(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
A61K 31/437 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년12월20일
(11) 등록번호 10-0660241
(24) 등록일자 2006년12월14일

(21) 출원번호 10-2003-7014319
(22) 출원일자 2003년11월03일
심사청구일자 2005년03월30일
번역문 제출일자 2003년11월03일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2002/004944
국제출원일자 2002년05월02일
(65) 공개번호 10-2004-0007527
(43) 공개일자 2004년01월24일
(87) 국제공개번호 WO 2002/89780
국제공개일자 2002년11월14일

(30) 우선권주장 0110832.3 2001년05월03일 영국(GB)

(73) 특허권자 바이로겐 엘티디
영국 런던 밀 힐 버튼홀 로드 1-3 (우:엔더블유7 1에이디)

(72) 발명자 팀스,알버트,스탠리
영국엔더블유71에이디런던밀힐버튼홀로드1-3

테일러,데브라,린
영국엔더블유71에이디런던밀힐버튼홀로드1-3

(74) 대리인 남상선

심사관 : 김은희

전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 항바이러스성 화합물

(57) 요약

본 발명은 플라비바이러스에 의해 야기된 질환의 치료, 특히 간염 C 바이러스(HCV)에 의해 야기된 질환의 치료에서 특정 카스타노스퍼민 에스테르의 용도에 관한 것으로서, 상기 에스테르를 보조 치료제와 병용하여 포함하는 조성물을 제공한다.

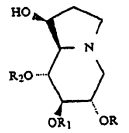
대표도

도 1

특허청구의 범위

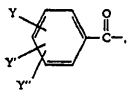
청구항 1.

하기 화학식을 갖는 유효량의 카스타노스퍼민 에스테르 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 헤파시바이러스(*Hepacivirus*) 감염의 치료 또는 예방용 약제 조성물:



상기 식에서,

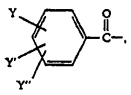
R, R_1 및 R_2는 독립적으로 수소, C_{1-14} 알카노일, C_{2-14} 알케노일, 시클로헥산카르보닐, C_{1-8} 알콕시아세틸,



메틸 또는 할로겐에 의해 치환되거나 치환되지 않은 나프탈렌카르보닐; 페닐이 메틸 또는 할로겐에 의해 치환되거나 치환되지 않은 페닐(C_{2-6} 알카노일); 신나모일; 메틸 또는 할로겐에 의해 치환되거나 치환되지 않은 피리딘카르보닐; C_{1-10} 알킬에 의해 치환되거나 치환되지 않은 디히드로피리딘 카르보닐; 메틸 또는 할로겐에 의해 치환되거나 치환되지 않은 티오펜카르보닐; 또는 메틸 또는 할로겐에 의해 치환되거나 치환되지 않은 푸란카르보닐이고; Y는 수소, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로겐, 트리플루오로메틸, C_{1-4} 알킬술포닐, C_{1-4} 알킬메르캅토, 시아노 또는 디메틸아미노이며; Y'는 수소, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로겐이거나, Y와 함께 3,4-메틸렌디옥시를 형성하고; Y"는 수소, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시 또는 할로겐이며; R, R_1 및 R_2 중 하나 또는 둘은 수소이다.

청구항 2.

제1항에 있어서, R, R_1 및 R_2가 각각 독립적으로 수소, C_{1-10} 알카노일, C_{2-10} 알케노일, C_{1-8} 알콕시아세틸 또는



이거나, Y가 수소, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로겐, 트리플루오로메틸, C_{1-4} 알킬술포닐, C_{1-4} 알킬메르캅토, 시아노 또는 디메틸아미노이고; Y'가 수소, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로겐이거나, Y와 함께 3,4-메틸렌디옥시를 형성하며; Y"가 수소, C_{1-4} 알콕시 또는 할로겐이고; R, R_1 및 R_2 중 하나 또는 둘이 수소임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 3.

제1항에 있어서, R, R_1 및 R_2가 각각 독립적으로 수소, C_{1-8} 알카노일, C_{2-8} 알케노일, C_{1-8} 알콕시아세틸이거나, 메틸 또는 할로겐으로 치환되거나 치환되지 않은 벤조일이고, R, R_1 및 R_2 중 하나 또는 둘이 수소임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 4.

제1항에 있어서, R, R_1 및 R_2가 각각 독립적으로 수소, C_{1-8} 알카노일, C_{2-8} 알케노일, C_{1-8} 알콕시아세틸이거나, 메틸, 브롬, 염소, 또는 불소기로 치환되거나 치환되지 않은 벤조일이고, R, R_1 및 R_2 중 하나 또는 둘이 수소임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 5.

제1항에 있어서, R_1이 C_{1-8} 알카노일, C_{2-10} 알케노일, C_{1-8} 알콕시아세틸이거나, 메틸 또는 할로겐으로 치환되거나 치환되지 않은 벤조일임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 6.

제1항에 있어서, R_1이 C_{1-8} 알카노일, C_{2-8} 알케노일, C_{1-8} 알콕시아세틸이거나, 메틸, 브롬, 염소, 또는 불소기로 치환되거나 치환되지 않은 벤조일임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 7.

삭제

청구항 8.

제1항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르가,

(a) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-벤조에이트;

(b) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 7-벤조에이트;

(c) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6- (4-메틸벤조에이트);

(d) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 7-(4-브로모벤조에이트);

(e) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6,8-디부타노에이트;

(f) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-부타노에이트;

(g) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-(2-푸란카르복실레이트);

(h) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 7- (2,4-디클로로벤조에이트);

(i) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-(3-헥세노에이트);

(j) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-옥타노에이트;

(k) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-펜타노에이트;

(l) O-피발로일 에스테르;

(m) 2-에틸-부티릴 에스테르;

(n) 3,3-디메틸부티릴 에스테르;

(o) 시클로프로파노일 에스테르;

(p) 4-메톡시벤조에이트 에스테르;

(q) 2-아미노벤조에이트 에스테르; 또는

(s) (a) 내지 (q)의 여하한 혼합물 또는 모두의 혼합물로부터 선택됨을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 9.
삭제

청구항 10.
삭제

청구항 11.
삭제

청구항 12.
삭제

청구항 13.
삭제

청구항 14.
삭제

청구항 15.
삭제

청구항 16.
삭제

청구항 17.
삭제

청구항 18.
삭제

청구항 19.
삭제

청구항 20.
삭제

청구항 21.
삭제

청구항 22.
삭제

청구항 23.

제1항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르가 [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-벤조에이트임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 24.

제1항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르가 [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-부타노에이트임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 25.

제1항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르가 [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-(2-푸란카르복실레이트)임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 26.

제1항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르가 [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-펜타노에이트임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 27.

제1-6, 8, 23-26항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적 허용 부형제를 추가로 포함함을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 28.

제1-6, 8, 23-26항 중 어느 한 항에 있어서, 헤파시바이러스가 C형 간염 바이러스(HCV)임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 29.

제1-6, 8, 23-26항 중 어느 한 항에 있어서, 이노신 모노포스페이트 탈수소효소의 억제제인 보조 치료제를 추가로 포함함을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 30.

제29항에 있어서, 이노신 모노포스페이트 탈수소효소 억제제가 미코페놀산임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 31.

제29항에 있어서, 이노신 모노포스페이트 탈수소효소 억제제가 VX497(메리멤포디브(merimempodib))임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 32.

제29항에 있어서, 이노신 모노포스페이트 탈수소효소 억제제가 리바비린임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 33.

제32항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르가 [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-부타노에이트임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 34.

제33항에 있어서, 조성물이 키트 형태임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 35.

제34항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르 및/또는 보조 치료제가 단위 투여 형태임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 36.

제1-6, 8, 23-26항 중 어느 한 항에 있어서, 인터페론 또는 티모신-α인 보조 치료제를 추가로 포함함을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 37.

제36항에 있어서, 인터페론이 인터페론-α(IFN-α)임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 38.

제37항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르가 [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-부타노에이트임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 39.

제38항에 있어서, 조성물이 키트 형태임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 40.

제39항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르 및/또는 보조 치료제가 단위 투여 형태임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 41.

제1-6, 8, 23-26항 중 어느 한 항에 있어서, 항산화제인 보조 치료제를 추가로 포함함을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 42.

제41항에 있어서, 항산화제가 플라비노이드임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 43.

제42항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르가 [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-부타노에이트임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 44.

제43항에 있어서, 조성물이 키트 형태임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 45.

제44항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르 및/또는 보조 치료제가 단위 투여 형태임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 46.

제1-6, 8, 23-26항 중 어느 한 항에 있어서, 헤파시바이러스 세린 프로테아제 억제제 또는 헤파시바이러스 헬리카아제 억제제인 보조 치료제를 추가로 포함함을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 47.

제46항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르가 [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-부타노에이트임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 48.

제47항에 있어서, 조성물이 키트 형태임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 49.

제48항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르 및/또는 보조 치료제가 단위 투여 형태임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 50.

제1-6, 8, 23-26항 중 어느 한 항에 있어서, HCV E1 및/또는 E2 단백질에 특이적 항체인 보조 치료제를 추가로 포함함을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 51.

제50항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르가 [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-부타노에이트임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 52.

제51항에 있어서, 조성물이 키트 형태임을 특징으로 하는 약제 조성물.

청구항 53.

제52항에 있어서, 카스타노스퍼민 에스테르 및/또는 보조 치료제가 단위 투여 형태임을 특징으로 하는 약제 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 플라비바이러스에 의해 야기된 질환의 치료, 특히 C형 간염 바이러스(HCV)에 의해 야기된 질환의 치료에서 특정 카스타노스퍼민(castanospermine) 에스테르의 용도에 관한 것이다.

배경기술

플라비바이러스

플라비바이러스 군(플라비비리대(*Flaviviridae*) 과)은 플라비바이러스(*Flavivirus*) 속, 페스티바이러스(*Pestivirus*) 속 및 헤파시바이러스(*Hepacivirus*) 속을 포함하고, 다수의 사람 질환 및 병원체 및 가축 산업에서 상당한 손실을 초래하는 수많은 동물 질환의 병원체를 포함한다.

플라비비리대 과(이것의 일원이 본원에서 플라비바이러스로서 언급됨)은 플라비바이러스 속(예컨대, 황열병 바이러스, 뎅기 바이러스, 일본 뇌염 바이러스 및 틱-본 뇌염 바이러스), 페스티바이러스 속(예컨대, 소 바이러스성 설사 바이러스, 전형적인 돼지열 바이러스 및 보더 질환 바이러스), 헤파시바이러스 속(C형 간염 바이러스) 및 현재 미분류된 플라비비리대의 일원(예컨대, GB 바이러스 유형 A, B 및 C)을 포함한다.

플라비비리대 일원의 전체 목록이 바이러스의 분류 국제 위원회에 의해 상세하게 정의되었고 (일반적으로 허용되는 분류적 정의가 Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (book). M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, R. B. Wickner (2000). Virus Taxonomy, VIIth report of the ICTV. Academic Press, SanDiego에 기재되어 있음), 이의 내용이 본원에서 참고문헌으로 인용된다.

그러나, 아마도 대부분의 상당한 플라비바이러스는 C형 간염 바이러스(HCV)이다. HCV는 1989년에 처음 동정되었고 이후 이 바이러스는 수혈 후 비-A형, 비-B형 간염의 대부분의 원인인 것으로 밝혀졌다. 실제로, HCV는 현재 만성 간 질환을 야기하는 가장 대중적인 감염 중의 하나로서 인식되고, 세계 보건 기구는 1억 7천만명의 사람이 만성적으로 감염되어 있다고 추정한다. HCV 감염은 감염된 환자의 85%에서 만성 감염을 초래하고, 이들 중의 약 20 내지 30%는 종종 간세포암종이 병발하는 경화증 및 말기 간 질환으로 진행될 것이다.

바이러스를 세포 배양액에서 효과적으로 증식시킬 수 없었기 때문에 HCV에 대한 연구는 제한적이었다. 그러나, 사람 HCV의 복제를 지지할 수 있는 적절한 세포 배양 시스템의 부재하에, BVDV는 인정된 세포 배양 모델이다. HCV 및 BVDV는 상당한 수준의 국소 단백질 상동성, 공통의 복제 방법을 갖고 아마도 동일한 바이러스 외피용 하위세포의 위치를 공유한다.

HCV는 플라비비리대(*Flaviviridae*) 과에 속하나, 헤파시바이러스(*Hepacivirus*) 속과는 별개인 것으로 분류되는, 외피 플러스-가닥 RNA 바이러스이다. HCV 게놈은 ~3000개의 아미노산 잔기 폴리단백질을 엔코딩하는 단 하나의 긴 오픈 리딩 프레임으로 구성된다. 이 폴리단백질은 공동번역 및 사후번역 처리되어 두개의 N-연결된 글리코실화 단백질 E1 및 E2를 포함하는 10개 이상의 상이한 생성물을 형성한다.

게놈은 안정한 2차 및 3차 구조를 형성하는 비번역적 영역(NTRs)을 5' 및 3' 말단에 지닌다. 5' NTR은 ORF의 개시 코돈에 매우 근접하게 리보솜을 직접 결합시키는 내부 리보솜 도입 부위(IRES)를 운반한다. 따라서, HCV RNA의 번역은, 통상적으로 세포 mRNA가 이용하는 CAP-의존성 메커니즘이 아닌, IRES에 의해 매개된다.

폴리단백질내에서, 분해 생성물은 다음과 같이 배열된다: 코어(C), 외피 단백질 1 (E1), E2, p7, 비구조 단백질 2(NS2), NS3, NS4A, NS4B, NS5A 및 NS5B. 코어 단백질은 누클레오캡시드의 주요 성분을 형성하는 고도로 염기성인 RNA 결합 단백질이다. 외피 단백질 E1 및 E2는 카르복시-말단 영역을 통해 부착된 고도로 글리코실화된 유형 1의 막 단백질이다. 이들은 바이러스 입자의 지질 외피로 함몰되고 결합하여 안정한 헤테로이량체를 형성한다. 분해 생성물 p7은 기능이 알려지지 않은 소형의 소수성 펩티드이다. 비구조 단백질은 바이러스 복제와 관련이 있고 프로테아제(NS2/NS3), 헬리카제(NS3) 및 RNA 폴리머라제 활성(NS5B)을 지닌다.

숙주 세포와의 결합에는 아마도 E2 또는 E1/E2 복합체와 세포 표면에 존재하는 수용체의 상호작용이 요구된다.

효과적인 세포 배양 복제 시스템의 결여로 인해, HCV 입자 어셈블리에 대한 정보는 매우 제한되어 있다. 그러나, 복합체 글리칸의 부재, 소포체(ER)에서 HCV 당단백질의 국소적인 발현 및 세포 표면상의 이러한 단백질의 부재는, 초기 비리온의 형태발생이 ER에서 세포내 소포로 발아됨에 의해 발생한다는 것을 시사한다. 추가로, 성숙한 E1-E2 헤테로이량체가 ER을 떠나지 않고, ER 보류 시그날이 E1 및 E2 모두의 C-말단 영역에서 동정되었다. 이 경우 바이러스는 구조적 분비 경로를 통해 배출될 것이다. 이러한 가정에 일치하여, 복합체 N-결합된 글리칸이 부분적으로 정제된 바이러스 입자의 표면에서 발견되었고, 이는 바이러스가 골지(Golgi)를 통과함을 시사한다.

최근까지, 인터페론-α(IFN-α)는 HCV 감염 치료에서 효과가 입증된 유일한 치료제이다. IFN-α이용시, 50% 이하의 환자가 치료에 반응을 보이나, 이것이 대다수의 환자에서 입증된 것은 아니며, 상당한 관련 부작용이 존재한다. 보다 최근에, IFN-α를 누클레오시드 동족체 리바비린과 병용하여 이용함으로써 보다 양호한 결과가 달성되었으나, 보다 유효한 항바이러스 활성과 감소된 부작용을 갖는 새로운 치료 후보물질을 동정하기 위한 지속적인 연구가 요구된다.

따라서, 일반적으로 말해, 개선된 항-플라비바이러스 약제, 구체적으로 항-HCV 약제가 요구된다.

당단백질 및 바이러스 성장

당단백질은 당과 단백질의 아미노산 사이의 결합에 따라 주된 두개의 부류로 구분된다. 가장 일반적으로 광범하게 연구되는 것은 단백질의 아스파라긴과 올리고사카라이드의 N-아세틸-D-글루코사민 잔기 사이에 존재하는 N-글리코시드 결합이다. N-결합된 올리고사카라이드는 폴리펩티드 주쇄에 부착된 후, 소포체(ER) 중의 일련의 특이적인 효소에 의해 처리되며, 이 처리 경로는 널리 규명되어 있다.

ER에서, α-글루코시다제 1은 전구 올리고사카라이드로부터 말단의 α-1,2 글루코스 잔기의 제거를 초래하고 α-글루코시다제 2는, 만노시다제에 의한 만노오스 잔기의 제거 및 다양한 트랜스퍼라제를 필요로 하는 추가 처리 반응 이전에, 잔존하는 2개의 α-1.3 결합된 글루코스 잔기를 제거한다. 이러한 올리고사카라이드 "트리밍(trimming)" 반응은 당단백질이 정확하게 폴딩되어 골지체를 통해 운반되는 칼넥신(calnexin) 및 칼레티쿨린(calreticulin) 등의 샤페론 단백질과 상호작용할 수 있도록 한다.

이러한 생합성 경로에 중요한 효소 억제제, 특히 α-글루코시다제 및 α-만노시다제를 저해하는 것들은 수개의 외피 바이러스의 복제를 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 억제제는 바이러스 외피 당단백질의 폴딩을 방해함에 의해 기능하고, 따라서 초기 바이러스-숙주 세포 상호작용 또는 후속적인 융합을 억제한다. 또한 이들은 바이러스 막의 완성에 요구되는 적절한 당단백질의 생성을 방해함에 의해 바이러스의 복제(duplication)를 억제할 수 있다.

예를 들어, 비특이적인 글리코실화 억제제 2-데옥시-D-글루코스 및 β-히드록시-노르발린은 HIV 당단백질의 발현을 억제하고 신시티아(syncytia)의 형성을 저해함이 보고되었다 (Blough 등, Biochemical and Biophysical Research Communications, 141 (1), 33-38 (1986)). 이러한 제제로 처리된 HIV-감염 세포는, 생각컨대 바이러스의 막 형성에 요구되는 당단백질을 이용하지 못하므로, 바이러스 증식이 중단된다.

또다른 보고에서, 글리코실화 억제제 2-데옥시-2-플루오로-D 만노오스가 인플루엔자 감염된 세포에 대하여 바이러스 막 단백질의 글리코실화를 억제함에 의해 항바이러스 활성을 나타냄이 발견되었다 (McDowell 등, Biochemistry, 24 (27), 8145-52 (1985)). 또한 이 보고에서 2-데옥시글루코스 및 2-데옥시-플루오로글루코스의 항바이러스 활성을 연구하였고, 각각이 상이한 메커니즘에 의해 바이러스 단백질의 글리코실화를 억제함을 발견하였다.

루(Lu) 등 (1995)은 N-결합 글리코실화가 B형 간염 바이러스의 분비에 필수적이라는 증거를 제시하였고 (Virology 213: 660-665), 블록(Block) 등(1994)은 사람 B형 간염 바이러스의 분비가 이미노 당 N-부틸데옥시노지리마이신에 의해 억제됨을 입증하였다 (PNAS 91: 2235-2239). WO 99/29321호를 참조한다.

테일러(Taylor) 등(1988)은 시토메갈로바이러스의 감염능이 카스타노스퍼민 또는 그밖의 식물성 알칼로이드로 처리 후 손실됨을 증명하였고, 이것은 명백히 당단백질의 합성과 관련이 있다 (Antiviral Res. 10: 11-26). 미국 특허 제 5,004,746호를 참조한다.

테일러(Taylor) 등(1994)은 6-0-부타노일 카스타노스퍼민에 의한 당단백질 처리 효소인 α-글루코시다제 1의 억제가 사람 면역결핍성 바이러스-감염된 T-세포에 영향을 미침을 제시하고 (Antimicrob. Ag. Chemother. 38: 1780-1787), 선카라(Sunkara) 등(1989)은 카스타노스퍼민 동족체의 항-HIV 활성에 대하여 기술하였다 (Lancet II 1206). 미국 특허 제 5,004,746호를 참조한다.

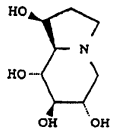
미국 특허 제 5,385,911호는 특정 카스타노스퍼민 에스테르의 항-헤르페스 활성에 대해 기술한다.

그러나, 공지된 그밖의 수많은 글리코실화 억제제가 항바이러스 활성을 지니지 않는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 외피 바이러스에 대한 항바이러스 활성, 특히 글리코실화 억제제의 항-플라비바이러스 활성은 전혀 예측할 수 없는 것이다.

글루코시다제 억제제

카스타노스퍼민 및 특정 이미노 당, 예컨대 데옥시노지리마이신(DNJ)은 ER α-글루코시다제 억제제이며, 양자 모두 당단백질 처리의 초기 단계를 유효하게 억제한다. 그러나, 이러한 효과는 이들이 적용되는 시스템에 따라 실제로 다르며, 이들은 매우 상이한 특이성을 나타낼 것이고, 카스타노스퍼민은 α-글루코시다제 1에 비교적 특이적이다.

카스타노스퍼민은 하기 구조를 갖는 알칼로이드로서, 카스타노스페르뭄 오스트레일(*Castanospermum australe*)의 종자로부터 최초로 분리되었다:



이 화합물은 분류적으로 하기에 따라 수가지 방식으로 명명될 수 있다: [1S- (1α,6β,7β,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 또는 [1S,(1S,6S,7R,8R,8aR)-1,6,7,8-테트라히드록시-인돌리지딘 또는 1,2,4,8-테트라데옥시-1,4,8-니트릴로-L-글리세로-D-갈락토-옥티톨. "카스타노스퍼민(castanospermin)" 또는 제 1 분류명을 하기 논의에서 이용할 것이다.

브란자-니키타(Branza-Nichita) 등(2001) 문헌[J.Virol 75(8): 3527-3565]에서는 이미노당 *N*-부틸데옥시노지리마이신이 페스티바이러스 B VDV에 대한 항바이러스 효과를 가짐을 개시하고 있다. 그러나, 연구자들은, α-글리코시다제 억제

제를 이용한 치료가 상기 바이러스 및 그밖의 외피 바이러스의 생활 주기에는 영향을 미칠 수 있으나, 이 효과가 바이러스 단백질에 의한 특정 폴딩 경로에 상당히 의존적일 수 있으므로 그밖의 바이러스에 대하여는 생성될 수 없음을 명백히 하고 있다.

커레이고트(Courageot) 등(2000)의 문헌[J.Virol.74(1): 564-572]에서는 α-글루코시다제 억제제 카스타노스퍼민 및 DNJ가 시험관내 마우스 모델에서 뎅기 바이러스의 생산을 감소시킨다고 보고하였다. 그러나, 이미노당 억제제 DNJ와 카스타노스퍼민의 활성 간에 실질적인 차이는 보고되지 않았다.

WO 99/29321호는, 그 중에서도 특히 HCV 감염 치료용 α-글루코시다제 억제제(및 특히 이미노 당)의 용도에 대해 기술한다. 그러나, 이와 관련하여 특히 카스타노스퍼민(또는 이의 에스테르 또는 유도체)에 대해서는 언급된 바 없다. 대신, 이 문헌에서는 다양한 이미노 당의 활성에 초점을 맞추고 있다.

초우키(Choukhi) 등(1998)의 문헌[J.Virol. 72(5):3851-3858]에서는 HCV 당단백질 및 이들의 샤페론 간의 상호작용에 대한 카스타노스퍼민의 효과에 대해 보고한다. 카스타노스퍼민은 HCV 당단백질 및 샤페론 칼넥신 및 칼레티쿨린 간의 상호작용을 소멸시키지 않았다. 카스타노스퍼민은 오히려 칼레티쿨린에 대한 당단백질의 결합을 실제로 증가시켰다. 연구자들은 다음과 같이 결론내리면서, HCV 당단백질 처리가 당단백질의 트리밍 억제제(예컨대, 카스타노스퍼민)에 민감하지 않다고 제안하였다:

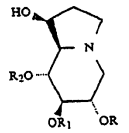
...칼넥신 또는 칼레티쿨린에 대한 HCV 당단백질의 결합 및 이로부터의 유리는 N-결합 글리칸의....트리밍에 독립적일 수 있다.

[Choukhi 등, 3856면, 칼럼 1]

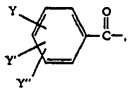
이러한 상반되는 교시에도 불구하고, 본 발명자들은 놀랍게도 특정 카스타노스퍼민의 에스테르가 실제로 플라비비리대(*Flaviviridae*)의 일원(HCV를 포함)에 대한 항바이러스 활성을 나타냄을 발견하였다. 더욱이, 이들은 예상치 못하게, 그 치료 지수가 이미노 당류의 그밖의 α-글리코시다제 억제제가 나타낸 것보다 훨씬 우수하다는 것을 발견하였다 (에스테르는 비교적 높은 항바이러스 활성 및 비교적 낮은 독성을 나타낸다). 어떠한 이론에도 구속되지 않길 바라며, 예상치 못한 이러한 카스타노스퍼민 에스테르의 특성은 당단백질 처리 효소(즉, α-글리코시다제 1)의 특정 부류에 대한 이들의 상대적인 특이성을 반영하는 것으로 가정될 수 있다.

발명의 개요

본 발명에 따라 하기 화학식을 갖는 유효량의 카스타노스퍼민 에스테르 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 유도체를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 요구하는 환자에서 플라비바이러스 감염을 치료하는 방법이 제공된다:



상기 식에서, R, R_1 및 R_2는 독립적으로 수소, C_{1-14} 알카노일, C_{1-14} 알케노일, 시클로헥산카르보닐, C_{1-8} 알콕시아세틸,



메틸 또는 할로겐에 의해 임의로 치환된 나프탈렌카르보닐; 페닐이 메틸 또는 할로겐에 의해 임의로 치환된 페닐(C_{2-6} 알카노일); 신나모일; 메틸 또는 할로겐에 의해 임의로 치환된 피리딘카르보닐; C_{1-10} 알킬에 의해 임의로 치환된 디히드로피리딘 카르보닐; 메틸 또는 할로겐에 의해 임의로 치환된 티오펜카르보닐; 또는 메틸 또는 할로겐에 의해 임의로 치환된 푸란카르보닐이고; Y는 수소, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로겐, 트리플루오로메틸, C_{1-4} 알킬술포닐, C_{1-4} 알킬메르캅토,

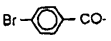
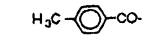
시아노 또는 디메틸아미노이며; Y'는 수소, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로겐이거나, Y와 함께 3,4-메틸렌디옥시를 형성하고; Y"는 수소, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시 또는 할로겐이며; R, R_1 및 R_2는 이들 중의 하나 또는 두개가 수소가 되도록 선택된다.

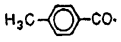
바람직하게는, R, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 수소, C_{1-10} 알카노일, C_{1-10} 알케노일, C_{1-8} 알콕시아세틸이거나, Y가 수소, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로겐, 트리플루오로메틸, C_{1-4} 알킬술포닐, C_{1-4} 알킬메르캅토, 시아노 또는 디메틸아미노이고; Y'가 수소, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로겐이거나, Y와 함께 3,4-메틸렌디옥시를 형성하며; Y"가 수소, C_{1-4} 알콕시 또는 할로겐이고; R, R_1 및 R_2는 이들 중의 하나 또는 두개가 수소가 되도록 선택된다.

R, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 수소, C_{1-8} 알카노일, C_{1-8} 알케노일, C_{1-8} 알콕시아세틸이거나, 알킬 또는 할로겐으로 임의로 치환된 벤조일일 수 있고, R, R_1 및 R_2는 이들 중의 하나 또는 두개가 수소가 되도록 임의로 선택된다.

R, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 수소, C_{1-8} 알카노일, C_{1-8} 알케노일, C_{1-8} 알콕시아세틸이거나, 메틸, 브롬, 염소, 또는 불소기로 임의로 치환된 벤조일일 수 있고, R, R_1 및 R_2는 이들 중의 하나 또는 두개가 수소가 되도록 임의로 선택된다.

바람직한 구체예에서, 카스타노스퍼민 에스테르는 표 1에 제시된 구조를 갖는다.

화합물	구 조 R	화합물	구 조 R
CAST	H	MDL 29270	H
MDL 28574	$CH_3(CH_2)_2$-CO-	MDL 44370	
MDL 43305		MDL 29797	$CH_3(CH_2)_6$-CO-
MDL 28553		MDL 29710	$CH_3(CH_2)_3$-CO-
MDL 29435		MDL 29513	$CH_3CH_2(CH)_2CH_2$-CO-
MDL 29204			

*MDL 29270에서 R_1은  이고: 그밖의 모든 구조에서 R_1은 H임.

기본 구조

특히 바람직한 것은 R_1이 C_{1-8} 알카노일, C_{1-10} 알케노일, C_{1-8} 알콕시아세틸이거나, 알킬기 또는 할로겐으로 임의로 치환된 벤조일인 카스타노스퍼민 에스테르이다.

R_1은 C_{1-8} 알카노일, C_{1-8} 알케노일, C_{1-8} 알콕시아세틸이거나, 메틸, 브롬, 염소, 또는 불소기로 임의로 치환된 벤조일일 수 있다.

카스타노스퍼민 에스테르는,

(a) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-벤조에이트;

(b) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 7-벤조에이트;

(c) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6- (4-메틸벤조에이트);

(d) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 7-(4-브로모벤조에이트);

(e) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6,8-디부타노에이트;

(f) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-부타노에이트;

(g) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-(2-푸란카르복실레이트);

(h) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 7- (2,4-디클로로벤조에이트);

(i) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-(3-헥세노에이트);

(j) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-옥타노에이트;

(k) [1S-(1α,6β,7α,8β,8aβ)]-옥타히드로-1,6,7,8-인돌리진테트롤 6-펜타노에이트;

(l) 0-피발로일 에스테르;

(m) 2-에틸-부티릴 에스테르;

(n) 3,3-디메틸부티릴 에스테르;

(o) 시클로프로파노일 에스테르;

(p) 4-메톡시벤조에이트 에스테르;

(q) 2-아미노벤조에이트 에스테르; 및

(r) (a) 내지 (q)의 여하한 혼합물 또는 모두의 혼합물로부터 선택될 수 있다.

플라비바이러스는, 예를 들어 페스티바이러스(*Pestivirus*) 속 또는 플라비바이러스(*Flavivirus*) 속의 일원일 수 있다.

바람직한 구체예에서, 플라비바이러스는 헤파시바이러스(*Hepacivirus*) 속의 일원이다. 특히 바람직한 구체예에서, 헤파시바이러스는 C형 간염 바이러스(HCV)이다.

그밖의 플라비바이러스는 플라비바이러스 속(예컨대, 황열병 바이러스, 뎅기 바이러스, 일본 뇌염 바이러스 및 틱-본 뇌염 바이러스), 페스티바이러스 속(예컨대, 소 바이러스성 설사 바이러스, 전형적인 돼지열 바이러스 및 보더 질환 바이러스) 및 현재 미분류된 플라비비리대의 일원(예컨대, GV 바이러스 유형 A, B 및 C)을 포함한다.

본 발명의 또다른 양태에서, 플라비바이러스는 동물 바이러스이고, 예를 들어, 소 설사 바이러스(BVDV), 전형적인 돼지열 바이러스, 보더 질환 바이러스 및 돼지 콜레라 바이러스로부터 임의로 선택된 페스티바이러스이다.

본 발명의 또다른 양태에서, 플라비바이러스 감염의 치료 또는 예방용 약제를 제조하기 위한, 상기 기술한 카스타노스퍼민 에스테르의 용도를 제공한다.

따라서, 본 발명은 상기 기술한 카스타노스퍼민 에스테르의 사용(예컨대, 활성 성분으로서)을 특징으로 하는, 플라비바이러스 감염의 치료 또는 예방용 약제의 제조 방법에 관한 것이다.

치료 또는 예방은 상기 정의된 바이러스에 의한 감염의 치료 또는 예방인 것이 바람직하다. 특히, 치료 또는 예방은 C형 간염, 황열병, 뎅기열, 일본 뇌염, 머레이 밸리 뇌염, 로시오 바이러스 감염, 웨스트 닐 열, 세인트 루이스 뇌염, 틱-본 뇌염, 도약병 바이러스 감염, 포와산 바이러스 감염, 옴스크 출혈열, 키아사누르 포레스트 질환, 소 설사, 전형적인 돼지열, 보더 질환 및 돼지 콜레라에서 선택된 질환의 치료 또는 예방일 수 있다.

또한 본 발명의 약제는 보조 치료제와 병용하여(예컨대, 혼합하거나 함께 포장하여) 본 발명의 카스타노스퍼민 에스테르를 포함할 수 있다. 보조 치료제는 항바이러스 화합물, 예를 들어 항-HCV 약제를 포함할 수 있다. 특히 바람직한 보조 치료제는 인터페론-α 및/또는 리바비린이다.

따라서, 또다른 양태에서, 본 발명은 앞서 정의된 어느 하나의 카스타노스퍼민 에스테르를, (a) HCV에 의한 세포 결합 및/또는 세포 감염을 억제하는 화합물과 병용하여 포함하는 조성물을 제공한다. 이들은, 예를 들어 HCV E1 및/또는 E2 단백질에 대한 항체(예컨대, 모노클로날 항체) 및 글루코사미노글리칸(예컨대, 헤파란 술페이트 및 수라민); (b) IRES 억제제, 프로테아제(예컨대, 세린 프로테아제) 억제제, 헬리카제 억제제 및 바이러스 폴리머라제/레플리카제의 억제제를 포함하여, 바이러스 캡시드로부터 바이러스 RNA의 방출 또는 HCV 유전자 생성물의 기능을 억제하는 화합물; (c) 이노신 모노포스페이트 탈수소효소의 억제제(예컨대, 리바비린, 미코페놀산 및 VX497) 및 DNJ와 그 유도체 등의 당단백질 처리 억제제를 포함하여, 바이러스 복제에 관련되거나 영향을 미치는 세포 기능을 방해하는 화합물; (d) 면역 기능을 변경시키는 화합물(예컨대, 티모신 알파 및 인터페론, 예컨대 α인터페론 및 β인터페론) 및 (e) HCV 감염 증상 및 효과를 조절하는 화합물(예컨대, 플라비노이드 등의 산화방지제)을 포함한다.

추가로, 본 발명은 앞서 정의된 어느 하나의 카스타노스퍼민 에스테르를, 빈번하게 발견되는 공동감염(예컨대, B형 간염 바이러스 및 사람 레트로바이러스, 예컨대 사람 면역결핍성 바이러스 유형 1 및 2 및 사람 T-세포 림프영양성 바이러스 유형 1 및 2)의 치료에 사용되는 화합물과 병용하여 포함하는 조성물을 제공한다. 이러한 화합물의 구체예에는 누클레오티드 RT 억제제(예컨대, 라미부딘(3TC), 지도부딘, 스타부딘, 디다노신, 아데포비르 디피복실 및 아바카비르), 비-누클레오시드 RT 억제제(예컨대, 네비라핀) 및 프로테아제 억제제(예컨대, 사퀴나비르, 인디나비르 및 리토나비르)가 포함된다.

상기 논의된 보조 치료제는 본 발명의 카스타노스퍼민 에스테르와 함께 투여될 수 있다. 선택적으로, 카스타노스퍼민 에스테르 및 보조 치료제(들)를 연속하여 투여할 수 있다.

인터페론은, 물론 그밖의 인터페론(예를 들어, 클로닝된 사람 인터페론 유전자의 발현에 의해 생성된 인터페론)을 이용할 수 있으나, 인터페론-α(IFN-α)인 것이 바람직하다 .

추가로, 상기 기술된 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 임의로 포함한다. 따라서, 본 발명은 상기 기술된 조성물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명은 조성물은, 예를 들어 상기 기술된 여하한 치료 방법 및 예방 방법에 따른 치료 또는 예방 용도를 갖는 것이 바람직하다.

또다른 양태에서, 본 발명은 앞서 정의된 어느 하나의 카스타노스퍼민 에스테르를, 상기 기술한대로 (a) HCV에 의한 세포 결합 및/또는 감염을 억제하는 화합물; (b) 바이러스 캡시드로부터 바이러스 RNA의 방출 또는 HCV 유전자 생성물의 기능을 억제하는 화합물; (c) 바이러스 복제에 관련되거나 영향을 미치는 세포 기능을 방해하는 화합물; (d) 면역 기능을 변경시키는 화합물, 및 (e) HCV 감염 증상 및 효과를 조절하는 화합물과 병용하여 포함하는 성분들의 약제학적 키트를 제공한다.

또한 이 키트는 플라비바이러스 질환(예를 들어, 상기 기술한 플라비바이러스 질환)의 치료용 안내서를 추가로 포함한다.

카스타노스퍼민 에스테르 및 보조 치료제(들)는 단위 용량 형태로 공동포장될 수 있다.

본 발명의 조성물에서, 카스타노스퍼민 에스테르 및 보조 치료제(들)는 상보적이거나 상승적인 방식으로 작용할 수 있다.

HCV 감염의 치료에서 상승적인 방식으로 작용하는 인터페론과 본 발명의 카스타노스퍼민 에스테르 모두를 포함하는 조성물 및 방법이 특히 바람직하다.

전술한 여하한 약제 조성물에서 본 발명의 조성물 또는 카스타노스퍼민 에스테르는 단위 용량 형태로 존재할 수 있다.

따라서, 본 발명은 카스타노스퍼민 에스테르와 보조 치료제(들)가 단위 용량 형태로 존재하는 상기 정의된 키트에 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

본원에서 이용한 용어 "플라비바이러스"는 플라비비리대(*Flaviviridae*) 족의 여하한 일원을 포함하도록 의도된다.

"약제학적으로 허용되는 염"이란 표현은 기재 화합물의 여하한 무독성 유기산 또는 무기산 부가염을 포함하도록 의도된다.

적절한 염을 형성하는 구체적인 무기산은 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함하고, 산 금속염으로는, 예컨대 나트륨 모노히드로겐 오르소포스페이트 및 황산수소칼륨 등이 있다. 적절한 염을 형성하는 구체적인 유기산은 모노, 디 및 트리카르복실산을 포함한다. 이러한 산의 구체예에는, 예를 들어, 아세트산, 글리콜산, 락트산, 피루브산, 말론산, 숙신산, 글루타르산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 말레산, 히드록시말레산, 벤조산, 히드록시벤조산, 페닐아세트산, 신남산, 살리실산 및 2-페녹시벤조산이 포함된다. 적절한 염을 형성하는 그밖의 유기산으로는 메탄 술폰산 및 2-히드록시에탄 술폰산 등의 술폰산이 있다.

이러한 염 및 염기 화합물은 수화된 형태나 실제로 무수형태로 존재할 수 있다. 산 염은, 수용액 또는 알코올 수용액이나 적절한 산을 함유하는 그밖의 적절한 용매에 유리 염기를 용해시키고 용액을 증발시켜 분리하거나, 염이 직접 분리되거나 용액의 농축에 의해 수득될 수 있는 경우 유기 용매 중의 유리 염기를 반응시키는 등의 표준 기술에 의해 제조된다.

일반적으로 본 발명의 화합물의 산 부가염은 물과 다양한 친수성 유기 용매에 가용성이고 이들의 유리 염기 형태와 비교하여 높은 용융점 및 증가된 용해성을 나타내는 결정성 물질이다.

"약제학적으로 허용되는 유도체"라는 표현은 가수분해에 대한 내성이 보다 높고 증가된 친유성을 갖는 에스테르 전구약물을 포함하도록 의도된다. 이러한 전구약물은 경구 전달시 GI계로부터 급속히 제거되는 한편, 표적 부위(예컨대, 간)에서 활성 약물의 농도를 지속시키는 '데포 효과'를 제공한다.

상기와 관련하여 C_{1-14} 알카노일기는 직쇄 또는 분지쇄 또는 고리형일 수 있고, 구체적으로 포르밀, 아세틸, 프로피오닐, 부티릴, 이소부티릴, 시클로프로판카르보닐, 헥사노일, 옥타노일 및 데카노일일 수 있다.

상기와 관련하여 C_{1-14} 알케노일기는 직쇄 또는 분지쇄 또는 고리형일 수 있으나, 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는다. 구체적으로 프로페노일, 부테노일, 이소부테노일, 헥세노일, 옥테노일 및 데케노일을 포함한다.

상기와 관련하여 C_{1-6} 알콕시아세틸은 메톡시아세틸, 에톡시아세틸 및 부톡시아세틸일 수 있다.

상기와 관련하여 할로겐은 구체적으로 불소, 염소, 브롬 또는 요오드일 수 있다.

상기와 관련하여 C_{2-6} 알카노일기는 아세틸, 프로피오닐, 부티릴, 이소부티릴 및 헥사노일일 수 있다.

상기와 관련하여 C_{1-4} 알킬기는, 알콕시, 알킬술포닐 또는 알킬-메르캅토기의 일부이든 단독이든간에, 4개 이하의 탄소 원자를 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 알킬기일 수 있다. 이러한 기의 다양한 구체예로는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 메톡시, 에톡시, 부톡시, 메틸술포닐, 에틸술포닐, 메틸메르캅토 및 에틸메르캅토가 있다.

상기와 관련하여 페닐(C_{2-6} 알카노일)기는 벤젠아세틸 및 벤젠프로피오닐일 수 있다.

상기와 관련하여 다양한 나프탈렌카르보닐, 피리딘카르보닐, 티오펜카르보닐 및 푸란카르보닐기는 다양한 위치 이성질체를 포함하고, 이들은 나프탈렌-1-카르보닐, 나프탈렌-2-카르보닐, 니코티노일, 이소니코티노일, N-메틸-디히드로-피리딘-3-카르보닐, 티오펜-2-카르보닐, 티오펜-3-카르보닐, 푸란-2-카르보닐 및 푸란-3-카르보닐일 수 있다. 나프탈렌, 피리딘, 티오펜 및 푸란기는 상기 언급한대로 임의로 치환될 수 있다.

본 발명의 바람직한 화합물은 상기 기술한대로 R, R_1 및 R_2 중의 하나 또는 둘이 알카노일, 알케노일이거나, 벤조일이 Y, Y' 및 Y"에 의해 치환된 벤조일기인 것들이고, 특히 C_{1-4} 알카노일이거나 알킬 또는 할로겐으로 임의로 치환된 벤조일인 것들이다.

보다 바람직한 화합물은 R, R_1 및 R_2 중의 하나가 알카노일이거나 벤조일이고, 특히 C_{1-8} 알카노일, C_{1-8} 알케노일이거나 알킬 또는 할로겐으로 임의로 치환된 벤조일이며, 그 나머지는 수소인 화학식 1의 화합물들이다.

보다 바람직한 화합물은 R, R_1 및 R_2 중의 하나가 C_{1-8} 알카노일, C_{1-8} 알케노일이거나, 알킬 또는 할로겐, 특히 메틸, 브롬, 염소 또는 불소기에 의해 임의로 치환된 벤조일이고, 그 나머지는 수소인 화학식 1의 화합물들이다.

가장 바람직한 화합물은 R_1이 C_{1-8} 알카노일, C_{1-8} 알케노일이거나, 알킬 또는 할로겐, 특히 메틸, 브롬, 염소 또는 불소기에 의해 치환된 벤조일, 가장 바람직하게는 메틸, 브롬, 염소 또는 불소기에 의해 파라 위치에서 임의로 치환된 벤조일이고, R 및 R_2는 각각 수소인 화학식 1의 화합물들이다.

본 발명의 에스테르는 카스타노스퍼민을 불활성 용매 중의 적절한 산 염화물 또는 산 무수물과 반응시킴에 의해 제조된다. 할로겐화물은 염화물 또는 브롬화물일 수 있고 무수물은 혼합 무수물을 포함한다. 이용되는 산 할로겐화물 또는 산 무수물의 상대량, 용매의 상대량, 온도 및 반응 시간은 모두 아실화되는 히드록시기의 수가 최소화되도록 조절된다. 따라서, 단지 제한된 과량의 산 유도체를 이용하고, 이것은 아실화제의 약 3배 이하를 의미한다.

비교적 다량의 용매를 이용하면, 반응물을 희석시켜 고도로 아실화된 생성물이 형성되는 양을 억제한다. 사용되는 용매는 반응물과 반응하지 않으며 이들을 용해시키는 것이 바람직하다.

추가로, 반응 동안 형성된 여하한 산과 반응하거나 이를 제거하는 3차 아민의 존재하에 반응을 수행하는 것이 바람직하다. 3차 아민은 혼합물에 첨가되거나 그 자체가 과량으로 이용되어 용매로서 기능할 수 있다. 이와 관련하여 피리딘이 바람직한 용매이다. 상기 지적한대로, 시간 및 온도 역시 아실화의 발생을 제한하도록 조절된다.

이 반응은 빙욕에서 약 16시간 동안 냉각되어 모노에스테르를 수득하도록 수행되고, 만약 디에스테르가 요망된다면, 예컨대 7일 등의 보다 장기간까지 반응 시간을 연장하는 것이 바람직하다. 반응은 실제로 보다 높은 온도에서 수행될 수 있고 다양한 관련 인자들이 적절하게 조절되는 한 가열을 이용하는 것도 가능하다.

설명한대로 반응을 수행할 때, 최종 반응 혼합물은 여전히 상당량의 미반응 카스타노스퍼민을 함유할 것이다. 이러한 미반응 물질을 반응 혼합물로부터 회수하여 후속 반응으로 재순환시키고, 따라서 에스테르로 전환되는 카스타노스퍼민의 총량을 증가시킬 수 있다. 반응이 모노에스테르를 분리시키기 쉬운 조건하에 수행될 때 이러한 재순환 과정이 특히 중요하다.

상기 기술한 방법은 일반적으로 6- 또는 7-모노에스테르나 6,7- 또는 6,8-디에스테르를 생성할 것이다. 적절한 차단기를 이용하여 그밖의 이성질체를 수득할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 카스타노스퍼민을 2-(디브로모메틸)벤조일 염화물과 반응시켜 6,7-디에스테르를 수득할 수 있다. 이후 이 디에스테르를 적절한 산 할로겐화물 또는 산 무수물과 반응시켜 상응하는 8-에스테르를 생성한다. 두개의 보호기는, 이후 두개의 디브로모메틸기를 포르밀기로 전환하고(수성 아세톤 중의 은 퍼클로레이트 및 2,4,6-콜리딘 이용), 이어서 모르폴린과 수산화 이온을 이용하여 수득된 포르밀벤조산 에스테르를 가수분해함에 의해 용이하게 제거된다.

기술된 방법을 유사한 방식으로 이용하여 디에스테르 이량체를 수득할 수 있다.

표준 에스테르화 공정에서 1,8-O-이소프로필리덴카스타노스퍼민 또는 1,8-시클로헥실리덴카스타노스퍼민과 산 염화물의 반응은 거의 배타적으로 6-에스테르의 형성에 유리하다. 이후 4-톨루엔술폰산 등의 산 처리에 의해 이소프로필리덴 또는 시클로헥실리덴기를 제거한다. 출발 케탈 화합물은 스스로 카스타노스퍼민 6,7-디벤조에이트의 형태로 수득된다. 이 디벤조에이트를 2-메톡시프로펜 또는 1-메톡시시클로헥센 및 산과 반응시켜 1,8-O-이소프로필리덴 또는 1,8-O-시클로헥실리덴기를 수득하고, 수산화나트륨 등의 염기를 이용한 가수분해 또는 촉매로서 나트륨 또는 칼륨 알콕시드를 이용한 에스테르교환반응에 의해 두개의 벤조에이트 에스테르기를 제거한다.

의학적 적용

본 발명은, 예를 들어 치료 및/또는 예방법에서 약제의 적용에 관한 것이다. 이 방법은 수의학적 적용을 포함한다.

본원에서 이용된 용어 "플라비바이러스 감염의 치료 방법"은 플라비바이러스에 감염된 환자(사람 또는 동물)의 치료를 의미한다. 치료 방법은 상기 환자에게 본 발명의 조성물 또는 약제를 항바이러스작용에 효과적인 양으로 투여하는 것을 포함한다.

본원에서 이용된 용어 "플라비바이러스 감염"은 상기 환자의 세포 또는 신체에 존재하는 플라비바이러스와 관련된 (예컨대, 이에 기인하거나, 이로 인해 악화되거나, 이를 특징으로 하는) 여하한 상태 또는 조건을 의미한다.

본원에서 이용된 용어 "환자"는 사람, 양, 말, 소, 돼지, 개, 고양이, 래트 및 마우스를 포함하여, 영장류 등의 포유동물을 의미한다.

약량학

본 발명의 약제는 경구 경로 또는, 정맥내, 근육내, 복막내, 피하, 경피, 기도(에어로졸), 직장, 질 및 국소(협측 및 설하를 포함) 투여를 포함하는 비경구 경로에 의해 투여될 수 있다.

투여되는 카스타노스퍼민 에스테르의 양은 적용되는 특정 투여 단위, 치료 기간, 치료 환자의 연령 및 성별, 치료 질병의 특성 및 정도, 및 선택된 특정 카스타노스퍼민 에스테르에 따라 크게 달라질 수 있다.

더욱이, 카스타노스퍼민 에스테르는 플라비바이러스 감염의 치료에 유용한 것으로 공지된 기타 제제(상기 기술함)와 함께 사용될 수 있고 이러한 구체예에서 용량은 그에 따라서 적절히 조절될 수 있다.

가수분해에 양호한 내성을 나타내고 증가된 친유성을 갖는 본 발명의 카스타노스퍼민 에스테르 전구약물 유도체를 혼입시키는 경우 보다 낮은 용량을 이용할 수 있다. 상기에서 설명한대로, 이러한 전구약물은 경구 전달시 GI계로부터 급속히 제거되는 한편, 표적 부위(예컨대, 간)에서 활성 약물의 농도를 지속시키는 '데포 효과'를 제공한다.

따라서, 투여되는 카스타노스퍼민 에스테르의 유효량은 일반적으로 약 15mg/kg 내지 500mg/kg의 범위일 것이다. 단위 용량은 25 내지 500mg의 카스타노스퍼민 에스테르를 함유할 수 있고, 매일 1회 또는 2회로 투여될 수 있다. 카스타노스퍼민 에스테르는, 상기 기술한대로, 경구, 비경구 또는 국소적으로 통상적인 투여 단위 형태를 이용하여 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있다.

바람직한 투여 경로는 경구 투여이다. 일반적으로 적절한 용량은 매일 투약대상자의 체중 킬로그램 당 0.1 내지 300mg의 범위이고, 바람직하게는 6 내지 150mg의 범위이며, 가장 바람직하게는 15 내지 100mg의 범위일 것이다.

요망되는 용량은 하루 동안 적절한 간격으로 2회, 3회, 4회, 5회 또는 6회 이상의 하위 용량으로 투여되는 것이 바람직하다. 이러한 하위 용량은, 예를 들어 단위 투여 형태 당 10 내지 1500mg의 활성 성분, 바람직하게는 20 내지 1000mg, 가장 바람직하게는 50 내지 700mg의 활성 성분을 함유하는 단위 투여 형태로 투여될 수 있다.

제형화

본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제와 병용하여 제공될 수 있다. 예를 들어, 불활성 희석제, 붕해제, 결합제, 윤활제, 감미제, 향료, 착색제 및 방부제를 포함하는 여하한 적절한 부형제를 이용할 수 있다. 적절한 불활성 희석제는 탄산나트륨 및 탄산칼슘, 인산나트륨 및 인산칼슘, 및 락토오스를 포함하며, 옥수수전분 및 알긴산이 적절한 붕해제이다. 결합제는 전분 및 젤라틴을 포함할 수 있고, 윤활제는, 만약 존재한다면, 대개 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 또는 탤크일 것이다.

약제학적 조성물은 여하한 적절한 형태일 수 있고, 이것은 예를 들어, 정제, 엘릭시르제, 캡슐, 용액, 현탁액, 분말, 과립 및 에어로졸을 포함한다.

약제학적 조성물은 성분들의 키트의 형태일 수 있고, 키트는 사용을 위한 안내서 및/또는 다수의 상이한 성분들과 함께 본 발명의 조성물을 단위 투여 형태로 포함할 수 있다.

경구용 정제는 불활성 희석제, 붕해제, 결합제, 윤활제, 감미제, 향료, 착색제 및 방부제 등의 약제학적으로 허용되는 부형제와 혼합된 활성 성분을 포함할 수 있다. 적절한 불활성 희석제는 탄산나트륨 및 탄산칼슘, 인산나트륨 및 인산칼슘, 및 락토오스를 포함하며, 옥수수전분 및 알긴산이 적절한 붕해제이다. 결합제는 전분 및 젤라틴을 포함할 수 있고, 윤활제는, 만약 존재한다면, 대개 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 또는 탤크일 것이다. 요망된다면, 위장관에서의 흡수를 지연시키기 위해 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트 등의 재료로 정제를 코팅할 수 있다.

경구용 캡슐은 활성 성분이 고체 희석제와 혼합되어 있는 경질 젤라틴 캡슐과, 활성 성분이 물이나 땅콩유, 액체 파라핀 또는 올리브유 등의 오일과 혼합되어 있는 연질 젤라틴 캡슐을 포함한다.

직장 투여용 제형은, 예를 들어 코코아 버터 또는 살리실레이트를 포함하는 적절한 기재와 함께 좌약으로서 제공될 수 있다.

질 투여에 적절합 제형은 활성 성분에 추가하여, 당해 분야에 적절한 것으로 공지된 담체를 함유하는 페서리, 탐폰, 크림, 겔, 페이스트, 포움 또는 스프레이 제형으로서 제공될 수 있다.

근육내, 복막내, 피하 및 정맥내 이용을 위해, 본 발명의 화합물은 일반적으로 적절한 pH로 완충되어 등장성인 무균 수용액 또는 현탁액으로 제공될 것이다.

적절한 수성 비히클은 링거(Ringer's) 용액 및 등장성 염화나트륨을 포함한다. 본 발명에 따른 수성 현탁액은 셀룰로스 유도체, 나트륨 알기네이트, 폴리비닐피롤리돈 및 검 트라가칸트 등의 현탁제 및 레시틴 등의 습윤제를 포함할 수 있다. 수성 현탁액용으로 적절한 방부제는 에틸 및 n-프로필 p-히드록시벤조에이트를 포함한다.

또한 본 발명의 화합물은 리포솜 제형으로 제공될 수 있다.

경구 투여용 카스타노스퍼민 에스테르는, 캡슐, 알약, 정제, 트로키, 로젠지, 용융물, 분말, 과립, 용액, 현탁액, 분산액 또는 에멀젼(용액, 현탁액, 분산액 또는 에멀젼은 수성 또는 비수성일 수 있음) 등의 고체 또는 액체 조제물로 제형화될 수 있다. 고체 단위 투여 형태는, 예를 들어 계면활성제, 윤활제, 및 락토오스, 수크로스, 인산칼슘 및 옥수수전분 등의 불활성 충전제를 함유하는 보통의 경질 또는 연질 젤라틴 유형의 캡슐일 수 있다.

또다른 구체예에서, 본 발명의 화합물은 락토오스, 수크로스 및 옥수수전분 등의 통상의 정제 기재를, 아카시아, 옥수수전분 또는 젤라틴 등의 결합제, 투여후 정제의 붕괴 및 용해를 보조하는 감자 전분, 알긴산, 옥수수전분 및 구아검 등의 붕해제, 정제 과립의 흐름을 개선시키고 정제 다이 및 펀치의 표면에 대한 정제 재료의 부착을 막는 윤활제, 예를 들어 탤크, 스테아르산, 또는 마그네슘, 칼슘, 또는 아연 스테아레이트, 정제의 심미적 질을 향상시키고 환자가 보다 용이하게 수용하도록 하는 염료, 착색제 및 향료와 병용하여 정제화될 수 있다.

경구용 액체 투여 형태에 적절한 부형제는, 약제학적으로 허용되는 계면활성제, 현탁제 또는 유화제를 첨가하거나 이들을 첨가하지 않은, 물과 알코올 등의 희석제, 예를 들어 에탄올, 벤질 알코올 및 폴리에틸렌 알코올을 포함한다.

또한 본 발명의 카스타노스퍼민 에스테르 유도체는 비경구적으로, 즉 피하, 정맥내, 근육내 또는 복막내로 투여될 수 있다.

이러한 구체예에서, 약제는 무균 액체 또는 액체 혼합물일 수 있는 약제학적 담체와 함께 생리적으로 허용되는 희석제 중의 주사가능한 용량의 화합물로서 제공된다. 적절한 액체는 물, 염수, 수성 덱스트로스 및 관련 당 용액 및 알코올(예컨대, 에탄올, 이소프로판올, 또는 헥사데실 알코올), 글리콜(예컨대, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜), 글리세롤 케탈(예컨대, 2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-메탄올), 에테르(예컨대, 폴리(에틸렌-글리콜) 400), 오일, 지방산, 지방산 에스테르 또는 글리세리드, 또는 아세틸화 지방산 글리세리드를 포함하며, 여기에 약제학적으로 허용되는 계면활성제(예컨대, 비누 또는 세척제), 현탁제(예컨대, 펙틴, 카르호머, 메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스 또는 카르복시메틸셀룰로스), 또는 유화제 및 그밖의 약제학적 애쥬번트가 첨가되거나 첨가되지 않는다. 본 발명의 비경구 제형에 이용될 수 있는 구체적인 오일은 페트롤레움, 동물, 식물, 또는 합성 기원의 것들이며, 예를 들어, 땅콩유, 대두유, 참깨유, 면실유, 옥수수유, 올리브유, 바셀린 및 광유가 있다.

적절한 지방산은 올레산, 스테아르산 및 이소스테아르산을 포함한다. 적절한 지방산 에스테르에는, 예를 들어 에틸 올리에이트 및 이소프로필 미리스테이트가 있다.

적절한 비누는 지방산의 알칼리 금속염, 암모늄염 및 트리에탄올아민염을 포함하고 적절한 세척제는 양이온성 세척제, 예를 들어, 디메틸 디알킬 암모늄 할라이드, 알킬 피리디늄 할라이드 및 알킬아민 아세테이트; 음이온성 세척제, 예를 들어, 알킬, 아릴 및 올레핀 술포네이트, 알킬, 올레핀, 에테르 및 모노글리세리드 술페이트, 및 술포숙시네이트; 비이온성 세척제, 예를 들어 지방산 산화아민, 지방산 알칸올아미드 및 폴리옥시에틸렌폴리프로필렌 공중합체; 및 양성 세척제, 예를 들어 알킬-베타-아미노프로피오네이트 및 2-알킬이미다졸린 4차 암모늄염 뿐 아니라 이의 혼합물을 포함한다.

본 발명의 비경구 조성물은 통상적으로 약 0.5 내지 약 25 중량%의 화학식 1의 카스타노스퍼민 에스테르 유도체를 용액 중에 함유할 것이다. 또한 방부제 및 완충액이 바람직하게 이용될 수 있다. 주사 부위의 염증을 최소화하거나 제거하기 위해, 이러한 조성물은 약 12 내지 약 17의 친수-친유 평형(HLB)을 갖는 비이온성 계면활성제를 함유할 수 있다. 제형 중의 계면활성제의 양은 약 5 내지 약 15 중량%의 범위이다. 계면활성제는 상기 HLB를 갖는 단일 성분이거나 요망되는 HLB를 갖는 둘 이상의 성분의 혼합물일 수 있다. 비경구 제형에 이용된 구체적인 계면활성제는 폴리에틸렌 솔비탄 지방산 에스테르의 군, 예를 들어 솔비탄 모노올리에이트 및 산화프로필렌과 프로필렌 글리콜의 축합에 의해 형성된, 소수성 기재와 산화에틸렌의 고분자량 부가물이 있다.

또한 본 발명의 카스타노스퍼민 에스테르 유도체는 국소적으로 투여될 수 있고, 이렇게 처방시 담체는 적절하게 용액, 연고 또는 겔 기재를 포함할 수 있다. 기재는, 예를 들어 하기 중의 하나 이상을 포함할 수 있다: 바셀린, 라놀린, 폴리에틸렌 글리콜, 밀랍, 광유, 물과 알코올 등의 희석제, 및 유화제와 안정화제. 국소 제형에서 카스타노스퍼민 에스테르 또는 이의 약제학적 염의 농도는 약 0.1 내지 약 10% w/v(단위 부피 당 중량)일 것이다.

이제부터 하기 구체예를 참조로 본 발명을 설명할 것이나, 이는 단순히 설명하는 것이며 어떠한 방식으로든 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다. 본 발명의 범위내에서 세부사항에 대한 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

실시예

세포, 바이러스 및 억제제

소의 신장에서 유래된 MDBK 세포(NBL-1)(ACTT CCL22) 및 세포병변(cp) BVDV(균주 NADL)(ATCC VR-534)를 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(ATCC)으로부터 구입하였다.

10%의 FCS, 2mM의 L-글루타민, 50U/ml의 페니실린 및 50㎍/ml의 스트렙토마이신이 보충된 둘베코 개질 이글 배지(DMEM)(Sigma, Poole, Dorset)에서 MDBK 세포를 부양하였다.

종래 기술 (Liu, P. S., Hoekstra, W. J. and King, C. H. R. (1990). Synthesis of potent anti-HIV agents: esters of castanospermine. Tetrahedron Lett. 31: 1535-1549) 및 아벤티스(Aventis)에서 제공하는대로 (종래에 Marion Merrell Dow로서 공지됨) 6-0-부타노일카스타노스퍼민 (부케스트(Bucast); 셀고시비르(Celgosivir) ; VIR-222 ; MDL 28,574A)을 합성하였다. 종래에 기술한대로 (Liu, P. S. and Rhinehart, B. L. (1986) Isolation of castanospermine and its use as an anti-diabetic agent. EP 0 202 661호) 모레톤 배이 체스넛, 카스타노스페르뭄 오스트레일(*Castanospermum australe*)의 종자로부터 분리된 카스타노스퍼민 (1S, 6S, 7R, 8R, 8aR-1,6,7,8-테트라하드록시인돌리지딘)을 또한 아벤티스로부터 구입하였다. N-부틸-데옥시노지리마이신 (N-부틸-DNJ) 및 N-노닐-데옥시노지리마이신 (NN-DNJ)을 토론토 리서치 케미칼스(캐나다)로부터 구입하였다. 부케스트(Bucast), 카스타노스퍼민과 N-부틸-DNJ를 물 중의 100mM의 원액으로서 제조하였다. NN-DNJ를 DMSO 중의 100mM의 원액으로서 제조하였다. 원액을 -20℃에서 저장하였다.

플라크 감소 검정

MDBK 세포를 6-웰의 세포 배양 플레이트(Nunclon™, Nunc, Denmark)에 시딩하고 컨플루언스(confluency)하게 성장하도록 하였다. 가온된 인산염 완충 염수(PBS)에서 세포를 2회 세척하고, 1%의 말 혈청 및 1mM의 $MgCl_2$를 함유하는 0.25ml의 PBS에서 BVDV NADL(150pfu/웰)로 감염시켰다. 이후 세포 배양 플레이트를 5%의 CO_2를 이용하여 37℃에서 1시간 동안 배양하고, 15분 내지 20분마다 플레이트를 흔들어주었다. 이후 바이러스 접종물을 제거하고, 상이한 농도의

시험 화합물을 함유하거나 화합물을 전혀 함유하지 않으며 5%의 말 혈청, 2mM의 L-글루타민, 50U/ml의 페니실린 및 50 ㎍/ml의 스트렙토마이신이 보충된 DMEM으로 희석시킨 0.5%의 낮은 겔화 온도 아가로스 오버레이 3.0ml로 교환하였다. 각 농도의 시험 화합물에 대해 두배수 또는 세배수 이상의 웰을 사용하였다. 아가로스가 실온에서 15분간 응고되도록 한 다음, 37℃에서 5%의 CO_2를 이용하여 배양하였다. 3일 배양 후, 1.5ml의 10% 포름알데히드 용액을 한천 오버레이에 첨가하고 하룻밤동안 방치함에 의해 세포를 고정하였다. 웰로부터 한천을 천천히 제거하고, PBS 중의 0.3%의 메틸렌 블루를 이용하여 세포를 실온에서 10분간 염색하였다. 과도한 염료를 제거하고 세포를 PBS로 세척한 다음, 플레이트를 건조시키고 바이러스 플라크를 현미경으로 계수하였다. 존재하는 플라크의 평균수 대 화합물의 로그 농도로부터 점을 찍어 용량 반응선을 그렸다. 선형회귀분석에 따라 50% 억제 농도(IC_{50})를 산정하였다.

XTT 세포병변 검정

MDBK 세포를 96-웰의 세포 배양 플레이트(Costar® 3596, Corning Incorp., USA)에 시딩하고 컨플루언시하게 성장하도록 하였다. 가온된 인산염 완충 염수(PBS)에서 세포를 2회 세척하고, 5%의 말 혈청, 2mM의 L-글루타민, 50U/ml의 페니실린 및 50㎍/ml의 스트렙토마이신이 보충된 100㎕의 DMEM중의 BVDV NADL(100pfu/웰)로 감염시켰다. 몇몇 웰은 대조군으로서 기능하도록 모의 감염시켰다. 추가로, 상기와 같이 보충되었으나, 상이한 농도의 시험 화합물을 함유하거나 화합물을 전혀 함유하지 않는 100㎕의 DMEM를 각 웰에 첨가시켰다. 각 화합물 농도에 대해 세배수의 웰을 사용하였다. 동시에, 감염되지 않은 세포를 화합물로 처리하여 세포독성을 평가하였다. 이후 플레이트를 37℃에서 5%의 CO_2를 이용하여 배양하였다. 6일 배양 후, 25㎕의 1mg/ml 2,3-비스[2-메톡시-4-니트로-5-술포페닐]-2H-테트라졸륨-5-카르복스아닐리드(XTT)/25μM 페나진 메토술페이트(PMS) 용액 (XTT 및 PMS는 Sigma, Poole, Dorset, UK에서 구입)을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 37℃에서 5%의 CO_2를 이용하여 2시간 동안 배양하였다. 이후 450nm에서 흡광도를 측정하였다. O.D 대 화합물의 로그 농도의 데이터를 점으로 표시하고 50% 억제 농도(IC_{50})를 산정하였다.

항-바이러스 활성

MDBK 세포에서의 플라크 감소 검정에서, 카스타노스퍼민과 부케스트는 모두 용량 의존적 방식으로 BVDV 플라크의 형성을 억제하였다 (도 1). 부케스트는, 사람 면역결핍성 바이러스(HIV)에 대한 활성과 관련하여 종래에 보고된대로, 카스타노스퍼민보다 약 13배 이상 유효하였다. 부케스트의 평균 IC_{50}은, 카스타노스퍼민에 대한 216.6μM±55.0μM의 평균 IC_{50}과 비교하여, 16.25μM±7.5μM이었다 (표 2).

표 2

플라크 감소 검정에 의한 α-글루코시다제 1 억제제의 항-BVDV 활성

화합물	IC_{50} (μM)	평균 IC_{50} (μM) ±SD	CC_{50} (μM)
부케스트	10, 10, 20, 25	16.25 ±7.5	>1000
카스타노스퍼민	180, 190, 280	216.6 ±55.0	>1000
N- 부틸 -DNJ	>300, 250		>300
N- 노닐 -DNJ	90, 120	105	독성 @ 300

세포 단층의 현미경 검사에 의해 판단시, 1000μM 이하의 농도에서 세포독성의 징후는 나타나지 않았다. 동시에 플라크 감소 시험에서, α-글루코시다제 1 억제제, N-부틸-DNJ 및 N-노닐-DNJ는 단지 각각 >100μM 및 >300μM의 농도에서 부분적인 억제를 나타내었다. N-노닐-DNJ는 300μM의 농도에서 세포에 대해 뚜렷한 세포독성을 나타내었다.

XTT 세포병변 검정을 이용하여 α-글루코시다제 1 억제제의 항-BVDV 효과 및 세포독성을 평가한 경우에도 유사한 결과를 얻었다. 도 2에 도시한대로, 부케스트 및 카스타노스퍼민은 모두 바이러스-유도 세포 치사에 대해 MDBK 세포를 보호하였으며 감염되지 않은 처리 세포에 대해서는 세포독성을 나타내지 않았다. 동일한 시험에서, N-부틸-DNJ나 N-노닐-DNJ는 BVDV의 세포병변 효과에 대한 어떠한 보호도 입증하지 못하였다. 이전의 플라크 감소 시험에서 관찰된대로, N-부틸-DNJ가 세포독성을 나타내지 않은 반면, N-노닐-DNJ는 MDBK 세포에 대한 뚜렷한 세포독성을 나타내었다. N-노닐-DNJ에 대하여 추정된 50% 세포독성 농도는 120μM이었다. 약 0.01의 다중감염(MOI) 이용시, 이러한 세포병변 검정에서 부케스트 및 카스타노스퍼민의 평균 IC_{50} 수치는 각각 36μM±22μM 및 400μM이었다 (표 3).

표 3

XTT 세포병변 검정에 의한 α-글루코시다제 1 억제제의 항-BVDV 활성 및 세포독성

화합물	*IC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
부케스트	60, 30, 70, 40, 60 평균 = 52 ±16.43	>300
카스타노스퍼민	300, 500 평균 = 400	>1000
N-부틸-DNJ	>300, >1000	>1000
N-노닐-DNJ	60, >100	120

*MOI = 0.01

한 실험에서, N-노닐-DNJ는 약간의 항바이러스 활성을 나타내었으나, 선택성 지수는 단지 2배였다.

부케스트의 항-BVDV 활성에 대한 바이러스 MOI의 효과에 대한 검사 결과, 감염성 바이러스 : 세포수의 비가 낮을수록 보다 유효한 것으로 나타났다 (도 3 및 표 4)

표 4

상이한 다중감염에서 XTT 세포병변 검정에 의해 측정된 부케스트 및 N-부틸-DNJ의 항-BVDV 활성

MOI	IC_{50} (μM)	
	부케스트	N-부틸-DNJ
0.1	200, 170	>300
0.01	60, 30	>300
0.001	40	>300
0.0001	5.0	55

매우 낮은 MOI를 이용했을 때 N-부틸-DNJ에서 약간의 항바이러스 효과가 얻어질 수 있었으나, 이 억제제는 부케스트보다 10배 정도 덜 유효하였다.

XTT 세포병변 검정은, MDBK 세포에 대한 BVDV의 세포병변 효과를 억제하는 사람 백혈구 인터페론(인터페론 α)의 능력을 측정하기 위해 이용되었고, 웰 당 인터페론 내성 유닛(IRU)의 IC_{50} 수치는 1.3 이었다. 추가 실험은, 인터페론 α의 IC_{50} 수치가 부케스트와 조합된 인터페론 α의 존재하에 감소되었음을 입증하였다. 또한 부케스트에 대한 IC_{50} 수치는 이러한 조합에 의해 감소되었다. 서넬(Suhnel)(Antiviral Research, 13, 23-40)의 방정식을 이용하여 조합 지수(CI)를 산출하였다. 1 미만의 CI 수치는 상승적인 상호작용을 나타내는 것이고 0.8 미만의 수치는 통계적으로 유의한 결과를 나타내는 것으로 고려된다. 인터페론 α및 부케스트의 조합은 0.28 내지 0.46 범위의 CI 수치를 나타내었다. 따라서, 이러한 결과는 인터페론 α의 존재하에 부케스트를 이용하는 것이 상승적인 효과를 초래함을 나타내는 것이다.

이러한 데이터를 표 5에 요약한다.

표 5

XTT 세포병변 검정으로 측정한 인터페론 알파와 조합된 부케스트의 항-BVDV 활성

고정된 약물 농도	IC_{50}	조 합 지 수(CI)
인터페론 α (IRU/웰)	부케스트 (μM)	
0.5	3	0.46
0.25	4	0.28
0.125	13	0.37
0	52±16.43	
부케스트 (μM)	인터페론 α (IRU/웰)	
10	0.12	0.3
5	0.22	0.28
0	1.3	

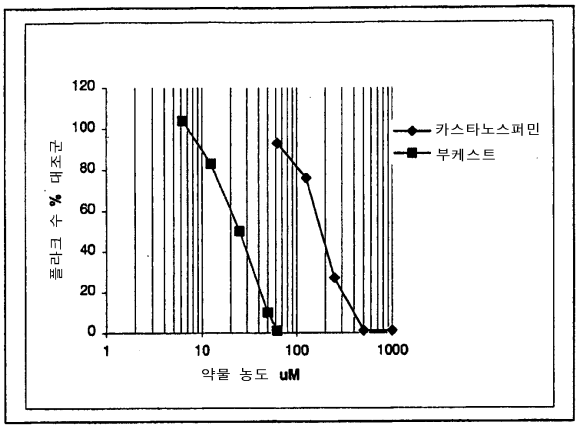
대응내용

전술한 상세한 설명은 본 발명의 바람직한 구체예를 제시한 것이다. 당업자라면 실제로 이의 수많은 변형 및 개질이 상기 설명을 고려하여 이루어질 수 있음을 예측할 것이다. 이러한 변형 및 개질이 첨부된 청구범위내에 포함된다.

도면

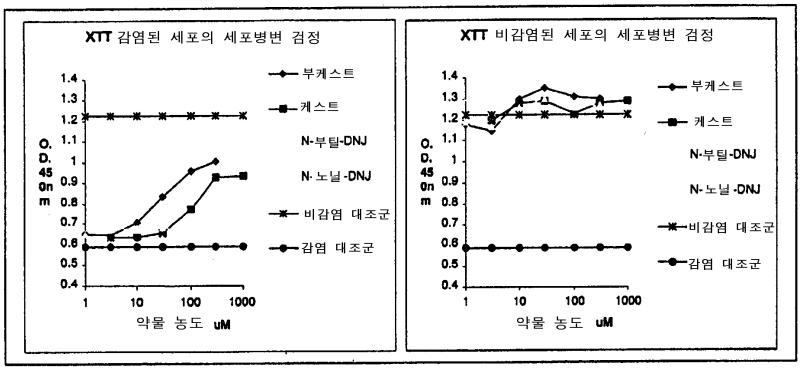
도면1

MDBK 세포에서 플라크 감소 검정에 의한 부케스트와 카스타노스퍼민의 항-BVDV 활성의 비교

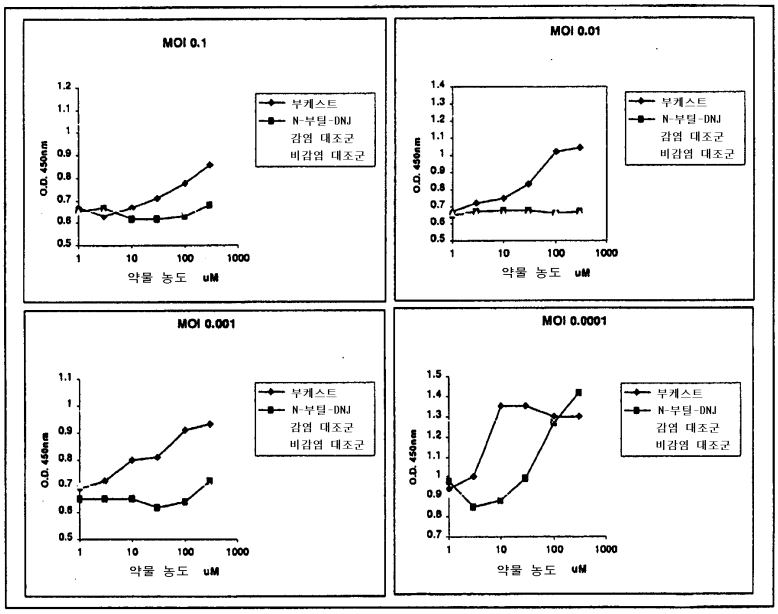


도면2

XTT 세포병변 검정에 의한 알파-글루코시다제 1 억제제의 항-BVDV 활성 및 세포독성



도면3

상이한 다중감염에서 XTT 세포병변 검정에 의한

부케스트 및 N-부틸-DNJ의 항-BVDV 활성