

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023년 9월 7일 (07.09.2023)



(10) 국제공개번호
WO 2023/167382 A1

(51) 국제특허분류: MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
C07H 19/067 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01) (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
A61K 31/7068 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01) MR, NE, SN, TD, TG).

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/013638

(22) 국제출원일: 2022년 9월 13일 (13.09.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보: 10-2022-0028064 2022년 3월 4일 (04.03.2022) KR

(71) 출원인: 동아대학교 산학협력단 (DONG-A UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION FOR INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION) [KR/KR]; 49315 부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, Busan (KR).

(72) 발명자: 조종현 (CHO, Jong Hyun); 51003 경상남도 김해시 변화1로19번길 10, 2층, Gyeongsangnam-do (KR). 안연진 (AN, Yeon Jin); 44682 울산광역시 남구 팔동로 85, 112동 1101호, Ulsan (KR). 최세명 (CHOI, Se-myong); 47581 부산광역시 연제구 대리로22번길 2, Busan (KR). 최은랑 (CHOI, Eun Rang); 49307 부산광역시 사하구 낙동대로575번길 57-5, Busan (KR). 남예은 (NAM, Ye Eun); 47516 부산광역시 연제구 세병로 44, 101동 1602호, Busan (KR). 서은우 (SEO, Eun Woo); 51382 경상남도 창원시 의창구 중동로 34, 111동 2205호, Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,

(54) Title: N4-ISOBUTYRYLOXYCYTIDINE ANALOG SYNTHESIS AND COMPOSITION FOR TREATING VIRAL INFECTION COMPRISING ANTI-VIRAL USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: N4-이소부티릴옥시시티딘 모방체 합성과 이의 항바이러스 용도를 포함하는 바이러스 감염 치료용 조성물

(57) Abstract: The present invention relates to N⁴-isobutyryloxycytidine analog synthesis and to the anti-viral use thereof against dengue virus, influenza virus, and SARS-CoV-2 virus.

(57) 요약서: 본 발명은 N⁴-이소부티릴옥시시티딘 모방체 합성과 이의 맵기 바이러스, 인플루엔자 바이러스 및 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 항바이러스 용도에 대한 것이다.



WO 2023/167382 A1

명세서

발명의 명칭: N⁴-이소부티릴옥시시티딘 모방체 합성과 이의 항바이러스 용도를 포함하는 바이러스 감염 치료용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 N⁴-이소부티릴옥시시티딘 모방체 합성과 이의 항바이러스 용도에 대한 것이다.

배경기술

- [2] β -D-N⁴-hydroxycytidine (NHC)은 다양한 RNA 바이러스의 중합체 효소를 억제하는 합성 뉴클레오사이드로서, 고위험 RNA 바이러스 중합체 효소 억제제로서 작용하나 세포독성과 바이러스 유전자의 돌연변이를 유발하므로 항바이러스 신약으로 개발에 한계점을 가지고 있다.
- [3] 최근 NHC 전구체가 SARS-CoV-2의 중합체 효소 억제제로 미국 FDA의 승인을 받았지만, 여전히 세포독성과 바이러스 유전자 변이에 대한 문제점을 가지고 있다. 따라서, NHC의 세포 독성과 돌연변이를 개선할 새로운 전구체 도출이 요구되고 있다.
- [4] [선행기술문헌]
- [5] [특허문헌]
- [6] 대한민국 등록특허 제10-1228503호

발명의 상세한 설명

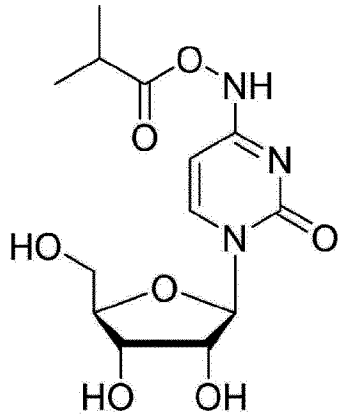
기술적 과제

- [7] 이에, 본 발명자들은 N⁴-히드록시시티딘(NHC)의 핵산의 염기부분을 모방한 전구체(prodrug)인 새로운 N⁴-이소부티릴옥시시티딘을 합성하고 이의 항바이러스 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [8] 따라서, 본 발명의 목적은 N⁴-이소부티릴옥시시티딘 모방체 합성과 이의 항바이러스 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적 염을 제공한다:
- [10] [화학식 1]

[11]



[12] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 상기 화합물 또는 이의 약제학적 염을 유효성분으로 포함하는 항바이러스 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[13] 본 발명의 *N*⁴-이소부틸옥시시티딘은 모체인 NHC보다 생리적 활성이 개선되어 바이러스에 대해 더 높은 세포독성 및 항바이러스 효능을 나타내어, 효과적인 항바이러스제로서의 용도를 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[14] 본 발명은 서지사항에 기입한 연구과제사 1건 이외에 부산광역시에서 지원받은 사업의 결과물로서 연구과제정보는 하기와 같다.

[15] 과제번호: 2021-0481

[16] 부처명: 부산광역시

[17] 과제관리 전문기관명: 부산광역시

[18] 연구사업명: BB21플러스사업

[19] 연구과제명: 바이러스 유래 노인성 질환 치료제 전문인력 양성 사업(4차년도)

[20] 과제수행기관: 동아대학교

[21] 연구기간: 2021.06.01 ~ 2022.05.31

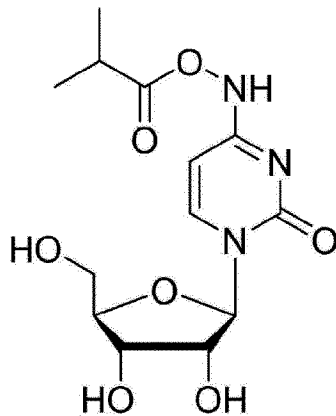
[22] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예를 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[23] 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[24] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적 염을 제공한다:

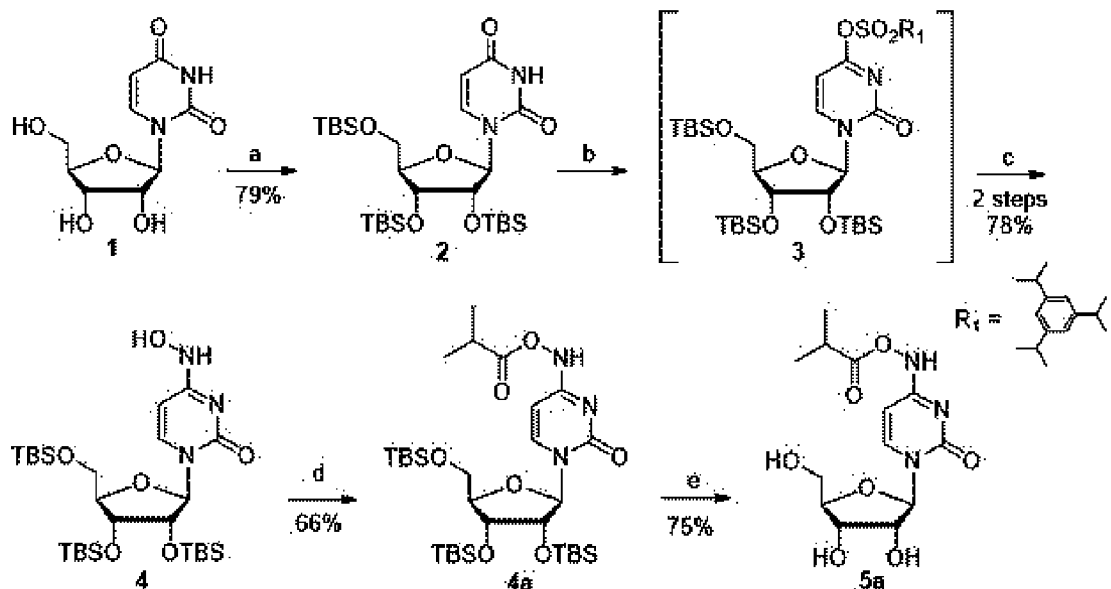
[25] [화학식 1]

[26]



[27] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 화합물은 하기 반응식에 따른 공정에 의해 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[28]



[29] Reagents and reaction conditions: a) TBSCl, imidazole, DMF, 0 °C → rt, 12 h; b) 2,4,6-Triisopropylbenzenesulfonyl chloride, DMAP, DIEA, CH₂Cl₂, 0 °C → rt, 15 h; c) NH₂OH-HCl, DIEA, 0 °C → rt, 12 h; d) Isobutyryl chloride, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C, 12 h; e) 20 equiv. Et₃N-3HF, THF, 0 °C → rt, 48 h

[30] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 상기 화합물 또는 이의 약제학적 염을 유효성분으로 포함하는 항바이러스 조성물을 제공한다.

[31] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 바이러스는 RNA 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 바이러스는 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), 땡기 바이러스 또는 인플루엔자 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A 또는 인플루엔자 B 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [32] 본 발명의 약학적 조성물에서, 본 발명에 따른 화합물이 당업계의 공지된 담체 및 희석제와 함께 적절한 제형으로 투여될 수 있으며, 목적하는 방법에 따라 경구 투여 또는 비경구 투여, 예를 들면, 정맥 내 주사, 근육 내 주사, 복강 내 주사, 피하주사, 좌제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [33] 상기 제형들은 약제학적 조성물에 통상적으로 사용되는 적당한 부형제, 충전물, 결합제, 습윤제, 분해제, 유회제, 계면활성제, 분산제, 완충액, 방부제, 용해보조제, 소독제, 감미료, 향신료, 진통제, 안정화제, 등장액제 등을 이용한 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [34] 상기 기술된 각각의 제형은 약학적으로 허용되는 담체 또는 첨가제를 포함할 수 있다. 상기 담체 또는 첨가제의 구체적인 예로는 물, 약학적으로 허용되는 유기용매, 콜라겐, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리딘, 카복시비닐 중합체, 알긴산 나트륨, 수용성 덱스트란, 카복시메틸 나트륨 녹말, 펙틴, 잔탄 고무, 아라비아 고무, 카제인, 젤라틴, 한천, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸글리콜, 바셀린, 파라핀, 스테아릴 알코올, 스테아린산, 인간 혈청 알부민, 만니톨, 소비톨 및 젖산 등이 있다. 한 개 또는 그 이상의 첨가제가 조제 형태에 따라 선택되거나 또는 적절히 조합될 수 있다. 더 나아가, 세포치료제 투여방법으로는, 정맥내, 동맥내 투여와 같은 통상적인 전신투여 이외에 표적세포로의 국소적 투여가 행해질 수 있으며, 카테터 기술 및 외과적 수술과 조합된 투여 방법이 사용될 수 있다.
- [35] 본 발명의 조성물은 본 발명에 따른 화합물을 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 약제학적으로 유효한 양으로 포함할 수 있다.
- [36] 본 발명에서 "약제학적으로 유효한 양"이란, 치료하고자 하는 면역 거부 질환에 대해 완화, 억제, 호전 및/또는 완치효과를 나타내는 유효성분의 양을 말한다. 본 발명의 본 발명에 따른 화합물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 예를 들면, 치료적으로 유효한 투여량은, 초기에는 세포배양을 통한 시험관내 분석을 사용하여 결정할 수 있다. 당 분야에서 과도한 실험을 거치지 않고도 치료에 유효한 양을 결정할 수 있을 것이며, 이러한 정보를 이용하여 인간에서 유용한 투여량을 더욱 정확하게 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 화합물은 유효성분으로서 0.1 내지 100 mg/kg/일의 양으로 투여될 수 있다.
- [37] 본 발명의 유효물질은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 약학적으로 허용가능한 염이란 표현은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 유효물질의 염기 화합물의 이로운 효능을 떨어뜨리지 않는 유효물질의 염기 화합물의 어떠한 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 이들 염은 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산,

메탄설펜산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈록투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설펜산, 에테인설펜산, 4-톨루엔설펜산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등을 사용할 수 있다. 또한, 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함한다. 예를 들면, 산부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 메실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설펜에이트/설펜에이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 퓨마레이트, 글루세테이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설펜에이트, 나프틸레이트, 2-나프틸레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으며, 이들 중 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트가 바람직하다.

- [38] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 유효물질을 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.
- [39] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은 염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [40] 나아가, 본 발명은 유효물질 및 이의 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 이성질체, 광학 이성질체 등을 모두 포함한다.
- [41] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 화합물 또는 이의 약제학적 염 또는 이를 포함하는 조성물을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 바이러스 감염의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [42] 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 예를 들어, 인간일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

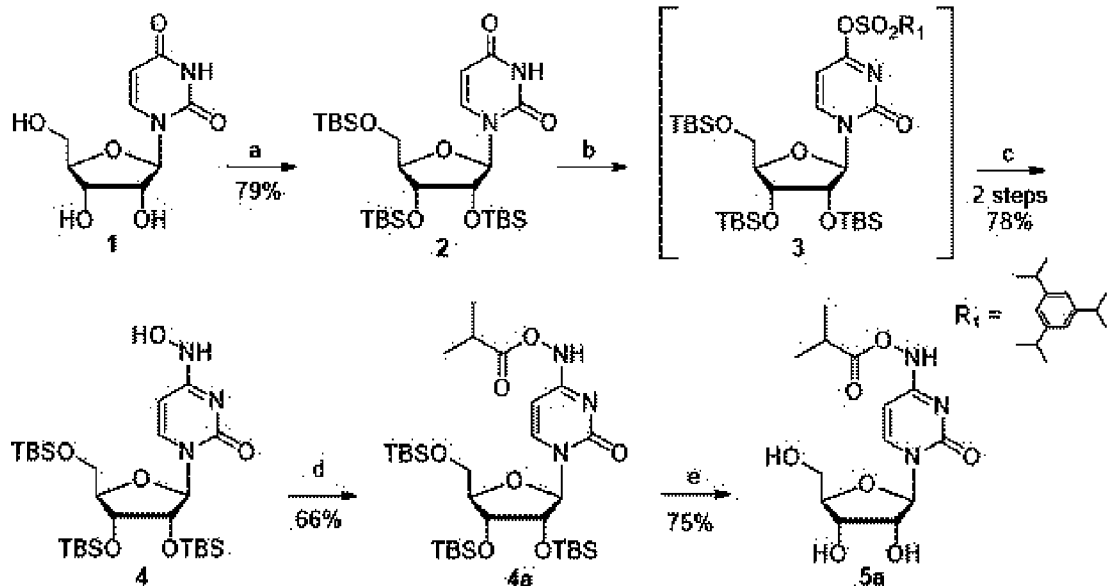
발명의 실시를 위한 형태

[43] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[44]

[45] [제조예 1] *N*⁴-이소부티릴옥시시티딘 (5a)의 제조

[46]



[47] Reagents and reaction conditions: a) TBSCl, imidazole, DMF, 0 °C → rt, 12 h; b) 2,4,6-Triisopropylbenzenesulfonyl chloride, DMAP, DIEA, CH₂Cl₂, 0 °C → rt, 15 h; c) NH₂OH-HCl, DIEA, 0 °C → rt, 12 h; d) Isobutyryl chloride, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C, 12 h; e) 20 equiv. Et₃N-3HF, THF, 0 °C → rt, 48 h

[48] **1-((2R,3R,4R,5R)-3,4-Bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((tert-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione(2)**

[49] 100 mL의 무수 DMF에 유리딘(uridine, 1)(5 g, 20.48 mmol)을 녹인 후 0 °C에서 N₂ 대기 하에 TBSCl(11.11 g, 73.71 mmol)과 이미다졸(6.27 g, 92.14 mmol)을 첨가하였다. 상온에서 12시간 교반한 반응 혼합물을 10 mL MeOH로 처리한 후 상온에서 20분간 교반하였다. 그런 다음 용액을 찬물(100 mL)에 붓고 디에틸 에테르(100 mL x 3)로 추출하였다. 결합된 유기층을 소금물(100 mL)으로 세척하고 Na₂SO₄에서 건조시킨 후 여과하였다. 여과물은 진공 상태에서 농축되었고 잔여물은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Hexane: EtOAc = 50:1 ~ 5:1 v/v)로 화합물 2(9.52 g, 16.22 mmol)를 79% 수율로 얻었다.

[50] ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.36 (br, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.87 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.67 (dd, *J* = 2.4, 8.0 Hz, 1H), 4.13-4.05 (m, 3H), 3.97 (dd, *J* = 1.2, 11.6 Hz, 1H), 3.75 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 0.93 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 0.88 (s, 9H), 0.13-0.06 (m, 18H).

[51] **1-((2R,3R,4R,5R)-3,4-Bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((tert-butyldimethylsilyl**

yl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-4-(hydroxyamino)pyrimidin-2(1H)-one (4)

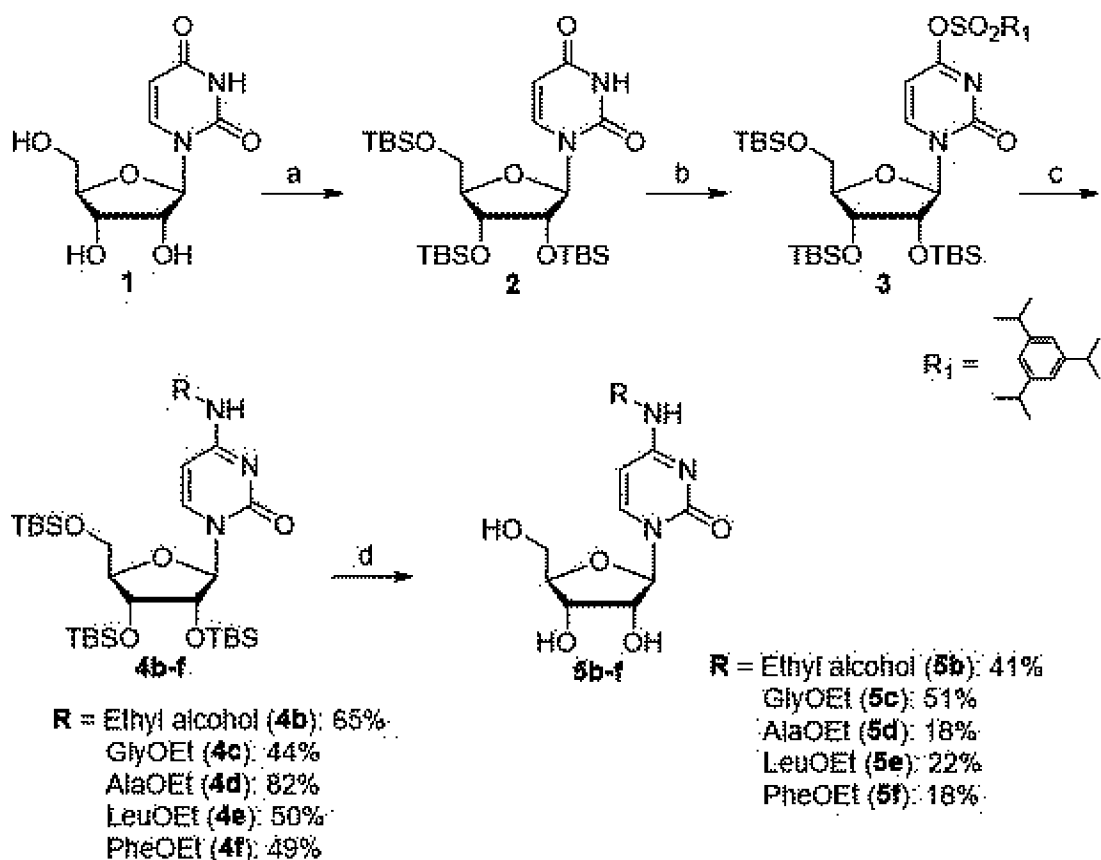
- [52] 20 mL의 무수 CH_2Cl_2 에 화합물 2(1.65 g, 2.18 mmol)를 녹인 후 2,4,6-트리아이소프로필벤젠설포닐 염화물(1.70 g, 5.62 mmol), DMAP(0.04 g, 0.33 mmol), *N,N*-디이소프로필에틸아민(DIEA)(1.82 g, 14.05 mmol)을 첨가하였다. 상온에서 15시간 동안 교반한 후 반응 혼합물을 N_2 대기에서 0 °C에서 $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (0.78 g, 11.25 mmol)과 DIEA(1.45 g, 1.45 mmol)로 처리하였다. 실온에서 12시간 동안 교반한 후, 결과 용액을 CH_2Cl_2 (20 mL)로 희석한 후 분쇄된 얼음(10 g)에 담근 후 10분간 교반하였다. 그 결과 나온 용액을 분별 깔때기에 붓고 유기층을 분리했다. 수용층은 CH_2Cl_2 (20 mL x 2)로 세척하였다. 결합된 유기층을 소금물(100 mL)으로 세척한 후 Na_2SO_4 에서 건조시킨 후 여과하였다. 여과물은 진공 상태에서 농축되었고 잔여물은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Hexane: EtOAc = 10:1 ~ 2:1 v/v)로 화합물 4(1.31 g, 2.18 mmol)를 78% 수율로 얻었다.
- [53] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.55 (br, 1H), 7.24 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.90 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 5.58 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.08-4.02 (m, 2H), 4.00 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 3.90 (dd, J = 11.6, 2.4 Hz, 1H), 3.71 (dd, J = 11.56, 1.2 Hz, 1H), 1.79 (s, 1H), 0.93 (s, 9H), 0.90 (s, 9H), 0.88 (s, 9H), 0.11-0.04 (m, 18H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 149.49, 145.62, 131.19, 97.95, 87.88, 85.04, 75.40, 71.95, 62.69, 18.58, 18.22, 18.08, -4.20, -4.48, -4.51, -4.63, -5.34, -5.36.
- [54] **1-((2R,3R,4R,5R)-3,4-Bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((tert-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-4-((isobutyryloxy)amino)pyrimidin-2(1H)-one (4a)**
- [55] 9 mL의 무수 CH_2Cl_2 에 화합물 4 (0.52 g, 0.86 mmol)를 용액에 녹인 후 아르곤 대기 하에 0 °C에서 염화이소부티릴(0.12 g, 1.08 mmol)과 트리에틸아민(0.13 g, 1.30 mmol)을 첨가하였다. 상온에서 2시간 동안 교반한 후 반응 혼합물을 0.2 mL MeOH로 처리하여 여분의 염화이소부티릴을 소멸시켰다. 0 °C에서 5분간 교반하고 감압 하에서 농축한 후 잔류물을 CH_2Cl_2 (10 mL)로 희석한 후 실리카겔에 흡착하고 실리카겔 크로마토그래피(Hexane: EtOAc = 8:1 ~ 5:1 v/v)로 화합물 4a(0.22 g, 0.29 mmol)를 66% 수율로 얻었다.
- [56] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.28 (br, 1H), 7.51 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.87 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.76 (dd, J = 1.6, 8.4 Hz, 1H), 4.07-4.02 (m, 3H), 3.91 (dd, J = 2.0, 11.6 Hz, 1H), 3.71 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 2.72-2.65 (m, 1H), 1.25 (d, J = 4.0 Hz, 3H), 1.24 (d, J = 3.6 Hz 3H), 0.92-0.86 (m, 27H), 0.10-0.03 (m, 18H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ 173.52, 148.87, 148.68, 133.72, 97.24, 88.22, 85.21, 76.08, 75.76, 71.76, 62.49, 33.02, 26.04, 25.93, 25.83, 19.31, 18.51, 18.20, 18.03, -4.21, -4.56, -4.73, -5.40, -5.54.
- [57] **1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-4-((isobutyryloxy)amino)pyrimidin-2(1H)-one (5a)** (*N*⁴-isobutyryloxycytidine)

[58] 2 mL의 THF에 화합물 4a(0.10 g, 0.15 mmol)를 넣고 아르곤 대기 하에 0 °C에서 Et₃N·3HF(0.12 g, 0.74 mmol)를 첨가하였다. 상온에서 48시간 동안 교반한 후 반응 혼합물을 0 °C에서 실리카겔(3.0 g)로 조심스럽게(carefully)처리하여 같은 온도에서 30분간 저은 후 감소된 압력으로 농축하였다. 잔류물은 실리카겔 크로마토그래피(CH₂Cl₂ : MeOH = 20:1 ~ 8:1 v/v)로 정제하여 화합물 5a(0.04 g, 0.11 mmol)를 75% 수율로 얻었다.

[59] ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.89 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.73(d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.19-4.13 (m, 2H), 3.97 (q, *J* = 3.6 Hz, 1H), 3.81(dd, *J* = 2.8, 12.0 Hz, 1H), 3.72(dd, *J* = 3.2, 12.0 Hz, 1H), 2.86-2.83 (m, 1H), 1.23 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 176.33, 151.17, 150.84, 135.95, 97.35, 89.94, 86.29, 75.07, 71.62, 64.30, 62.58, 33.55, 19.49; HRMS-ESI⁺: *m/z* calcd for C₁₃H₁₉N₃O₇ (M+H⁺) 330.1296, found 330.1292.

[60] [제조예 2]

[61]



[62] Reagents and reaction conditions: a) TBSCl, imidazole, DMF, 0 °C → rt, 12 h; b) 2,4,6-Triisopropylbenzenesulfonyl chloride, DMAP, DIEA, CH₂Cl₂, 0 °C → rt, 15 h; c) 2-Aminoethanol for **4b**, ethyl amino acids-HCl for **4c-f**, Et₃N, 0 °C → rt, CH₃CN, 12 h; d) HCl/EtOH, EtOH, rt, 12 h for **5b-f**

[63] 1-((2R,3R,4R,5R)-3,4-Bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((tert-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-4-((2-hydroxyethyl)amino)pyrimidin-2(1H)-

one (4b)

[64] 제조예 1의 화합물 **4**와 유사한 반응방법을 사용하여 화합물을 65% 수율로 얻었다.

[65] ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 9.30 (br, 0.5H), 8.21 (d, *J* = 7.6 Hz, 0.5H), 8.01 (d, *J* = 7.6 Hz, 0.5H), 6.65 (br, 0.5H), 5.75-5.62 (m, 2H), 4.13-4.00 (m, 5H), 3.86-3.75 (m, 3H), 3.63-3.38 (m, 2H), 0.95-0.87 (m, 27H), 0.13-0.06 (m, 18H).

[66] **1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-4-((2-hydroxyethyl)amino)pyrimidin-2(1H)-one (5b)**

[67] 화합물 **4b**를 HCl/EtOH 용액을 사용하여 TBS 보호기를 제거하여 화합물 **5b**를 41% 수율로 얻었다.

[68] ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 7.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.89 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 5.87 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 4.15-4.11 (m, 2H), 4.01-4.00 (m, 1H), 3.87 (dd, *J* = 2.8, 12.4 Hz, 1H), 3.74 (dd, *J* = 3.2, 12.4 Hz, 1H), 3.67 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.49 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H). ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 165.78, 158.81, 141.60, 97.01, 92.26, 85.76, 76.10, 70.79, 62.01, 61.45, 44.17; HRMS-ESI⁺: *m/z* calcd for C₁₁H₁₇N₃O₆ (M+H⁺) 288.1190, found 288.1188.

[69] **Ethyl(1-((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)glycinate (4c)**

[70] 제조예 1의 화합물 **4**와 유사한 반응방법을 사용하여 화합물을 44% 수율로 얻었다.

[71] ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.16 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.71 (s, 1H), 5.60 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.29 (br, 1H), 4.27-4.19 (m, 4H), 4.13-4.00 (m, 4H), 3.76 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.94 (s, 9H), 0.90 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.24-0.03 (m, 18H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 163.40, 141.12, 93.81, 90.87, 82.71, 69.04, 61.78, 60.79, 42.60, 26.22, 26.06, 26.00, 18.67, 18.20, 14.27, -3.92, -4.01, -4.94, -5.05, -5.14, -5.44.

[72] **Ethyl(1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)glycinate (5c)**

[73] 화합물 **5b**와 동일한 방법을 사용하여 화합물을 51% 수율로 얻었다.

[74] ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 8.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.2H), 8.47 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.8H), 6.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.2H), 6.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.8H), 5.88 (m, 1H), 4.34-4.25 (m, 3H), 4.22-4.15 (m, 2H), 4.09-4.06 (m, 1H), 3.92 (m, 1H), 3.77 (m, 1H), 3.60 (q, *J* = 6.8 Hz, 0.8H), 3.48 (q, *J* = 6.8 Hz, 0.2H), 1.33-1.29 (m, 3H); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 168.57, 159.81, 145.10, 99.56, 95.21, 91.95, 86.47, 76.37, 70.52, 63.31, 61.45, 44.79, 14.40; HRMS-ESI⁺: *m/z* calcd for C₁₃H₁₉N₃O₇ (M+H⁺) 330.1296, found 330.1294.

[75] **Ethyl(1-((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldime**

thylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)-L-alaninate (4d)

[76] 제조예 1의 화합물 **4**와 유사한 반응방법을 사용하여 화합물을 82% 수율로 얻었다.

[77] ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.16 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.70 (s, 1H), 5.58 (br, 1H), 5.54 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.97 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.20 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.16-4.06 (m, 3H), 4.11-3.99 (dd, *J* = 8.0, 4.0 Hz, 1H), 3.75 (dd, *J* = 1.2, 12.0 Hz, 1H), 1.45 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.30-1.09 (m, 3H), 0.94-0.87 (m, 27H), 0.25-0.03 (m, 18H).

[78] **Ethyl(1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)-L-alaninate (5d)**

[79] 화합물 **5b**와 동일한 방법을 사용하여 화합물을 18% 수율로 얻었다.

[80] ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 8.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.89 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.68 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.32-4.24 (m, 2H), 4.23-4.16 (m, 2H), 4.11-4.07 (m, 1H), 3.91 (dd, *J* = 2.4, 12.4 Hz, 1H), 3.78 (dd, *J* = 2.0, 12.4 Hz, 1H), 1.58 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

[81] **Ethyl(1-((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)-L-leucinate (4e)**

[82] 화합물 **4**와 유사한 방법을 사용하여 화합물을 50% 수율로 얻었다.

[83] ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.16 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.68 (s, 1H), 5.55 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.13-5.07 (m, 1H), 4.02-4.15 (m, 2H), 4.11-4.06 (m, 3H), 4.02-3.99 (m, 1H), 3.76 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 1.78-1.72 (m, 1H), 1.69-1.63 (m, 1H), 1.60-1.54 (m, 1H), 1.27 (t, *J* = 3.2 Hz, 3H), 0.94-0.86 (m, 33H), 0.26-0.03 (m, 18H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 173.83, 163.40, 155.99, 141.06, 93.88, 91.00, 82.49, 76.29, 68.79, 61.53, 60.64, 51.43, 41.88, 29.81, 26.24, 26.06, 26.00, 25.02, 22.99, 22.47, 18.49, 18.19, 14.26, -3.88, -3.94, -4.96, -5.07, -5.14, -5.45.

[84] **Ethyl(1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)-L-leucinate (5e)**

[85] 화합물 **5b**와 동일한 방법을 사용하여 화합물을 22% 수율로 얻었다.

[86] ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 8.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.2H), 8.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.8H), 6.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.2H), 6.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.8H), 5.88 (d, *J* = 3.2 Hz, 0.8H), 5.87 (d, *J* = 2.8 Hz, 0.2H), 4.68 (dd, *J* = 4.4, 9.6 Hz, 0.8H), 4.62 (dd, *J* = 8.4, 5.6 Hz, 0.2H), 4.29-4.22 (m, 2H), 4.22-4.15 (m, 2H), 4.10-4.06 (m, 1H), 3.91 (dd, *J* = 12.4, 2.4 Hz, 1H), 3.77 (dd, *J* = 12.4, 2.8 Hz, 1H), 1.91-1.69 (m, 3H), 1.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.01 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.97 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 171.25, 157.86, 144.98, 98.56, 95.28, 92.01, 86.42, 76.28, 70.54, 63.40, 61.49, 55.06, 41.00, 26.08, 23.17, 21.53, 14.40; HRMS-ESI⁺: *m/z* calcd for C₁₇H₂₇N₃O₇ (M+H⁺) 386.1922, found 386.1918.

[87] **Ethyl(1-((2R,3R,4R,5R)-3,4-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-5-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)-L-phenylalaninate (4f)**

[88] 제조예 1의 화합물 **4**와 유사한 방법을 사용하여 화합물을 49% 수율로 얻었다.

[89] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.18 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.27-7.22 (m, 3H), 7.05-7.04 (m, 2H), 5.72 (s, 1H), 5.53 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.40 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.32-5.28 (m, 1H), 4.22-4.14 (m, 2H), 4.13-4.08 (m, 3H), 4.01 (q, $J = 4.0$ Hz, 1H), 3.77 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 3.35 (dd, $J = 5.6, 10.0$ Hz, 1H), 3.17 (dd, $J = 4.0, 13.6$ Hz, 1H), 1.26 (t, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.93-0.87 (m, 27H), 0.28-0.03 (m, 18H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 171.99, 162.84, 156.06, 141.23, 136.05, 129.66, 128.54, 127.08, 93.91, 91.03, 82.66, 76.34, 68.92, 61.76, 60.71, 53.75, 37.49, 26.24, 26.14, 26.08, 26.01, 25.95, 25.86, 18.67, 18.22, 18.20, 14.28, -3.89, -3.94, -4.96, -5.06, -5.14, -5.43.

[90] **Ethyl(1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-2-oxo-1,2-dihydropyrimidin-4-yl)-L-phenylalaninate (5f)**

[91] 화합물 **5b**와 동일한 방법을 사용하여 화합물을 18% 수율로 얻었다.

[92] ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 8.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 0.3 H), 8.37 (d, $J = 7.6$ Hz, 0.7 H), 7.33-7.23 (m, 5H), 6.18-6.15 (m, 1H), 5.82-5.80 (m, 1H), 5.02-4.96 (m, 0.7H), 4.94-4.88 (m, 0.3H), 4.13-4.24 (m, 2H), 4.17-4.12 (m, 2H), 4.09-4.04 (m, 1H), 3.92 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 3.76 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 3.49-3.36 (m, 1H), 3.19-3.16 (m, 0.3H), 3.14-3.06 (m, 0.7H), 1.17 (t, $J = 7.2$ Hz, 2.1H), 1.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 0.9H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ 170.09, 145.06, 136.75, 130.78, 130.38, 129.99, 129.87, 128.55, 95.11, 92.03, 86.39, 76.24, 70.46, 70.08, 63.53, 62.37, 61.44, 57.86, 38.59, 14.40; HRMS-ESI $^+$: m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 420.1765, found 420.1762.

[93] [실시예 1] DENV-2 활성도 평가 방법

[94] **DENV-2 레플리콘 BHK-21 세포(DENV-2 replicon BHK-21 cell)**

[95] 아기 햄스터 신장(BHK-21) 세포 유래 레플리콘 세포주는 37 °C에서 5% 이하 CO_2 에서 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone)과 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 푸로마이신(Invivogen)을 보충한 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Corning)에서 배양했다. 항생제 없이 배양 배지를 사용하여 항바이러스 및 세포독성의 효과를 검증하였다.

[96] 세포독성분석

[97] 제조예 1에서 제조한 화합물의 세포독성은 MTT

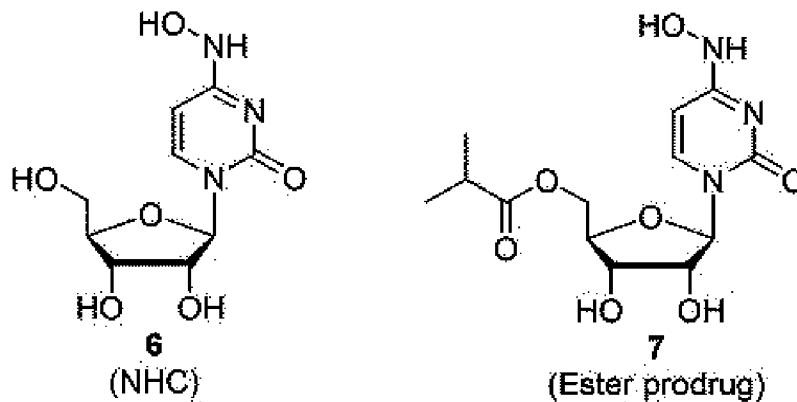
(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Invitrogen, M6494) 분석을 사용하여 DENV-2 replicon BHK-21 (DENV2-BHK) 세포에서 평가되었다. 본 연구에서는 BHK-21 cell을 37 °C에서 CO_2 5% 하에서 96웰 플레이트 5,000 cells/well로 제조하였다. 세포를 부착한 후 동일한 농도(10 μM)로 시험용 화합물 3개를 주입하고 배양 후 MTT 용액(0.5 mg/ml)을 처리하여 30분간 배양하였다. 상등액을 제거한 후 DMSO를 첨가하여 포마잔(Formazan, 보라색)으로서의

지표가 용해되었으며, 그 흡광도 값은 분광광도계(Spectrophotometer Plus 384, Molecular Devices Corp, CA, Sunnyvale, Molecular Devices Corp)를 사용하여 540 nm에서 측정되었다. 결과는 3회 반복 검사의 평균 $\pm$ S.E로 나타냈다.

[98] 루시퍼레이스 리포터 분석 (Luciferase reporter assay)

[99] 발광 신호는 레닐라 루시퍼레이스(*Renilla luciferase*) 분석 시스템(Promega)을 사용하여 측정되었다. DENV2-BHK는 96웰 플레이트의 5,000개 셀/웰로 도금되었으며(plated) 바닥은 투명하고 평평하다(Corning). 화합물을 처리하는 과정은 상기 기재한 바와 같으며, 90~95%의 합류(confluence)를 이룬 후 40 μ l의 상등액을 제거하였다. 레닐라 루시퍼레이스(*Renilla luciferase*) 분석 시약을 첨가하고 1-2분 후에 발광신호(LS)를 측정하여 LS의 최대치를 나타냈다. 최종 발광 값은 처리되지 않은 그룹의 LS와 비교하여 계산하였다. 결과는 3회 반복 검사의 평균 $\pm$ S.E로 나타냈다.

[100]



[101] 화합물 **6**(NHC, β -D-N⁴-hydroxycytidine)의 에스테르 프로드럭(**5a**)은 체외에서 DENV-2 레플리콘에 대해 평가되었다. 항 DENV-2 활성과 세포독성의 결과는 표 2에 나타냈다. 합성 프로드럭(**5a**)을 replicon으로 검사했더니 모체 화합물 **6**에 비해 세포독성이 2배 감소했고, EC₅₀ 값은 표 1과 같이 2배 정도 소폭 증가했다. 또한, 화합물 **5a**는 에스테르 전구체 **7**보다는 6배 정도 EC₅₀ 값이 더 개선되었다. 하지만, 에틸 알코올 유도체(**5b**)와 C₄-아미노산 유도체(**5c-f**)를 포함한 다른 합성 화합물은 복제 분석에서 유의미한 항-DENV 활성을 나타내지 않았다.

[102] [표 1]

[103] BHK-21 세포에서 뉴클레오사이드 유사체의 항 DENV-2 활성 및 세포독성

Entry	Compound	EC ₅₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)	S.I.
1	RBV	1.16	5.46	4.70
2	6	2.84	5.75	2.02
3	5b	>100	>100	-
4	5c	>100	>100	-
5	5d	>100	>100	-
6	5e	>100	>100	-
7	5f	>100	>100	-
8	5a	3.95	10.85	2.74
9	7	23.38	42.25	1.81

RBV, Ribavirin.

EC₅₀, 50% effective concentration.

CC₅₀, 50% cytotoxic concentration.

S.I., Selectivity index = CC₅₀/EC₅₀.

[104] [실시예 2] SARS-CoV-2 활성도 평가

[105] 세포, 바이러스 및 화합물

[106] 질병관리본부가 제공한 SARS-CoV-2(BetaCoV/Korea/KCDC03/2020)를 37 °C의 배로 세포(Vero cells)에서 3일간 증폭했다. 1000g에서 5분간 원심분리 후 바이러스는 -80 °C에서 보관하였으며, 플라크 분석에서 바이러스 적정량을 측정하였다.

[107] 세포 배양 기반 항바이러스 검사

[108] 이미지 기반 시스템에서 항 SARS-CoV-2 활성을 평가하기 위해 배로 셀은 밤새 96-웰(well) 플레이트(웰당 2×104개 셀)에서 배양되었다. 화합물을 3배로 희석한 후, 세포는 생물학적 안전 수준 3 실험실에서 이를 동안 37 °C에서 동일한 양의 SARS-CoV-2(MOI 0.05)에 감염되었다. 세포는 냉장 아세톤:메탄올(1:3)로 고정하고 투과되어 항 스파이크 항체(Genetex, Irvine, CA, USA)로 프로빙한(probing) 후 알렉사 플루오르 488 결합 염소 안티 마우스 IgG(Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG, Invitrogen, Carlsbad, CA, CA, USA)로 EC₅₀ 값을 결정했다. 세포 핵을 4',6-다이아미디노-2-페닐린돌(DAPI; Invitrogen)로 대조염색하여 CC₅₀ 값을 계산했다. 웰당 4개 지점에서 검출된 바이러스 스파이크 단백질 유도 또는 세포 핵에서 유래된 신호의 수는 오페레타 고함량 선별 시스템(Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)과 내장된 Harmony 고함량 영상 및 분석 소프트웨어 3.5.2를 사용하여 독립 검체 3개에서 정량화하였다. 50% 조직 배양 감염 용량(TCID₅₀)을 결정하기 위해 항바이러스 화합물이 없거나 존재하는 상태에서 SARS-CoV-2에 감염된 세포를 2일 동안 배양했다. 96웰 판에 씨딩(seeding)된 신선한 Vero 세포는 2일 동안 배양 상층액을 연속으로 10배 희석하여 감염시켰다. TCID₅₀은 위에서 언급한 바와 같이 SARS-CoV-2 스파이크

단백질 유도 녹색 형광 개체군과 DAPI 유도 핵 분포의 수를 계산하여 측정하였다.

[109] **SARS-CoV-2에 대한 생물학적 활성**

[110] 에스테르 프로드럭 유도체(**5a**)를 *in vitro*에서 SARS-CoV-2에 대해 조사하였다. SARS-CoV-2의 활성과 세포독성의 결과가 표 2에 요약되어 있다. 합성 전구체(**5a**)를 SARS-CoV-2(BetaCoV/Korea/KCDC03/2020)로 검사했을 때, 에스테르 프로드럭(**5a**)의 항바이러스 활성은 5배 정도, 세포 독성은 약 6배 이상 모체 화합물 **6**보다 개선되었다. 새로운 프로드럭인 **5a**의 EC₅₀(유효농도 50%) 값은 3.5 μ M이고, 세포독성 100 μ M 이상으로 관찰되었다. 특히, 화합물 **5a**의 항바이러스 활성은 다른 에스테르 전구체 **7**보다 3.5배 개선되었고, 세포독성은 서로 비슷한 값을 나타내었다. 하지만, 에틸 알코올 유도체(**5b**)와 C₄-아미노산 유도체(**5c-f**)를 포함한 다른 합성 화합물은 유의미한 생물학적 SARS-CoV-2 활성을 나타내지 않았다.

[111] [표 2]

[112] **Anti-SARS-CoV-2 생리활성 및 세포독성**

Entry	Compound	EC ₅₀ (μ M)	CC ₅₀ (μ M)	SI
1	6	>16.5	16.5	-
2	5b	>100	>100	-
3	5c	>100	>100	-
4	5d	>100	>100	-
5	5e	>100	>100	-
6	5f	>100	>100	-
7	5a	3.5	>100	>28.6
8	7	11.8	>100	>8.5
9	Remdesivir	11.1	>100	>9.0

[113] [실시예 3] 항인플루엔자 활성 평가

[114] **세포, 바이러스 및 화합물**

[115] 인플루엔자 바이러스 A/Puerto Rico/8/34(PR8; H1N1), A/Hong Kong/8/68(HK; H3N2), B/Lee/40(Lee)를 ATCC에서 구입하였다. 인플루엔자 A 바이러스는 37 °C에서 10일된 배아 난자에 3일 동안 접종한 반면, 인플루엔자 B 바이러스는 35 °C에서 2 μ g/ml의 페닐알라닐 클로로메틸 케톤(TPCK) 처리 트립신(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 존재하는 MDCK 세포에서 3일 동안 증폭되었다.

[116] **세포 배양 기반 항바이러스 검사**

- [117] 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 분석은 96웰 플레이트(웰당 3×10⁴개 세포)에서 밤새 자란 MDCK 세포를 35 °C에서 1시간 동안 0.001의 다발성 감염(MOI)으로 모의감염하거나 각 바이러스 균주에 감염시키는 프로토콜에 따라 수행되었다. 동일한 온도에서 3일 동안 각 화합물의 Illations. 비감염 또는 감염 세포의 생존 가능성을 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨브로마이드를 사용하여 각각 절반 최대 세포독성 농도(CC₅₀)와 절반 최대 유효 농도(EC₅₀)를 측정하였다.
- [118] **Flu A 및 B 바이러스에 대한 생물학적 활성**
- [119] 표 3에 요약된 바와 같이 새로운 에스테르 프로드릭(**5a**)을 Flu A/Puerto Rico/8/34(PR8; H1N1), Flu A/Hong Kong/8/68(HK; H3N2), Flu B/Lee/40 (Lee)에 대해 평가하였다. 항독성 A/B에 대한 효능 결과와 세포독성은 표 3에 요약되어 있다. 합성 전구체 **5a**는 화합물 **6**과 전구체 **7**과 동일한 세포독성을 나타내었다. 또한, 합성 전구체 **5a**의 Flu A(H1N1과 H3N2)에 대한 생리활성은 모체 화합물 **6** 보다는 낮지만 전구체 화합물(**7**)과 비슷한 효능 값을 보였다. 역으로 합성 전구체 **5a**의 Flu B에 대한 생리활성은 모체 화합물 **6**과 비슷하였지만 전구체 화합물(**7**)보다는 효능 값이 낮았다. 새로운 에스테르 유도체 **5a**의 효능은 Flu A(H1N1)의 경우 5.8 μM, Flu A(H3N2)의 경우 7.3 μM, Flu B의 경우 3.4 μM 정도였으며, 이 값은 T-705 (6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide)와 비슷한 경향성의 항-인플루엔자 효능을 보였다. 또한, 유도체 **5a**의 효능은 Flu B에 대하여 현재 치료제로 사용 중인 AMT (Amantadine)와 유사한 효능을 보였다. 하지만, 에틸알코올(**5b**)과 C₄-아미노산 유도체(**5c-f**)를 포함한 다른 합성 화합물은 유의미한 anti-Flu A/B 활성을 나타내지 않았다.
- [120] [표 3]

[121] Anti-Flu A와 B 생리활성 및 세포독성

No.	Code	Toxicity (CC ₅₀ μM)	Antiviral activity (EC ₅₀ μM)			Selectivity index		
			Flu A	Flu A	Flu B	Flu A	Flu A	Flu B
			H1N1	H3N2	-	H1N1	H3H2	-
			PR8	Hong Kong	Lee	PR8	Hong Kong	Lee
1	6	>100.0	1.7	2.3	< 1.2	>58.8	>43.5	<1,200
2	5a	>100.0	5.8	7.3	3.4	>17.2	>13.7	>29.4
3	7	>100.0	6.6	6.0	23.8	> 15.2	> 16.7	> 4.2
4	5b	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	-	-	-
5	5c	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	-	-	-
6	5d	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	-	-	-
7	5e	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	-	-	-
8	5f	>100.0	>100.0	>100.0	>100.0	-	-	-
9	AMT	>100.0	>100.0	6.4	>100.0	ND	>15.6	ND
10	RBV	>100.0	37.7	38.7	33.3	> 2.7	> 2.6	> 3
11	T-705	>100.0	3.2	8.5	7.6	>1,111	>20,000	>13.2

AMT: Amantadine

RBV: Ribavirin

T-705: Favipiravir (6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamide)

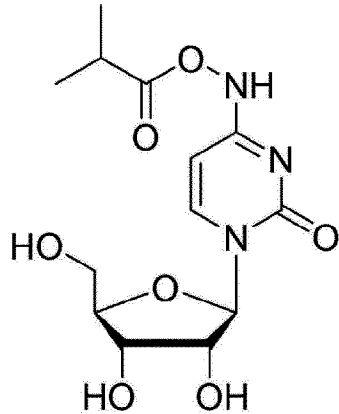
- [122] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

산업상 이용가능성

- [123] 본 발명의 N⁴-이소부티릴옥시시티딘은 모체인 NHC보다 생리적 활성이 개선되어 바이러스에 대해 더 높은 세포독성 및 항바이러스 효능을 나타내어, 효과적인 항바이러스제로서의 용도를 제공할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적 염:
[화학식 1]



- [청구항 2] 제1항에 따른 화합물 또는 이의 약제학적 염을 유효성분으로 포함하는, 바이러스의 감염 치료용 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 바이러스는 RNA 바이러스인 것인, 항바이러스 조성물.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 바이러스는 SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)인 것인, 항바이러스 조성물.
- [청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스인 것인, 항바이러스 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A 또는 인플루엔자 B 바이러스인 것인, 항바이러스 조성물.
- [청구항 7] 제2항에 있어서, 상기 바이러스는 Dengue 바이러스인 것인, 항바이러스 조성물.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/013638

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07H 19/067(2006.01)i; A61K 31/7068(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07H 19/067(2006.01); A61K 31/7068(2006.01); C07H 19/10(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus), Google & keywords: N4-이소부티릴 옥시시티딘 (N4-isobutyryl oxycytidine), 항바이러스 (anti-viral), 감염 (infection)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PAYMODE, D. J. et al. Toward a practical, two-step process for molnupiravir: Direct hydroxyamination of cytidine followed by selective esterification. Organic process research & development. 2021, vol. 25, pp. 1822-1830. See abstract; pages 1822 and 1827; and figures 11-13.	1-7
X	KR 10-2017-0123308 A (EMORY UNIVERSITY) 07 November 2017 (2017-11-07) See claims 1-22.	1-7
X	IVANOV, M. A. et al. New N4-hydroxycytidine derivatives: synthesis and antiviral activity. Collection of Czechoslovak chemical communications. 2006, vol. 71, no. 7, pp. 1099-1106, Abstract. See abstract.	1,2
A	CN 111548384 A (CHANGZHOU ANDI SANITARY PRODUCTS TECHNOLOGY CO., LTD.) 18 August 2020 (2020-08-18) See entire document.	1-7
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 January 2023		Date of mailing of the international search report 17 January 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/013638

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AN, Y. K. et al. Synthesis and evaluation of β -D-N4-hydroxycytidine (NHC) prodrugs against SARS-Cov-2 in vitro. 128th General meeting of the Korean chemical society. 2021. See abstract. ※This document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-7
X	AN, Y. K. et al. Modification and evaluation of β -D-N4-hydroxycytidine (NHC) prodrugs against SARS-Cov-2. 2021, 제24회 한국유기합성학회 학술대회 및 정기 총회 (2021 the 24th Korean Society of Organic Synthesis Conference and Annual Meeting.) See abstract. ※This document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/013638

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2017-0123308	A	07 November 2017	AU	2015-370004	A1	13 July 2017
				AU	2015-370004	B2	11 March 2021
				AU	2021-203840	A1	08 July 2021
				BR	112017013858	A2	27 February 2018
				CA	2972259	A1	30 June 2016
				CN	107427529	A	01 December 2017
				DK	3236972	T3	04 October 2021
				EA	201791460	A1	29 December 2017
				EP	3236972	A1	01 November 2017
				EP	3236972	B1	28 July 2021
				EP	3939985	A1	19 January 2022
				ES	2892123	T3	02 February 2022
				HR	P20211456	T1	24 December 2021
				HU	E056470	T2	28 February 2022
				IL	252997	A	31 August 2017
				IL	252997	B	31 January 2021
				IL	279663	A	01 March 2021
				IL	279663	B	01 October 2022
				IL	296496	A	01 November 2022
				JP	2018-500354	A	11 January 2018
				JP	2022-058363	A	12 April 2022
				LT	3236972	T	10 November 2021
				PL	3236972	T3	07 March 2022
				PT	3236972	T	24 September 2021
				RS	62434	B1	30 November 2021
				SG	10202105371	A	29 July 2021
				SG	11201705069	A	28 July 2017
				SI	3236972	T1	31 December 2021
				US	2019-0022116	A1	24 January 2019
				US	2021-0060050	A1	04 March 2021
				WO	2016-106050	A1	30 June 2016
CN	111548384	A	18 August 2020	CN	111548384	B	27 April 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07H 19/067(2006.01)i; A61K 31/7068(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07H 19/067(2006.01); A61K 31/7068(2006.01); C07H 19/10(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: eKOMPASS(특허청 내부검색 시스템), STN (Registry, Caplus), Google & 키워드: N4-이소부티릴 옥시시티딘 (N4-isobutyryl oxycytidine), 항바이러스 (anti-viral), 감염 (infection)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	PAYMODE, D. J. 등, "Toward a practical, two-step process for molnupiravir: Direct hydroxyamination of cytidine followed by selective esterification", Organic process research & development, 2021, 25권, 페이지 1822-1830 초록; 페이지 1822, 1827; 도면 11-13	1-7
X	KR 10-2017-0123308 A (에모리 유니버시티) 2017.11.07 청구항 1-22	1-7
X	[IVANOV, M. A. 등, "New N4-hydroxycytidine derivatives: synthesis and antiviral activity", Collection of czechoslovak chemical communications, 2006, 71권, 7호, 페이지 1099-1106]의 초록 초록	1,2
A	CN 111548384 A (CHANGZHOU ANDI SANITARY PRODUCTS TECHNOLOGY CO., LTD.) 2020.08.18 전문	1-7
X	AN, Y. K. 등, "Synthesis and evaluation of β-D-N4-hydroxycytidine (NHC) prodrugs against SARS-Cov-2 in vitro", 128th General meeting of the Korean chemical society, 2021 초록 ※위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임	1-7
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년01월16일(16.01.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년01월17일(17.01.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	AN, Y. K. 등, “Modification and evaluation of β -D-N4-hydroxycytidine (NHC) prodrugs against SARS-Cov-2”, 2021, 제24회 한국유기합성학회 학술대회 및 정기 총회 초록 ※위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임	1-7

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0123308 A	2017/11/07	AU 2015-370004 A1	2017/07/13
		AU 2015-370004 B2	2021/03/11
		AU 2021-203840 A1	2021/07/08
		BR 112017013858 A2	2018/02/27
		CA 2972259 A1	2016/06/30
		CN 107427529 A	2017/12/01
		DK 3236972 T3	2021/10/04
		EA 201791460 A1	2017/12/29
		EP 3236972 A1	2017/11/01
		EP 3236972 B1	2021/07/28
		EP 3939985 A1	2022/01/19
		ES 2892123 T3	2022/02/02
		HR P20211456 T1	2021/12/24
		HU E056470 T2	2022/02/28
		IL 252997 A	2017/08/31
		IL 252997 B	2021/01/31
		IL 279663 A	2021/03/01
		IL 279663 B	2022/10/01
		IL 296496 A	2022/11/01
		JP 2018-500354 A	2018/01/11
		JP 2022-058363 A	2022/04/12
		LT 3236972 T	2021/11/10
		PL 3236972 T3	2022/03/07
		PT 3236972 T	2021/09/24
		RS 62434 B1	2021/11/30
		SG 10202105371 A	2021/07/29
		SG 11201705069 A	2017/07/28
		SI 3236972 T1	2021/12/31
		US 2019-0022116 A1	2019/01/24
		US 2021-0060050 A1	2021/03/04
		WO 2016-106050 A1	2016/06/30
CN 111548384 A	2020/08/18	CN 111548384 B	2021/04/27