



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0119924
(43) 공개일자 2015년10월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7084 (2006.01) **A61K 31/7088**
 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) **A61K 39/39** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/7084 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7025458
- (22) 출원일자(국제) 2014년02월18일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년09월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/016996
- (87) 국제공개번호 WO 2014/127378
 국제공개일자 2014년08월21일
- (30) 우선권주장
 61/766,011 2013년02월18일 미국(US)
- (71) 출원인
스프링 뱅크 파마슈티칼스, 인크.
 미국 매사추세츠 밀포드 슈트 에스-7 세다르 스트리트 113 (우:01757)
- (72) 발명자
아이어, 라다크리슈난, 피.
 미국 01545 매사추세츠 슈루즈버리 퀘일 할로우 드라이브 15
- (74) 대리인
특허법인 남엔드남

전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **백신 애쥬번트 및 치료제로서의 짧은 올리고뉴클레오티드의 설계**

(57) 요 약

본 발명은 유효량의 뉴클레오시드, 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 유사체, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머를 투여함으로써 대상체의 질병, 질환, 감염, 또는 바이러스에 대해 대상체에서 미생물 감염을 치료하는 방법 및 대상체에서 면역계 반응을 개선시키는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 대상체(예를 들어, 인간)에서 바이러스 감염, 박테리아 감염, 기생충 감염, 또는 진균 감염을 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 화합물은, 예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 디뉴클레오티드 및 트리뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명의 화합물은, 예를 들어, 예방 및 치료를 포함하는 다양한 치료 적용에 유용하다. 본 발명은 또한 본원에 언급된 바와 같은 다양한 치료 적용에 유용한 화합물의 설계 및 합성을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 2039/55561 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

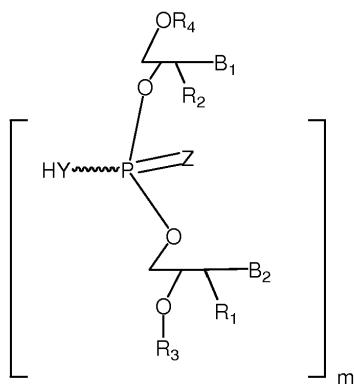
유효량의 예방제를 미생물 감염의 치료를 필요로 하는 것으로 확인된 대상체에 투여함으로써 미생물 감염을 치료하는 방법으로서, 상기 예방제가 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 유사체, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인, 방법.

청구항 2

유효량의 백신 애쥬번트를 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 질병, 질환, 감염, 또는 바이러스에 대한 대상체의 면역계 반응을 개선시키는 방법으로서, 상기 백신 애쥬번트가 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 유사체, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인, 방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 유사체가 하기 화학식 (I)의 화합물인 방법:



상기 식에서,

R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 H, OH, O-아킬, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 아르알킬, 헤테로사이클릭, O-아릴, O-헤테로아릴아릴, 또는 헤테로사이클릭이고;

R₃는 수소, 알킬, 치환된 알킬, C(O)-알킬, C(O)O-알킬, C(O)-아릴, C(O)O-아릴, C(O)NH-알킬, 및 C(O)NH-아릴로부터 선택되고;

Y 및 Z는 각각 독립적으로 O 또는 S이고;

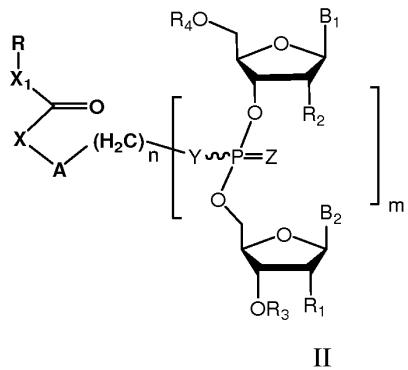
B₁ 및 B₂는 각각 독립적으로 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 우라실 또는 변형된 뉴클레오시드이고;

m은 1 내지 6이고;

R₄는 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, C(O)-알킬, C(O)O-알킬, C(O)-아릴, C(O)O-아릴, C(O)NH-알킬, 및 C(O)NH-아릴, 모노포스페이트, 디포스페이트, 또는 트리포스페이트 기이다.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 유사체가 하기 화학식 (II)의 화합물인 방법:



상기 식에서,

X는 부재하거나, O, NH, NR, 또는 S이고;

X₁은 부재하거나, O, 또는 NH이고;

A는 부재하거나, 아릴, 또는 아르알킬이고;

n은 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5이고;

R은 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 아르알킬, 헤테로사이클릭, O-알킬, O-헤테로아릴, 또는 스테로이달(sterooidal)이고;

R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 H, OH, O-아킬, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 아르알킬, 헤�테로사이클릭, O-아릴, O-헤테로아릴아릴, 또는 헤�테로사이클릭이고;

R₃는 수소, 알킬, 치환된 알킬, C(O)-알킬, C(O)O-알킬, C(O)-아릴, C(O)O-아릴, C(O)NH-알킬, 및 C(O)NH-아릴로부터 선택되고;

Y 및 Z는 각각 독립적으로 O 또는 S이고;

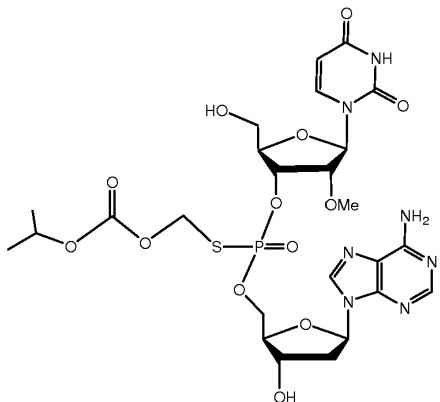
B₁ 및 B₂는 각각 독립적으로 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 우라실 또는 변형된 뉴클레오시드이고;

m은 1 내지 6이고;

R₄는 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, C(O)-알킬, C(O)O-알킬, C(O)-아릴, C(O)O-아릴, C(O)NH-알킬, 및 C(O)NH-아릴, 모노포스페이트, 디포스페이트, 또는 트리포스페이트 기이다.

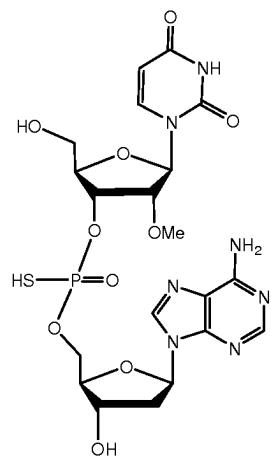
청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 유사체가 하기 구조의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토며인 방법:



청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 유사체가 하기 구조의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인 방법:



청구항 7

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 방법이 백신을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 백신이 BCG 백신인 방법.

청구항 9

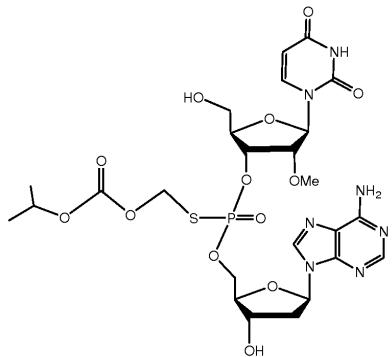
제 8항에 있어서, 상기 예방제 또는 백신 애쥬번트가 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 예방제 또는 백신 애쥬번트가 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인 방법.

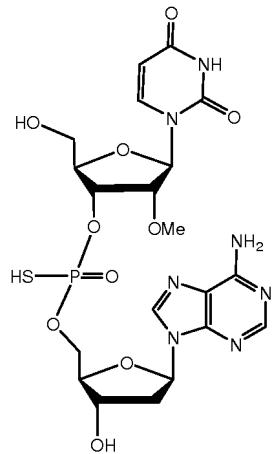
청구항 11

제 8항에 있어서, 상기 예방제 또는 백신 애쥬번트가 하기 구조의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인 방법:



청구항 12

제 8항에 있어서, 상기 예방제 또는 백신 애쥬번트가 하기 구조의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인 방법:



청구항 13

제 2항에 있어서, 상기 백신 애쥬번트가 미생물 감염을 치료하거나 예방하기 위한 백신과 함께 투여되는 방법.

청구항 14

제 7항에 있어서, 상기 방법이 바이러스에 대해 대상체의 면역계 반응을 개선시키기 위해 이용되는 방법.

청구항 15

제 7항에 있어서, 상기 방법이 암에 대해 면역계 반응을 개선시키기 위해 이용되는 방법.

청구항 16

유효량의 화합물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 대상체의 바이러스 감염의 예방 및 치료를 위한 방법으로서, 상기 화합물이 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인, 방법.

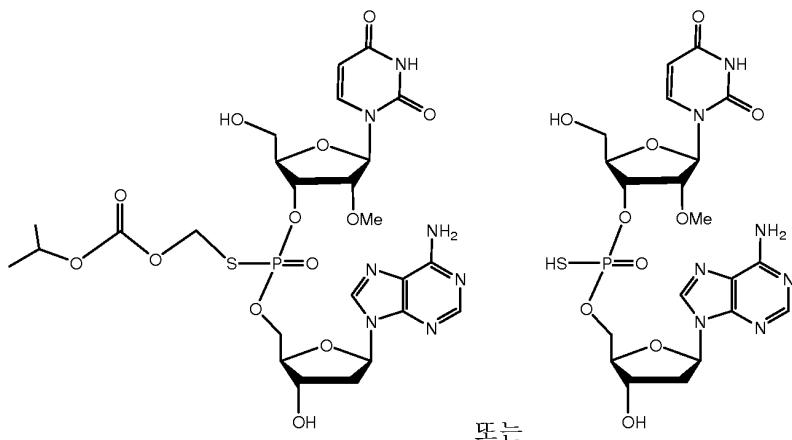
청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 방법이 상기 화합물과 조합되거나 상기 화합물과 연속적인 백신 또는 하나 이상의 추가 작용제의 투여를 포함하는 방법.

청구항 18

제 16항에 있어서, 화합물이 하기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분

입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인 방법:



청구항 19

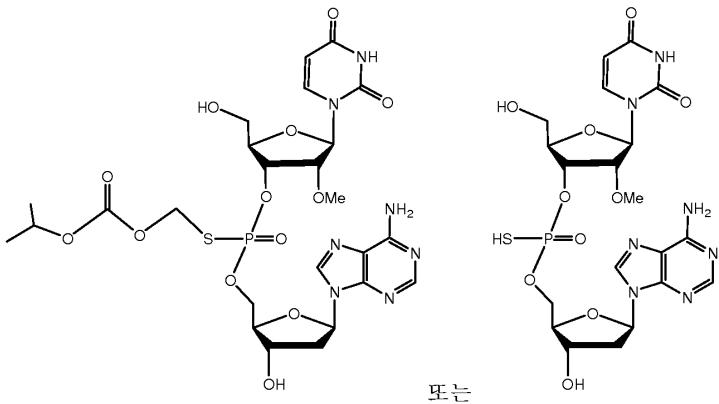
유효량의 화합물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 대상체의 박테리아 감염의 예방 및 치료를 위한 방법으로서, 상기 화합물이 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인, 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 방법이 상기 화합물과 조합되거나 상기 화합물과 연속적인 백신 또는 하나 이상의 추가 작용제의 투여를 포함하는 방법.

청구항 21

제 19항에 있어서, 화합물이 하기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인 방법:



청구항 22

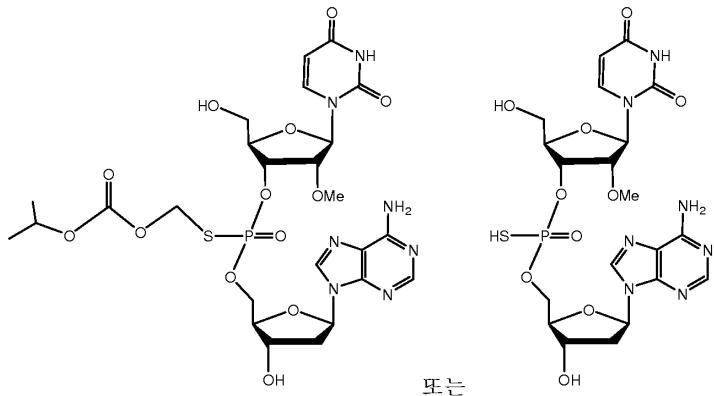
유효량의 화합물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 대상체의 진균 감염의 예방 및 치료를 위한 방법으로서, 상기 화합물이 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인, 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서, 상기 방법이 상기 화합물과 조합되거나 상기 화합물과 연속적인 백신 또는 하나 이상의 추가 작용제의 투여를 포함하는 방법.

청구항 24

제 22항에 있어서, 화합물이 하기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인 방법:



청구항 25

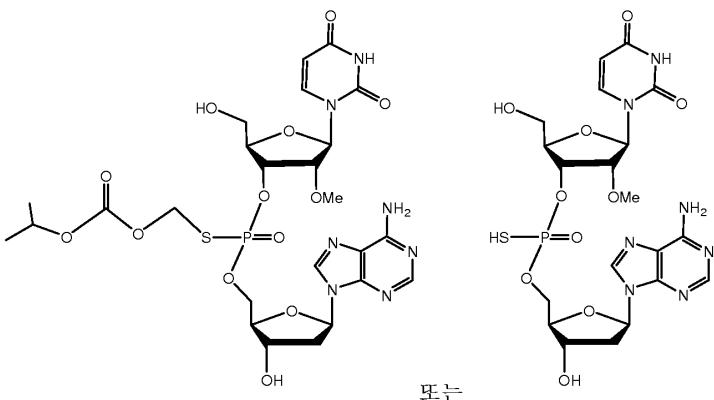
유효량의 화합물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 대상체의 기생충 감염의 예방 및 치료를 위한 방법으로서, 상기 화합물이 화학식 (I) 또는 (II)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머인, 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서, 상기 방법이 상기 화합물과 조합되거나 상기 화합물과 연속적인 백신 또는 하나 이상의 추가작용제의 투여를 포함하는 방법.

청구항 27

제 25항에 있어서, 화합물이 하기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 토토머인 방법:



발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 전후-참조

본 발명은 전체 개시내용이 참조로서 본원에 포함되는 2013년 2월 18일에 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 61/766,011호로부터 우선권의 이익을 주장한다.

배경 기술

발명의 배경

[0003] 선천 면역은 원핵생물 및 진핵생물 병원체, 예를 들어, 바이러스, 박테리아, 진균, 기생충 등에 대한 신체의 방어에서 중요한 역할을 한다. 또한, 바이러스에 의해 야기된 급성 및 만성 감염은 유의한 충족되지 않은 의학적 필요성을 갖는 전세계적인 주요 공중 보건 위기를 발생시킨다(1,2). 감염성 질병에 더하여, 바이러스는 각각이 유의한 사망률 및 이환률을 발생시키는 간암, 자궁경부암, 및 췌장암을 포함하는 전세계 모든 암의 15-20%를 야기시킨다.

[0005] 인간 고통에 더하여, 바이러스 질병은 압도적인 건강관리 비용 및 생산성의 손실을 발생시킨다. 예를 들어, 전 세계 5억 내지 6억 명의 사람이 HBV 및 HCV에 만성적으로 감염되며, 바이러스-유도성 간경화증 및 간암으로 인해 매년 백만 내지 이백만 명이 사망한다. 전세계 만명의 환자가 간이식을 절박하게 필요로 한다. 인간 유두종 바이러스 감염은 자궁경부암을 발생시키며, HIV 감염과 관련된 카포시 육종의 발병률이 모두 잘 기록되어 있다. 범유행 인플루엔자는 인간에서의 높은 수준의 이환률 및 사망률을 특징으로 하며, 이의 신규한 항원성 서브타입에 대한 미리 존재하는 면역성의 결핍으로 인해 감염 및 발병기전의 수준 증가와 관련된다. 항바이러스 물질은 범유행 인플루엔자의 확산을 잠재적으로 늦출 수 있을 뿐만 아니라, 궁극적으로는 해법이 될 수 있다. 미코박테리움 튜베르콜로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)(*Mtb*)에 의해 야기되는 결핵은 현재 어떠한 다른 박테리아 감염보다 많은 사람을 사망시킨다. 90개가 넘는 국가에서 거의 인간 집단의 1/3이 *Mtb*에 감염되며, 이백만 명의 사람이 상기 질병으로 매년 사망한다.

[0006] 백신은 제한된 수의 바이러스에 대한 예방제로 이용가능하나, 이들은 이미 감염된 사람들에게는 실질적인 치료 이익이 없다. 또한, 특정 바이러스에 대한 백신(예를 들어, 인플루엔자 백신)은 범유행병의 사망률에 유의한 영향을 미치지 않을 수 있는데, 이는 새로운 인간 균주가 확인된 후 새로운 인간 균주에 대해 적합한 백신의 충분한 용량을 발생시키는데 시간이 필요하기 때문이다. 애쥬번트의 사용은 백신의 효능을 증대시킬 수 있고, 광범위한 바이러스에 대한 보호를 발생시킬 수 있다.

[0007] 결과로서, 우리의 항바이러스 방어는 거의 전적으로 항바이러스 약물의 사용에 의존한다. 불행히도, 많은 의학적으로 중요한 바이러스, 특히 RNA 바이러스는 위험하거나, 모델 시스템으로 시험될 수 없거나, 잠재적 후보 약물의 시험을 위해 충분히 증식될 수 없다.

[0008] 현재 항바이러스 약물 중 많은 약물이 바이러스 중합효소, 프로테아제, 인테그라제, 및 진입 억제제로서 개발되었다. 그러나, 바이러스 성장을 억제하도록 설계된 약물은 또한 숙주 세포에 유해하게 영향을 미칠 수 있는데, 이는 바이러스 생활 주기가 일반 숙주 세포 기능과 연동되어 있기 때문이다. 항바이러스 개입을 받아들이는 제한된 바이러스 표적은 항바이러스 약물 발견을 추가로 심화시킨다. 결과로서, 거의 50년의 항바이러스 연구에도 불구하고, 우리의 항바이러스 약물의 비축은 전세계 시장에서 단지 약 34종의 항바이러스 약물로 위험할 정도로 적게 머물러 있으며, 이는 대부분 HIV 및 헤르페스 바이러스에 대한 것이다.

[0009] 추가로, HCV 및 HBV를 포함하는 여러 만성 바이러스 질병에 대한 현재의 치료 선택은 극도로 제한되고 도전적인 것으로 남아 있다. 또한, 치료 중지시의 바이러스 반동, 약물-유도 독성, 및 항바이러스 약물의 선택압 하에서의 내성 균주의 출현이 현재 항바이러스 요법에서 심각한 문제로 지속적으로 남아 있다. 바이러스의 완전한 균열은 거의 달성되지 않으며, 기껏해야 매우 적은 코호트의 환자에서 달성되는데, 이는 현재 항바이러스 요법이 부적절하고 유지할 수 없는 항바이러스 반응을 발생시키기 때문이다. 숙주-인코딩된 기능을 표적으로 하는 약물의 개발이 항미생물제 발견을 위한 대안적 전략을 제공한다.

[0010] 바이러스는 또한 숙주 면역 반응을 피하고, 다양한 메커니즘을 통해 약물에 대한 내성을 발생시키기 위해 영리한 전략을 지속적으로 진화시켜 왔다. 세포는 레티노산 유도성 유전자(RIG-I) 및 다른 RIG-유사 단백질(RLR), MDA5, 뉴클레오티드 올리고머화 도메인 단백질-2(NOD2) 및 다른 Nod-유사 단백질(NLR)을 포함하는 세포 센서를 통해 미생물 감염으로부터 그들 자신을 보호한다. 미생물 핵산 또는 웨პ티드와 병원체 인지 수용체의 상호작용을 통한 상기 단백질의 활성화는 인터페론 신호전달 경로가 감염으로부터 세포를 보호하는 IFN 생성을 발생시키는 것을 야기시킨다. 또한, DNA 및 RNA 바이러스 둘 모두가 타입 I 인터페론(IFN) 생성을 억제하는 것이 인지되며, 이에 의해 IFN 반응을 조절하는 것이 광범위한 바이러스의 생존에 필수적인 것이 암시된다(3,4). 따라서, 효과적인 항바이러스 요법의 개발은 각각이 바이러스의 균열을 위해 숙주 면역 반응을 자극하는 것을 포함하는 새로운 다수의 작용 메커니즘을 갖는 새로운 부류의 약물들의 조합의 이용을 포함해야 한다. 유사하게, 박테리아는 항박테리아 작용제에 대한 내성을 발생시키는 독특한 메커니즘을 진화시켰다. 따라서, 효과적인 항박테리아 요법의 개발은 각각이 박테리아의 균열을 위해 숙주 면역 반응을 자극하는 것을 포함하는 새로운 다수의 작용 메커니즘을 갖는 새로운 부류의 약물들의 조합의 이용을 포함해야 한다. 많은 다양한 유형의 암은

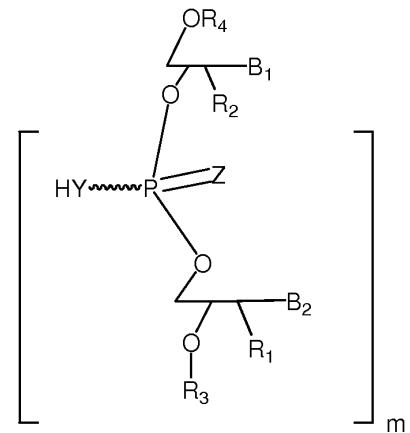
항암제에 대한 내성을 발생시키기 위해 다양한 메커니즘을 진화시켜 왔다. 따라서, 효과적인 항암 요법의 개발은 각각이 암의 근절을 위해 숙주 면역 반응을 자극하는 것을 포함하는 새로운 다수의 작용 메커니즘을 갖는 새로운 부류의 약물들의 조합의 이용을 포함해야 한다.

발명의 내용

발명의 개요

[0011] 한 양태에서, 본 발명은 예방제로서 유용한 뉴클레오시드, 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 유사체, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머(이하, "본 발명의 화합물"로 언급됨)를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 백신 애쥬번트로서 유용한 뉴클레오시드, 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 유사체, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머를 제공한다.

[0013] 본 발명의 화합물은, 예를 들어, 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머를 포함한다:



[0014]

상기 식에서,

[0016] R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 H, OH, O-아킬, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 아르알킬, 헤테로사이클릭, O-아릴, O-헤테로아릴아릴, 또는 헤�테로사이클릭이고;

[0017] R_3 는 수소, 알킬, 치환된 알킬, C(O)-알킬, C(O)O-알킬, C(O)-아릴, C(O)O-아릴, C(O)NH-알킬, 및 C(O)NH-아릴로부터 선택되고;

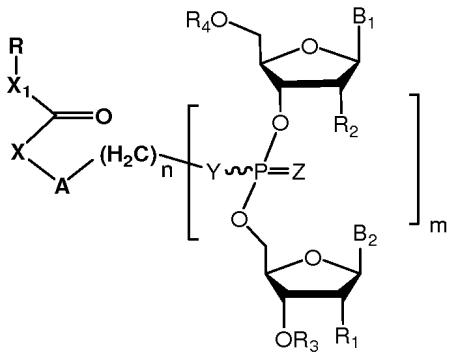
[0018] Y 및 Z는 각각 독립적으로 O 또는 S이고;

[0019] B_1 및 B_2 는 각각 독립적으로 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 우라실 또는 변형된 뉴클레오시드이고;

[0020] m은 1 내지 6이고;

[0021] R_4 는 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, C(O)-알킬, C(O)O-알킬, C(O)-아릴, C(O)O-아릴, C(O)NH-알킬, 및 C(O)NH-아릴, 모노포스페이트, 디포스페이트, 또는 트리포스페이트 기이다.

[0022] 한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 하기 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머이다:



II

[0023]

상기 식에서,

[0024]

X는 부재하거나, O, NH, NR, 또는 S이고;

[0025]

X₁은 부재하거나, O, 또는 NH이고;

[0026]

A는 부재하거나, 아릴, 또는 아르알킬이고;

[0027]

n은 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5이고;

[0028]

R은 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 아르알킬, 헤테로사이클릭, O-알킬, O-헤테로아릴, 또는 스테로이달(sterooidal)이고;

[0029]

R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 H, OH, O-아킬, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 아르알킬, 헤�테로사이클릭, O-아릴, O-헤테로아릴아릴, 또는 헤테로사이클릭이고;

[0030]

R₃는 수소, 알킬, 치환된 알킬, C(O)-알킬, C(O)O-알킬, C(O)-아릴, C(O)O-아릴, C(O)NH-알킬, 및 C(O)NH-아릴로부터 선택되고;

[0031]

Y 및 Z는 각각 독립적으로 O 또는 S이고;

[0032]

B₁ 및 B₂는 각각 독립적으로 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 우라실 또는 변형된 뉴클레오시드이고;

[0033]

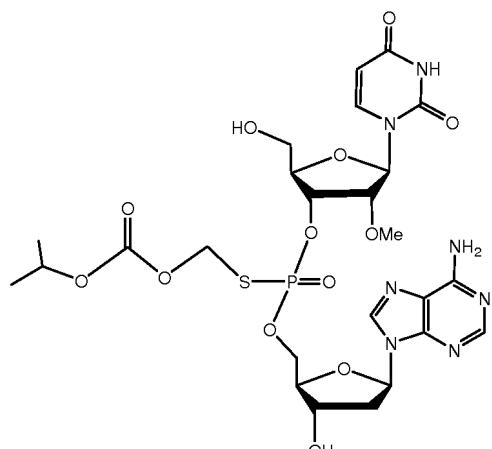
m은 1 내지 6이고;

[0034]

R₄는 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, C(O)-알킬, C(O)O-알킬, C(O)-아릴, C(O)O-아릴, C(O)NH-알킬, 및 C(O)NH-아릴, 모노포스페이트, 디포스페이트, 또는 트리포스페이트 기이다.

[0035]

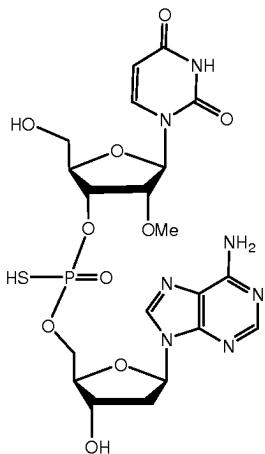
한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 하기 구조의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머이다:



[0036]

[0038]

또 다른 구체예에서, 본 발명의 화합물은 하기 구조의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토미이다:



[0039]

[0040]

본 발명은 또한 유효량의 본 발명의 화합물을 미생물 감염을 치료하는 것을 필요로 하는 것으로 확인된 대상체(또는 숙주)에 투여함으로써 대상체(또는 숙주)의 미생물 감염을 치료하는 방법을 제공한다.

[0041]

또 다른 양태에서, 본 발명은 질병, 질환, 감염, 또는 바이러스에 대해 대상체(또는 숙주)의 면역계 반응을 개선시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 백신 애쥬번트로서 유효량의 본 발명의 화합물을 대상체에 투여하는 것을 포함한다.

[0042]

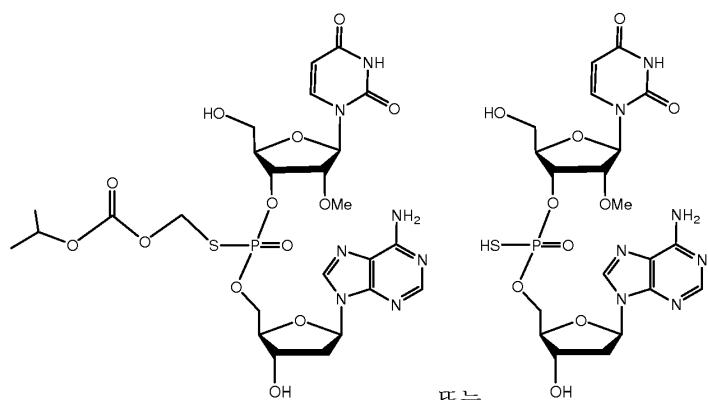
상기 방법의 특정 구체예에서, 본 발명의 화합물은 화학식 (I)의 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 염, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토미이다.

[0043]

다른 구체예에서, 본 발명의 화합물은 화학식 (II)의 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 유사체, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토미이다.

[0044]

한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 하기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토미이다:



[0045]

본 발명은 또한 인간을 포함하는 숙주(또는 대상체)의 바이러스 감염의 예방 및 치료를 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 유효량의 본 발명의 화합물을 투여하는 것을 포함한다.

[0047]

또 다른 양태에서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 인간을 포함하는 숙주(또는 대상체)의 박테리아 감염의 예방 및 치료를 위한 방법을 제공한다.

[0048]

추가로, 본 발명은 인간을 포함하는 숙주(또는 대상체)의 기생충 감염의 예방 및 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 유효량의 본 발명의 화합물을 투여하는 것을 포함한다.

[0049] 또한, 추가로, 본 발명은 유효량의 본 발명의 화합물을 숙주에 투여함으로써 인간을 포함하는 숙주(대상체)의 진균 감염의 예방 및 치료를 위한 방법을 제공한다.

[0050] 본 발명의 방법에 따라, 본 발명의 화합물은 백신(예를 들어, BCG 백신) 또는 하나 이상의 추가 작용제와 함께 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 방법에 따라, 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 백신 또는 추가 작용제(또는 작용제들)와 조합하거나 이들과 연속적으로 투여될 수 있다.

[0051] 한 구체예에서, 본 발명의 화합물 및 백신은 미생물 감염을 치료하거나 예방하기 위해 투여된다.

[0052] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 화합물은 미생물 감염을 치료하거나 예방하기 위해 다른 항미생물제와 조합하여 투여된다.

[0053] 다른 구체예에서, 본 발명의 방법 및 화합물은 바이러스에 대해 사용된다.

[0054] 추가 구체예에서, 상기 방법 및 화합물은 암을 치료하거나 예방하기 위해 사용된다.

[0055] 본 발명은 본원에서 기재되는 질환, 질병, 감염, 또는 바이러스의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물 및 키트를 추가로 제공한다. 약학적 조성물은 치료적 유효량의 본 발명의 화합물, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 본 발명의 키트는 치료적 유효량의 본 발명의 화합물, 및 본원에 기재되는 질환, 질병, 감염, 또는 바이러스의 치료 또는 예방을 위해 화합물을 투여하기 위한 서면 설명서를 포함한다. 본 발명은 또한 본원의 질환, 질병, 감염, 또는 바이러스의 치료 또는 예방을 위한 패키징된 제약 및 물품을 제공한다.

[0056] 또한, 본 발명은 본원에 언급된 다양한 치료 적용에 유용한 화합물의 설계 및 합성을 또한 제공한다. 본 발명의 다른 특징 및 장점은 상세한 설명, 및 청구항으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0058] 본 발명의 상기 및 다른 목적, 특징 및 장점은 유사한 참조 부호가 다양한 도면의 전체에 걸쳐 동일 부분을 나타내는 하기 수반되는 도면에 예시된 바와 같은 본 발명의 바람직한 구체예의 하기 더욱 특정한 설명으로부터 명백해질 것이다. 도면은 반드시 비율에 따라 정한 것이 아니며, 대신 본 발명의 원리를 예시하는 경우 강조가 이루어진다.

[0059] 도 1은 미처리(UT) 및 SMNH 화합물 처리된 인간 폐 상피 세포(HLE A549 세포)에서의 인터페론 조절 인자-3(IRF3)-루시페라제 리포터 유전자의 활성화를 나타낸다.

[0060] 도 2는 SMNH 화합물(SB 40 및 SB 1B [SB 44-1])에 의한 IRF3 활성화가 NOD2 활성화를 통해 매개되는 것을 입증한다.

[0061] 도 3은 SB 44에 의한 HLE 세포에서의 RIG-I의 활성화 후 IRF3 유도를 나타낸다.

[0062] 도 4는 SB 44에 의한 RIG-I 및 NOD2의 활성화 후의 전사 인자 NF-KB의 유도를 입증한다.

[0063] 도 5는 IRF3의 유도가 IFN 신호전달 캐스케이드에서 주요 중간체인 인산화된 IRF3의 형성을 발생시키는 것을 나타낸다.

[0064] 도 6은 SB 1B에 의한 IRF3 유도가 NOD2 활성화를 통해 매개되고, SB 40이 SB 44의 활성 대사물임을 나타낸다.

[0065] 도 7은 SMNH 화합물(SB 44 및 SB 302, a, 옥살레이트 형태)이 인간 폐 상피 A549 세포로부터의 인터페론- β (IFN- β)의 생성을 유도하는 것을 나타낸다.

[0066] 도 8은 SB 1B("SB-44-1-D"로 제시됨) 처리가 폐 상피 A549 세포로부터 IFN- β 의 생성을 발생시키는 것을 나타낸다.

[0067] 도 9는 SB 1B("SB-44-1-D"로 제시됨)에 의한 반응자 유전자(responder gene) RIG-I 및 NOD2의 유도를 나타내며, SB 50은 NOD2를 활성화시키지 않고, 음성 대조군으로 사용된다.

[0068] 도 10(a-d)은 SMNH 화합물이 대식세포에서 펩티드 항원-85B의 시험관내 제시를 향상시키며, 이는 증가된 MHC-II I 밸현과 관련되는 것을 나타낸다(SB 44는 SB 1A로 제시됨).

[0069] 도 11(a-e): a)는 마우스에서의 백신 실험의 모델을 나타내고; b-e)는 NOD2-활성화 화합물 SB 1A(SB 44로도 제시됨) 및 SB 1B가 마우스에서 결핵에 대한 BCG 백신의 효능을 부스팅시키기 위한 애쥬번트로서 뮤라밀 디펩티드(MDP)보다 나은 것을 나타내는 그래프이다.

- [0070] 도 12(aa-bb)는 NOD2-활성화 화합물 SB 1A(SB 44로도 제시됨) 및 SB 1B(SB 44의 Rp-이성질체)가 대식세포에서 카스파제-의존성 메커니즘을 통해 MDP 또는 온전한 BCG 바실러스와 조합한 경우에만 IL-1 β 를 유도하는 것을 나타낸다.
- [0071] 도 13(a-b)은 BCG 백신과 조합된 NOD2-활성화 SB 1A(SB 44로도 제시됨) 및 SB 1B(SB 44의 Rp-이성질체)가 마우스에서 결핵의 재공격에 대한 보호를 유도하는 것을 나타내며, 이는 장기간 보호를 암시한다.
- [0072] 도 14는 SB 1A(SB 44로도 제시됨) 및 SB 1B(SB 44의 Rp-이성질체) 유도된 MPEC가 마우스에서 강한 효과기 T 세포로서 재생됨으로써 장기간 보호를 가능케 할 수 있음을 확인하기 위해 개발된 모델을 나타낸다.
- [0073] 도 15(a-b)는 BCG 백신의 SB 1A(SB 44로도 제시됨) 또는 SB 1B(SB 44의 Rp-이성질체) 조합이 결핵을 이용한 재공격에 대해 더 나은 회상 반응(recall response)을 발생시키는 능력을 보유하는 것을 나타낸다.
- [0074] 도 16은 BCG 백신과 조합된 NOD2-활성화 SB 1A(SB 44로도 제시됨) 및 SB 1B(SB 44의 Rp-이성질체) 화합물이 결핵 재공격 마우스의 폐에서 항원 특이적 CD8 T 세포의 강한 확장을 유도하는 것을 나타낸다.
- [0075] 도 17은 본 발명의 화합물과 조합되는 경우 BCG로 처리된 PBMC에서의 인터페론의 유도를 나타낸다.
- [0076] **발명의 상세한 설명**
- [0077] 한 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 화합물 및 대상체에서의 미생물 감염의 치료를 위해 상기 화합물을 이용하는 방법을 특징으로 한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 질병, 질환, 감염, 또는 바이러스에 대한 대상체의 면역계 반응을 개선시키기 위한 화합물, 조성물, 및 방법에 관한 것이다.
- [0078] 본 발명은 또한 유효량의 본 발명의 화합물을 숙주(또는 대상체)에 투여함으로써 인간을 포함하는 숙주(또는 대상체)의 바이러스 감염, 박테리아 감염, 기생충 감염, 또는 진균 감염의 예방 및 치료를 위한 방법을 제공한다.
- [0079] 다양 내성 Mtb(MDR-Mtb)는 이소니아지드(Isoniazid), 리팜핀(Rifampin), 카나마이신(Kanamycin) 등을 포함하는 현재의 항-TB 약물 중 다수에 내성이다. WHO는 전세계적으로 오천만명 이하의 사람이 MDR-Mtb에 감염될 수 있는 것으로 추정한다. 약물 치료/내성에서의 어려움으로 인해, 결핵을 예방하거나 제한하기 위한 예방접종은 중요성이 증가하고 있다. 현재, BCG 백신은 아동기 TB에 대해 단지 가변적으로 보호적이며, 성인 질병에 대한 보호는 제공하지 않는다. 따라서, 더욱 효능있는 BCG 백신이 필요하다. BCG의 효능을 부스팅하기 위한 한 접근법은 이를 애쥬번트와 조합시키는 것이다. 애쥬번트는 백신 면역원성을 촉진하고, 조절하고, 개선시킬 수 있는 화합물이다. 애쥬번트는 또한 표적 항원의 필요한 투여량을 감소시킬 수 있고, 정성적 방식으로 항원-특이적 면역 반응, 예를 들어, Th1 및 Th2 반응을 조절할 수 있다. 선천 면역에서의 최근의 진전은 TLR, RIG-I, 및 NLR, 특히 NOD2가 선천 면역 반응을 자극하고, 애쥬번트-유사 활성을 촉진하는 다양한 핵산 리간드를 인지하는 것을 밝혀내었다.
- [0080] 척추동물 시스템은 미생물 침입에 의해 항상 공격받으며, 병원체의 제거를 위해 면역-매개 방어를 진화시켜왔다. 포유동물 면역계는 선천 면역 및 후천 면역의 성분을 포함한다. 선천 면역계는 제한된 수의 점-라인(germ-line) 인코딩된 병원체 인지 수용체(PRR)를 통해 미생물을 인지한다(3,4). 포식세포, 예를 들어, 대식세포 및 수지상 세포는 선천 면역 반응을 매개한다. 후천 면역 반응은 유전자-재배열과 같은 메커니즘에 의해 발생된 항원-특이적 수용체를 갖는 립프구를 수반하는 특이성을 특징으로 한다. 선천 면역은 간 손상, 섬유증, 및 재생을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 한다. 예를 들어, 인터페론에 의한 자연살세포(NK 세포)의 활성화는 간 섬유증을 치료하기 위한 새로운 전략일 수 있다. 이는 NK 세포의 활성화가 활성화된 간 성상세포(HSC)를 특이적으로 사멸시킴으로써, 간 섬유증 및 간 종양 형성을 개선시킬 수 있기 때문이다. 그러므로, 본 발명에 개시된 올리고뉴클레오티드 유사체는 간 섬유증, 및 간암의 진행을 억제하는데 유용할 수 있다.
- [0081] 미생물은 또한 감염으로부터 숙주 세포를 보호하는 면역 반응을 회피하는 영리한 전략으로 진화하여 왔다. 확실히, DNA 및 RNA 바이러스 둘 모두는 세포 IFN 생성(타입-I, IFN- α , IFN- β)을 억제한다. 세포내 IFN은 감염되지 않은 세포의 세포질에 존재하는 전사 인자 IRF3(IFN 조절 인자 3)에 의해 발현/생성이 매개되는 효능있는 항바이러스 사이토카인이다. IRF3는, 세포가 감염되고, 바이러스 성분(병원체 관련 분자 패턴(PAMPS)으로도 공지됨, 예를 들어, 바이러스 유전체, 바이러스 단백질 등)이 특화된 바이러스 센서 또는 패턴 인지 수용체(PRR)에 의해 인지된 후에 활성화된다. 활성화된 IRF3은 핵으로 전위되어, IFN 유전자 발현을 트랜스액티베이션(transactivation)시킨다. IFN 생성은 (i) 선천 및 적응 면역 반응의 활성화, (ii) 항바이러스 및 유리한 전염증성 인자의 생성에 의한 세포에서의 항바이러스 상태의 유도, 및 (iii) 바이러스-감염된 세포의 조절된 아폽토시스와 같은 다양한 메커니즘을 통해 보호적 항바이러스 효과(주변분비 및 자가분비 활성을 통합)를 유도한다.

따라서, PRR은 IFN-반응의 필수적 성분이다. 가장 최근에, 뉴클레오티드 올리고머화 도메인(NOD) 단백질 패밀리의 한 일원인 NOD2가 RSV 및 인플루엔자 A를 포함하는 단일-가닥 RNA(ssRNA) 바이러스를 검출하는 PRR인 것으로 밝혀졌다. 흥미롭게도, 바이러스 센서 RIG-I와 유사하게, NOD2의 활성화는 또한 IFN 생성 및 NF- κ B의 유도를 위한 신호전달 캐스케이드를 촉발시켜, IFN의 항바이러스 작용을 강화시키기 위한 조절된 전염증성 반응을 촉진한다. NOD2는 RSV 및 인플루엔자 A와 같은 광범위한 ssRNA 바이러스를 검출하는 바이러스 센서이므로, 이는 항바이러스 내성과 대항하고, 항바이러스 발견을 위한 독특한 숙주 표적을 제공한다.

[0082] NOD2와 유사하게, RIG-I은 타입 1 인터페론 면역 방어를 활성화시킴으로써, 바이러스 복제를 억제하고, 또한 바이러스 감염에 대한 세포 증식허용을 억제하는 PAMP로서 이중 가닥 바이러스 RNA를 인지하는 숙주 세포질 단백질이다(6-15). RIG-I은 광범위한 RNA 바이러스, 예를 들어, 플라비바이러스, 예를 들어, C형 간염 바이러스, 센다이 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 뿐만 아니라, 수포성 구내염 바이러스, 광견병 바이러스 및 일본 뇌염 바이러스를 검출하는 바이러스 센서이며, 이는 광범위한 항바이러스 활성에 대한 독특한 숙주 표적이다. HBV는 DNA 바이러스이나, 이는 DNA 합성의 개시를 위한 프리지노믹(pregenomic) RNA 주형을 이용하고, 따라서 잠재적으로 RIG-I이 HBV pgRNA에 대한 수용체일 수 있음이 주목할만 하다.

[0083] 특정 디뉴클레오티드 조성물이 RIG-I 경로의 활성화를 통한 선천 면역의 자극 및 인터페론 생성의 유도를 위한 잠재성을 갖는 것이 발견되었다. 이러한 화합물은 또한 바이러스 감염에 대해 예방적으로 유용하고, 백신에서 애쥬번트로 유용할 수 있다.

[0084] 바이러스 센서 RIG-I은 C-말단 조절 도메인(RD), 2개의 말단 카스파제 활성화 및 보충 도메인(CARDS), 뿐만 아니라 중심 ATPase 도메인으로 구성된 다합체 세포질 단백질이다. 바이러스 이중-가닥 RNA(dsRNA) 및 5'-트리포스페이트는 RIG-I이 숙주 RNA(보통, 말단에 "Cap" 변형을 가짐)로부터 병원체 RNA(트리포스페이트를 갖는 dsRNA 및 트리포스페이트를 갖지 않는 dsRNA)를 구별하는 것을 가능케 하는 2개의 PAMP이다(6-14). 또한, RIG-I은 전위의 현상을 통해 바이러스 RNA를 감지하는 능력을 갖는다(Myong et al., Science 323, 1070. 2009). 바이러스 유전체의 dsRNA에서의 RIG-I 전위 및 반복 셔틀링(repetitive shuttling)은 RIG-I이 입체형태적 변화를 겪고, 이의 ATPase를 활성화시키고, CARDs를 유비퀴틴화에 노출시키는 촉발제이다. 다음 단계에서, CARDs는 미토콘드리아 항바이러스 신호전달(MAVS)과 상호작용하여[인터페론 베타 자극제로도 공지됨[(IPS-1), 또는 VISA], 타입 I IFN 발현(IFN- α , β)을 발생시키는 다운스트림 신호전달을 유도한다.

[0085] NOD2 및 RIG-I은 구조적 및 조직적으로 매우 유사한 다합체 단백질이다. 따라서, RIG-I과 유사하게, NOD2는 CARD 도메인을 함유한다. 또한, RIG-I 및 NOD2 둘 모두는 NBD(뉴클레오티드 결합 도메인)(NOD2에 대함) 및 헬리카제(helicase)(RIG-I에 대함) 도메인에 위치된 뉴클레오티드-결합 포켓을 갖는다. 문자 모델링 연구는 특정 디뉴클레오티드 조성물이 NBD에 결합하는 뉴클레오시드 트리포스페이트(NTP) 구조와 구조 유사성을 갖는 것을 나타낸다. 본 발명자는 짧은 올리고뉴클레오티드가 NOD2(및 RIG-I)의 NBD에 결합하는 NTP 모방체로 작용하고, 다운스트림 항바이러스 활성을 위한 이들의 활성화를 야기시키는 것을 가정한다.

[0086] 본 발명자(들)는 본 발명의 뉴클레오시드, 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 유사체가 TLR, RLR, 및 NLR로 집합적으로 공지된 Toll-유사 수용체(TLR), 비-TLR 수용체, 예를 들어, 레티노산 유도성 유전자-1(RIG-I), 및 뉴클레오티드 올리고머화 단백질(NOD)을 수반하는 면역 경로를 조절할 수 있는 것을 발견하였다. 이들 각각의 리간드에 의한 이들 경로의 활성화는 다양한 사이토카인, 및 케모카인, 예를 들어, 인터루킨, 인터페론, NF-KB, TNF-알파 등의 생성을 유도할 수 있고, 또한 항미생물 활성을 갖는 특정 세포 단백질의 유도를 야기함으로써 항미생물 면역을 제공할 수 있다. 역으로, 본 발명자(들)는 염증 경로의 억제를 야기하여 자가면역 질병에서 이로운 효과를 발생시키기 위한 화합물을 설계하였다.

[0087] 본 발명자(들)는 본 발명에 따른 뉴클레오시드, 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물, 및 이의 유사체가 백신을 위한 애쥬번트로 사용될 수 있는 것을 예기치 않게 발견하였다. 본 발명의 화합물은 박테리아 및 바이러스 작용 제에 의해 야기된 다양한 감염성 질병에 대한 치료적 유용성을 갖는다. 본 발명의 화합물은 또한 자가면역 질병, 예를 들어, 알레르기, 천식, 염증성 장애, 및 다른 질병, 예를 들어, 암을 치료하거나 예방하는데 있어서 유용하다.

[0088] 따라서, 본 발명은 본원에 기재되는 다양한 질환, 질병, 감염, 또는 바이러스를 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공한다.

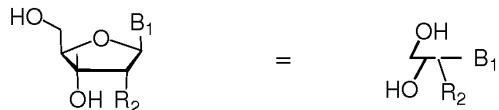
정의

[0089] 본 발명이 더욱 용이하게 이해될 수 있도록 하기 위해, 특정 용어가 먼저 정의되고, 편의를 위해 본원에서 수집

된다.

[0091] 본 발명의 화합물은 "자연" 핵산, 즉, 자연 뉴클레오시드간 결합, 또는 핵염기 G, C, T, U, A 등으로부터 하나 이상의 변형을 포함한다. 변형은, 예를 들어, 뉴클레오티드간 결합, 염기, 또는 당 모이어티의 변형을 포함한다.

[0092] 뉴클레오시드 단위는 선 그림의 국제적으로 수용되는 규약에 의해 표시된다. 예로서, 하기 2'-치환된 리보뉴클레오시드는 규약 구조 및 상응하는 선 그림 형태 둘 모두로 표시된다:



[0093]

[0094] α 또는 β N-뉴클레오시드 또는 C-뉴클레오시드를 발생시키는 B₁ 및 B₂에 부착된 당 단위는 푸라노스, 데옥시리보푸라노스, 리보스, 및 아라비노스를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0095] 용어 "투여" 또는 "투여하는"은 화합물(들)의 의도된 기능을 수행하기 위해 화합물(들)을 대상체에 도입시키는 경로를 포함한다. 이용될 수 있는 투여 경로의 예는 주사(피하, 정맥내, 비경구, 복막내, 수막강내), 경구, 흡입, 직장 및 경피를 포함한다. 약학적 제조물은, 물론, 각각의 투여 경로에 적합한 형태로 제공된다. 예를 들어, 이들 제조물은 정제 또는 캡슐 형태로, 주사 및 흡입에 의해, 로션 또는 연고에 의해 국소적으로, 좌약에 의해 직장내로 투여된다. 경구 투여가 바람직하다. 주사는 볼루스(bolus)일 수 있거나, 연속 주입일 수 있다. 투여 경로에 따라, 화합물은 이의 의도된 기능을 수행하는 능력에 유해하게 영향을 미칠 수 있는 자연 조건으로부터 이를 보호하기 위해 선택된 물질로 코팅되거나 선택된 물질 내에 배치될 수 있다.

[0096] 화합물은 단독으로 또는 상기 기재된 바와 같은 또 다른 작용제(예를 들어, 백신) 또는 약학적으로 허용되는 단체 또는 둘 모두와 함께 투여될 수 있다. 화합물은 다른 작용제의 투여 전, 다른 작용제와 동시에, 또는 다른 작용제의 투여 후에 투여될 수 있다. 또한, 화합물은 생체내에서 이의 활성 대사물 또는 더욱 활성인 대사물로 전환되는 프로폼(proform)으로 투여될 수 있다.

[0097] 본원에서 사용되는 용어 "아릴"은 폐닐, 나프틸, 테트라하이드로나프틸, 인다닐, 인데닐 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 1 또는 2개의 방향족 고리를 갖는 모노- 또는 폴리사이클릭 카르보사이클릭 고리 시스템을 나타낸다.

[0098] 본원에서 사용되는 용어 "헤테로아릴"은 하나 이상의 고리 원자가, 예를 들어, S, O 및 N로부터 선택되는 5 내지 10개의 고리 원자를 갖는 모노- 또는 폴리사이클릭(예를 들어, 바이-, 또는 트리사이클릭 또는 그 초과) 방향족 라디칼 또는 고리를 나타내고; 0, 1 또는 2개의 고리 원자는, 예를 들어, S, O 및 N으로부터 독립적으로 선택된 추가 헤테로원자이고; 나머지 고리 원자는 탄소이고, 여기서 고리 내에 함유된 임의의 N 또는 S는 임의로 산화될 수 있다. 헤테로아릴은 피리디닐, 피라지닐, 피리미디닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 티아졸릴, 옥사졸릴, 이소옥사졸릴, 티아디아졸릴, 옥사디아졸릴, 티오페닐, 푸라닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 벤즈이미다졸릴, 벤즈옥사졸릴, 퀴녹살리닐 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0099] 본 발명에 따르면, 본원에 기재된 아릴, 치환된 아릴, 헤테로아릴 및 치환된 헤테로아릴 중 임의의 것은 임의의 방향족 기일 수 있다. 방향족 기는 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0100] 본원에서 사용되는 용어 "알킬"은 1 내지 6개, 또는 1 내지 12개의 탄소 원자를 각각 함유하는 포화된 칙체 또는 분자체 탄화수소 라디칼을 나타낸다. C1-C6 알킬 라디칼의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-부틸, 터트-부틸, 네오펜틸 및 n-헥실 라디칼을 포함하나, 이에 제한되지는 않고; C1-C12 알킬 라디칼의 예는 에틸, 프로필, 이소프로필, n-헥실, 옥틸, 데실, 도데실 라디칼을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0101] 용어 "아르알킬" 또는 "아릴알킬"은 아릴-치환된 알킬 라디칼, 예를 들어, 벤질, 디페닐메틸, 트리페닐메틸, 폐닐에틸, 및 디페닐에틸을 포함한다.

[0102] 본원에서 사용되는 용어 "헤테로사이클릭"은 비-방향족 5-, 6- 또는 7-원 고리 또는 바이- 또는 트리-사이클릭 기 용합 시스템을 나타내고, 여기서 (i) 각각의 고리는 산소, 황 및 질소로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자를 함유하고, (ii) 각각의 5-원 고리는 0 내지 1개의 이중 결합을 갖고, 각각의 6-원 고리는 0 내지 2개의 이중 결합을 갖고, (iii) 질소 및 황 헤�테로원자는 임의로 산화될 수 있고, (iv) 질소 헤테로원자는

임의로 사차화될 수 있고, (iv) 상기 고리 중 임의의 고리는 벤젠 고리에 융합될 수 있고, (v) 잔여 고리 원자는 임의로 옥소-치환될 수 있는 탄소 원자이다. 대표적 혜테로사이클로알킬 기는 [1,3]디옥솔란, 피롤리디닐, 피라졸리닐, 피라졸리디닐, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 페페리디닐, 페페라지닐, 옥사졸리디닐, 이속사졸리디닐, 모르톨리닐, 티아졸리디닐, 이소티아졸리디닐, 퀴녹살리닐, 피리다지노닐, 및 테트라하이드로푸릴을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 혜테로사이클릭 기는 추가로 치환될 수 있다.

본원에서 사용되는 용어 "사이클로알킬"은 단일 수소 원자의 제거에 의해 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 포화 카르보사이클릭 고리 화합물로부터 유래되는 1가기를 나타낸다. 예로는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 바이사이클로 [2.2.1] 헵틸, 및 바이사이클로 [2.2.2] 옥틸을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

본원에서 사용되는 용어 "스테로이달"은 4개의 고리 내에 배열된 기본적인 17개의 탄소 원자를 갖고, 스테롤 및 담즙산, 부신 및 성 호르몬, 특정 자연 약물, 예를 들어, 디지탈리스 화합물, 및 특정 비타민의 전구체를 포함하는 다수의 자연 발생 또는 합성 지방-용해성 유기 화합물 중 임의의 것을 나타낸다. 스테로이달 구조의 예는 콜레스테롤, 콜레스티놀, 3 α -사이클로-5 α -클레스탄-6 β -올, 담즙산, 콜레스테릴 포르미에이트, 콜레스티닐 포르미에이트를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

본원에서 사용되는 용어 "변형된 뉴클레오시드"는 변형된 헤테로사이클릭 염기, 변형된 당 모이어티, 또는 이들의 조합물을 포함하는 임의의 뉴클레오시드를 나타낸다. 일부 구체예에서, 변형된 뉴클레오시드는 본원에 기재

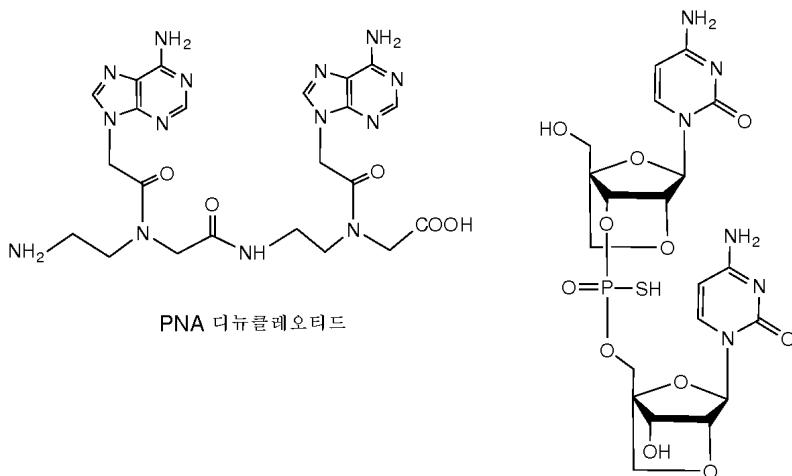
된 바와 같은 비-자연 퓨리미딘 또는 퓨린 뉴클레오시드이다. 변형된 뉴클레오시드의 예는 2'-치환된 리보뉴클레오시드 아라비노뉴클레오시드 또는 2'-데옥시-2'-플루오로아라비노시드, 테아자-아데닌, 테아자구아닌을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0107] 본 발명의 목적상, 용어 "짧은 올리고뉴클레오티드(들)"은 1 내지 약 6개의 연결된 뉴클레오시드 단위로부터 형성된 모노, 디 또는 폴리뉴클레오시드를 나타낸다. 이러한 짧은 뉴클레오티드는 유전체 또는 cDNA를 포함하는 존재하는 핵산원으로부터 수득될 수 있으나, 바람직하게는 합성 방법에 의해 생성된다. 뉴클레오시드 잔기는 다수의 공지된 뉴클레오시드간 결합 중 임의의 것에 의해 서로 커플링될 수 있다. 이러한 뉴클레오시드간 결합은 변형되거나 변형되지 않을 수 있고, 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포라미데이트, 실록산, 카르보네이트, 카르보알록시, 아세트아미데이트, 카르바메이트, 모르폴리노, 보라노, 티오에테르, 브릿징된 포스포라미데이트, 브릿징된 메틸렌 포스포네이트, 브릿징된 포스포로티오에이트, 및 셀론 뉴클레오시드간 결합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 용어 "짧은 뉴클레오티드"는 또한 하나 이상의 임체특이적 뉴클레오시드간 결합(예를 들어, (RP)- 또는 (SP)-포스포로티오에이트, 알킬포스포네이트, 또는 포스포트리에스테르 결합)을 갖는 폴리뉴클레오시드를 포함한다. 본 발명의 짧은 뉴클레오티드는 결합이 포스페이트기를 포함하거나 그렇지 않은 간에 임의의 상기 뉴클레오시드간 결합을 포함한다. 특정한 바람직한 구체예에서, 이들 뉴클레오시드간 결합은 변형되거나 변형되지 않을 수 있고, 포스포디에스테르, 포스포로티오에이트, 또는 포스포로디티오에이트 결합, 또는 이들의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0108] 용어 "짧은 뉴클레오티드(들)"은 또한 단백질 기, 친지질성 기, 중격제, 디아민, 폴산, 콜레스테롤 및 아다만탄을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 추가 치환기를 포함한다.

[0109] 용어 "짧은 뉴클레오티드(들)"은 또한 웨티드 핵산(PNA), 포스페이트 기를 갖는 웨티드 핵산(PHONA), 잠금 핵산(LNA)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 임의의 다른 핵염기 함유 중합체를 포함한다.

[0110] PNA 및 LNA의 예는 하기 제시된다:



[0111] "뉴클레오티드"는 뉴클레오티드간 결합, 당 기 및 헤테로사이클릭 염기를 포함하는 핵산의 서브-유닛(DNA 또는 RNA 또는 이의 유사체, 예를 들어, 웨티드 핵산(PNA) 및 잠금 핵산(LNA)이건 아니건 간에) 뿐만 아니라 상기 서브-유닛의 유사체를 나타낸다. "뉴클레오시드"는 당 기 및 헤테로사이클릭 핵염기를 포함하는 핵산 서브유닛을 나타낸다. 본원에서 사용되는 용어 "뉴클레오시드" 및 "뉴클레오티드"는 자연 발생 뉴클레오티드간 결합("뉴클레오티드"에 관함), 예를 들어, 포스포디에스테르 뉴클레오티드간 결합; 자연 발생 당 모이어티, 예를 들어, 리보스 및 데옥시리보스 모이어티; 및 자연 발생 핵염기, 예를 들어, 퓨린 및 퓨리미딘 염기, 예를 들어, 아데닌(A), 티민(T), 시토신(C), 구아닌(G), 또는 우라실(U), 뿐만 아니라 변형된 뉴클레오티드간 결합, 변형된 당 모이어티 및 변형된 퓨린 및 퓨리미딘 염기 또는 이의 유사체 또는 변형된 및 변형되지 않은 뉴클레오티드간 결합, 당 모이어티 및 퓨린 및 퓨리미딘 염기의 임의의 조합물을 함유하는 모이어티를 포함할 것이 이해될 것이다. 변형된 뉴클레오시드의 다른 예는 리보스 및 데옥시리보스 모이어티의 고리-개방 형태로 구성되는 아시를로뉴클레오시드(acyclonucleoside)를 포함한다. 상응하게, 상기 고리-개방 뉴클레오시드는 변형된 뉴클레오티드로 뉴클레오시드(acyclonucleoside)를 포함한다. 상응하게, 상기 고리-개방 뉴클레오시드는 변형된 뉴클레오티드로 뉴클레오시드(acyclonucleoside)를 포함한다.

드를 형성시키는데 사용될 수 있다. 변형된 뉴클레오시드의 다른 예는 C-뉴클레오시드, 예를 들어, 슈도-이소시티딘, 및 뉴클레오시드 동배체를 포함하는 뉴클레오시드 모방체, 예를 들어, 웨티드 핵산 단량체, 및 잠금 핵산 단량체를 포함한다.

[0113] 핵염기는 자연 발생 퓨린 및 피리미딘 핵염기, 및 메틸화된 퓨린 또는 피리미딘, 아실화된 퓨린 또는 피리미딘 등, 또는 보호기, 예를 들어, 아세틸, 디플루오로아세틸, 트리플루오로아세틸, 이소부티릴, 벤조일 등의 첨가를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 변형된 핵염기를 포함한다. 퓨린 또는 피리미딘 염기는 또한 상기의 유사체일 수 있고, 적합한 유사체는 당업자에게 공지되어 있을 것이며, 적절한 교과서 및 문헌에 기재되어 있다. 일반적인 유사체는 1-메틸아데닌, 2-메틸아데닌, N6-메틸아데닌, N6-이소펜틸아데닌, 2-메틸티오-N-6-이소펜틸아데닌, N,N-디메틸아데닌, 8-브로모아데닌, 2-티오시토신, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, 5-에틸시토신, 4-아세틸시토신, 1-메틸구아닌, 2-메틸구아닌, 7-메틸구아닌, 2,2-디메틸구아닌, 8-브로모구아닌, 8-메톡시 구아닌, 8-메톡시 아데닌, 8-클로로구아닌, 8-아미노구아닌, 8-메틸구아닌, 8-티오구아닌, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-아이오도우라실, 5-에틸우라실, 5-프로필우라실, 5-메톡시우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 5-(카르복시하이드록시메틸)우라실, 5-(메틸아미노메틸)우라실, 5-(카르복시메틸아미노메틸)-우라실, 2-티오우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 5-(2-브로모보닐)우라실, 우라실-5-옥시아세트산, 우라실-5-옥시아세트산 메틸 에스테르, 슈도우라실, 1-메틸슈도우라실, 큐에오신, 이노신, 1-메틸이노신, 하이포잔틴, 잔틴, 2-아미노퓨린, 6-하이드록시아미노퓨린, 6-티오퓨린, 2,6-디아미노퓨린 5-트리플루오로메틸 티민, 6-클로로-아데닌, 7-데아자-아데닌을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 예는 5-플루오로-우라실, 5-트리플루오로메틸 티민, 6-클로로-아데닌, 2-사이클로펜틸옥시-아데닌, 7-데아자-아데닌을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0114] 특정 구체예에서, 염기 B는 보편 핵염기를 포함하는 비자연 핵염기일 수 있다. 염기 B의 이러한 예는 디플루오로톨릴, 니트로파롤릴 및 니트로-이미다졸릴 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0115] "변형된 핵염기"로 또한 언급되는 "변형된 염기"는 헤테로사이클릭이거나 아닐 수 있는 질소 함유 화합물을 포함하는 것이 또한 이해되어야 한다. 상기 바람직한 질소 함유 화합물은 R18이 수소, 부틸옥시카르보닐(Boc), 벤질옥시카르보닐, 알릴, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 아르알킬, 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 또는 헤테로사이클릭인 -NHR18을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0116] 용어 "변형된 핵염기"는 가장 고전적 의미로 뉴클레오시드 염기가 아니지만 뉴클레오시드 염기로 작용할 수 있는 헤테로사이클릭 화합물을 포함하는 것으로 추가로 의도된다. 상기 화합물은 당 분야에 공지된 바와 같은 "보편 염기(universal base)"를 포함한다. 보편 염기는 질소 원자를 함유하거나 함유하지 않을 수 있는 방향족 고리 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 보편 염기는 뉴클레오시드의 펜토스 당의 C-1' 탄소에 공유적으로 부착될 수 있다. 보편 염기의 예는 3-메틸-프로파닐카르보스티릴(PIM), 3-메틸이소카르보스티릴 (MICS), 및 5-메틸 이소카르보스티릴 모이어티를 포함한다. 추가 예는 이노신 유도체, 아졸 카르복사미드 유사체, 니트로아졸, 및 니트로이미다졸을 포함한다.

[0117] 변형된 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드 당 모이어티의 예는 트레할로스, 아라비노스, 2'-데옥시-2'-치환된 펜토스 모이어티, 2'-0-치환된 펜토스 모이어티, 리보스, 럭소스, 및 자일로스, 또는 헥소스 당 기를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 목적상, "2'-치환된 리보뉴클레오시드" 또는 "2'-치환된 아라비노시드"와 같이 언급된 당 기 중 임의의 당 기의 용어 "2'-치환된"은 펜토스 모이어티의 2'-위치에서의 하이드록실기가 치환되어 2'-치환되거나 2'-0-치환된 리보뉴클레오시드 또는 아라비노뉴클레오시드가 생성되는 리보뉴클레오시드 또는 아라비노뉴클레오시드를 포함한다. 바람직하게는, 상기 치환은 1-6개의 포화 또는 불포화 탄소 원자를 함유하는 저급 알킬기, 또는 6-10개의 탄소 원자를 갖는 아릴기와의 치환이며, 상기 알킬, 또는 아릴기는 비치환되거나, 예를 들어, 할로, 하이드록시, 트리플루오로메틸, 시아노, 니트로, 아실, 아실옥시, 알콕시, 카르복실, 카르보알콕시, 또는 아미노기로 치환될 수 있다. 2'-0-치환된 리보뉴클레오시드 또는 2'-0-치환된-아라비노시드의 예는 2'-0-메틸 리보뉴클레오시드(본원에서 또한 2'-OMe로 표시됨) 또는 2'-0-메틸 아라비노시드 및 2'-0-메톡시에틸 리보뉴클레오시드 또는 2'-0-메톡시에틸 아라비노시드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 용어 "2'-치환된 리보뉴클레오시드" 또는 "2'-치환된 아라비노시드"는 또한 2'-하이드록실기가 1-6개의 포화 또는 불포화 탄소 원자를 함유하는 저급 알킬기, 또는 아미노 또는 할로기로 대체되는 리보뉴클레오시드 또는 아라비노뉴클레오시드를 포함한다. 상기 2'-치환된 리보뉴클레오시드 또는 2'-치환된 아라비노시드의 예는 2'-아미노, 2'-플루오로, 2'-알릴, 및 2'-프로파길 리보뉴클레오시드 또는 아라비노시드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0118] 변형된 뉴클레오티드간 결합의 예는 치환된 및 비치환된 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 알킬포스포노티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포라미데이트, 실록산, 카르보네이트, 카르보알콕시, 아세트아미데이트, 카르바메이트, 모르폴리노, 보라노, 티오에테르, 브릿징된 포스포라미데이트, 브릿징된 메틸렌 포스포네이트, 브릿징된 포스포로티오에이트, 및 설폰 뉴클레오시드간 결합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0119] 본 발명의 화합물은 하나 이상의 비대칭 중심을 함유하며, 따라서 라세미체 및 라세미 혼합물, 단일 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체 혼합물 및 개별적 부분입체 이성질체로 발생할 수 있다. 본 발명은 5-원 푸라노스 고리에 대해 β -D 입체화학 입체형태를 갖는 짧은 뉴클레오티드 화합물, 즉, 5-원 푸라노스 고리의 C-1 및 C-4에서의 치환이 β -입체화학 입체형태(본원에 기재된 일부 화학식에서 굵은 선에 의해 통상적으로 표시되는 "위쪽" 방향)를 갖는 짧은 뉴클레오티드 화합물을 포함하는 것을 의미한다.

[0120] 용어 "프로드러그"는 생체내에서 대사될 수 있는 모이어티를 갖는 화합물을 포함한다. 일반적으로, 프로드러그는 에스테라제 또는 약물을 활성화시키는 다른 메커니즘에 의해 생체내에서 대사된다. 프로드러그 및 이의 용도의 예는 당 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19 참조). 프로드러그는 화합물의 최종 분리 및 정제 동안 정위에서 제조될 수 있거나, 자유산 형태의 정제된 화합물 또는 하이드록실과 적합한 에스테르화 작용제를 개별적으로 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 하이드록실기는 카르복실산을 이용한 처리에 의해 에스테르로 전환될 수 있다. 프로드러그 모이어티의 예는 치환되거나 비치환된, 분지형 또는 비분지형 저급 알킬 에스테르 모이어티(예를 들어, 프로피온산 에스테르), 저급 알케닐 에스테르, 디-저급 알킬-아미노 저급-알킬 에스테르(예를 들어, 디메틸아미노에틸 에스테르), 아실아미노 저급 알킬 에스테르(예를 들어, 아세틸옥시메틸 에스테르), 아실옥시 저급 알킬 에스테르(예를 들어, 피발로일옥시메틸 에스테르), 아릴 에스테르(페닐 에스테르), 아릴-저급 알킬 에스테르(예를 들어, 벤질 에스테르), 치환된(예를 들어, 메틸, 할로, 또는 메톡시 치환기를 가짐) 아릴 및 아릴-저급 알킬 에스테르, 아미드, 저급-알킬 아미드, 디-저급 알킬 아미드, 및 하이드록시 아미드를 포함한다. 특정 프로드러그 모이어티는, 예를 들어, 프로피온산 에스테르 및 아실 에스테르이다. 생체내에서 다른 메커니즘을 통해 활성 형태로 전환되는 프로드러그가 또한 포함된다.

약어

[0122] 하기 도면 및 실시예의 설명에서 이용될 수 있는 약어는 다음과 같다:

[0123] 아세트산에 대해 AcOH;

[0124] 디-터트-부틸-디카르보네이트에 대해 Boc₂O;

[0125] t-부톡시카르보닐에 대해 Boc;

[0126] 1-메틸-1-(4-바이페닐릴)에틸 카르보닐에 대해 Bpoc;

[0127] 벤조일에 대해 Bz;

[0128] 벤질에 대해 Bn;

[0129] 터트-부틸 N-하이드록시카르바메이트에 대해 BocNHOH;

[0130] 포타슘 터트-부톡시드에 대해 t-BuOK;

[0131] 트리부틸린 하이드라이드에 대해 Bu₃SnH;

[0132] 카르보닐디이미다졸에 대해 CDI;

[0133] 디클로로메탄에 대해 CH₂Cl₂;

[0134] 메틸에 대해 CH₃;

[0135] 아세토니트릴에 대해 CH₃CN;

[0136] 디메틸 설록시드에 대해 DMSO;

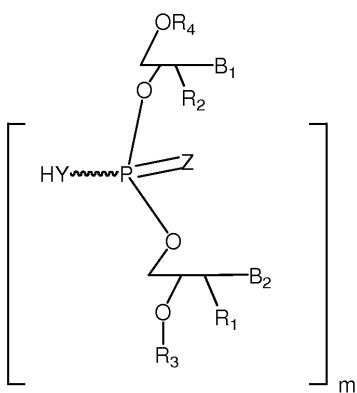
[0137] 에틸 아세테이트에 대해 EtOAc;

- [0138] 에탄올에 대해 EtOH;
- [0139] 디에틸 에테르에 대해 Et₂O;
- [0140] 염화수소에 대해 HCl;
- [0141] 메탄올에 대해 MeOH;
- [0142] 메톡시메틸에 대해 MOM;
- [0143] 메실 또는 -SO₂-CH₃에 대해 Ms;
- [0144] 메탄설폰산 무수물 또는 메실-무수물에 대해 Ms₂O;
- [0145] 염화나트륨에 대해 NaCl;
- [0146] 소듐 하이드라이드에 대해 NaH;
- [0147] 소듐 바이카르보네이트 또는 소듐 하이드로겐 카르보네이트에 대해 NaHCO₃;
- [0148] 소듐 카르보네이트에 대해 Na₂CO₃;
- [0149] 소듐 하이드록시드에 대해 NaOH;
- [0150] 소듐 설페이트에 대해 Na₂SO₄;
- [0151] 소듐 바이설파이트 또는 소듐 하이드로겐 설파이트에 대해 NaHSO₃;
- [0152] 소듐 티오설페이트에 대해 Na₂S₂O₃;
- [0153] 하이드라진에 대해 NH₂NH₂;
- [0154] 암모늄 바이카르보네이트에 대해 NH₄HCO₃;
- [0155] 암모늄 클로라이드에 대해 NH₄Cl;
- [0156] 하이드록실에 대해 OH;
- [0157] 메톡시에 대해 OMe;
- [0158] 에톡시에 대해 OEt;
- [0159] 트리에틸아민에 대해 TEA 또는 Et₃N;
- [0160] 트리플루오로아세트산에 대해 TFA;
- [0161] 테트라하이드로푸란에 대해 THF;
- [0162] 트리페닐포스핀에 대해 TPP 또는 PPh₃;
- [0163] 토실 또는 -SO₂-C₆H₄CH₃에 대해 Ts;
- [0164] 톨릴설폰산 무수물 또는 토실-무수물에 대해 Ts₂O;
- [0165] p-톨릴설폰산에 대해 TsOH;
- [0166] 폐닐에 대해 Ph;
- [0167] 터트-부틸 디메틸실릴에 대해 TBS;
- [0168] 트리메틸실릴에 대해 TMS;
- [0169] 트리메틸실릴 클로라이드에 대해 TMSCl.
- [0170] 본 발명의 화합물

[0171] 본 발명은 뉴클레오시드, 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물, 또는 이의 유사체, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머를 제공한다. 본 발명은 또한 이들의 프로드러그 및 대사물 형태의 화합물을 포함한다.

[0172] 특정 구체예에서, 본 발명은 3'-dApsU_{2'-OMe}, 3'-dApsA_{7deaza}, 및 3'-dApsTpSC 및 이들의 유사체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 디-, 및 트리-뉴클레오티드를 제공하며, 여기서 "ps"는 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합을 나타낸다.

[0173] 본 발명의 화합물은, 예를 들어, 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머를 포함한다:



[0174] 상기 식에서,

[0176] R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 H, OH, O-아킬, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 아르알킬, 헤테로사이클릭, O-아릴, O-헤테로아릴아릴, 또는 헤테로사이클릭이고;

[0177] R₃는 수소, 알킬, 치환된 알킬, C(O)-알킬, C(O)O-알킬, C(O)-아릴, C(O)O-아릴, C(O)NH-알킬, 및 C(O)NH-아릴로부터 선택되고;

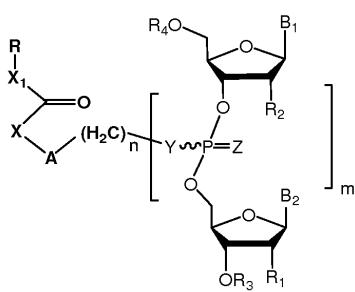
[0178] Y 및 Z는 각각 독립적으로 O 또는 S이고;

[0179] B₁ 및 B₂는 각각 독립적으로 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 우라실 또는 변형된 뉴클레오시드이고;

[0180] m은 1 내지 6이고;

[0181] R₄는 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, C(O)-알킬, C(O)O-알킬, C(O)-아릴, C(O)O-아릴, C(O)NH-알킬, 및 C(O)NH-아릴, 모노포스페이트, 디포스페이트, 또는 트리포스페이트 기이다.

[0182] 한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 하기 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머를 포함한다:

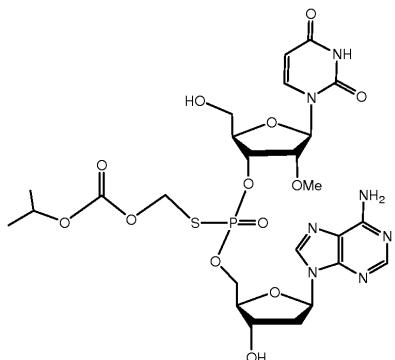


II

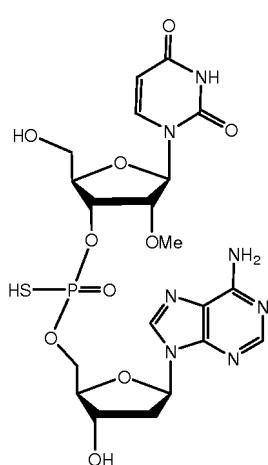
[0183] 상기 식에서,

[0184] X는 부재하거나, O, NH, NR, 또는 S이고;

- [0186] X_1 은 부재하거나, 0, 또는 NH 이고;
- [0187] A는 부재하거나, 아릴, 또는 아르알킬이고;
- [0188] n은 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5이고;
- [0189] R은 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 아르알킬, 헤테로사이클릭, 0-알킬, 0-헤테로아릴, 또는 스테로이디이고;
- [0190] R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 H, OH, 0-아킬, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 치환된 아릴, 아르알킬, 헤테로사이클릭, 0-아릴, 0-헤테로아릴아릴, 또는 헤테로사이클릭이고;
- [0191] R_3 는 수소, 알킬, 치환된 알킬, $C(O)$ -알킬, $C(O)O$ -알킬, $C(O)-아릴$, $C(O)O-아릴$, $C(O)NH$ -알킬, 및 $C(O)NH$ -아릴로부터 선택되고;
- [0192] Y 및 Z는 각각 독립적으로 O 또는 S이고;
- [0193] B_1 및 B_2 는 각각 독립적으로 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 우라실 또는 변형된 뉴클레오시드이고;
- [0194] m은 1 내지 6이고;
- [0195] R_4 는 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, $C(O)$ -알킬, $C(O)O$ -알킬, $C(O)-아릴$, $C(O)O-아릴$, $C(O)NH$ -알킬, 및 $C(O)NH$ -아릴, 모노포스페이트, 디포스페이트, 또는 트리포스페이트 기이다.
- [0196] 한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 하기 구조의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토며이다:

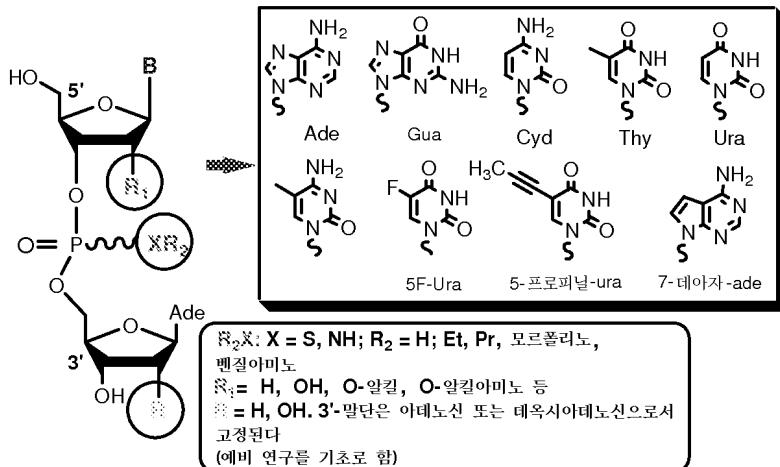


- [0197]
- [0198] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 화합물은 하기 구조의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토며이다:



- [0199]
- [0200] 본 발명의 다른 구체예는 하기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체

제 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토머를 제공한다:



SS 44: $R = H$; $R_1 = OMe$; $\oplus = Ura$; $XR_2 = OCH_2O\text{-}COO\text{-}iPr$.

SS 45: $XR_2 = OMe$; $R_1 = OMe$; $\oplus = Ura$

모든 화합물은 표준 포스포리마이드, 또는 예비 연구와 유사한 H-포스포네이트 화학을 이용하여 합성될 것이다.

[0201]

추가로, 본 발명의 화합물은 "자연" 핵산, 즉, 자연 뉴클레오시드간 결합, 또는 핵염기 G, C, T, U, A 등으로부터 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 변형은, 예를 들어, 뉴클레오티드간 결합, 염기, 또는 당 모이어티의 변형을 포함한다.

[0202]

본 발명은 또한 본원에 기재된 화합물의 토토머, 입체이성질체, 광학 이성질체, N-옥사이드, 하이드레이트, 용매, 다형태, 약학적으로 허용되는 에스테르, 아미드, 염, 프로드러그, 및 동위원소 유도체를 제공한다.

[0204]

본 발명의 화합물의 일부의 구조는 비대칭 탄소 원자를 포함한다. 따라서, 상기 비대칭으로부터 발생하는 이성질체(예를 들어, 모든 거울상 이성질체 및 부분입체 이성질체)는 달리 표시하지 않는 한 본 발명의 범위 내에 포함된다. 이러한 이성질체는 고전적 분리 기술 및/또는 입체화학 조절 합성에 의해 실질적으로 순수한 형태로 수득될 수 있다.

[0205]

자연 발생 또는 합성 이성질체는 당 분야에 공지된 여러 방식으로 분리될 수 있다. 2개의 거울상 이성질체의 라세미 혼합물을 분리시키기 위한 방법은 키랄 정지상을 이용한 크로마토그래피를 포함한다(예를 들어, 문헌 ["Chiral Liquid Chromatography," W.J. Lough, Ed. Chapman and Hall, New York (1989)] 참조). 거울상 이성질체는 또한 고전적인 분해 기술에 의해 분리될 수 있다.

[0206]

본 발명의 화합물을 수득하는 방법은 화합물을 구매하거나, 합성하거나, 달리 획득하는 것을 포함한다. 본 발명의 화합물을 합성하는 것은 당 분야에 통상적인 기술의 화학자의 방법 내에 속하고, 본 발명의 화합물을 제조하기 위한 예시적 방법이 본원에 기재된다. 반응 조건을 최적화시키고, 필요시 경쟁 부산물을 최소화시키기 위한 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 상기 방법은 또한 본원에 특별히 기재된 단계 전 또는 후에 본원의 화합물의 합성을 궁극적으로 가능케 하기 위해 적합한 보호기를 첨가하거나 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 다양한 합성 단계가 교대 순서로 또는 요망되는 화합물을 제공하는 순서로 수행될 수 있다.

방법 및 용도

본 발명의 화합물은 알레르기, 염증, 자가면역 질병, COPD, 천식 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 숙주 면역 성분을 수반하는 광범위한 치료 영역에서 유용하다. 이들 화합물은 다수의 메커니즘을 통해 면역 반응의 조정자로 작용할 수 있는 사실에 의해, 이들은 자가면역 질병에서 치료적 용도를 갖는다. 예를 들어, 상기 화합물은 선천 면역 반응을 자극하는 잠재성을 가지므로, 이들은 흑색종, 골수종, 암종, 교모세포종 및 육종을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다양한 암의 치료에서 단독으로 또는 다른 작용제와 조합하여 이용될 수 있다. 예를 들어, 특정 올리고뉴클레오티드 조성물은 면역 반응을 억제하는 잠재성을 가지므로, 이들은 알레르기, 천식, COPD 및 다발경화증을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 다양한 자가면역 질병의 치료에서 단독으로 또는 다른 작용제와 조합하여 이용될 수 있다.

많은 인터페론-관련 유전자 생성물은 아폽토시스를 유도할 수 있으므로, 상기 화합물은 암세포의 선택적인 세포

사멸을 유도할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 백신 또는 또 다른 작용제(들) 또는 다른 작용제(들)과 조합하거나 이들과 연속적으로 사용될 수 있다.

[0210] 따라서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 화합물을 미생물 감염의 치료를 필요로 하는 것으로 확인된 대상체(또는 숙주)에 투여함으로써 대상체(또는 숙주)의 미생물 감염을 치료하는 방법을 제공한다.

[0211] 또 다른 양태에서, 본 발명은 질병, 질환, 감염, 또는 바이러스에 대해 대상체의 면역계 반응을 개선시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 백신 애쥬번트로서 유효량의 본 발명의 화합물을 대상체에 투여하는 것을 포함한다.

[0212] 본 발명은 또한 유효량의 본 발명의 화합물의 투여에 의한 인간을 포함하는 숙주(또는 대상체)의 바이러스 감염의 예방 및 치료를 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 백신 또는 다른 작용제와 조합하여 또는 이들과 연속하여 투여될 수 있다.

[0213] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 화합물의 투여에 의한 인간을 포함하는 숙주(또는 대상체)의 박테리아 감염의 예방 및 치료를 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 백신 또는 다른 작용제와 조합하여 또는 이들과 연속하여 투여될 수 있다.

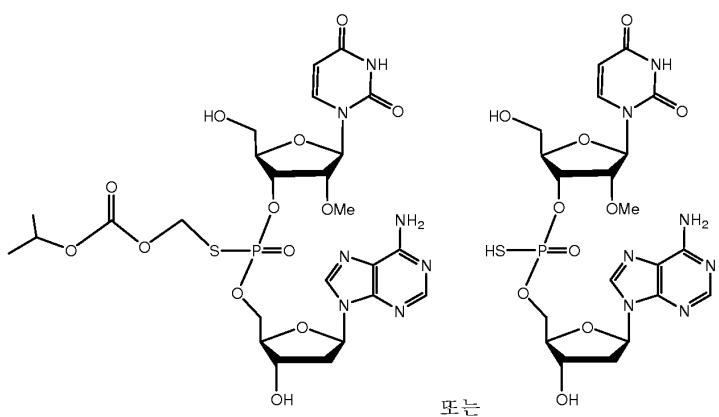
[0214] 추가로, 본 발명은 유효량의 본 발명의 화합물의 투여에 의한 인간을 포함하는 숙주(또는 대상체)의 기생충 감염의 예방 및 치료 방법을 제공한다. 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 백신 또는 다른 작용제와 조합하여 또는 이들과 연속하여 투여될 수 있다.

[0215] 인간을 포함하는 숙주(또는 대상체)의 진균 감염의 예방 및 치료를 위한 방법이 또한 개시된다. 상기 방법은 단독으로 또는 백신 또는 또 다른 작용제(들) 또는 다른 작용제(들)과 조합하여 또는 이들과 연속하여 투여될 수 있는 유효량의 본 발명의 화합물을 투여하는 것을 포함한다.

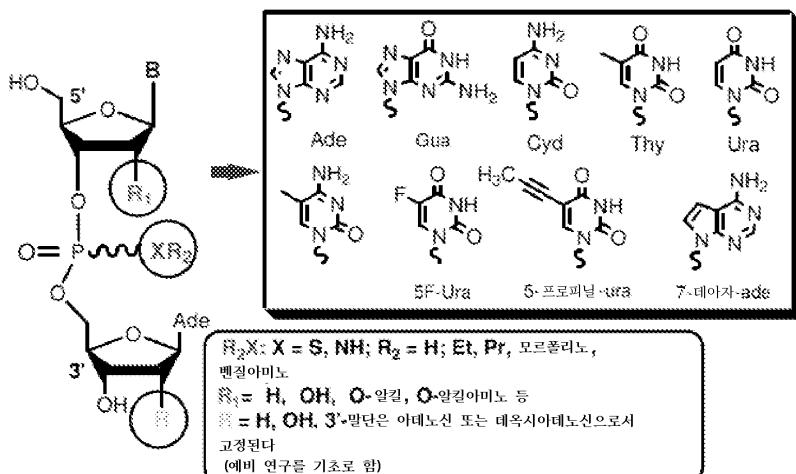
[0216] 상기 방법의 특정 구체예에서, 본 발명의 화합물은 화학식 (I)의 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 유사체, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토며이다.

[0217] 다른 구체예에서, 본 발명의 화합물은 화학식 (II)의 짧은 올리고뉴클레오티드 화합물 또는 이의 유사체, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토며이다.

[0218] 한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 하기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토며이다:



[0219] 추가로, 본 발명은 하기 차트에 제공된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 라세미체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 기하 이성질체, 또는 토토며의 용도를 제공한다:

SS 44: R = H; R₁ = OMe; B = Ura; XR₂ = OCH₂-O-COO-4pr,SS 40: XR₂ = SH; R₁ = OMe; B = Ura

모든 화합물은 표준 포스포리미다이트, 또는 예비 연구와 유사한 H-포스포네이트 화학을 이용하여 합성될 것이다.

[0221]

본 발명의 방법에 따르면, 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 백신(예를 들어, BCG 백신) 또는 하나 이상의 추가 작용제와 함께 투여될 수 있다.

한 구체예에서, 본 발명의 화합물 및 백신은 미생물 감염을 치료하거나 예방하기 위해 투여된다.

또 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 바이러스에 대해 사용된다.

추가 구체예에서, 상기 방법은 암을 치료하거나 예방하기 위해 사용된다.

본 발명의 방법은 요망되는 결과를 달성하는데 필요한 시간 동안 요망되는 결과를 달성하는데 필요한 양으로 치료적 유효량 또는 억제량의 본 발명의 화합물을 대상체에 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 추가 방법은 요망되는 결과를 달성하는데 필요한 시간 동안 요망되는 결과를 달성하는데 필요한 양으로 억제량의 본 발명의 조성물의 화합물을 이용한 생물학적 샘플의 처리이다.

본 발명의 또 다른 양태는 질병을 치료하는데 유용한 하나 이상의 작용제와 조합된 본 발명의 화합물을 이용하여 치료하는 것을 포함한다. 예를 들어, 바이러스에 대해 활성인 상기 작용제는 라미부딘(Lamivudine)(3TC), 아데포비(Adefovir), 테노포비(Tenofovir), 간시클로비(Gancyclovir), 아시클로비(acyclovir), 인터페론(Interferon), 리바비린(Ribavirin), 텔비부딘(Telbivudine)을 포함하고; COPD, 천식, 알레르기, 알레르기 비염에 대한 다른 작용제는 테오필린(Theophylline), 알베스코(Alvesco)(시클레소니드(Ciclesonide)), 팬타나세(Patanase)(알라파티딘 하이드로클로라이드(Olapatidine hydrochloride)), 리테어리스(Litairis)(암브레센탄(Ambresentan))(길리드(Gilead)), 차이잘(Xyzal)(레보세티리진 dihydrochloride), 브로바나(Brovana)(아르포르모테롤 타르트레이트(Arformoterol tartrate)), 스피리바(Spiriva)(트리트로퓸 브로마이드(Tritropium bromide)), 클라리넥스(Clarinex), 테클로메타손 디프로피오네이트(Declomethsone dipropionate), 레모두닐(Remodulin)(트레프로스테닐(treprostienil)), 조페넥스(Xopenex), 두오냅(Duoneb)(알부테롤(albuterol) 및 트리트로퓸 브로마이드(Tritropium bromide)), 포르메테롤 푸마레이트(Formeterol fumarate), 트라클리어(Tracleer)(보산탄(bosantan)), 트리암시놀론 아세토니드(Triamcinolone acetonide), 부데소니드(Budesonide), 싱글레어(Singulair), 세레벤트(Serevent), 틸라데(Tilade)(흡입기 및 네뷸라이저), 차이플로(Zyfllo), 아콜레이트(Accolate), 세타스(Cedax), 지르텍(Zyrtec), 허셉틴(herceptin)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 항암제 중에서는, 예를 들어, 탁솔(taxol), 파클리타셀(paclitaxel), 시스플라틴(cisplatin), 허셉틴, 글리백(Gleevac), 인터페론(Interferon) 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

본 발명의 상기 방법에 따르면, 조합물의 개별적 성분은 치료 과정 동안 다양한 시간에서 별개로 투여될 수 있거나, 나누어지거나 단일한 조합 형태로 동시 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은 동시 또는 교대 치료의 상기 모든 요법을 포함하는 것으로 이해되어야 하고, 용어 "투여하는"은 이에 따라 해석되어야 한다. 본 발명의 화합물과 다른 작용제의 조합의 범위는 원칙적으로 바이러스, 박테리아, 기생충, 진균 감염 등을 치료하기 위한 임의의 약학적 조성물과의 임의의 조합을 포함하는 것이 이해될 것이다. 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제 2의 치료제와 조합하여 사용되는 경우, 각각의 화합물의 용량은 화합물이 단독으로 사용되

는 경우의 용량과 동일하거나 상이할 수 있다.

[0229] 본 발명의 화합물과 다른 작용제의 조합의 범위는 원칙적으로 COPD, 천식, 알레르기 비염, 암 등을 치료하기 위한 임의의 약학적 조성물과의 임의의 조합을 포함하는 것이 이해될 것이다. 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제 2의 치료제와 조합하여 사용되는 경우, 각각의 화합물의 용량은 화합물이 단독으로 사용되는 용량과 동일하거나 상이할 수 있다.

[0230] 본 발명의 목적상, 항미생물제는 바이러스, 박테리아, 진균 및 기생충 감염에 대해 효과적인 화합물을 나타내는 것을 의미한다.

[0231] 본원에서 사용되는 용어 본 발명의 화합물의 "치료적 유효량"은 생물학적 샘플 또는 대상체에서 이로운 생물학적 반응을 생성시키기는 화합물의 충분한 양을 의미한다. 의학 분야에서 잘 이해되는 바와 같이, 본 발명의 화합물의 치료적 유효량은 임의의 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 이익/위험비일 것이다.

[0232] 본 발명의 화합물의 억제량 또는 억제 용량은 약 0.1 mg/Kg 내지 약 500 mg/Kg, 대안적으로 약 1 내지 약 50 mg/Kg의 범위일 수 있다. 억제량 또는 억제 용량은 또한 투여 경로뿐만 아니라 다른 작용제와의 공동-사용 가능성에 따라 다양할 것이다.

[0233] 본원에서 사용되는 용어 "생물학적 샘플(들)"은 대상체로의 투여가 의도되는 생물학적 기원의 물질을 의미한다. 생물학적 샘플의 예는 혈액 및 이의 성분, 예를 들어, 혈장, 혈소판, 혈액 세포의 부분모집단 등; 기관, 예를 들어, 신장, 간, 심장, 폐, 뇌 등; 정자 및 난세포; 골수 및 이의 성분; 또는 줄기 세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 따라서, 본 발명의 또 다른 구체에는 상기 생물학적 샘플과 억제량의 본 발명의 화합물 또는 약학적 조성물을 접촉시킴으로써 생물학적 샘플을 처리하는 방법이다.

[0234] 대상체의 상태의 개선시, 본 발명의 화합물, 조성을 또는 조합물의 유지 용량이 필요시 투여될 수 있다. 이후, 투여량 또는 투여 빈도, 또는 이 둘 모두는 증상이 요망되는 수준으로 경감된 경우 개선된 상태가 유지되는 수준까지 증상의 함수에 따라 감소될 수 있으며, 치료는 중단될 것이다. 그러나, 대상체는 질병 증상의 임의의 재발시 장기간에 걸쳐 간헐적 치료를 필요로 할 수 있다. 그러나, 본 발명의 화합물 및 조성물의 전체 일일 사용량은 확실한 의학적 판단의 범위 내에서 담당의에 의해 결정되는 것이 이해될 것이다. 임의의 특정한 환자에 대한 특정한 억제 용량은 치료되는 장애 및 장애의 중증도; 이용되는 특정 화합물의 활성; 이용되는 특정 조성물; 환자의 연령, 체중, 전반적 건강, 성별 및 식이; 이용되는 특정 화합물의 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 속도; 처리 기간; 이용되는 특정 화합물과 조합되거나 이와 동시에 사용되는 약물; 및 의학 분야에 널리 공지된 유사한 요인을 포함하는 다양한 요인에 좌우될 것이다.

약학적 조성물

[0235] 본 발명은 약학적으로 허용되는 담체와 회합된 본 발명의 화합물 및 이의 유도체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 또 다른 예는 상기 기재된 화합물 중 임의의 화합물과 약학적으로 허용되는 담체를 조합시킴으로써 제조된 약학적 조성물이다.

[0236] 본 발명의 약학적 조성물은 활성 성분으로서 본 발명의 적어도 하나의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하며, 이는 또한 약학적으로 허용되는 담체 및 부형제 및 임의로 다른 치료 성분을 함유할 수 있다. "약학적으로 허용되는"은 담체, 희석제, 또는 부형제가 제형의 다른 성분과 상용성이어야 하고, 제형의 부형제에 해롭지 않아야 하는 것을 의미한다. 조성물은 경구, 직장, 국소, 비경구(폐하, 근내, 및 정맥내를 포함함), 눈(안구), 폐(비내 또는 협축 흡입), 또는 비내 투여에 적합한 조성물을 포함하나, 임의의 제공된 경우에서 가장 적합한 경로는 치료되는 질환의 특성 및 중증도 및 활성 성분의 특성에 좌우될 것이다. 이들은 편리하게는 단위 투여 형태로 제공될 수 있고, 약학 분야에 널리 공지된 방법 중 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0237] 실제 용도에서, 본 발명의 화합물은 통상적인 약학적 배합 기술에 따라 약학적 담체와 충분히 혼합된 활성 성분으로 조합될 수 있다. 담체는 투여, 예를 들어, 경구 또는 비경구(정맥내 포함) 투여에 요망되는 제조 형태에 따라 매우 다양한 형태를 취할 수 있다. 경구 투여 형태를 위한 조성물을 제조하는데 있어서, 일반적인 약학적 매질 중 임의의 약학적 매질, 예를 들어, 경구 액체 제조물, 예를 들어, 혼탁액, 엘리서(elixir) 및 용액의 경우에서 물, 글리콜, 오일, 알콜, 착향제, 보존제, 착색제 등; 또는 경구 고체 제조물, 예를 들어, 분말, 경질 및 연질 캡슐 및 정제의 경우에서 담체, 예를 들어, 전분, 당, 미정질 셀룰로스, 희석제, 과립화 작용제, 윤활제, 결합제, 봉해제 등이 이용될 수 있고, 고체 경구 제조물이 액체 제조물에 비해 바람직하다.

[0238] 투여의 용이성으로 인해, 고체 약학적 담체가 명백히 이용되는 경우 정제 및 캡슐이 가장 유리한 경구 투여 단

위 형태이다. 요망되는 경우, 정제는 표준 수성 또는 비-수성 기술에 의해 코팅될 수 있다. 상기 조성물 및 제조물은 적어도 0.1 퍼센트의 활성 화합물을 함유해야 한다. 상기 조성물에서의 활성 화합물의 백분율은 물론 다양할 수 있고, 이는 편리하게는 단위 중량의 약 2 퍼센트 내지 약 60 퍼센트일 수 있다. 상기 치료적으로 유용한 조성물 내의 활성 화합물의 양은 효과적인 투여량이 수득될 양이다. 활성 화합물은 또한, 예를 들어, 액체 점액 또는 분무와 같이 비내 투여될 수 있다.

[0240] 정제, 환약, 캡슐 등은 또한 결합제, 예를 들어, 검 트래거캔쓰(gum tragacanth), 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴; 부형제, 예를 들어, 디칼슘 포스페이트; 봉해제, 예를 들어, 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산; 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트; 및 감미제, 예를 들어, 수크로스, 락토스 또는 사카린을 함유할 수 있다.

[0241] 투여 단위 형태가 캡슐인 경우, 이는 상기 유형의 물질에 더하여 액체 담체, 예를 들어, 지방 오일을 함유할 수 있다. 다양한 다른 물질이 코팅으로서 또는 투여 단위의 물리적 형태를 변형시키기 위해 제공될 수 있다. 예를 들어, 정제는 셀락, 당 또는 둘 모두로 코팅될 수 있다. 시럽 또는 엘릭서는 활성 성분에 더하여 감미제로서 수크로스, 보존제로서 메틸 및 프로필파라벤, 염료 및 착향제, 예를 들어, 체리 또는 오렌지 향을 함유할 수 있다. 분해에 대해 활성 약학 성분을 안정화시키는 다양한 안정화제, 예를 들어, 아미노산 또는 폴리아민이 첨가될 수 있다. 다른 부형제는 PEG 400, 글리신, 비타민 E 유도체, 소르비탄 모노-올레아이트, 키토산, 콜린 시트레이트, 소르비탄 모노스테아레이트, Tween 80, Igepal CA 630, Brij 35, NP-40 및 이들의 유사한 유도체를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0242] 본 발명의 화합물은 또한 비경구 투여될 수 있다. 이들 활성 화합물의 용액 또는 혼탁액은 계면활성제, 예를 들어, 하이드록시-프로필셀룰로스와 적합하게 혼합된 물에서 제조될 수 있다. 분산액은 또한 오일 중 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물에서 제조될 수 있다. 일반적인 저장 및 사용 조건하에서, 이들 제조물은 미생물의 성장을 방지하기 위한 보존제를 함유한다. 주사 용도에 적합한 약학적 형태는 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에서, 형태는 바람직하게는 멸균된 형태이고, 바람직하게는 용이한 주사가능성이 존재하는 정도의 유체이다. 이는 제조 및 저장 조건하에서 안정적이어야 하고, 미생물, 예를 들어, 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜), 이들의 적합한 혼합물, 및 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다.

[0243] 포유동물, 특히 인간에게 치료적으로 효과적인 투여량의 본 발명의 화합물을 제공하기 위해 임의의 적합한 투여 경로가 이용될 수 있다. 용어 화합물의 "투여" 및 화합물을 "투여하는"은 본 발명의 화합물을 이를 필요로 하는 개체에게 제공하는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 투여 경로는, 예를 들어, 경구, 설하, 경첨막, 정맥내, 피하, 비내, 국소, 질내 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0244] 선택된 투여 경로와 관계없이, 적합한 수화된 형태로 사용될 수 있는 화합물(들), 및/또는 본 발명의 약학적 조성물은 당업자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 약학적으로 허용되는 투여 형태로 제형화된다.

[0245] 본 발명의 약학적 조성물 내의 활성 성분의 실제 투여량 수준 및 투여 시간 경과는 환자에게 독성이 없이 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대해 요망되는 치료 반응을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양을 수득하기 위해 다양화될 수 있다. 예시적 용량 범위는 하루 당 체중 킬로그램 당 약 0.1 μ g 내지 20 밀리그램(mg/kg/일)(예를 들어, 0.1 μ g/kg 내지 2mg/kg, 0.3-3 μ g/kg, 0.18-0.54mg/kg)이다. 다른 구체예에서, 상기 양은 약 0.1 mg/kg/일 내지 약 100 mg/kg/일로 다양하다. 또 다른 구체예에서, 상기 양은 약 0.001 μ g 내지 약 100 μ g/kg(예를 들어, 체중의 kg)으로 다양하다. 상기 언급된 값에 대해 중간 범위가 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다.

[0246] 단일, 다수 또는 나누어진 용량으로 대상체에 투여되는 본 발명의 화합물의 전체 일일 억제 용량은, 예를 들어, 0.01 내지 50 mg/kg 체중 또는 더욱 일반적으로 0.1 내지 25 mg/kg 체중의 양일 수 있다.

[0247] 단일 용량 조성물은 일일 용량을 제조하기 위해 상기 양 또는 이의 약수(submultiple)를 함유할 수 있다. 다수 용량은 다양한 시간 간격으로 투여되는 단일 용량일 수 있다. 일반적으로, 본 발명에 따른 치료 요법은 단일 또는 다수 용량으로 하루 당 약 10 mg 내지 약 1000 mg의 본 발명의 화합물(들)을 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0248] 추가로, 본 발명의 화합물은 다수의 전달 경로, 예를 들어, 경구, 정맥내, 설하, 비내, 국소 전달 경로 등에 의해 투여될 수 있다.

[0249] 키트

[0250] 본 발명은 본원에 기재된 질병, 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 키트를 제공한다. 한 구체예에서, 키트는 단위 투여 형태의 유효량의 본 발명의 화합물을 함유하는 치료 또는 예방 조성물을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 화합물은 백신 또는 통상적인 치료제와 조합하여 제공된다. 다른 구체예에서, 키트는 치료 또는 예방 조성물을 함유하는 멸균 용기를 포함하며, 상기 용기는 박스, 앰풀, 병, 바이얼, 튜브, 백, 파우치, 수포-백, 또는 당 분야에 공지된 다른 적합한 용기일 수 있다. 상기 용기는 플라스틱, 유리, 접합가공지, 금속 호일, 또는 약제를 담기에 적합한 다른 물질로 제조될 수 있다.

[0251] 요망시, 본 발명의 화합물은 본원에 기재된 특정 질병, 질환 또는 장애를 갖거나 이들의 위험이 있는 대상체에 화합물을 투여하기 위한 설명서와 함께 제공된다. 설명서는 일반적으로 질병, 질환, 장애, 감염 또는 바이러스의 치료 또는 예방을 위한 조성물의 용도에 관한 정보를 포함할 것이다. 다른 구체예에서, 설명서는 하기 중 적어도 하나를 포함한다: 치료제의 설명; 투여 스케줄 및 허혈 또는 이의 증상의 치료 또는 예방을 위한 투여; 지침; 경고; 적응증; 카운터-인디케이션(counter-indication); 과량투여 정보; 부작용; 동물 약리학; 임상 연구; 및/또는 참고문헌. 설명서는 용기(존재하는 경우) 위에 직접 프린트될 수 있거나, 용기에 적용되는 라벨, 또는 용기 내 또는 용기와 함께 공급되는 별개의 시트, 팜플렛, 카드, 또는 폴더로 존재할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0252] 실시예

[0253] 하기 실시예는 본 발명의 검정, 스크리닝, 및 치료 방법을 제조하고 이용하는 방법의 완전한 개시 및 설명을 당업자에게 제공하기 위해 제공되며, 이는 발명자가 이들의 발명으로 간주하는 것의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.

화합물의 합성

[0255] 본 발명에서 예시적 예로 기재된 뉴클레오티드 유사체의 집중 라이브러리(focused library)를 종전과 같이 합성하였다(17-22). 예시된 집중 라이브러리를 제조하기 위해 고체상 합성 및 용액상 전략 둘 모두를 상보적 방식으로 이용하였다. 상기 방법은 당 핵염기 및 뉴클레오티드간 결합에서 변형을 갖는 라이브러리의 합성에 사용될 수 있다. 본 발명자의 연구소에서의 여러 기술적 혁신은 뉴클레오티드 라이브러리의 합성을 촉진하였다: a) 본 발명자는 고체상 포스포라미다이트 및 H-포스포네이트 기술을 이용한 디뉴클레오티드 라이브러리의 합성을 위한 전략을 이전에 개발하였다(17-22). 본 발명자의 연구소로부터의 최근의 기술 혁신을 또한 디뉴클레오티드 화합물 및 유사체의 고체상 합성을 위해 이용하였다(17-22). (i) 마이크로파-보조 방법을 이용한 아미노-, 및 카르복시-관능화 고체 지지체의 초고속 제조, (ii) 고체 지지체 상의 뉴클레오시드의 로딩을 위한 신규한 방법. 용매로서 디메틸포름아미드(DMF)의 사용을 포함하는 뉴클레오시드-로딩된 지지체의 대규모 제조를 위한 개선된 방법을 개발하였다. 80 내지 300 마이크로몰/g의 지지체의 높은 뉴클레오시드 로딩이 수득된다. (iii) 디뉴클레오티드의 대규모 합성을 촉진하는 고체 지지체의 로딩 및 고체상 합성을 위한 LOTUS®로 언급되는 신규한 반응기. LOTUS®은 반응물의 조절된 전달을 위한 공압 밸브가 장비된 다목적 반응기이다(20-22).

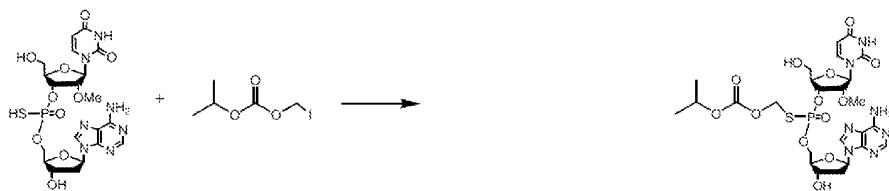
[0256] 실시예 1

[0257] 포스포로티오에이트 유사체 3-dApsU2'-OMe (1)의 Rp,Sp 혼합물을 특별히 제작된 LOTUS 반응기®(Padmanabhan, S.; Coughlin, J. E.; Iyer, R. P. Tetrahedron Lett. 2005, 46, 343; Iyer, R. P.; Coughlin, J. E.; Padmanabhan, S. Org. Prep. Proc. Int'l. 2005, 37, 205)와 함께 고체상 포스포라미다이트 화학(Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. Tetrahedron 1993, 49, 1925)을 이용하여 대규모(1 밀리몰의 뉴클레오시드-로딩된 조절 다공성 유리(CPG) 지지체)로 합성하였다. dA-연결된 CPG 지지체를 본 발명자에 의해 최근에 발견된 초고속 관능화 및 고체 지지체를 위한 로딩 방법을 이용하여 제조하였다. 뉴클레오티드간 디뉴클레오시드 포스파이트 커플링된 생성물의 황화(sulfurization)를 위해, 3H-1,2-벤조디티올-3-온-1,1,-디옥시드(건성 CH3CN 중 0.4 M)의 용액을 이용하였다(Iyer, R. P.; Regan, J. B.; Egan, W.; Beaucage, S. L. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 1253).

[0258] 쳐리, 크로마토그래피 정제, 및 동결건조 후, Rp,Sp 5의 소듐 염(~60:40 혼합물)을 >96% 순도로 수득하였고, 이를 ³¹P 및 ¹H NMR에 의해 특성규명하였다. 따라서, 디뉴클레오티드 화합물 및 유사체의 집중 라이브러리의 고체상 합성을 용이하게 수행하였다. 상보적 전략에서, 화합물 (1)의 합성을 위해 용액상 합성을 또한 이용하였다.

이들 방법은 다양한 화학적 변형을 갖는 화합물의 합성을 가능하게 하였다.

[0259] **실시예 2: 화합물 3의 합성**



5

3

[0260] 표적 화합물 (3)을 2단계로 제조하였다.

[0261] **단계 1. 아이오도메틸이소프로필 카르보네이트의 제조:** 무수 아세토니트릴(20 mL) 중 무수 소듐 아이오다이드(6 g, 40 mmol)의 용액에 무수 아세토니트릴(10 mL) 중 클로로메틸 이소프로필 카르보네이트(2.9 g, 19 mmol)를 20 분에 걸쳐 적가하였다. 알루미늄 호일로 덮인(빛으로부터 보호됨) 반응 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 분리된 고체를 여과시키고, 아세토니트릴로 세척하고, 여과액을 감압하에서 농축시켰다. 잔여물을 물(10 mL)에 용해시키고, 유기물을 에테르(25 mL) 중에서 추출하였다. 에테르 추출물을 소듐 바이설파이트(5%, 10 mL) 및 이후에 염수(10 mL)로 세척하였다. 유기층을 무수 소듐 설페이트 상에서 건조시키고, 여과시키고, 농축시키고, 높은 건조 진공하에서 건조시켰다. 수율 2.72 g (58%); $^1\text{H-NMR}$ δ 1.3 (d, 6H), 4.95 (m, 1H), 5.95 (s, 2H).

[0262] **단계 2. 화합물 5의 알킬화:** 교반 하에서 물(HPLC, 400 mL) 중 디뉴클레오티드 (1)(60 mg, 0.098mmol)의 용액에 아세톤(1 mL) 중 아이오도메틸 이소프로필 카르보네이트(80 mg, 0.0166 mmol, 3.33 eq)의 용액을 첨가하였다. 알킬화제의 오일성 방울의 임의의 분리를 피하기 위해 추가 아세톤(1 mL)을 첨가하여 투명한 용액을 수득하였다. 알루미늄 호일로 덮인 반응 혼합물을 3시간 동안 교반하고, rotavap 조건 및 이후에 고진공에서 농축시켜, 백색 고체로서 반응 혼합물을 수득하였다. 이를 먼저 클로로포름을 이용하고, 천천히 2%로부터 최종적으로 8% 메탄올을 함유하는 클로로포름을 이용하는 실리카 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 주요 성분을 함유하는 분획을 조합하고, 농축시키고, 밤새 고진공하에서 건조시켰다. 요망되는 순수한 생성물 (3)을 거의 정량적 수율로 분리시켰다(68 mg); $^{31}\text{P-NMR}$ (MeOH-d_4) δ 27.7, 28.6.

[0263] **실시예 3: NOD2/RIG-I 리간드로서의 SB 40, SB 44, 및 SB 1B의 발견 및 활성**

[0264] NOD2 활성화에 대한 SMNH 화합물의 평가를 일차, 이차, 및 삼차 검정에 의해 수행하였다. 일차 검정에서, SMNH 화합물을 NOD2를 내인성으로 발현하는 것으로 공지된 HLE A549 세포에서의 IRF3 발현의 유도에 대해서 시험하였다. 도 1-2에 제시된 바와 같이, 디뉴클레오티드 유사체 SB 40, SB 43, SB 44, 및 SB 1B는 IRF3 활성화를 유도하였으나, 디뉴클레오티드 SB 50, SB 110, 및 SB 60과 같은 관련 유사체는 그렇지 않았다. 2개의 이성질체 Rp 및 Sp의 혼합물인 SB 44는 SB 40의 프로드러그이다. SB 1B은 SB 44의 Rp 이성질체이고, 도 1-2에서 SB 44-1로 제시된다.

[0265] IRF3-루시페라제 트랜스펙션된 세포를 DMSO 단독(UT) 또는 SMNH 화합물(μM)과 함께 인큐베이션하였다. 12시간 인큐베이션 후, 제조업체의 프로토콜에 따라 Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)을 이용하여 루시페라제 활성을 측정하였다. 레닐라(renilla) 루시페라제의 발현을 측정함으로써 트랜스펙션 효율을 표준화시켰다. 루시페라제 단위(즉, 유도 배수)를 표준 방법(평균 \pm 표준 편차; 3회의 독립적 실험)에 의해 측정하였다. 결과는 도 1에 제시된다.

[0266] HEK 293 세포를 NOD2, pcDNA 및 IRF3-루시페라제로 트랜스펙션시켰다. 이후, 세포를 ssRNA(0.5 mg/ml) 또는 SMNH 화합물($1\text{ }\mu\text{M}$)과 함께 인큐베이션하였다. 12시간 인큐베이션 후, 루시페라제 활성을 이전에 기재된 바와 같이 측정하였다. 루시페라제 검정 결과는 3회의 독립적 실험(이들 검정에서 이용된 상세한 재료 및 방법은 참고문헌 (28) 참조)으로부터의 평균 \pm S.D.로 제시된다. 결과는 도 2에 제시된다.

[0267] 도 3은 SB 44에 의한 RIG-I 활성화를 제시한다. HEK 293 세포를 RIG-I, pcDNA 및 IRF3-루시페라제로 트랜스펙션시켰다. 이후, 세포를 SB 44 (100 또는 500 nM)와 함께 인큐베이션하였다. 8시간 또는 16시간 인큐베이션 후, 루시페라제 활성을 이전에 기재된 바와 같이 측정하였다. 루시페라제 검정 결과는 3회의 독립적 실험으로

부터의 평균 ± S.D.로 제시된다.

[0269] 도 4는 RIGI 및 Nod2 활성화를 통한 SB 44에 의한 NF- κ B 활성의 유도를 나타낸다. HEK 293 세포를 RIGI, pcDNA, Nod2 및 NF- κ B-루시페라제로 트랜스펙션시켰다. 이후, 세포를 SB 44(10 μ M)와 함께 인큐베이션하였다. 12시간 인큐베이션 후, 루시페라제 활성을 이전에 기재된 바와 같이 측정하였다. 루시페라제 검정 결과는 3회의 독립적 실험으로부터의 평균 ± S.D.로 제시된다.

[0270] 도 5는 SB 44-처리된 인간 폐 상피 세포(HLEC)에서의 활성화된 IRF3(인산화된 IRF3 또는 phospho-IRF3)의 검출을 제시한다. 인간 폐 상피 A549 세포를 DMSO 또는 SB 44(500 nM)와 함께 인큐베이션하였다. 지정된 처리 후 시점에서, 세포 용해질을 인산화된 IRF3(phospho-IRF3)에 특이적인 항체(Cell signaling)를 이용한 웨스턴 블로팅에 적용시켰다.

[0271] 도 6은 SB 44-처리된 인간 폐 상피 세포(HLEC)에서의 활성화된 IRF3(인산화된 IRF3 또는 phospho-IRF3)의 검출을 제시한다. 인간 폐 상피 A549 세포를 DMSO 또는 SB 44(500 nM)와 함께 인큐베이션하였다. 지정된 처리 후 시점에서, 세포 용해질을 인산화된 IRF3(phospho-IRF3)에 특이적인 항체(Cell signaling)를 이용한 웨스턴 블로팅에 적용시켰다.

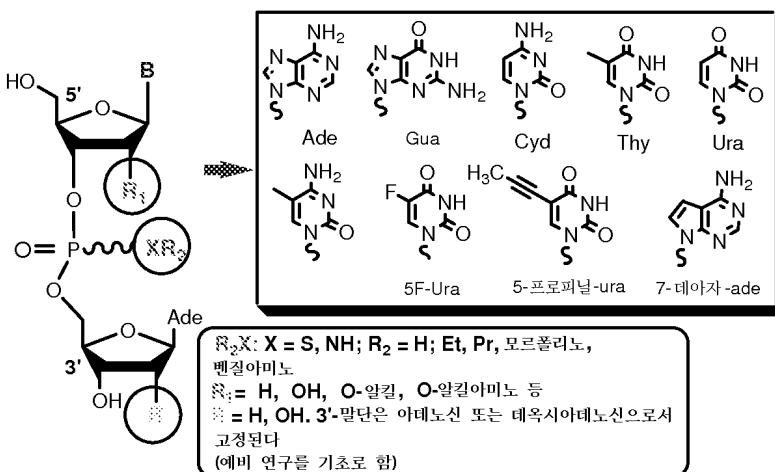
[0272] 추가 시험 결과가 도 7-9에 제시된다.

[0273] 결론 및 논의: 상기 결과를 기초로 하여, BCG 백신과 조합된 화합물 SB 40, SB 44 및 SB 1B를 애쥬번트-유사 활성에 대해 평가하였다. NOD2/RIG-I을 활성화시킨 디뉴클레오티드 화합물 SB 40, SB 44 및 SB 1B는 또한 BCG와 함께 사용되는 경우 시험관 내에서 항원 제시를 향상시키고, MΦ에서 MHC-II를 증가시키고, 마우스의 항-TB T 세포 기능에 있어서 급격한 증가를 야기시키는 것으로 밝혀졌다. 이전에 언급된 바와 같이, SB 44는 2개의 이성질체(Rp, 및 Sp)의 혼합물이고, SB 1B는 혼합물 내에서 약 55-60%를 구성하는 Rp-이성질체이다.

실시예 4: NOD2 및 RIG-I에 대한 최적 리간드의 설계

[0275] NOD2 및 RIG-I에 대한 최적 리간드의 발견을 위해, 예시적 예로서 하기 예제에 제시되는 바와 같은 염기 및 당 변형 둘 모두를 포함하는 추가 화합물의 합성을 위한 최초 리드(lead)로서 디뉴클레오티드 구조 SB 40 및 SB 44를 이용하였다. 포스포라미다이트, 및 H-포스포네이트 화학과 함께 고체상, 및 용액상 합성 전략 둘 모두를 이들의 합성에 이용하였다. 많은 기초 성분은 시판되거나, 사내 합성될 것이다.

[0276] SB 40 및 SB 44와 관련된 화합물의 대표적 예가 하기 제시된다:



[0277] 모든 화합물은 표준 포스포라미다이트, 또는 예비 연구와 유사한 H-포스포네이트 화학을 이용하여 합성될 것이다.

실시예 5: 대식세포 및 마우스를 이용한 BCG 백신과의 애쥬번트로서의 NLR 리간드의 연구

[0278] SB 1B의 애쥬번트 개발을 위한 이론적 설명: 애쥬번트는 MΦ에서 사이토카인 분비를 향상시키는 것으로 공지되어 있으나, T 세포를 활성화시키기 위해 항원을 제시하는 MΦ 및 DC의 능력에 대한 이들의 효과는 공지되어 있지 않다. 마찬가지로, T 세포 기능이 장기간 효능을 위해 조절될 수 있는지의 여부도 또한 명백하지 않다.

BCG는 결핵을 예방하기 위해 사용되는 오늘날 전세계에서 가장 널리 사용되는 백신이다. 이는 결핵에 대해 아동을 보호하나, 성인 TB에 대해서는 제한된 효능을 갖는데, 이는 아마 장기간 효능의 결핍 때문일 것이다. 본 섹션에서, 본 발명자는 SB 1A 및 SB 1B가 BCG 백신으로 감염되는 경우에 MΦ 기능을 향상시키고, 이들이 마우스에 제공되는 경우에 일차 백신 및 결핵의 재감염에 대해 보호하는 잠재성을 갖는 부스터 백신 둘 모두로서 BCG의 활성을 부스팅시키는 것을 입증한다.

[0280] C57B1/6 마우스 골수 유래 대식세포(MΦ)를 4시간 동안 10 μ g/웰의 SMNH 화합물 1-4 및 LPS 양성 대조군(1 μ g/mL)으로 처리한 후, 4시간 동안 미코박테리움 소 바실러스 칼메트 구에린(BCG) 박테리아로 감염시켰다. 항원-85B 애피토프에 특이적인 BB7 T 세포를 오버레이(overlay)시키고, 18시간 후에 수거된 상층액을 샌드위치 ELISA(p 값, t 검정)를 이용하여 IL-2에 대해 시험하였다.

[0281] 도 10(a-d)는 하기를 제시한다: a) 가장 활성인 SB 화합물의 최초 스크리닝은 공지된 TLR4 효능제인 LPS와 함께 SB 1(NOD2 효능제) 및 SB 3 및 SB 44(SB 1과 관련된 디뉴클레오티드)를 평가하였다. a) SB 1 및 2는 항원 제시를 향상시켰고; b) SB 1A(SB 44) 및 SB 1B(SB 1B, SB 44의 Rp-이성질체)를 SB 2 및 LPS와 비교하였다. SB 44의 Rp-이성질체(SB 1B)는 완전한 활성을 보유하며; c) 2시간 동안 각각 5 μ M의 신호전달 분자(AP-1, CREB, 및 MAPK(p38, ERK1/2 및 JNK)의 억제제로 MΦ를 처리한 후, 2시간 동안 SB 화합물로 활성화시키고, 2시간 동안 BCG로 감염시켰다. MΦ를 고정시키고, 흐름세포측정법을 이용하여 표면 MHC-II에 대해 분석하였다. SB 1A는 MAPK 또는 AP-1/CREB의 차단에 의해 억제되는 MHC-II의 표면 발현을 향상시킨다(BCG와의 SB 1A 조합에 비해 $>0.5 \log 10$ 전환). SB 1B는 유사한 활성을 가졌고(제시하지 않음); d) MAPK 또는 AP1/CREB의 억제제는 MHC-II에 대해 단독으로 효과가 없다.

[0282] 실시예 6: NOD2-RIG-I 활성화 SB 1A 및 IB 화합물은 실험적 에어로졸-유도 결핵에 대한 BCG 백신의 효능을 향상시킨다.

[0283] 마우스에서의 백신 실험 설계: C57B1/6 마우스를 BCG 단독 또는 SB 1A, SB 1B 및 MDP와 혼합된 BCG로 예방접종 시켰고, 이후 4주 후에 M. 튜베르콜로시스를 이용하여 에어로졸 공격하였다. 마우스를 보호(Mtb의 CFU 수에서의 감소)의 평가를 위해 4주 후에 희생시켰다. 비장 및 폐의 T 세포의 표현형 및 기능을 흐름세포측정법을 이용하여 측정하였다, 도 11(a).

[0284] 도 11(b)는 SB 1A 및 SB 1B가 폐의 Mtb 수를 감소시키는데 있어서 BCG 또는 MDP+BCG보다 나은 효능 있는 애주변 트인 것을 나타낸다(2원 배치 분산분석에 의한 p 값). 막대 상의 수는 \log_{10} 박테리아 로드를 나타낸다(MDP vs. SB 1A/SB 1B + BCG; p <0.02). SB 1A 및 SB 1B는 또한 비정의 Mtb 수를 감소시키는데 있어서 BCG 백신보다 낫다. SB 1B는 BCG 백신에 비해 다기능성 T 세포의 수를 향상시키나, SB 1A 및 SB 1B 둘 모두는 동등한 수준의 사합체 특이적 CD8 T 세포를 유도한다(도 11 (c-d)).

[0285] SB 1A는 BCG 백신보다 나은 기억 전구체 T 세포(MPEC)를 유도한다(도 11e). 하기 예시된 히스토그램은 비장에서의 기억 마커를 발현하는 T 세포 집단의 흐름세포측정 분석을 제시한다.

[0286] C57B1/6 마우스 골수 유래 일차 대식세포에 4시간 동안 SB 1A 또는 SB 1B 단독, MDP 단독 또는 이들을 표시된 바와 같이 조합하여 처리하였다. 4시간 동안 감염을 위해 BCG를 이용하였고, 18시간 후에 상층액을 수거하였고, ELISA를 이용하여 성숙 IL1 β 에 대해 적정하였다. 대식세포를 먼저 카스파제 차단을 위해 ZVAD-fmk(2시간)로 처리한 후, SB 1A 및 SB 1B로 활성화(4시간)시키고, BCG 감염(4시간)시켰다. 사이토카인을 18시간 이후에 측정하였다. 결과가 도 12(aa-bb)에 제시되며, 이는 NOD2-활성화 화합물 SB 1A 및 SB 1B가 대식세포에서의 카스파제-의존성 메커니즘을 통해 MDP 또는 온전한 BCG 바실러스와 조합되는 경우에만 IL-1 β 를 유도하는 것을 나타낸다.

[0287] BCG 백신과의 NOD2-활성화 SB 1A/1B 조합은 마우스에서 결핵의 재공격에 대한 보호를 유도하며, 이는 장기간 보호를 암시한다. BCG 백신은 TB를 예방하기 위해 사용되는 유일하게 승인된 백신이나, 이는 마우스에서 에어로졸 유도된 TB에 대해 보호가 약하며, 불량한 중심 기억을 유도한다(29). 이는 BCG가 MPEC를 유도하지 못함으로 인한 것으로 생각된다. SB 화합물이 상승된 MPEC를 유도한 것으로 밝혀졌다(도 11(e) 참조). 그러나, 중심 기억을 발생시키는 MPEC는 마우스에서 적은 수로 존재하며, 이들의 기능은 효과기 CD8 T 세포로의 이들의 강한 회상 확장에 의해서만 확인될 수 있다.

[0288] 따라서, SB 1A 및 SB 1B 유도 MPEC가 마우스에서 강한 효과기 T 세포로 재생시킴으로써 장기간 보호를 가능케 할 수 있음을 확인하기 위해 새로운 모델을 개발하였다. 상기 모델은 도 14에 제시되며, 여기서 일차 예방접종 및 공격 후, Mtb 뿐만 아니라 백신은 약물 요법을 통해 청소되어 MPEC를 휴지시킨다. 이후, 마우스는 보호의

평가를 위해 독성 *Mtb*로 재공격된다.

[0289] C57B1/6 마우스를 예방접종하고, 공격하고, 3주 동안 이소니아지드(isoniazid) 및 리팜핀을 이용하여 백신 및 *Mtb* 유기체를 청소시킨 후, 휴지시키고, 에어로졸 용량의 독성 *Mtb*로 재공격하였다. 4주 후, 그룹 당 3 마리의 독립된 마우스로부터의 폐 및 비장의 CFU 수 및 T 세포 분석을 통해 보호를 평가하였다. 가장 중요하게는, BCG 와의 SB 1B (SB 1B) 조합물은 일차 및 이차 재공격 후에 둘 모두에서 BCG보다 2배 더 낫게 보호한다(2원 배치 분산분석에 의한 p 값; 시점 당 그룹 당 5마리의 마우스).

[0290] 도 15(a-b)는 BCG 백신과의 SB 1A 또는 SB 1B 조합물이 결핵을 이용한 재공격에 대해 더 나은 회상 반응을 발생시키는 능력을 보유하는 것을 나타낸다.

[0291] 재공격 후(16주)에 도 11에 제시된 마우스의 폐를 흐름세포측정법을 이용하여 CD8 T 세포에 대해 분석하였다. 히스토그램 예는 CD8 T 세포에 대한 사합체 염색을 나타낸다. 기능성 T 세포를 측정하기 위해 사합체 + IFN γ 균주를 이용하였고, 폐에서의 결핵에 대한 기억 CD8 T 세포를 측정하기 위해 사합체 + CD44 균주를 이용하였다 (도 16 a-b).

[0292] 데이터는 예방접종된 마우스의 폐가 동등한 수의 퍼포린(perforin) + 그랜자임(granzyme)을 발현하는 기능성 CD8 T 세포 및 CD62L + CD44+ 중심 기억 T 세포를 함유하는 것을 나타낸다(도 16 c-d). 그러나, 폐는 기억 마커 CD62L 및 CD44를 또한 발현하는 상승된 수준의 사합체 + IFN γ CD8 T 세포를 함유한다. 이는 SB 1A 및 SB 1B가 결핵의 더 긴 기간의 억제에 중요한 항원 특이적 기억 T 세포의 규모를 부스팅시키는 것을 암시한다.

[0293] 요컨대, 마우스를 이용한 3개의 독립된 연구는 BCG 백신과의 SMNH 조합물이 결핵을 이용한 일차 공격 및 이차 공격 둘 모두에 대한 보호를 향상시키는 것을 이미 나타낸다.

실시예 7: SB 44의 전임상 연구

[0295] SB 44 및 SB 40을 이용하여 다수의 전임상 연구를 수행하였고, 이들 연구는 리드(lead) 애쥬번트 후보 SB 1B를 이용한 결과의 예시이다.

[0296] BCG를 이용한 연구에 의해 예시되는 바와 같이, SB 44 및 SB 40의 작용 메커니즘은 "외래" 핵산의 존재하에서의 RIG-I 및 NOD2의 유도 및 활성화를 포함한다. 대부분의 외래 핵산은 RIG-I 및 NOD2에 의해 "외래"인 것으로서의 이들 핵산의 선택적 인지의 기초를 형성하는 이들 구조 내의 서명 패턴(PAMP, 병원체-관련 분자 패턴)을 갖는다. 작용 메커니즘에서의 이들 독특한 선택성을 예시하기 위해, 여러 시험관내 연구가 수행되었고, 하기 요약된다:

[0297] 1). SB 40 및 SB 44를 28개의 사이토카인, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1a, IL-1b, IL-IRA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17A, TNF α , TNF β , G-CSF, GM-CSF IL-8, MCP-1, 에오팩신(Eotaxin), MIP-1 α , MIP-1 β , 및 RANTES에 대한 다중 검정을 수행함으로써 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에서 사이토카인을 유도하는 이들의 능력에 대해 평가하였다. 상기 화합물은 인간 PBMC 배양물에서 50 μ M까지 사이토카인 유도를 야기시키지 않았다.

[0298] 2). SB 40 및 SB 44가 박테리아 핵산의 존재하에서 세포에서 IFN의 생성을 증가시키는지의 여부를 평가하기 위해, PBMC에 BCG 단독 및 25 μ M의 SB 44 또는 SB 40을 갖는 BCG를 이용하여 처리하였다. BCG를 박테리아 핵산의 공급원으로 사용하였다. PBMC를 화합물 단독 또는 BCG 및 수거된 상층액의 존재하에서 화합물과 함께 24시간 동안 인큐베이션하였다. IFN 수준을 ELISA를 이용하여 결정하였다. 화합물은 BCG의 존재하에서 IFN 생성의 소폭 증가를 야기시켰다(BCG는 동일 실험으로부터 다른 사이토카인, 예를 들어, IL-1, 6, 8, 10 및 TNF- α 를 유도하였다).

[0299] 3). 외인성 RIG-I 및 NOD2 발현이 ISG56 루시페라제 리포터를 이용하여 수용체-결핍 세포에서 유도될 수 있는지의 여부를 결정하기 위해 실험을 수행하였다. 이를 위해, PolyI-PolyC를 양성 대조군으로 이용하였다. 이들 세포에서의 SB 40 및 SB 44의 첨가는 RIG-I 및 NOD2의 활성화로 인해 PolyI-PolyC에 의해 유도된 것에 비해 ISG-56 발현의 소폭의 2배 향상을 야기시켰다.

[0300] 결과는 SB 40 및 SB 44에 의한 IFN의 유도(NOD2/RIG-I 신호전달 캐스케이드를 통해 매개됨)가 외래 핵산의 존재 하에서 발생할 수 있음을 입증한다. 그러므로, 이들 화합물은 "사이토카인 폭풍" 및 관련된 전신 독성을 발생시키는 면역 경로의 비특이적 자극을 야기시킬 잠재성이 덜하다. 이들 작용 메커니즘 관찰은 BCG를 이용한 SB 44의 애쥬번트 활성화 일치하며, 이는 이의 이성질체에도 또한 적용된다.

[0301] **실시예 8: 인간 간으로부터의 S9 분획에서의 SB 44의 대사**

SB 44($10 \mu\text{M}$)를 S9 분획(인간으로부터 풀링됨)(1 mg/ml), NADPH(1.3 mM), UDPGA(5 mM), 1 ml 의 $1 \times \text{PBS}$ 완충액 중 알라메티신(Alamethicin)($10 \mu\text{g/ml}$), S-(5'-아데노실)-L-메티오닌 아이오다이드(0.1 mM), 아데노신 3'-포스페이트 5'-포스포설페이트 리튬 염 하이드레이트(0.1 mM) 및 아세틸 CoA(1 mM)를 함유하는 혼합물과 함께 인큐베이션하였다. 대사물 샘플을 HPLC 및 LC/MS 분석에 의해 평가하였다.

8시간 이하 동안 간 미세소체로의 프로드러그 Rp , Sp -SB 44의 노출은 디뉴클레오티드 Rp , Sp -SB 40으로의 이의 임체특이적 전환을 발생시켰다. 미세소체 인큐베이트의 LC/MS 평가는 대사의 주요 생성물(들)이 Rp , Sp -디뉴클레오티드 SB 40인 것을 나타내었다. MS 분석의 의해 결정시 소량의 탈황된 생성물($< 5\%$)이 또한 검출되었다. 몇몇 소량의 대사물($< 10\%$)이 또한 관찰되었다. 그러나, 이들 대사물의 정체는 분자 이온을 기초로하여 확실하게 확립될 수 없었다. 모든 경우에서, 미세소체 대사에서, 프로드러그 SB 44의 Rp - 및 Sp 이성질체 둘 모두는 활성 SB 40으로의 임체특이적 전환을 겪었고, 단지 소량의 탈황된 생성물[SB 40에 해당함]이 관찰되었다. SB 44의 개별적 Rp - 및 Sp -이성질체의 SB 40의 Rp - 및 Sp -이성질체로의 각각의 전환에서 유의한 속도 차이는 없었다.

SB 44의 SB 40으로의 혈청-매개 전환과 유사하게, 미세소체의 경우에서, 간 에스테라제는 SB 44의 SB 40으로의 가수분해 전환과 관련된 주요 대사 효소인 것으로 보인다. 혈청을 이용한 Rp -, Sp -SB 44의 초기 생물가역성 (bioreversibility) 연구에서, 개별적 이성질체는 거의 동일한 속도로 Rp -SB 44, Sp -SB 40으로 임체특이적으로 전환되었다. 간 및 혈장에서의 SB 44의 SB 40으로의 용이한 생물전환은 또한 편재성 에스테라제 효소의 광범위한 기질 특이성과 일치한다.

[0305] **실시예 9: S9 분획에 의한 SB 44의 시험관내 대사**

정제된 인간 간 미세소체 연구와 유사하게, 인간 간 S9 분획에 대한 프로드러그 SB 44의 노출은 SB 44의 디뉴클레오티드 SB 40으로의 임체특이적 전환을 발생시켰다. LC/MS에 의한 인큐베이트의 평가는 주요 생성물 SB 40에 더하여, SB 40에 해당하는 소량의 탈황된 생성물($< 5\%$)이 또한 형성된 것을 나타내었다. 몇몇 소량의 대사물이 또한 관찰되었다. S9 분획을 갖는 대사물의 폐단은 정제된 간 미세소체로 관찰된 것과 유사하였다. 따라서, SB 44의 임의의 단계 II 칸쥬케이션 반응 또는 최초로 형성된 활성 대사물 SB 40의 명백한 증거가 없다.

[0307] **실시예 10: SB 44의 시험관내 전임상 독성학 연구**

SB 44를 이들의 CC_{50} 을 결정하기 위해 매딘-다비 소 신장(Madin-Darby bovine kidney)(MDBK), Vero, 및 HFF(인간 포피 섬유모세포)를 포함하는 세포주 폐널에 대한 세포독성 평가에 적용시켰다. 표준 미세배양 테트라졸륨 검정(MTT) 검정을 MDBK, Vero, 및 HFF 세포주(미국 미생물 보존센터로부터 수득함)를 이용하여 96-웰 플레이트에서 수행하였다. 대조군은 뉴클레오시드 유사체 3TC, AZT, 및 ddC, 뿐만 아니라 약물이 없는 배지를 포함하였다. SDS를 양성 세포독성 대조군으로 이용하였다. 모든 프로드러그를 100 , 300 , 및 $1000 \mu\text{M}$ 의 농도에서 삼중으로 시험하였다. 세포와 시험 물질의 24시간의 인큐베이션 후, MTT 검정을 수행하였다.

화합물	Vero $CC_{50}, \mu\text{M}$	MDBK, $CC_{50}, \mu\text{M}$	HFF, $CC_{50}, \mu\text{M}$
SB 44	>1000	>1000	>1000

[0309] [0310] SB 40의 CC_{50} 은 $>1000 \mu\text{M}$ 이었다.

[0311] **실시예 11: SB 44의 박테리아 돌연변이 시험(스크리닝 형태)**

[0312] 본 연구의 목적은 박테리아 돌연변이 시험의 스크리닝(비-GLP) 형태를 이용하여 시험 항목의 유전독성 (genotoxicity)을 평가하는 것이었다.

[0313] 연구 계획: 시험을 단지 때때로 수행하였다. 표준 시험자 균주(목록 균주)의 서브셋을 시험 항목의 유전독성 잠재성을 평가하기 위해 이용하였다.

[0314] 시험 항목을 디메틸 살포시드(DMSO) 중에 포뮬레이션시키고, 박테리아 돌연변이 시험의 인큐베이션 전 형태를 이용하여 대략 반-로그(half-log) 희석과 함께 $5000 \mu\text{g}/\text{플레이트}$ (본 검정을 위한 표준 제한 용량)의 최대 농도에서 시험하였다. 무균 확인 플레이트 상에서의 콜로니의 부재로 미생물 오염의 부재를 확인하였다. 비히를 대조군에 대한 평균 복귀돌연변이주 콜로니 수는 실험실 과거 대조군 데이터에 근접하거나, 이의 범위 내였다. 적절한 양성 대조군 화합물(+/- S9 혼합물)은 적절한 박테리아 균주를 이용한 동시 비히를 대조군 수준(균주 TA 100에 대해 1.5X)의 적어도 2배의 복귀돌연변이주 콜로니 수에서의 증가를 유도하였으며, 이는 시험 시스템의

민감성 및 S9 혼합물의 활성을 입증한다. 비-복귀돌연변이주 박테리아의 백그라운드 론(background lawn)의 가시적인 터닝(thinning)이 SB 44에 대한 노출 후에 수득되지 않았으며, 이는 시험 항목이 시험된 수준에서 박테리아에 비독성이었음을 나타낸다. 침전이 관찰되지 않았다.

[0315] 복귀돌연변이주 콜로니 수에서의 실질적 증가가 S9 혼합물의 부재 또는 존재하에서 시험 항목에 대한 노출 후에 어떠한 균주에서도 수득되지 않았다. 따라서, SB 44는 본 시험관내 돌연변이유발성 검정에서 유전독성 활성의 어떠한 증거도 나타내지 않은 것으로 결론 내려진다.

[0316] **실시예 12: 시험관내 심장혈관 안전성 검정(hERG 시험)**

[0317] 본 연구의 목적은 hERG(인간 에테르-에이-고-고-관련 유전자(ether-a-go-go-related gene)) 포타슘 채널 전류(신속하게 활성화되는 자연 정류 심장 포타슘 전류인 IKr에 대한 대용물)에 대한 SB 40 및 SB 44의 시험관내 효과를 시험하는 것이었다.

[0318] 본 연구에서, hERG 채널을 내인성 IKr이 결핍된 인간 배아 신장(HEK293) 세포주에서 발현시켰다. HEK293 세포를 hERG cDNA로 안정적으로 트랜스펙션시키고, 자동 병행 패치 클램프 시스템인 QPatch HT[®]을 이용하여 실온에서 평가를 수행하였다. 각각의 시험 항목을 10, 50, 100 및 200 μ M에서 평가하였고, 각각의 농도를 3개의 세포(n = 3)에서 시험하였다. 각각의 시험 항목 농도에 대한 노출 기간은 3분이었다.

[0319] 둘 모두의 시험 항목에 대한 IC₅₀ 값은 결정될 수 없었는데, 이는 시험된 가장 높은 농도에 의한 hERG 전류의 억제가 50% 미만이었기 때문이다. 양성 대조군 E-4031은 hERG 억제에 대한 시험 시스템의 민감성을 입증한다.

[0320] 결론으로서, SB 40 및 SB 44는 hERG 검정에서 어떠한 활성도 나타내지 않으며, IC₅₀은 > 200 μ M이다.

[0321] **실시예 13: SB 44의 생체내 전임상 독성학 연구**

[0322] SB 44는 2개의 부분입체 이성질체(Rp, Sp)의 혼합물이며, 여기서 SB 1B는 혼합물 내에 55-60%의 정도로 존재하는 Rp-이성질체이다. 다수의 전임상 연구를 위한 영양법에 의해 투여되는 SB 44를 이용하여 수행하였으며, 연구 결과는 SB 1B가 단독으로 사용되는 경우의 가능한 결과의 예시이다. 연구는 SB 1B를 이용한 전임상 연구에 확실하게 기초하였는데, 이는 분석 및 생물분석 방법, 독성학 연구를 위한 제형, 독성학 프로토콜 등이 SB 1B로 전해질 수 있기 때문이다.

[0323] **실시예 14: 스프라그-돌리(Sprague-Dawley) 래트에서의 SB 44의 용량 범위-발견 연구**

[0324] 본 연구의 목적은 잠재적 독성 효과를 결정하고, 잠재적 독성 표적 기관을 확인하고, 성체 수컷 및 암컷 스프라그-돌리 래트로의 연속 7일 동안 SB 44의 매일 위관영양법 후에 시험된 최대 내성 용량(MTD) 및 종점에 대한 독성을 나타내지 않는 최대 용량(no observable adverse effect level)(NOAEL)을 결정하기 위한 것이었다. 본 연구로부터의 정보를 이후의 독성학 연구를 설계하고, 제안된 인간 용량의 적합성을 결정하기 위해 이용하였다. 본 연구는 단계 A 및 단계 B로 구성되었다. 단계 A는 용량 범위-발견 연구였다. 2마리의 래트(1마리의 수컷 및 1마리의 암컷)를 본 연구에 포함시켰다. 동물에 위관영양법(po)에 의해 1000 mg/kg의 단일 용량의 SB 44를 제공하였고, 3일 동안 관찰하였다. 둘 모두의 동물은 예상된 체중 증가를 가졌고, 이들의 예정된 희생 때까지 연구 전체에 걸쳐 정상으로 보였다. 부검을 수행하지 않았다.

[0325] 단계 B에서, 래트(3/성별/그룹)에 연속 7일 동안 50, 250, 및 1000 mg/kg/일의 매일 경구 용량의 SB 44를 제공하였다. 대조군 그룹(3/성별)에 또한 7일 동안 동일한 부피로 매일 경구 용량의 비히클, 50% PEG 400 + 50% HPMCT(멸균수 중 0.1% 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 및 0.2% Tween 80)를 제공하였다. 동물을 8일에 희생시켰다. 하기 파라미터를 평가하였다: 사망률/이환률, 임상적 관찰, 체중, 임상 병리학(혈액학 및 혈청 화학), 기관 중량, 및 부검시, 간 조직에 대한 육안 관찰 및 현미경적 조직병리학.

[0326] 단계 B의 모든 동물은 이들의 예정된 부검 때까지 생존하였다. 용량 투여 후 다양한 일에서 저 용량 그룹의 수컷을 제외하고는 "쇼벨링(shoveling)"의 용량-의존적 패턴이 처리된 그룹의 모든 동물에서 인지되었다. 신경학적 기능과 관련된 다른 유해한 징후 또는 다른 독성학 파라미터가 없었으므로, 상기 관찰은 래트가 시험 항목의 맛 및/또는 질감을 불쾌한 것으로 감지한 것을 나타낼 가능성이 높다. 체중, 임상 병리학, 기관 중량, 및 육안 및 현미경적 평가에 대해 다른 약물-관련 효과가 발견되지 않았다. 결론으로서, 연속 7일 동안 수컷 및 암컷 스프라그-돌리 래트로의 SB 44의 매일 위관영양법 투여는 명백한 생물학적 또는 독성학적으로 유의한 유해 효과를 발생시키지 않았다. SB 44가 연속 7일 동안 매일 경구 투여에 의해 제공되는 경우 NOAEL은 적어도 1000 mg/kg/일인 것으로 간주된다.

[0327] **실시예 15: 2주 회복 기간 및 골수 소핵 평가를 이용한 래트에서의 SB 44의 14일의 독성 연구**

본 연구의 목적은 14일 동안의 매일 경구 용량 투여 후의 SB 44의 잠재적 독성 효과를 결정하고, 소핵 평가에 의해 결정되는 바와 같은 SB 44의 유전독성을 평가하기 위한 것이었다. 수컷 및 암컷 스프라그-돌리 래트에 연속 14일 동안 50, 200 및 500 mg/kg/일 용량의 SB 44를 매일 투여하였다. 독성동태(TK) 평가의 목적을 위해 위성 그룹을 유사하게 처리하였고, SB 44의 활성 대사물인 SB 40의 수준에 대해 혈장을 분석하였다. SB 44의 잠재적 유전독성을 결정하기 위해 소핵 평가를 수행하였다. 주요 연구 그룹의 래트에 대해 15일 및 회복 그룹의 래트에 대해 28일에 부검을 수행하였다.

모든 동물은 연구 종료까지 생존하였고, 임상 관찰, 임상 병리학, 체중, 소변 파라미터, 부검 및 기관 중량에 의해 결정시 SB 44는 명백한 독성을 야기시키지 않았다. 그럼에도 불구하고, 조직의 혈미경적 평가는 시험 항목과 관련된 흉선에서 변화를 나타내었다. 증가된 흉선 림프구 파괴를 나타내는 흉선 식세포성 대식세포의 경미한 증가가 200 및 500 mg/kg/일의 수컷 및 암컷 둘 모두에서 관찰되었다. 흉선에서의 이러한 변화는 주요 및 회복 그룹 둘 모두에 존재하였으나, 흉선 위축 또는 증가된 흉선 퇴화의 어떠한 조직병리학적 증거와도 관련되지 않았다. 다른 기관에서 증가된 림프구 파괴의 증거가 존재하지 않았다. 이러한 관찰은 GI-스트레스 관련일 수 있고, 따라서 제한적인 독성학적 유의성으로 간주된다. 본 연구의 소핵 검정 부분에서, SB 44는 래트 골수 적혈구에서 소핵을 유도하는 것으로 밝혀지지 않았다.

[0329] **실시예 16: 독성동태 분석**

경구 투여 후의 최대 혈장 농도(C_{max}) 및 마지막 샘플링 시점까지의 혈장 농도 시간 곡선하 영역(AUC_{last})만이 보고되었는데, 이는 샘플의 대부분이 LLOQ 또는 LLOQ 근처의 SB 40 혈장 농도를 가져, 모든 TK 파라미터의 결정을 불확실하게 만들었기 때문이다. 1일 및 14일 둘 모두에 수컷 및 암컷 래트에서 C_{max} 및 AUC_{last} 에 대한 비선형 용량 상관관계가 있었다. 가장 높은 전신 노출이 14일에 수컷 및 암컷 둘 모두에 대해 가장 높은 용량(500 mg/kg)에서 측정되었고, SB 40에 대한 14일의 C_{max} 및 AUC_{last} 값은 투여된 각각의 용량에 대해 1일에서의 값보다 높았다. 14일에 대한 SB 44의 매일 투여 후의 SB 40의 상기 축적은 다시 혈장으로의 느린 방출과 조합된 간으로의 유의한 분포에 의해 야기될 수 있다. 암컷은 일반적으로 수컷보다 큰 전신 노출을 가졌고, 가장 큰 차이는 500 mg/kg 용량 그룹에서 14일에서 약 2배였다. 흉선에서의 혈미경적 발견 및 SB 44의 이들 효과로부터의 회복 증거의 부재를 기초로 하여, 본 연구에서 최대무작용량(no observed effect level)(NOEL)은 50 mg/kg/일인 것으로 결정되었다.

[0330] **실시예 17: 시노몰구스 원숭이에서의 SB 44의 용량 범위-발견 연구**

본 연구의 목적은 시노몰구스 원숭이로의 연속 4일 동안의 SB 44의 매일의 위관영양법 후에 시험된 종점에 대한 최대 내성 용량(MTD) 및 독성을 나타내지 않는 최대 용량(NOAEL)을 결정하는 것이었다. 이러한 연구로부터의 정보를 이후의 용량-범위 독성 연구를 설계하고, 제안된 인간 용량의 적합성을 결정하기 위해 이용하였다.

SB 44를 500 mg/kg/일에서 4일 동안 연속적으로 시노몰구스 원숭이에 경구 투여하였다. 이러한 용량은 임상성으로 잘 용인되었으나, 약 2배의 ALT 및 약 6배의 AST의 상승을 수반하였으며, 이는 처리 중지 약 1주일 후에 기준선으로 복귀하였다. 모든 혈액학적 파라미터는 정상으로 보였고, 다른 명백한 독성의 증거는 없었다.

결론: 상기 언급된 바와 같이, SB 44는 2개의 이성질체(Rp , Sp)의 혼합물이며, 여기서 SB 1B는 55% 초과로 존재하는 Rp -이성질체이다. SB 1B는 마우스에서 단기 일차 및 장기 *Mtb* 공격 실험에서 SB 44보다 애쥬번트로서 더 효과적인 것으로 보인다. 또한, 애쥬번트로서의 SB 44의 이차 이성질체(Sp -이성질체)의 효능에 대해 많이 공지되어 있지 않다. SB 44를 이용하여 다수의 전임상 연구를 수행하였다. 연구 결과는 SB 44에 의해 대표되는 디뉴클레오티드 조성물에 대한 우수한 안정성을 나타낸다. 결과로서, 피하 투여된 SB 1B에 대한 우수한 안전성 프로파일이 예상된다.

[0331] **실시예 18: BCG 및 화합물로 처리된 PBMC에서의 인터페론의 유도.**

본 검정을 위해, PBMC를 24웰 플레이트에서 ml 당 백만개의 세포로 플레이팅하였다. 플레이트의 그룹에 BCG, BCG + 화합물을 처리하고, 24시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 용해시키고, 상층액을 수거하였다. 사이토카인 및 타입 I 인터페론의 생성을 표준 키트를 이용한 ELISA 검정을 이용하여 평가하였다. BCG는 동일 실험으로부터 다른 사이토카인(IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 및 TNF)을 유도하였다. BCG 및 화합물로 처리된 세포는 BCG 단독에 비해 IFN의 증가된 생성을 유도하였다. 결과는 도 17에 제공된다.

- [0338] BCG는 동일 실험으로부터 다른 사이토카인(IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 및 TNF)을 유도하였다. BCG 및 화합물로 처리된 세포는 BCG 단독에 비해 IFN의 증가된 생성을 유도하였다.
- [0339] 요컨대, 본 발명에서 청구된 화합물은 세포내 미생물 센서의 활성제로 작용하며, 면역 반응의 활성화를 야기시킨다. 백신과 함께 사용되는 경우, 화합물은 애쥬번트로 작용하였고, 백신에 의해 유도된 면역 반응을 강화시킨다.
- [0340] **실시예 19. 시험관내 세포독성 연구**
- [0341] 간, 신장, 골수 및 미토콘드리아 독성을 예측하는 세포주의 패널(사내)을 이용한 리드(들)의 시험관내 세포독성 연구.
- [0342] 화합물 1 및 3은 다수의 세포주에서 $CC_{50} > 1000$ 마이크로몰로 우수한 안전성 프로파일을 갖는다. 96-웰 플레이트 판독기(ThermoMax, Molecular devices), 및 MDBK, Vero, 및 HFF 세포주(ATCC로부터 수득됨)와 함께 Promega CellTiter96 비-방사능 세포 증식 검정 키트를 이용하여 96-웰 플레이트에서 표준 MTT 검정을 수행하였다. 뉴클레오시드 유사체 3TC, AZT, 및 ddC, 뿐만 아니라, 약물이 없는 배지를 포함하는 여러 대조군을 이용하였다. SDS를 양성 세포독성 대조군으로 이용하였다. 화합물을 100, 300, 및 1000 μM 의 농도로 삼중으로 시험하였다. 시험 물질과 함께 세포의 24시간의 인큐베이션 후, MTT 검정을 수행하였다. 모든 시험된 화합물은 화합물에 대한 높은 안전성 지표를 나타내는 $CC_{50} > 1000$ 마이크로몰을 나타내었다.
- [0343] **인용된 참고문헌**
1. (a) WHO REPORT: Global prevalence of hepatitis A, B, C. *Weekly Epidemiological Record*, Vol 77, 6, 2002; (b) Delwaide, J., Gerard, C. *Evidence-based medicine treatment of chronic hepatitis C. Liege study Group on Viral hepatitis. Revue medicale de Liege* 55, 337, 2000.
 2. (a) Sorrell, M. F., Belongia, E. A., Costa, J., Gareen, I. F., Grem, J. L., Inadomi, J. M., Kern, E. R., McHugh, J. A., Peterson, G. M., Rein, M. F., Strader, D. B., Trotter, H. T. *National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of Hepatitis B. Ann. Int. Med.* 150, 204, 2009.
 - (b) Wild, C. P., Hall, A. J. *Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. Mutation Res.* 462, 381, 2000. Liang, T. J., Rehmann, B., Seeff, L. B., Hoofnagle, J. H. *Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. Ann. Intern. Med.* 132, 296, 2000.
 3. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. Pathogen recognition and Innate immunity. *Cell*, 24, 783-801, 2006.
 4. Katze, M. G., He, Y., Gale, M. Viruses and interferon: A fight for supremacy. *Nature Reviews*, 2, 675, Sept 2002.
 5. Takeda, K., Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17, 1-14, 2005.
 6. Saito, T., Hirai, R., Loo, Y-M., Owen, D., Johnson, C. L., Sinha, S. C., Akira, S., Fujita, T., Gale, M. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10, No. 2, 582-587, 2007.
 7. Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., Tschoopp, J. Cardif is an acceptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, 437, 1167-1172, 2005.
 8. Hiscott, J., Lin, R., Nakhaei, P., Paz, S. MasterCARD: A priceless link to innate immunity. *TRENDS in Molecular Medicine*, 12, 53-56, 2006.
- [0344]

9. Cui, S., Eisenacher, K., Kirchhofer, A., Brozka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K-K., Krug, A., Hopfner, K-P. The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Molecular Cell*, 29, 169-179, 2008.
10. Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5, 730-737, 2004.
12. Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K-K., Schlee, M., Endres, S., and Hartmann, G. 5'-triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, 314, 994-997, 2006.
13. Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Näslund, T. I., Liljeström, P., Weber, F., Reis e Sousa, C. RIG-I mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*, 314, 997-1001, 2006.
14. Myong, S., Cui, S., Cornish, P. V., Kirchhofer, A., Gack, M. U., Jung, J. U., Hopfner, K-P., Ha, T. Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. *Science*, 323, 1070, 2009.
15. Gack, M. U., Kirchhofer A., Shin, Y. C., Inn K. S., Liang C., Cui S., Myong S., Ha T., Hopfner, K-P., Jung, J. U. Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*.105(43):16743-8, 2008.
15. (a) Sabbah, A., Chang, T. H., Harnack, R., Frohlich, V., Tominaga, K., Dube, P. H., Xiang, Y., Bose, S. Activation of innate immune antiviral responses by NOD2. *Nat. Immunol.* 10, 1073, 2009. (b) Franchi, L., Warner, N., Viani, K., Nuñez, G. Function of NOD-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev.* 227, 106, 2009.
16. (a) Iyer, R. P., Pandey, R., Kuchimanchi, S. RNA interference: An exciting new approach for target validation, gene expression analysis and therapeutics. *Drugs of the Future*, 2003, 28, 51-59. (b) For reviews on antisense approach see: (i) Mirabelli, C. T., Crooke, S. T. Antisense Oligonucleotides in the context of modern molecular drug discovery and development. In: *Antisense Research and Applications*, S. T. Crooke and B. Lebleu (Eds.,) CRC

Press, New York 1993, 7-35. (ii) Szymkowski, D. E. Developing antisense oligonucleotides from the laboratory to clinical trials. *Drug. Disc. Today*, 1996, 1, 415-28

17. Iyer, R. P., Jin, Y., Roland A., Morrey, J. D., Mounir, S., Korba, B. E. Phosphorothioate Di- and Tri-nucleotides as a novel class of anti-HBV agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(6): 2199 – 2205, 2004.

18. Iyer, R. P., Roland A., Jin, Y., Mounir, S., Korba, B. E., Julander, J., Morrey, J. D. Anti-hepatitis B virus activity of ORI-9020, a novel phosphorothioate dinucleotide, in a transgenic mouse model. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(6):2318-20, 2004.

19. For examples of nucleotide combinatorial synthesis and antiviral evaluation, see:(a) Jin, Y., Roland, A., Zhou, W., Fauchon, M., Lyaku, J., Iyer, R. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 1921-25, 2000. (b) Jin, Y., X. Chen, M.-E. Cote, A. Roland, B. Korba, S. Mounir, Iyer, R. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 2057-2060, 2001.

20. Iyer, R. P., Coughlin, J., Padmanabhan, S. Microwave-assisted functionalization of solid supports for rapid loading of nucleosides. *Current Protocols Unit* 3.13, (Beaucage et al Eds,) John Wiley and Sons, 2006.

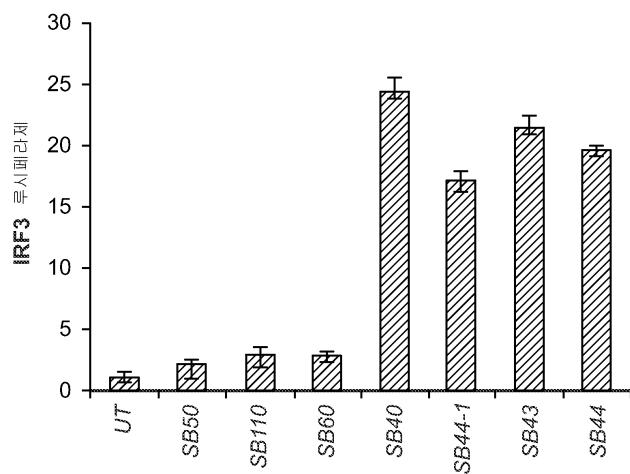
21. Padmanabhan, S., Coughlin, J., Iyer, R. P. Microwave-assisted functionalization of solid supports. Application in the rapid loading of nucleosides on controlled-pore-glass (CPG). *Tet. Lett.* 46, 343-347, 2005.

22. Iyer, R. P., Coughlin, J., Padmanabhan, S. Rapid functionalization and loading of solid supports. *Organic Preparations & Procedure International*, 37, 205-212, 2005.

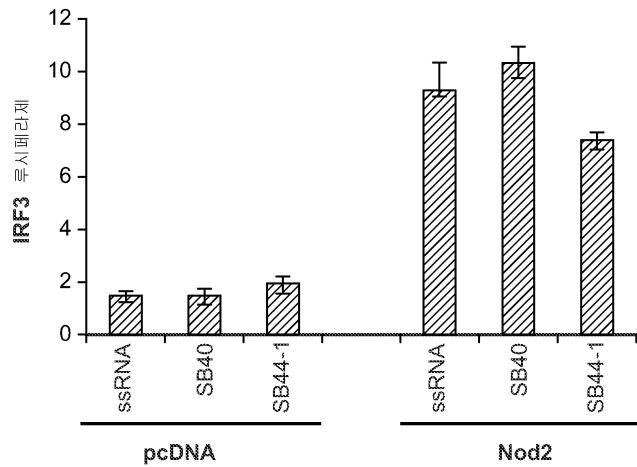
[0346]

도면

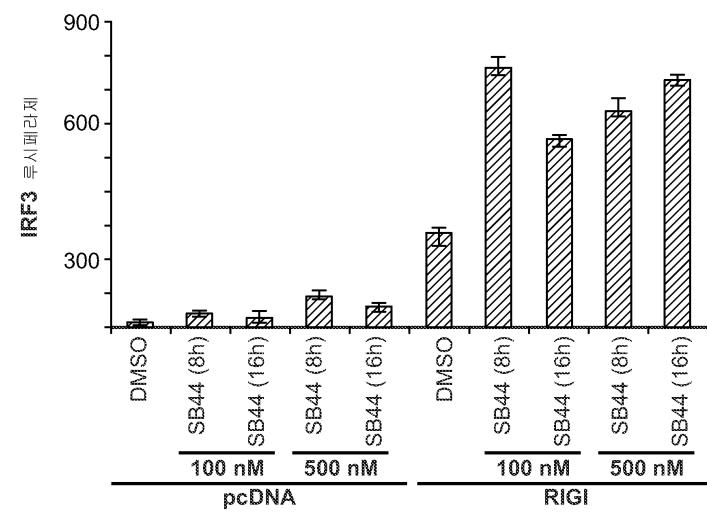
도면1



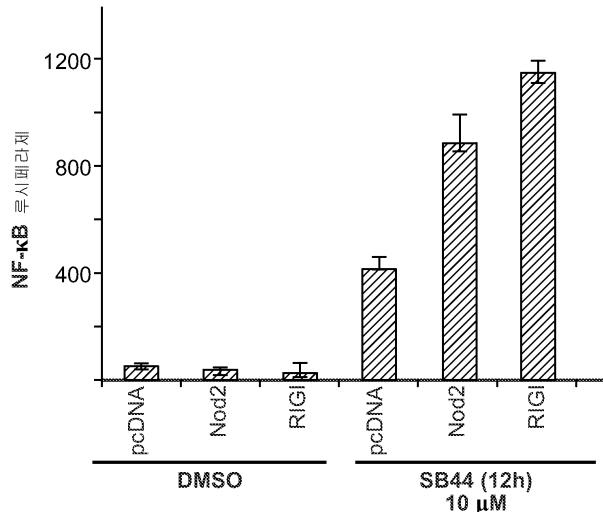
도면2



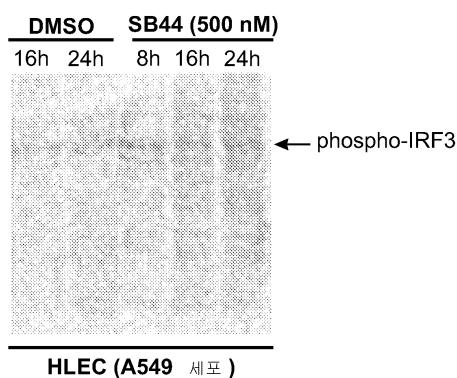
도면3



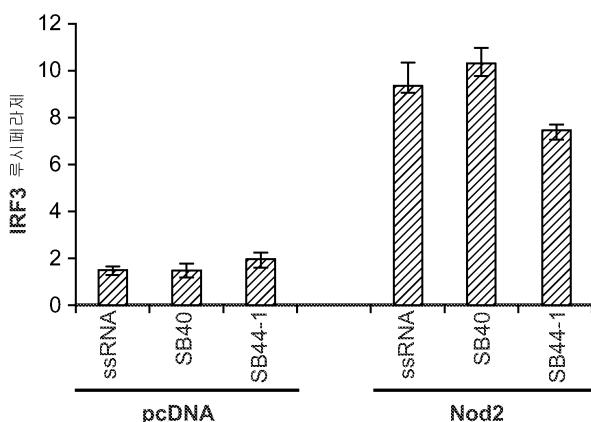
도면4



도면5

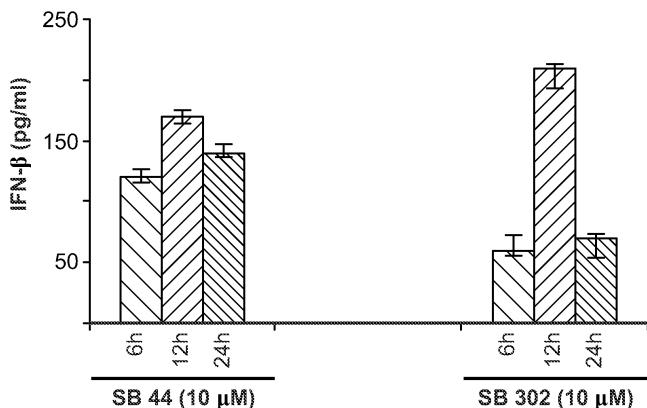


도면6



NOD2 활성화를 통한 SMNH 화합물(SB 40 및 SB 44)에 의한 항바이러스 반응의 유도.
 HEK 293 세포는 NOD2, pcDNA 및 IRF-3 루시페라제로 트랜스펙션되었다.
 이후 세포는 ssRNA(0.5 mg/ml) 또는 SMNH 화합물(1 μM)과 함께 인큐베이션되었다.
 12시간 인큐베이션 후, 루시페라제 활성은 이전에 기재된 바와 같이 측정되었다.
 루시페라제 검정 결과는 3회의 독립적 실험으로부터의 평균 ± S.D.로 제시된다.

도면7



SMNH 화합물(SB 44 및 SB 302)은 인간 폐 상피 A549 세포로부터의 인터페론- β (IFN- β)의 생성을 유도한다.

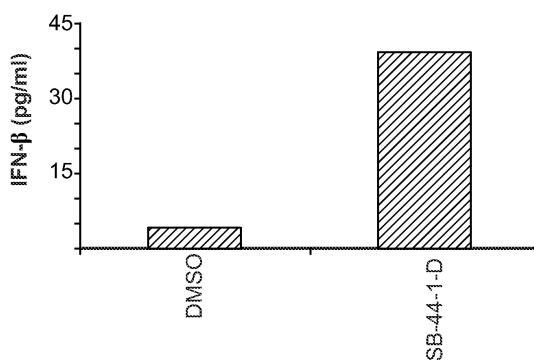
상기 세포는 SMNH 화합물 SB 44(10 μ M) 및 SB 302(10 μ M)와 함께 인큐베이션되었다.

6시간, 12시간, 24시간 인큐베이션 후, ELISA에 의한 IFN- β 를 검출하기 위해 배지

상층액이 수거되었다.

DMSO로 수득된 값(처리 6시간, 12시간, 또는 24시간 후)은 SMNH 화합물 처리된 세포로부터 수득된 상응하는 값으로부터 공제되었다.

도면8



폐 상피 세포로부터의 IFN- β 의 생성에서의 SB-44-1-D 처리 결과.

인간 폐 상피 A549 세포는 24시간 동안 DMSO(비히를 대조군) 또는 SB-44-1(10 μ M)로 처리되었다.

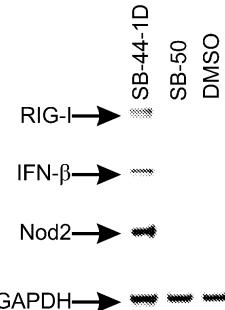
처리 후, 처리시의 세포로부터 방출된 IFN- β 의 수준을 측정하기 위해 배지 상층액으로

ELISA 검정이 수행되었다.

데이터는 유사한 결과를 갖는 3회의 독립적 실험의 평균이다.

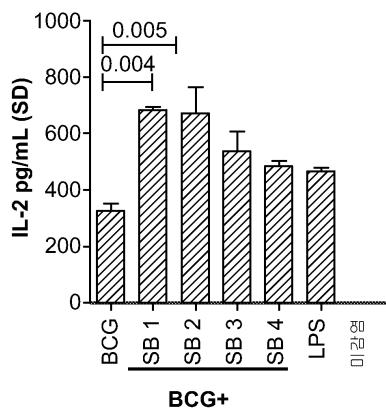
결과 - SB-44-1-D 처리는 폐 상피 세포로부터 IFN- β 방출을 촉발시킨다.

도면9

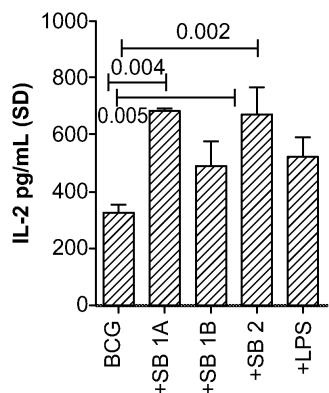


SB-44-1-D에 의한 선천 면역 반응자 유전자의 유도.
 인간 폐 상피 A549 세포는 12시간 동안 DMSO(비히를 대조군), SB-50(10μM) 또는
 SB-44-1(10μM)로 처리되었다.
 처리 후, RIG-I, Nod2 및 인터페론-β(IFN-β) 유전자의 발현을 검출하기 위해 세포로부터
 수거된 RNA가 RT-PCR에 이용되었다.
 결과 – SB-44-1-D는 A549 세포에서 RIG-I, Nod2 및 IFN-β 유전자의 발현을 유도한다.

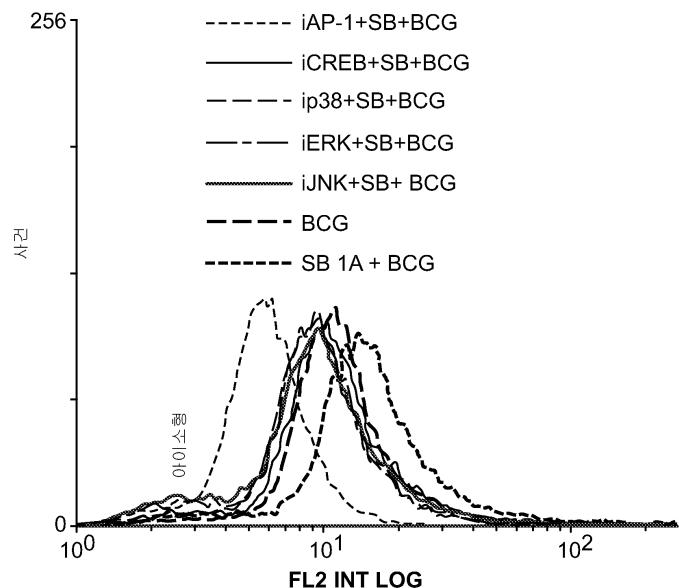
도면10a



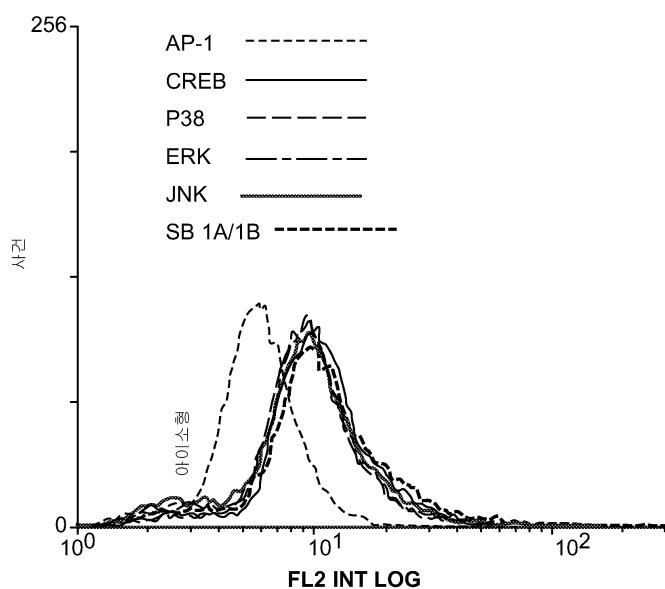
도면10b



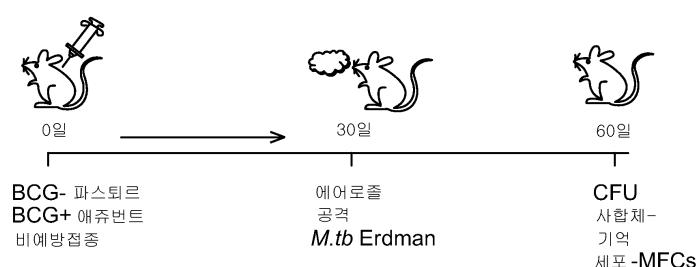
도면10c



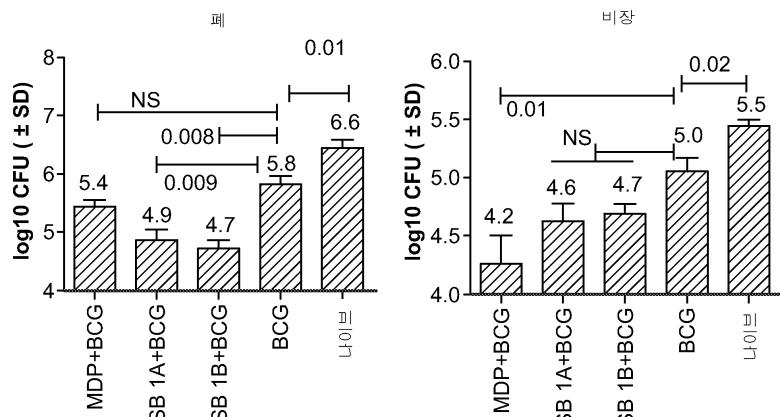
도면10d



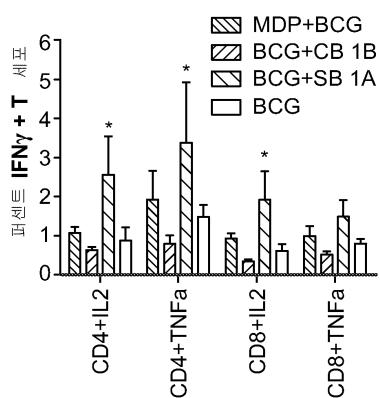
도면11a



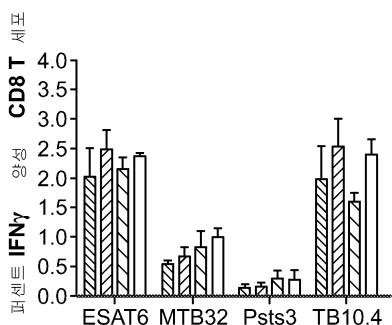
도면11b



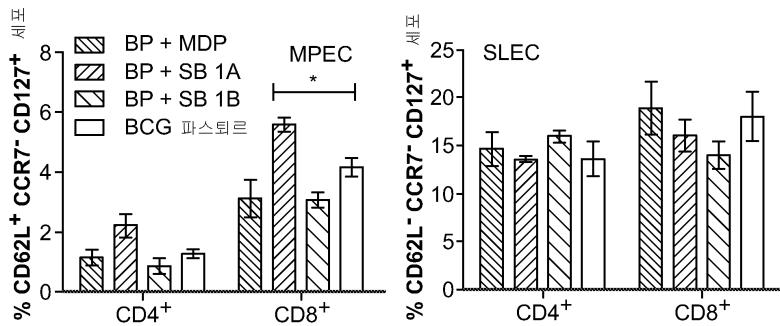
도면11c



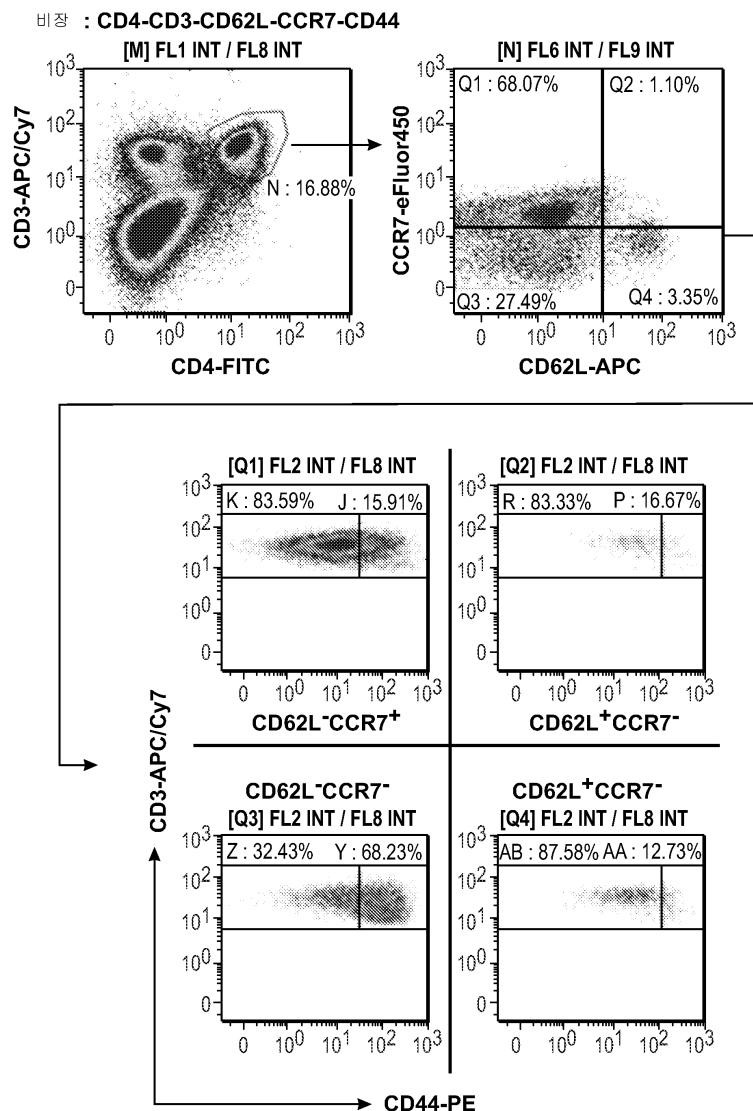
도면11d



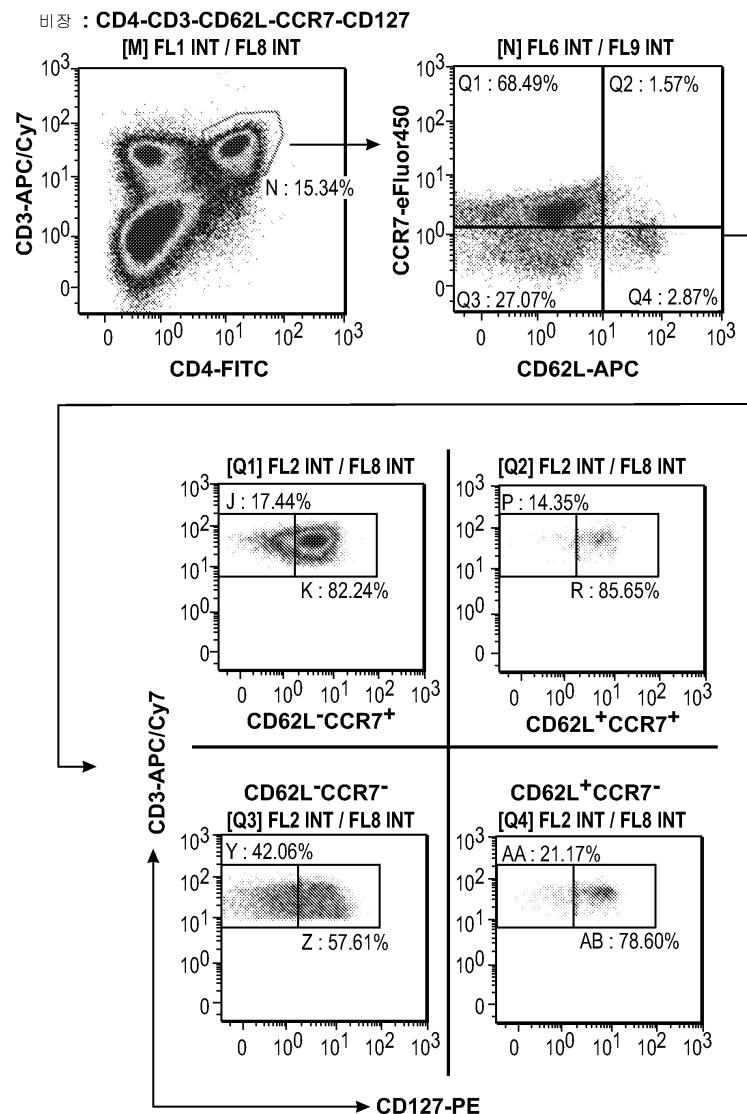
도면11e



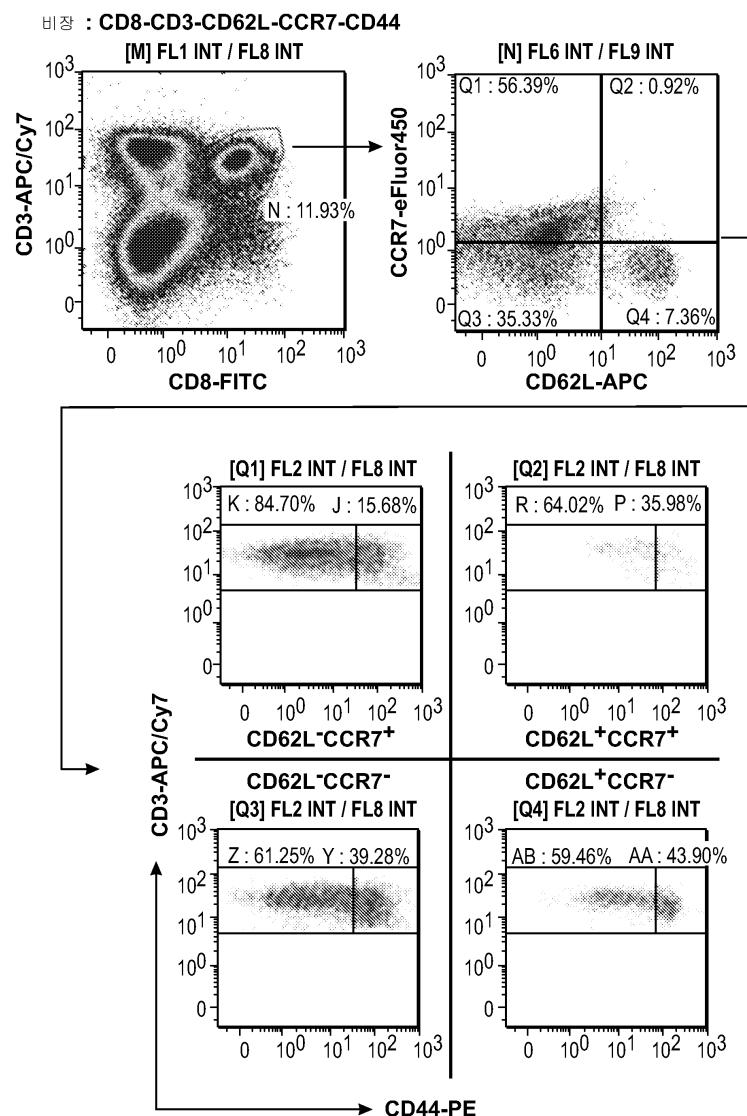
도면12aa



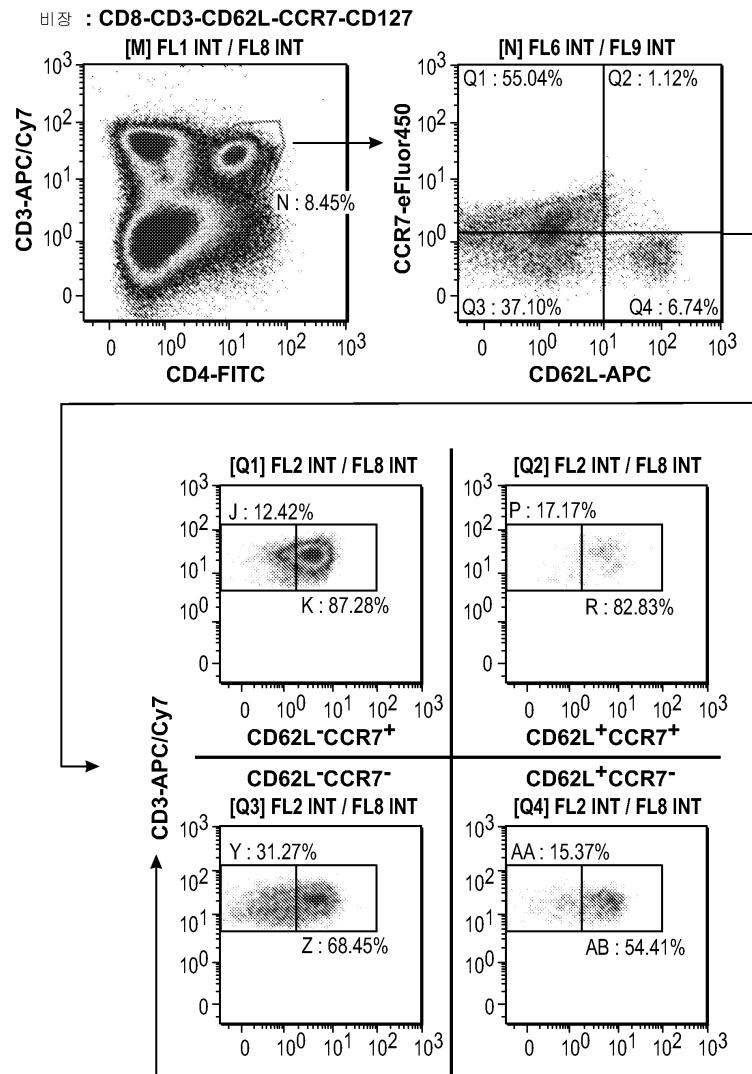
도면12ab



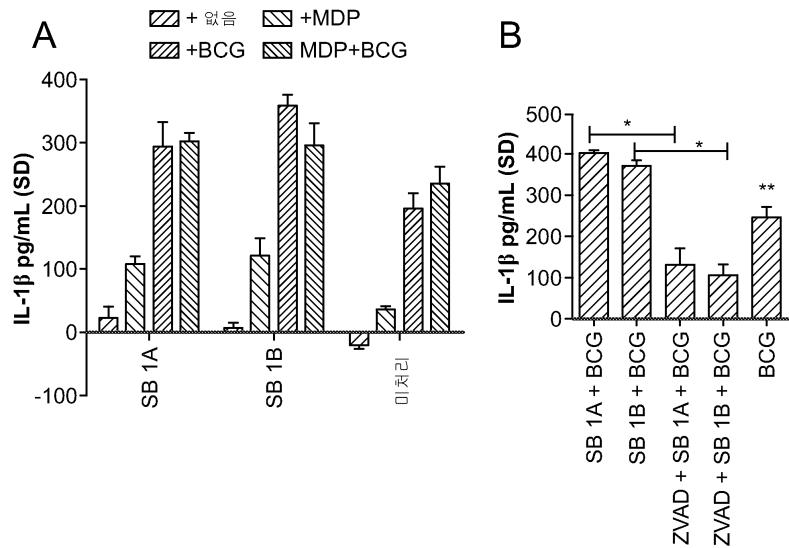
도면12ba



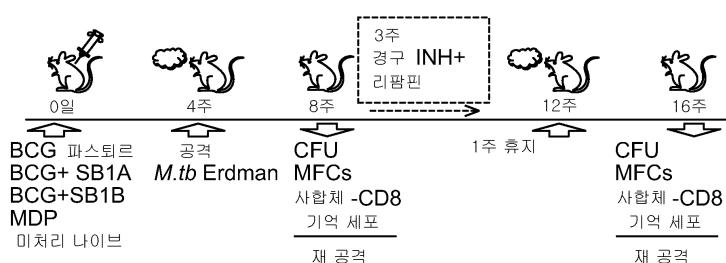
도면12bb



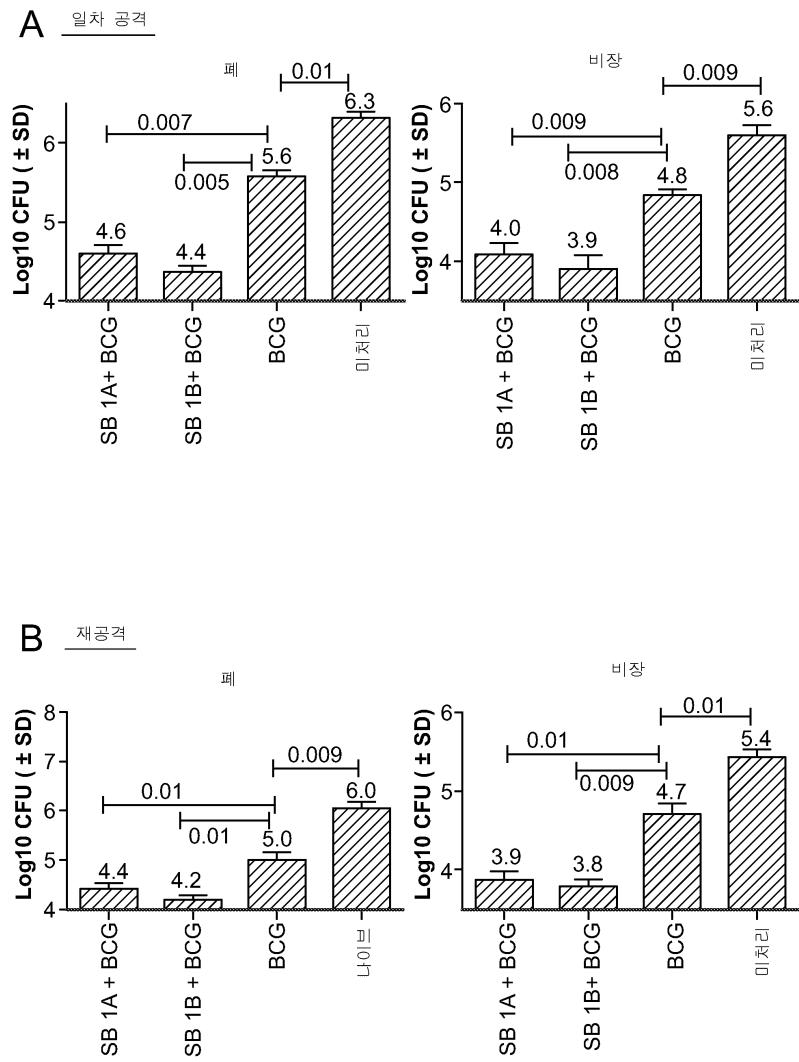
도면13



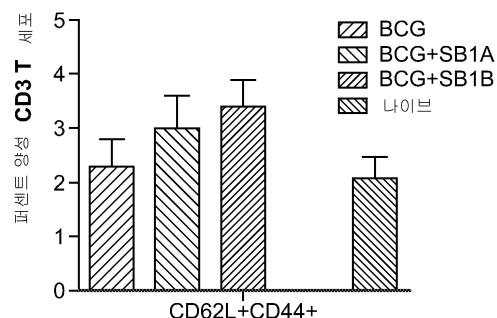
도면14



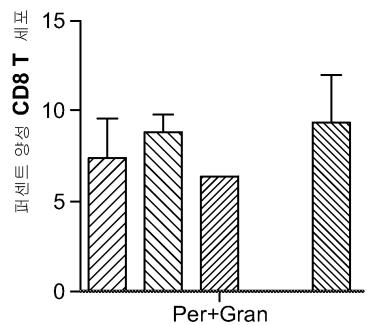
도면15



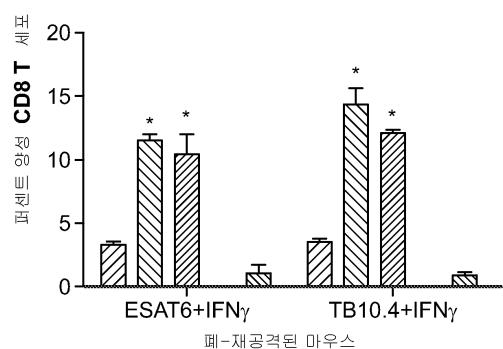
도면16a



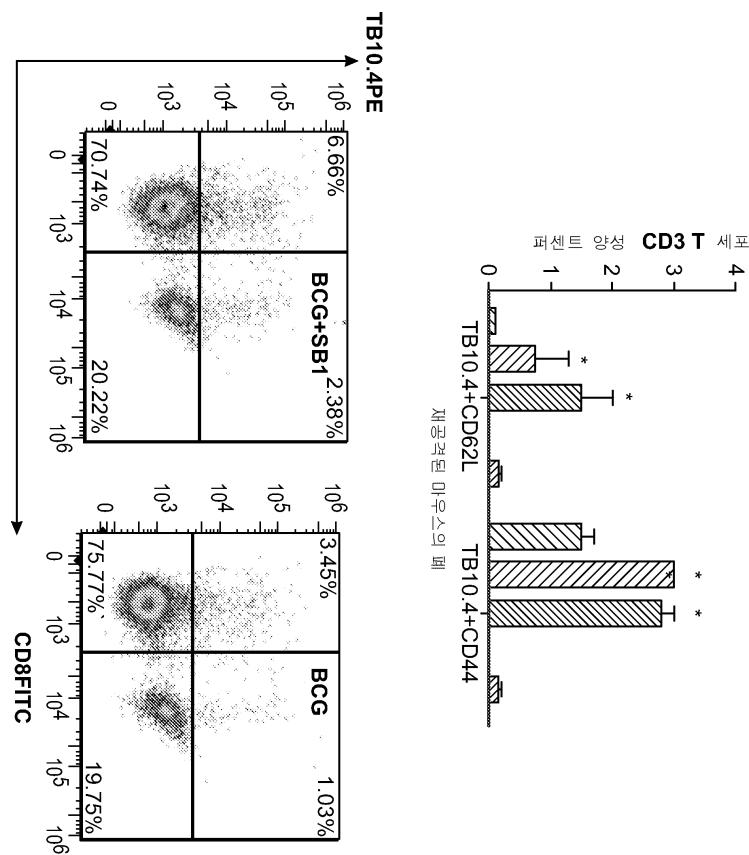
도면16b



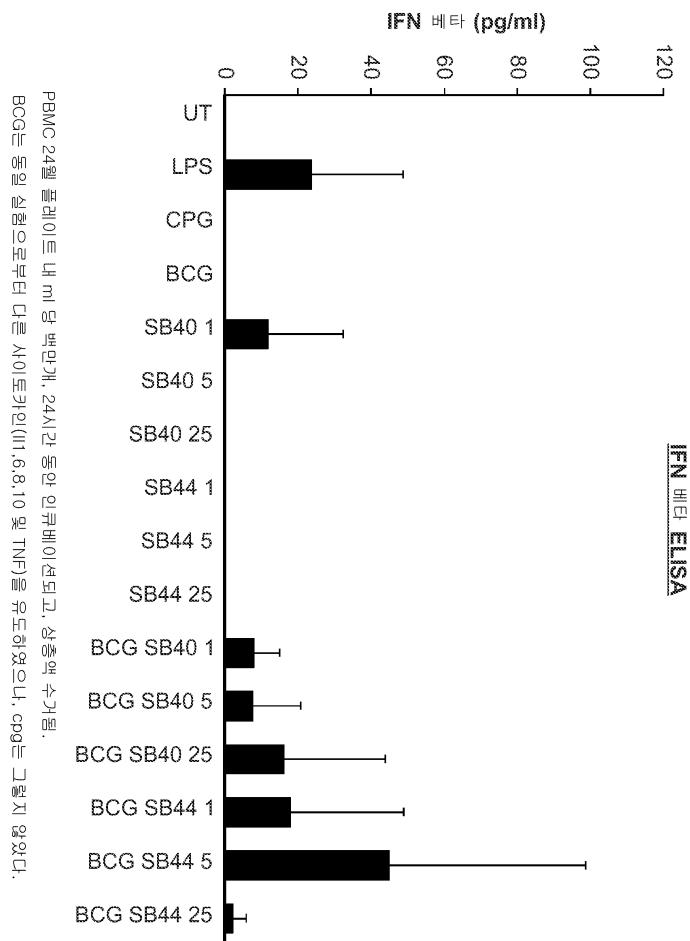
도면16c



도면16d



도면17



PBMC 24월 플레이트 내 1ml 당 빅먼개, 24시간 동안 인큐베이션되고, 상층액 수거됨.
BCG는 동일 실험으로부터 다른 사이토카인(IL-6, 8, 10 및 TNF)을 유도하였으나, cpg는 그렇지 않았다.