299호  
(특허문헌 0002) 한국공개특허 10-2016-0127710호

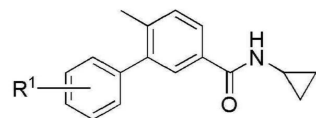
## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 B형간염 치료 효능을 갖는 신규한 화합물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 B형간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 B형간염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0019] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0020] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.
- [0021] [화학식 1]



- [0022]
- [0023] (상기 화학식 1에 있어서,

- [0024]  $R^1$ 은 이고;

- [0025]  $R^2$ 는 H,  $C_{1-8}$  직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 아릴  $C_{1-8}$  직쇄 또는 측쇄 알킬이다).

- [0027] 또한, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,
- [0028] 화합물 2와 화합물 3을 피리딘 용매에 용해하고, 상온에서 반응시켜 화합물 1을 얻는 단계(단계 1);
- [0029] 를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.



도 3 (A)는 본 발명에 따른 화합물 NJK14047의 처리 농도(0, 0.2, 1, 5, 20  $\mu$ M)에 따른 HepG2 및 HepG2.2.15 세포의 생존 능력을 나타낸 결과이다.

도 3 (B)는 HepG2.2.15, HepG2, AML-12, A549 및 HELA세포주에서 NJK14047의 세포독성을 측정한 결과이다.

도 3 (C)는 HBV 게놈 (pHBV-1.2x)으로 형질주입된 HepG2 세포의 NJK14047처리 농도 및 시간에 따른 p38 MAPK 활성화의 억제 결과이다.

도 3 (D)는 HepG2.2.15 세포에서 NJK14047처리농도에 따른 IL-6의 mRNA의 합성에 대한 효과를 나타낸 그래프이다(\* p <0.05, \*\* p <0.01).

도 3 (E)는 HepG2.2.15 세포에서 NJK14047처리농도에 따른 IL-10의 mRNA의 합성에 대한 효과를 나타낸 그래프이다(\* p <0.05, \*\* p <0.01).

도 4 (A)는 NJK14047 처리농도에 따른 HepG2.2.15세포에서의 HBsAg분비를 ELISA로 분석한 결과이다(\* p <0.05, \*\* p <0.01 및 \*\*\* p <0.001).

도 4 (B)는 NJK14047 처리농도에 따른 pHBV-1.2x로 형질주입된 HepG2세포에서의 HBsAg분비를 ELISA로 분석한 결과이다(\* p <0.05, \*\* p <0.01 및 \*\*\* p <0.001).

도 4 (C)는 NJK14047 처리농도에 따른 pHBV-1.2x로 형질주입된 HepG2세포에서의 HBeAg분비를 ELISA로 분석한 결과이다(\* p <0.05, \*\* p <0.01 및 \*\*\* p <0.001).

도 4 (D)는 NJK14047 처리농도에 따른 HepG2.2.15세포에서의 HBV 바이러스수준을 qPCR(quantitative PCR)로 측정한 결과이다(\* p <0.05, \*\* p <0.01 및 \*\*\* p <0.001).

도 4 (E)는 NJK14047 처리농도에 따른 pHBV-1.2x로 형질주입된 HepG2세포에서의 HBV 바이러스수준을 qPCR(quantitative PCR)로 측정한 결과이다(\* p <0.05, \*\* p <0.01 및 \*\*\* p <0.001).

도 5 (A)는 엔터카비르(ETV, 30 nM)처리 및 NJK14047 처리농도에 따른 HepG2.2.15세포에서의 pgRNA합성(3.5kb)을 정량적 역전사 PCR(quantitative RT-PCR)로 측정한 결과이다(\* p <0.05, \*\* p <0.01 및 \*\*\* p <0.001, N.S.: Not significant).

도 5 (B)는 엔터카비르(ETV, 30 nM)처리 및 NJK14047 처리농도에 따른 pHBV-1.2x로 형질주입된 HepG2세포에서의 pgRNA합성(3.5kb)을 정량적 역전사 PCR (quantitative RT-PCR)로 측정한 결과이다(\* p <0.05, \*\* p <0.01 및 \*\*\* p <0.001).

도 5 (C)는 엔터카비르(ETV, 30 nM)처리 및 NJK14047 처리농도에 따른 HepG2.2.15세포에서의 cccDNA합성(3.5kb)을 정량적 PCR (quantitative PCR)로 측정한 결과이다(\* p <0.05, \*\* p <0.01 및 \*\*\* p <0.001).

도 5 (D)는 엔터카비르(ETV, 30 nM)처리 및 NJK14047 처리농도에 따른 pHBV-1.2x로 형질주입된 HepG2세포에서의 cccDNA합성(3.5kb)을 정량적 PCR (quantitative PCR)로 측정한 결과이다(\* p <0.05, \*\* p <0.01 및 \*\*\* p <0.001).

도 6 (A)는 NTCP를 안정적으로 발현하는 HepG2시험관 내 HBV감염된 모델에서 엔터카비르(ETV, 30 nM)처리 및 NJK14047 처리농도에 따른 세포외 바이러스 DNA양을 정량적 PCR(quantitative PCR)과 ELISA로 측정한 결과이다(\* p <0.05, \*\* p <0.01).

도 6 (B)는 NTCP를 안정적으로 발현하는 HepG2시험관 내 HBV감염된 모델에서 엔터카비르(ETV, 30 nM)처리 및 NJK14047 처리농도에 따른 분비된 HBsAg의 양을 정량적 PCR(quantitative PCR)과 ELISA로 측정한 결과이다(\* p <0.05, \*\* p <0.01).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] B형 간염 바이러스 (Hepatitis B virus; HBV)는 헤파드나바이러스 (Hepadnaviridae)패밀리에 속하는 바이러스로 간세포에 침투하여 급성 및 만성 간염을 유발한다.

[0049] HBV의 생활사는 간세포 표면에 달라붙어 세포 내로 들어오는 침투 과정, 세포질에서 껍질을 벗겨내고 세포핵 안으로 침입해 DNA복제를 하는 증식 과정, 세포질에서 껍질을 쌓아 완전한 바이러스 형태로 재조합하는 조립 과정, 간세포 밖으로 빠져나가는 배출 과정, 그리고 또 다시 다른 간세포에 달라붙어 반복해서 증식하는 과정을

포함한다.

[0050] HBV는 부분적으로 이중가닥인 DNA 게놈(partially double-stranded DNA genome)을 가지고 있는데, HBV 게놈 DNA는 갭(gap)이 존재할 뿐만 아니라 양 말단에 단백질(oval shape) 혹은 RNA(wavy line)가 공유결합으로 연결되어 있고 양 말단이 연결되어 있지 않아 비틀림 응력(torsional stress)이 없어 Relaxed Circular DNA(RCDNA)라고도 부른다.

[0051] 간세포 내에서 HBV가 증식하려면 HBV의 DNA 게놈(RC DNA)이 간세포의 세포핵 내로 주입되고 이로부터 cccDNA(covalently closed circular DNA)가 생성되어야만 한다. 일단 cccDNA가 생성되면 그 세포의 수명이 다할 때까지 계속 HBV의 증식이 이루어질 수 있다. cccDNA 생성을 위해서는 우선 HBV가 간세포로 침투하는 것이 선행되어야 한다.

[0052] HBV의 외피(envelope)는 표면 항원(Hepatitis B surface antigen; HBsAg)을 포함하고 있는데, HBV가 간세포로 침투하기 위해서는 HBsAg가 간세포 표면의 헤파란 황산 프로테오글라이칸(heparan sulfate proteoglycan)에 결합하여 HBV가 간세포 표면에 부착하는 단계가 필수적이다. HBV가 간세포 표면에 부착하면 HBsAg의 Pre-S1 도메인이 간세포 표면에 존재하는 수용체인 나트륨 타우로콜레이트 코트랜스포트 폴리펩타이드(Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide, NTCP)에 결합함으로써 HBV가 간세포로 침투하게 된다.

[0053] cccDNA(covalently closed circular DNA)는 HBV에 감염된 간세포 핵 내에 존재하며 HBV 전사의 주형으로 작용한다. B형 간염 바이러스의 cccDNA 형성 억제제는 바이러스 생활사에 직접 작용하는 치료법의 일종이다. 이는 인터페론치료, 싸이토카인 치료, 바이러스 특이성 T세포 면역 회복 등과 같은 면역 치료법과는 구별된다.

[0054] 또한, B형 간염 바이러스의 cccDNA 형성 억제제는 감염된 B형 간염 바이러스 cccDNA의 소멸법과는 차이가 있다. B형 간염 바이러스의 cccDNA 소멸법은 임상에 적용하기 위해 적절한 운반체 개발이 동반되어야 하는 문제가 있다.

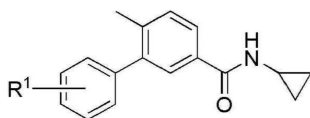
[0055] B형 간염 바이러스의 cccDNA 형성이 억제되면 HBV 게놈 DNA의 복제가 이루어지지 않고 HBV의 재생산이 불가능해지므로 아직 감염되지 않은 간세포로의 HBV전파는 더 이상 일어나지 않는다. 이미 cccDNA가 형성된 간세포는 그 수명(약 5개월)이 다 되어 사멸될 때 B형 간염 바이러스의 cccDNA도 같이 분해되어 없어지게 된다.

[0057] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

# **화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염**

[0060] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0061] [화학식 1]



[0062]

[0063] (상기 화학식 1에 있어서,

[0064] R¹은 이고;

[0065] R²는 H, C₁-₈ 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 아릴 C₁-₈ 직쇄 또는 측쇄 알킬이다).

[0067] 바람직하게,

[0068] 상기 R²는 H, C₂-₇ 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 페닐 C₁-₃ 직쇄 또는 측쇄 알킬이다.

- [0070] 더욱 바람직하게,
- [0071]  $R^2$ 는 H,  $C_{4-5}$  직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 페닐메틸이다.
- [0073] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 바람직한 예는 하기 화합물 군을 들 수 있고, 이들의 화학구조식을 하기 표 1에 나타내었다.
- [0075] 1)4'-(1-(부톡시이미노)에틸)-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드
- [0076] 2)N-사이클로프로필-4'-(1-((아이소펜틸옥시)이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드
- [0077] 3)N-사이클로프로필-4'-(1-(히드록시이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드
- [0078] 4)3'-(1-(부톡시이미노)에틸)-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드
- [0079] 5)N-사이클로프로필-3'-(1-(히드록시이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드
- [0080] 6)N-사이클로프로필-3'-(1-((아이소부톡시이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드
- [0081] 7)N-사이클로프로필-3'-(1-((아이소펜틸옥시)이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드
- [0082] 8)3'-(1-((벤질옥시)이미노)에틸)-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드
- [0084] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 약학적으로 허용가능한 염이란 표현은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1의 염기 화합물의 이로온 효능을 떨어뜨리지 않는 화학식 1의 염기 화합물의 어떠한 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 이들 염은 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔설폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등을 사용할 수 있다. 또한, 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함한다. 예를 들면, 산부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디설페이트, 에실레이트, 포메이트, 퓨마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 헥사플루오르포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프틸레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오르아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으며, 이들 중 하이드로클로라이드 또는 트리플루오르아세테이트가 바람직하다.
- [0086] 또한, 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 이성질체, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.
- [0088] 본 발명에 따른 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1의 화합물을 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액의 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 이어서 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[0090] 본 발명은 항 HBV 활성을 갖는 화학식 1의 화합물의 임의의 모든 호변형에 관한 것으로 특정한 화학식 1의 화합물은 용매화물 형태 및 비용매화물 형태, 예컨대 수화된 형태로 존재할 수 있다고 이해될 수 있다. 본 발명은 항 HBV 활성을 갖는 이러한 모든 용매화된 형태를 포괄하는 것으로 이해될 수 있다.

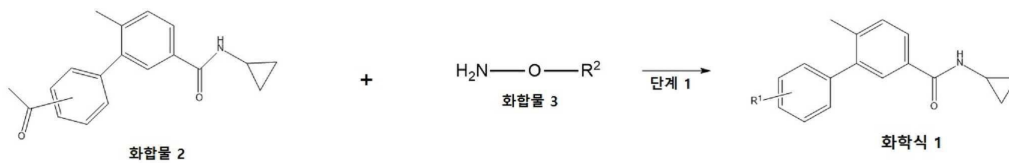
[0092] **제조방법**

[0093] 본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

[0094] 화합물 2와 화합물 3을 피리딘 용매에 용해하고, 상온에서 반응시켜 화합물 1을 얻는 단계(단계 1);

[0095] 를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0096] [반응식 1]



[0097]

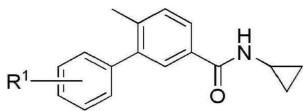
[0098] (상기 반응식 1에서,

[0099] 상기 R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 제 1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같다).

[0101] **B형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

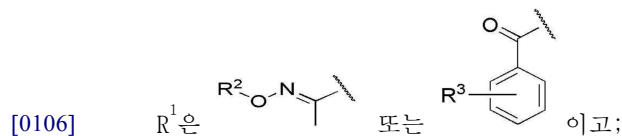
[0102] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 B형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0103] [화학식 1]



[0104]

[0105] (상기 화학식 1에 있어서,



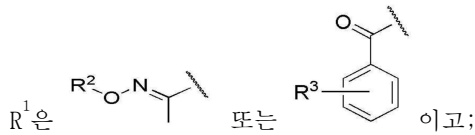
[0106]

[0107] R<sup>2</sup>는 H, C<sub>1-8</sub> 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 아릴 C<sub>1-8</sub> 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

[0108] R<sup>3</sup>는 C<sub>1-5</sub> 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고, 상기 C<sub>1-5</sub> 직쇄 또는 측쇄 알콕시는 하나 이상의 하이드록시기가 치환될 수 있다).

[0110] 바람직하게는,

[0111]



[0112]

$R^2$ 는 H, C<sub>2-7</sub> 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 페닐 C<sub>1-3</sub> 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

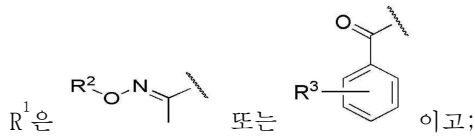
[0113]

$R^3$ 은 H, 또는 C<sub>1-4</sub> 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고, 상기 C<sub>1-4</sub> 직쇄 또는 측쇄 알콕시는 1 내지 4개의 하이드록시기가 치환될 수 있다.

[0115]

더욱 바람직하게는,

[0116]



[0117]

$R^2$ 는 H, C<sub>4-5</sub> 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 페닐메틸이고;

[0118]

$R^3$ 은 H, 메톡시, 또는 2,3-다이하이드록시프로필이다.

[0120]

상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 바람직한 예는 하기 화합물 군을 들 수 있고, 이들의 화학구조식을 하기 표 1에 나타내었다.

[0122]

1) 4'-(1-(부톡시이미노)에틸)-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0123]

2) N-사이클로프로필-4'-(1-((아이소펜틸옥시)이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0124]

3) N-사이클로프로필-4'-(1-(히드록시이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0125]

4) 3'-(1-(부톡시이미노)에틸)-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0126]

5) N-사이클로프로필-3'-(1-(히드록시이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0127]

6) N-사이클로프로필-3'-(1-((아이소부톡시이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0128]

7) N-사이클로프로필-3'-(1-((아이소펜틸옥시)이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0129]

8) 3'-(1-((벤질옥시)이미노)에틸)-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0130]

9) N-사이클로프로필-4'-(4-메톡시벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드;

[0131]

10) N-사이클로프로필-4'-(3-메톡시벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드;

[0132]

11) N-사이클로프로필-4'-(4-(2,3-다이하이드록시프로폭시)벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드.

[0134]

본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물은 염증전구물질로서 역할을 하는 p38 MAPK저해능이 우수하고(실험예 1 참조), 간세포에서 p38 MAPK 억제효과를 확인하였다(실험예 4 참조).

[0135]

또한, p38 MAPK과 HBsAg분비가 양의 상관관계가 있음을 확인하였고(실험예 2 참조), 상기 화합물이 p38 MAPK 저해를 통해 HBsAg 분비를 억제 할 수 있음을 확인하였다.

[0136]

본발명에 따른 화합물 NJK14047의 항바이러스 활성이 세포독성에 의해 유발되는 것이 아님을 확인하였다(실험예 3참조). 본발명에 따른 화합물 NJK14047은 HBsAg분비 및 HBeAg분비를 용량의존적으로 감소시킨다(실험예 5, 도

4B 및 도4C참조).

[0137] 또한, HBV 바이러스 수준은 NJK14047 처리 농도에 따라 감소되었으며, 이는 NJK14047이 바이러스 항원 생성뿐만 아니라 바이러스 복제 및 바이러스 입자 생성을 억제 할 수 있음을 나타내었다 실험예 6, 도 4D 및 도 4E참조).

[0139] 본발명에 따른 화합물 NJK14047은 pgRNA생성을 억제하며(실험예 7참조), cccDNA 생성을 억제하는 효과가 우수함 것으로 나타났다(실험예 8참조).

[0141] 따라서, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물은 HBsAg분비 및 HBeAg 분비를 감소시키며, HBV바이러스 수준이 감소하는 효과가 있고, pgRNA생성 억제 및 cccDNA 생성을 억제하는 효과가 우수하므로, HBV 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용할 수 있다.

[0143] 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상투여 시에 다양한 하기의 경구 또는 비 경구 투여 형태로 제제화 되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

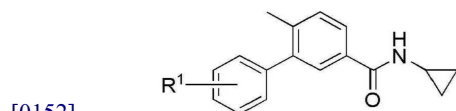
[0145] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/ 또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 이의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리 에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[0147] 또한, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.1 ~ 1,000 mg/일이며, 바람직하게는 1 ~ 500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

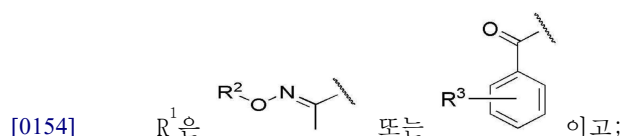
[0149] **B형 간염 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물**

[0150] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 B형 간염 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0151] [화학식 1]



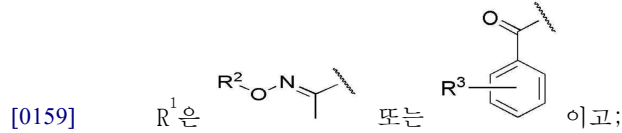
[0153] (상기 화학식 1에 있어서,



[0155] R<sup>2</sup>는 H, C<sub>1-8</sub> 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 아릴 C<sub>1-8</sub> 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

[0156]  $R^3$ 은  $C_{1-5}$  직쇄 또는 측쇄 알콕시이고, 상기  $C_{1-5}$  직쇄 또는 측쇄 알콕시는 하나 이상의 하이드록시기가 치환될 수 있다).

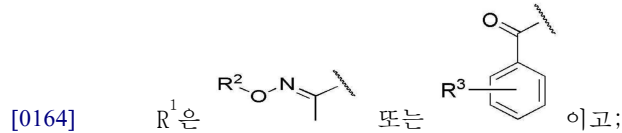
[0158] 바람직하게는,



[0160]  $R^2$ 는 H,  $C_{2-7}$  직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 페닐  $C_{1-3}$  직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

[0161]  $R^3$ 은 H, 또는  $C_{1-4}$  직쇄 또는 측쇄 알콕시이고, 상기  $C_{1-4}$  직쇄 또는 측쇄 알콕시는 1 내지 4개의 하이드록시기가 치환될 수 있다.

[0163] 더욱 바람직하게는,



[0165]  $R^2$ 는 H,  $C_{4-5}$  직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 페닐메틸이고;

[0166]  $R^3$ 은 H, 메톡시, 또는 2,3-다이하이드록시프로필이다.

[0168] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 바람직한 예는 하기 화합물 군을 들 수 있고, 이들의 화학구조식을 하기 표 1에 나타내었다.

[0170] 1) 4'-(1-(부톡시이미노)에틸)-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0171] 2) N-사이클로프로필-4'-(1-((아이소펜틸옥시)이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0172] 3) N-사이클로프로필-4'-(1-(히드록시이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0173] 4) 3'-(1-(부톡시이미노)에틸)-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0174] 5) N-사이클로프로필-3'-(1-(히드록시이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0175] 6) N-사이클로프로필-3'-(1-((아이소부톡시이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0176] 7) N-사이클로프로필-3'-(1-((아이소펜틸옥시)이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0177] 8) 3'-(1-((벤질옥시)이미노)에틸)-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드

[0178] 9) N-사이클로프로필-4'-(4-메톡시벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드;

[0179] 10) N-사이클로프로필-4'-(3-메톡시벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드;

[0180] 11) N-사이클로프로필-4'-(4-(2,3-다이하이드록시프로폭시)벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드.

[0182] 본 발명의 조성물을 건강기능식품으로 사용하는 경우, 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류,

피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능성식품을 모두 포함한다.

[0184] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물을 함유하는 건강기능식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 상기 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

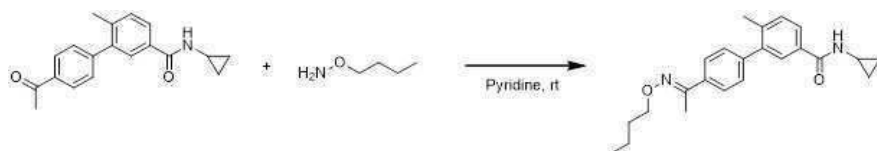
[0186] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물을 함유하는 건강기능식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명 조성물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능 식품 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0187] 상기 외에 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물을 함유하는 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능성식품 조성물은 천연 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0188] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 유효물질을 함유하는 건강기능성식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0190] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

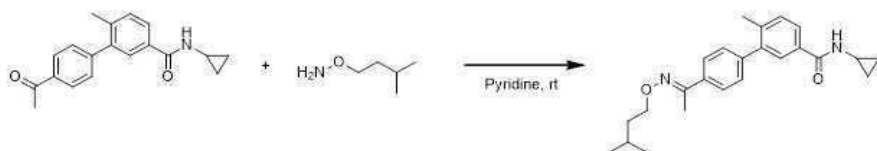
[0192] <실시예 1> 4'-(1-(부톡시이미노)에틸)-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드(NJK13018)



[0193]

[0194]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  7.70 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz), 7.65 (dd, 1H,  $J = 8.2, 1.8$  Hz), 7.51 (s, 1H), 7.33-7.29 (m, 3H), 6.38 (s, 1H), 4.22 (t, 2H,  $J = 6.6$  Hz), 2.89-2.88 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 1.77-1.64 (m, 2H), 1.50-1.36 (m, 2H), 0.97 (t, 3H,  $J = 7.4$  Hz), 0.85-0.84 (m, 2H), 0.61-0.60 (m, 2H)

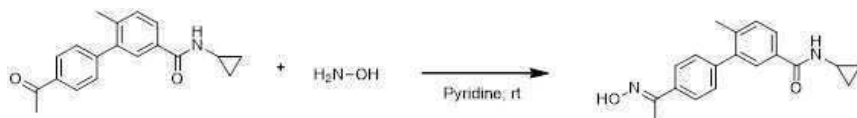
[0196] <실시예 2> N-사이클로프로필-4'-(1-((아이소펜틸옥시)이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드(NJK13020)



[0197]

[0198]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  7.70 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 7.65 (dd, 1H,  $J = 8.4, 1.8$  Hz), 7.57 (d, 1H,  $J = 1.8$  Hz), 7.31-7.29 (m, 3H), 6.36 (s, 1H), 4.25 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 2.91-2.86 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 1.81-1.72 (m, 1H), 1.64 (dt, 2H,  $J = 6.9, 6.6$ ), 0.97 (d, 6H,  $J = 6.4$ ), 0.88-0.82 (m, 2H), 0.61-0.60 (m, 2H)

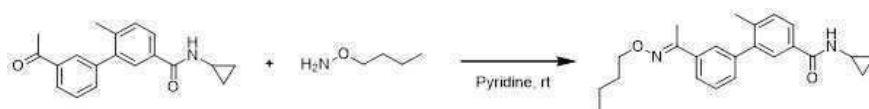
[0200] <실시예 3> N-사이클로프로필-4'-(1-(히드록시이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드(NJK13023)



[0201]

[0202]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz)  $\delta$  11.19 (s, 1H), 8.34 (d, 1H,  $J = 4.1$  Hz), 7.67 (d, 3H,  $J = 8.2$  Hz), 7.63 (d, 1H,  $J = 1.3$  Hz), 7.32 (t, 3H,  $J = 7.8$  Hz), 2.78-2.77 (m, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 0.62-0.59 (m, 2H), 0.51-0.48 (m, 2H)

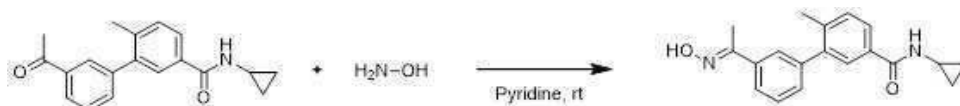
[0204] <실시예 4> 3'-(1-(부톡시이미노)에틸)-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드(NJK13031)



[0205]

[0206]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  7.68-7.62 (m, 2H), 7.57 (s, 2H), 7.40 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.31-7.26 (m, 2H), 6.44 (s, 1H), 4.19 (t, 2H,  $J = 6.7$  Hz), 2.90-2.86 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 1.74-1.67 (m, 2H), 1.48-1.39 (m, 2H), 0.96 (t, 3H,  $J = 7.4$  Hz), 0.86-0.81 (m, 2H), 0.62-0.58 (m, 2H)

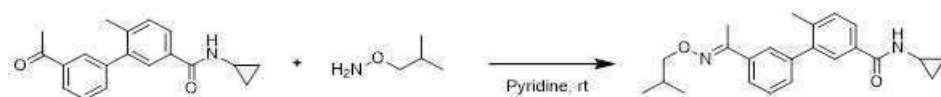
[0208] <실시예 5> N-사이클로프로필-3'-(1-(히드록시이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드(NJK13032)



[0209]

[0210]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  7.66 (d, 1H,  $J = 7.9$  Hz), 7.57 (d, 3H,  $J = 7.1$  Hz), 7.40 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.28 (d, 2H,  $J = 8.2$  Hz), 6.57 (s, 1H), 2.90-2.85 (m, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 0.84-0.80 (m, 2H), 0.62-0.58 (m, 2H)

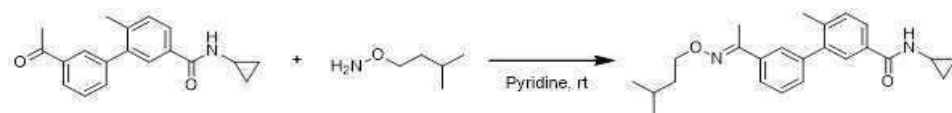
[0212] <실시예 6> N-사이클로프로필-3'-(1-((아이소부톡시이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'바이페닐]-3-카복사미드(NJK13034)



[0213]

[0214]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  7.68-7.62 (m, 2H), 7.58-7.56 (m, 2H), 7.41 (t, 1H,  $J = 7.7$  Hz), 7.32-7.26 (m, 2H), 6.33 (s, 1H), 3.97 (d, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 2.92-2.86 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.09-2.02 (m, 1H), 0.96 (d, 6H,  $J = 6.7$  Hz), 0.88-0.83 (m, 2H), 0.63-0.59 (m, 2H)

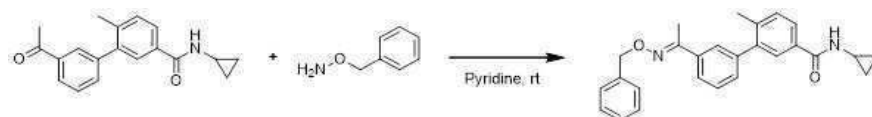
[0216] <실시예 7> N-사이클로프로필-3'-(1-((아이소펜틸옥시)이미노)에틸)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드 (NJK13035)



[0217]

[0218]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  7.68-7.62 (m, 2H), 7.57 (d, 2H,  $J = 2.0$  Hz), 7.41 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.32-7.26 (m, 2H), 6.38 (s, 1H), 4.23 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 2.91-2.86 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 1.79-1.72 (m, 1H), 1.64-1.59 (m, 2H), 0.95 (d, 6H,  $J = 6.6$  Hz), 0.87-0.84 (m, 2H), 0.63-0.61 (m, 2H)

[0220] <실시예 8> 3'-(1-((벤질옥시)이미노)에틸)-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드 (NJK13040)



[0221]

[0222]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  7.68-7.65 (m, 2H), 7.58-7.56 (m, 2H), 7.43-7.35 (m, 5H), 7.33-7.27 (m, 3H), 6.31 (s, 1H), 5.24 (s, 2H), 2.90-2.88 (m, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 0.88-0.83 (m, 2H), 0.62-0.58 (m, 2H)

[0224] <실시예 9> N-사이클로프로필-4'-(4-메톡시벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드 (NJK14021)

[0225] 공지의 화합물 N-사이클로프로필-4'-(4-메톡시벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드를 준비하였다.

[0227] <실시예 10> N-사이클로프로필-4'-(3-메톡시벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드 (NJK14027)

[0228] 공지의 화합물 N-사이클로프로필-4'-(3-메톡시벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드를 준비하였다.

[0230] <실시예 11> N-사이클로프로필-4'-(4-(2,3-다이하이드로옥시프로폭시)벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드 (NJK14047)

[0231] 공지의 화합물 N-사이클로프로필-4'-(4-(2,3-다이하이드로옥시프로폭시)벤조일)-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드를 준비하였다.

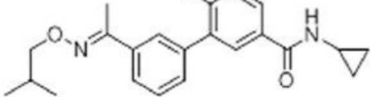
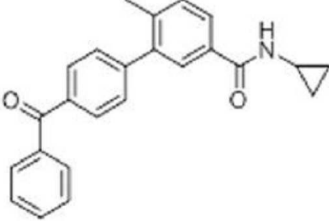
[0233] <비교예 1> 4'-벤조일-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드 (NJK14018)

[0234] 공지의 화합물 4'-벤조일-N-사이클로프로필-6-메틸-[1,1'-바이페닐]-3-카복사미드를 준비하였다.

표 1

[0237] 실시예 1 내지 11 및, 비교예 1의 화학구조식

|                      | 화학구조식 |                       | 화학구조식 |
|----------------------|-------|-----------------------|-------|
| 실시예 1<br>(NJK 13018) |       | 실시예 7<br>(NJK 13035)  |       |
| 실시예 2<br>(NJK 13020) |       | 실시예 8<br>(NJK 13040)  |       |
| 실시예 3<br>(NJK 13023) |       | 실시예 9<br>(NJK 14021)  |       |
| 실시예 4<br>(NJK 13031) |       | 실시예 10<br>(NJK 14027) |       |
| 실시예 5<br>(NJK 13032) |       | 실시예 11<br>(NJK 14047) |       |

|                      |                                                                                   |                      |                                                                                    |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 실시예 6<br>(NJK 13034) |  | 비교예 1<br>(NJK 14018) |  |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|

### [0238] <실험예 1> p38 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 저해능 평가

[0239] 상기 실시예 1-12에서 제조한 화합물의 p38  $\alpha$  MAPK 저해능을 평가하였다. 구체적으로, 실시예 1-12에서 제조한 화합물의 p38  $\alpha$  MAPK 저해능은 "SelectScreen™ Kinase Profiling Services (Life technologies)"를 이용하여 그 결과를 얻었고, 이를 하기 표 2에 나타내었다(도 1참조).

표 2

| 화합물               | % inhibition(1 $\mu$ M) |
|-------------------|-------------------------|
| 실시예 1 (NJK13018)  | 21                      |
| 실시예 2 (NJK13020)  | 14                      |
| 실시예 3 (NJK13023)  | 42                      |
| 실시예 4 (NJK13031)  | 7                       |
| 실시예 5 (NJK13032)  | 25                      |
| 실시예 6 (NJK13034)  | 10                      |
| 실시예 7 (NJK13035)  | 6                       |
| 실시예 8 (NJK13040)  | 9                       |
| 실시예 9 (NJK14021)  | 84                      |
| 실시예 10 (NJK14027) | 92                      |
| 실시예 11 (NJK14047) | 97                      |
| 비교예 1 (NJK14018)  | 89                      |

### [0241] <실험예 2> p38 MAPK 저해능과 HBsAg(B형 간염바이러스 표면항원; hepatitis B Surface Antigen)분비의 상관관계 확인

[0242] p38 MAPK 억제 활성은 HBsAg분비의 억제와 상관관계가 있다. 본발명에 따른 화합물의 anti-HBV활성을 조사하기 위해, HBV유전자형 D를 갖는 HepG2.2.15 세포를 화합물과 함께 48시간 동안 배양하였다.

[0243] NJK13032(실시예5)와 NJK13040(실시예 8)을 제외한 모든 화합물은 HBsAg 효소면역흡착법(enzyme-linked immunosorbent assays; ELISA, Bio-kit)로 분석하였다. 도 2 A에서와 같이 본 발명에 따른 화합물은 10  $\mu$ M농도에서에서 HBsAg분비를 50%이상 억제했다. NJK14021(실시예9) 및 NJK14027(실시예10)은 2  $\mu$ M에서 약 50% 억제를 나타냈다.

[0244] 특히, NJK14047(실시예 11)은 p38 MAPK 및 HBsAg 분비의 가장 큰 억제를 나타냈다. 도 2 B에 나타낸 바와 같이, 시험 관내 p38 MAPK 효소 저해 및 상기 화합물에 의한 HBsAg 분비 억제는 높은 양의 상관 관계 ( $r^2 = 0.8547$ )를 나타내어 상기 화합물이 p38 MAPK 저해를 통해 HBsAg 분비를 억제 할 수 있음을 확인하였다.

### [0246] <실험예 3> 세포독성 확인

[0247] 본 발명의 NJK14047(실시예 11)화합물의 HepG2 및 HepG2.2.15 세포에 대한 세포 독성을 분석하여 항 바이러스 활성이 세포 독성에 의해 유발될 가능성을 배제하였다.

[0249] \*세포 독성은 MTT (3-(4-5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석을 활용하여 다양한 세포에 대한 NJK14047의 세포 독성을 확인 하였다. 간략하게, 96- 웰 플레이트에서 HepG2, HepG2.2.15,

AML12, A549 또는 HeLa 세포를 48 시간 동안 NJK14047의 농도를 달리하여 배양 하였다.

- [0250] HepG2, HepG2.2.15, A549와 HeLa세포를 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 페니실린/스트렙토마이신 (100 U/mL)가 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's 224 medium)에서 배양하였다.
- [0251] AML12세포를 글루타맥스(GlutaMAX), 인슐린 (0.005 mg/mL), 트랜스페린(0.005 mg/mL), 셀레늄(5 ng/mL), 텍사 메타손(40 ng/mL)과 10% FBS가 포함된 AML12 배지(DMEM/F12; 1:1)에서 배양하였다.
- [0252] hNTCP-HepG2-C4세포(Dr, Koichi Watashi 제공)는 G418(500  $\mu$ g/mL)을 함유하는 AML12배지에서 배양하였다.
- [0253] 그 다음, 세포 배양 배지를 MTT (40  $\mu$ g / mL)가 함유 된 신선한 배지로 교체하고 4 시간 더 배양했다. 흡인 후, DMSO를 첨가하여 세포를 용해시키고 불수용성 포르마잔을 용해시켰다. 570 nm에서의 흡광도를 마이크로 플레이트 판독기로 측정 하였다.
- [0254] NJK14047 화합물 20  $\mu$ M까지의 농도에서 HepG2.2.15 세포에 유의한 세포 독성을 나타내지 않았다. 따라서, 20  $\mu$ M의 NJK14047을 다음 실험예에서 최대 농도로 사용 하였다 (도 3A참조).
- [0255] 또한, 다른 세포주에 대한 NJK14047의 세포 독성 효과를 추가로 분석 하였다. 도 3B에 도시 된 바와 같이, 50 % 세포 독성 농도 (CC<sub>50</sub>) 값은 53.7 내지 110.4  $\mu$ M 범위이고, 정상 마우스 간세포 (AML-12 세포)에서의 NJK14047 의 CC<sub>50</sub> 값은 다른 세포주에 비해 높은 값을 갖는다(125.99  $\mu$ M).

[0257] **<실험예 4> 간세포에서 p38MAPK억제 확인**

- [0258] 간세포에서 p38 MAPK 저해를 확인하기 위해 HBV 게놈 (pHBV-112 1.2x, GenBank no. AY641558)을 함유한 플라스 미드로 형질 전환된 HepG2 세포를 5 또는 20  $\mu$ M NJK14047(실시예11)로 처리하고 면역 블로팅으로 분석 하였다. NJK14047 처리는 총 단백질 수준에 영향을 주지 않으면서 p38 MAPK 인산화를 감소시켰으며, 이는 NJK14047이 HBV 감염 세포에서 p38 MAPK 활성화를 억제 할 수 있음을 나타낸다. (도 3C참조).
- [0259] 또한, NJK14047 처리는 HepG2.2.15 세포에서 interleukin (IL) -6 및 interleukin (IL)-10을 코딩하는 mRNA의 합성을 용량 의존적으로 현저히 억제하여 NJK14047이 p38 MAPK 매개 염증 반응을 억제 할 수 있음을 확인했다. (도3D 및 3E 참조).

[0261] **<실험예 5> HBsAg 및 HBeAg 분비 측정**

- [0262] 본 발명의 화합물 NJK14047(실시예 11)의 anti-HBV 활성을 확인하기 위해, HepG2.2.15 세포를 NJK14047의 농도 를 증가시켜 처리하고, 세포배양 상등액을 회수하여 HBsAg의 분비를 ELISA로 분석 하였다.
- [0263] 도 4A에 도시한 바와 같이 NJK14047은 HepG2.2.15 세포로부터 HBsAg 분비를 용량 의존적으로 억제 하였다 (IC<sub>50</sub> = 5.3  $\mu$ M, 도 4A참조). HepG2.2.15 세포를 이용한 HBeAg 분비에 대한 NJK14047의 효과를 검출할 수 없었고, 이 는 또한 ELISA에 의해 결정되었다 (데이터는 나타내지 않음). NJK14047의 antiviral 효과는 유전자 C형 바이러 스 게놈을 갖는 HBV 게놈 형질주입된 모델을 사용하여 확인하였다.
- [0264] 형질주입 24 시간 후, 세포를 NJK14047로 48 시간 동안 처리하고, 상등액을 ELISA로 분석 하였다. HepG2.2.15 세포에서 측정된 결과와 달리, 화합물 NJK14047은 HBsAg 및 HBeAg 분비 모두에서 용량 의존적인 감소결과를 나 타내었다.(도 4B 및 4C).

[0266] **<실험예 6> 바이러스입자 생성 측정**

- [0267] HBV 바이러스 생산에 대한 NJK14047(실시예 11)의 영향을 분석하여 HBV 복제에 미치는 영향을 조사 하였다. HepG2.2.15 247 및 HBV 게놈으로 형질주입된 HepG2 세포를 지시 된 농도의 NJK14047로 48 시간 동안 처리 하였 다. 수집 된 배양 상등액 중의 바이러스 입자는 이전에 기술 된 바와 같이 PEG6000을 사용하여 침전시켰다 (Wei Y, Tavis JE, Ganem D. 1996. Relationship between viral DNA synthesis and virion envelopment in hepatitis B viruses. J Virol 70:6455-6458.).
- [0268] HBV 게놈 - 형질주입된 세포로부터 얻은 바이러스 펠렛을 제조자의 지시에 따라 RQ1 DNase I (Promega, WI,

USA)로 처리하여 형질주입에 사용된 잔류 DNA를 제거 하였다. 바이러스 DNA는 하기 프라이머를 사용하여 qRT-PCR(quantitative real-time PCR)에 의해 정량화되었다: 정방향 프라이머, 5'-TTACAAGAATCCTCACAATACC-3'; 역방향 프라이머, 5'-GGAGGTGGGGACTGCGAAT-3'.

[0269] HBV 바이러스 수준은 NJK14047 처리에 따라 유의하게 감소되었으며, 이는 NJK14047이 바이러스 항원 생성뿐만 아니라 바이러스 복제 및 바이러스 입자 생성을 억제 할 수 있음을 나타내었다 (도 4D참조). 유사한 결과가 pHBV-1.2x로 형질 감염된 HepG2 세포를 사용한 실험으로부터 도출되었다 (도 4E참조).

#### [0271] <실험예 7> pgRNA 생성 측정

[0272] 본 발명의 화합물 NJK14047(실시예11)의 HBV pgRNA 생성에 미치는 영향을 분석 하였다. 세포에서의 HBV pgRNA 생성은 약간 변형 (Verrier ER, Colpitts CC, Bach C, Heydmann L, Weiss A, Renaud M, Durand SC, Habersetzer F, Durantel D, Abou-Jaoude G, Lopez Ledesma MM, Felmlee DJ, Soumillon M, Croonenborghs T, Pochet N, Nassal M, Schuster C, Brino L, Sureau C, Zeisel MB, Baumert TF. 2016. A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. Hepatology 63:35-48.)하여 측정 하였다. 전체 RNA는 TRIzol을 사용하여 HBV 게놈으로 형질 주입된 HepG2.2.15 또는 HepG2 세포로부터 분리하고 RQ1 DNaseI (Promega)로 처리 하였다. RNA를 통상의 페놀 - 클로로포름 이소아밀알콜 추출 및 에탄올 침전에 의해 정제하고 RNA 샘플 (1μg)로 cDNA 합성 하였다.

[0273] pgRNA의 양은 하기 프라이머 및 프로브를 사용하여 TaqMan real time RT-qPCR에 의해 측정 하였다: 순방향 프라이머, 5'-GGTCCCTAGAGAAGAACTCCCT-3'; 역방향 프라이머, 5'-CATTGAGATCCCGAGATTGAGAT-3'; TaqMan 프로브 5'-[FAM]-TCTCAATCGCCGCGTCGAGA-[TAMRA]-3'. 모든 값은 대조군으로서 GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)로 정규화하였다.

[0274] HepG2.2.15 세포 (도 5A) 및 pHBV-1.2x- 형질주입된 HepG2 세포 (도 5B)를 NJK14047 또는 엔테카비어 (ETV, 30nM)의 양으로 48 시간 동안 처리한 결과 NJK14047로 처리 된 세포에서 3.5 kb pgRNA의 현저한 감소가 비히클 - 처리된 세포에서와 비교하여 관찰되었다. .

#### [0276] < 실험예 8> HBV nuclear cccDNA의 정량

[0277] HepG2.2.15의 HBV cccDNA 또는 선형화 된 HBV 게놈으로 형질 감염된 HepG2 세포를 일부 수정하여 정량화 하였다 (Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, Pediconi N, Volz T, Pollicino T, Petersen J, Raimondo G, Dandri M, Levrero M. 2012. IFN-α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. J Clin Invest 122:529-537.). 수집 된 세포를 차가운 인산염 완충 식염수로 세척하고 얼음에서 10 분 동안 용해 완충액 270 μl (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM 에틸렌 디아민 테트라 아세트산 [EDTA], 1 % NP-40)에서 배양하여 용해시켰다.

[0278] 간략히 원심분리(10000 × g, 1 분) 후, 펠렛화된 핵을 분해버퍼B(10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% sodium dodecyl sulfate, and 0.5 mg/mL protein K)에 재현탁하고 37℃에서 밤새 배양하였다.

[0279] 페놀 - 클로로포름 추출 및 에탄올 추출에 의해 추출 된 DNA를 10 U Plasmid-Safe ATP-dependent DNase I(10U; Epicentre, WI, USA)로 45 분 동안 처리 한 다음, 70 °C에서 DNase를 비활성화시켰다.

[0280] cccDNA를 MEGA Quick Spin 키트 (Intron)를 사용하여 정제하고 다음의 프라이머 및 프로브를 사용하여 실시한 정량 PCR에 의해 정량화 하였다: cccF1, 5'-CCGTCTGTGCCTTCTCAT-3'; cccR1, 5'-CACAGCTTGGAGGCTTGAAC-3'; cccProbe, 5'-FAM280 CGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGC-TAMRA-3'.

[0281] 도 5C 및 5D에 나타낸 바와 같이, NJK14047로 처리하면 두 실험 모두 cccDNA가 유의하게 감소됨을 알수 있었다.

[0282] 또한, 5 μM NJK14047로 처리하면 HepG2.2.15 세포 및 pHBV-1.2x- 형질주입 세포에서 각각 cccDNA가 70 % 및 90 % 감소되었다. 따라서, 상기 결과에 의해 본 발명의 화합물 NJK14047에 의한 p38MAPK 저해가 cccDNA 생성 및 pgRNA 합성을 억제 할 수 있음을 확인하였다.

[0284] <실험예 9> In vitro HBV 감염 분석

[0285] 배양 상등액은 HepG2.2.15 세포 ( $4 \times 10^7$  세포 / 150-mm dish)로부터 14 일 동안 이틀마다 수집 하였다. 상등액을 간단히 원심 분리하고 여과하여 세포 파편을 제거 하였다 ( $0.45 \mu\text{m}$ ).

[0286] 바이러스 입자를 초 원심 분리 ( $100,000 \times g$ , 3 시간,  $4^\circ\text{C}$ )에 의해 농축시켰다. 바이러스 입자를 DMSO (2 %) 및 PEG8000 (4 %)을 함유하는 AML12 배지로 재현 탁시켰다. DMSO (2 %)를 함유하는 AML12 배지의 NTCP-HepG2-C4 세포를 HBV ( $6 \times 10^3$  게놈 당량 / 세포)에 감염시킨 후 원심 분리 (1300 rpm / 1 시간) 하였다.

[0287] 24 시간 동안 배양 한 후, 세포를 세척하고 NJK14047을 함유하는 AML12 배지에서 7 일 동안 유지시켰다. 세포 외 바이러스 DNA 및 HBsAg 수준은 전술 한 바와 같이 qPCR(quantitative PCR) 및 ELISA에 의해 결정되었다.

[0288] 그 결과, NJK14047 처리는 용량 의존적으로 HBV virion particle production(비리온 입자 생성) 및 HBsAg 분비 모두에서 현저한 감소 결과를 확인하였다(도 6A 및 B참조).

[0290] 따라서, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물은 HBsAg분비 및 HBeAg 분비를 감소시키며, HBV바이러스 수준이 감소하는 효과가 있고, pgRNA생성 억제 및 cccDNA 생성을 억제하는 효과가 우수하므로, HBV 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용할 수 있다.

[0292] 한편, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0294] <제제예 1> 산제의 제조

[0295] 화학식 1의 화합물 2 g

[0296] 유당 1 g

[0297] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0299] <제제예 2> 정제의 제조

[0300] 화학식 1의 화합물 100 mg

[0301] 옥수수전분 100 mg

[0302] 유당 100 mg

[0303] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0304] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0306] <제제예 3> 캡슐제의 제조

[0307] 화학식 1의 화합물 100 mg

[0308] 옥수수전분 100 mg

[0309] 유당 100 mg

[0310] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0311] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0313] <제제예 4> 주사제의 제조

[0314] 화학식 1의 화합물 100 mg

[0315] 만니톨 180 mg

[0316] Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 26 mg

[0317] 증류수 2974 mg

[0318] 통상적인 주사제의 제조방법에 따라, 상기 성분들을 제시된 함량으로 함유시켜 주사제를 제조하였다.

[0320] 건강기능식품의 제조예

[0321] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 목적에 따라 여러 형태의 건강기능식품으로 제조 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 유효물질을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 건강기능식품의 제조방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0323] <건강기능식품 제조예 1> 건강기능식품의 제조

[0324] 화학식 1의 화합물 100 mg

[0325] 비타민 혼합물 적량

[0326] 비타민 A 아세테이트 70 μg

[0327] 비타민 E 1.0 mg

[0328] 비타민 B1 0.13 mg

[0329] 비타민 B2 0.15 mg

[0330] 비타민 B6 0.5 mg

[0331] 비타민 B12 0.2 μg

[0332] 비타민 C 10 mg

[0333] 비오틴 10 μg

[0334] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0335] 엽산 50 μg

[0336] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0337] 무기질 혼합물 적량

[0338] 황산제1철 1.75 mg

[0339] 산화아연 0.82 mg

[0340] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0341] 제1인산칼륨 15 mg

[0342] 제2인산칼슘 55 mg

[0343] 구연산칼륨 90 mg

[0344] 탄산칼슘 100 mg

[0345] 염화마그네슘 24.8 mg

[0347] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능성 식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능성 식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능성 식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0349] <건강기능식품 제조예 2> 건강 기능 음료의 제조

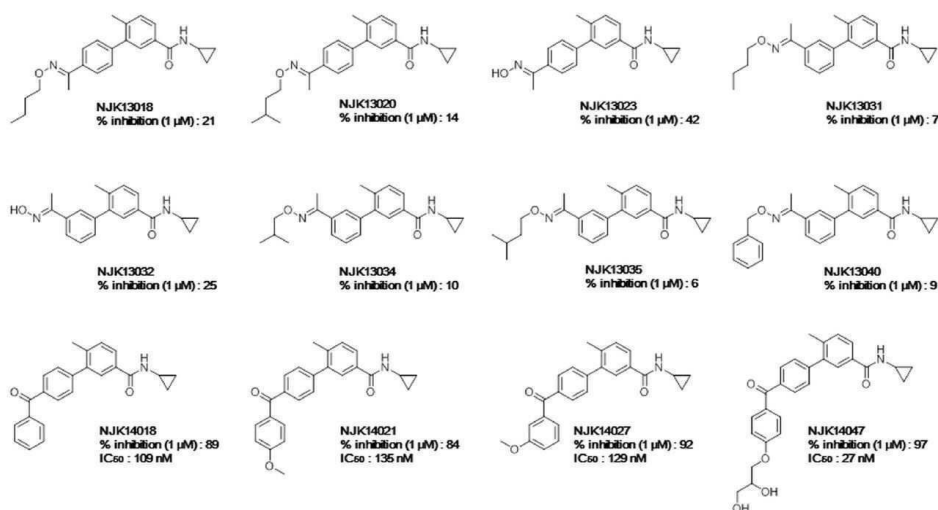
[0350] 화학식 1의 화합물 100 mg  
 [0351] 구연산 100 mg  
 [0352] 올리고당 100 mg  
 [0353] 매실농축액 2 mg  
 [0354] 타우린 100 mg  
 [0355] 정제수를 가하여 전체 500 mL

[0357] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 1 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다. 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요 계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

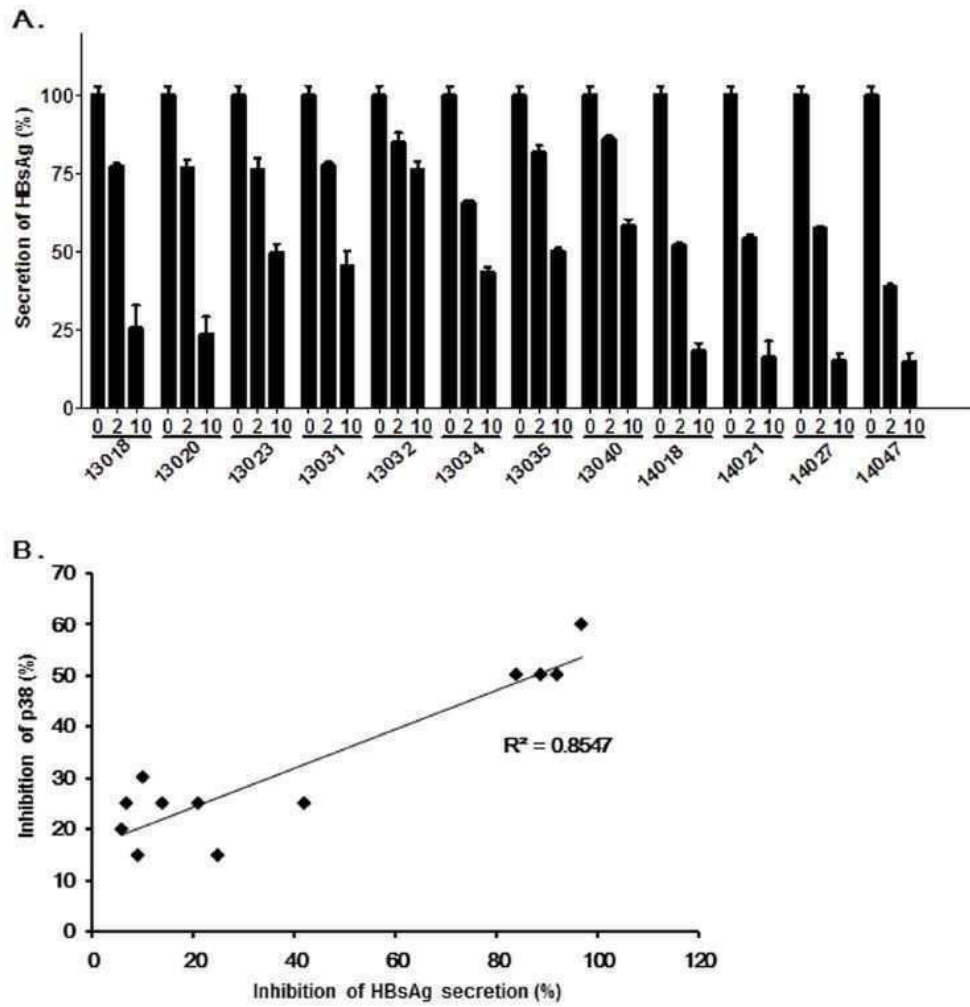
[0359] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

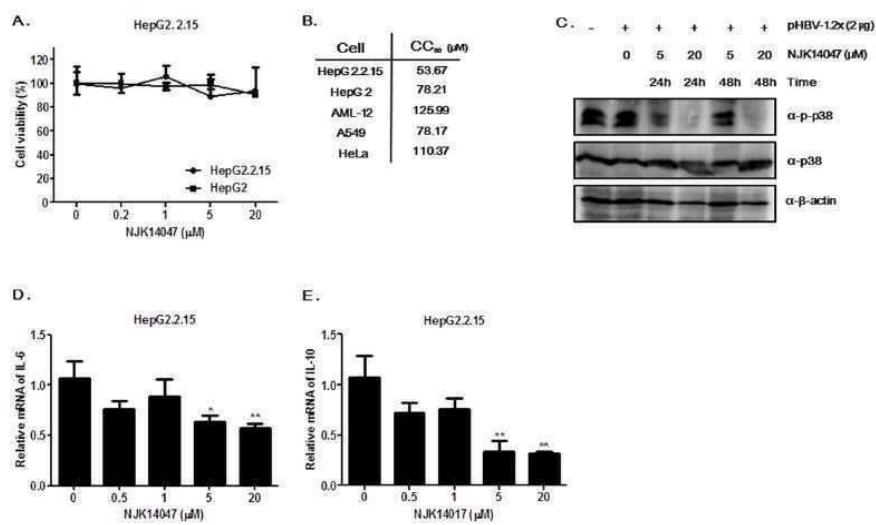
도면1



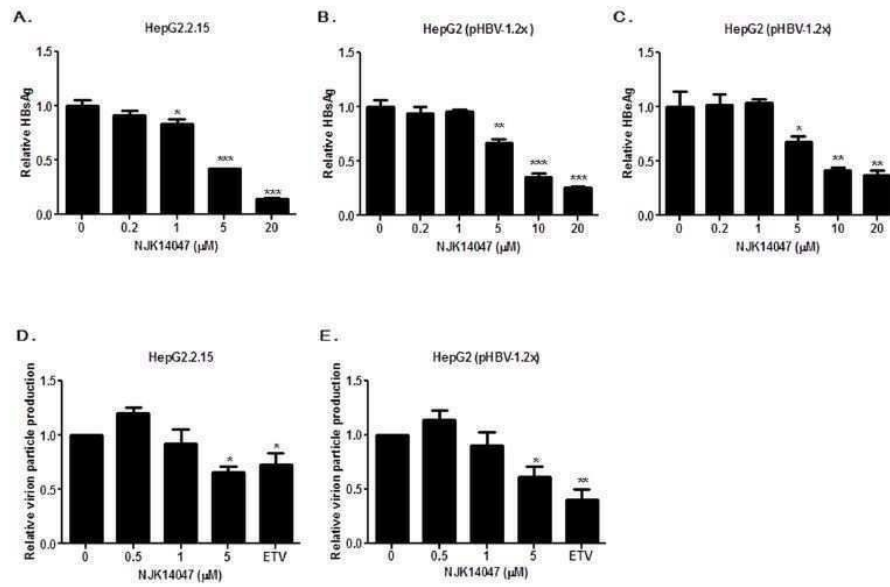
도면2



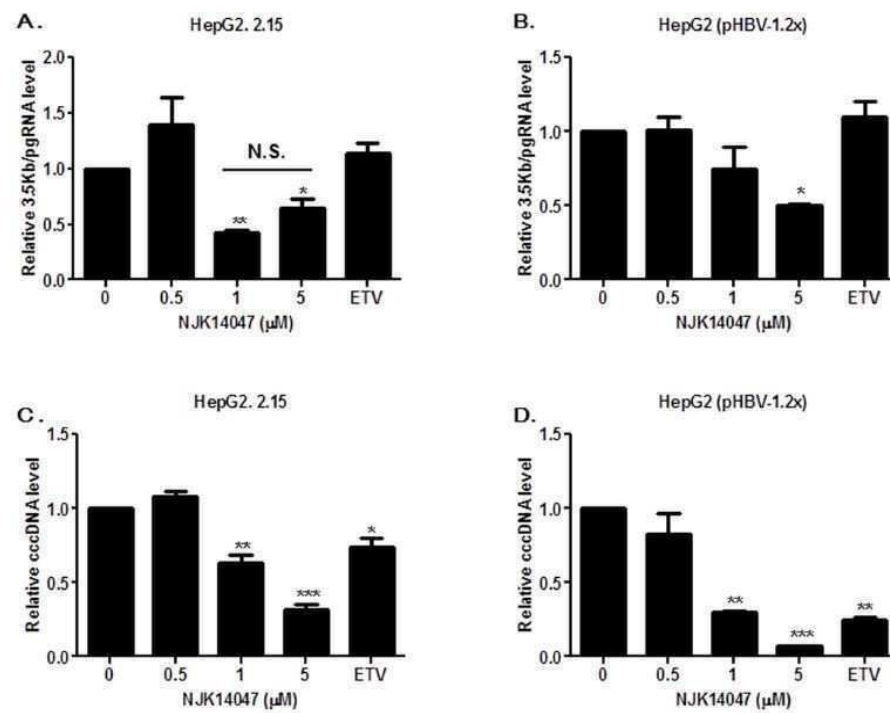
도면3



도면4



도면5



도면6

