



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년01월04일

(11) 등록번호 10-2620495

(24) 등록일자 2023년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 19/213 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07H 19/213 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7025118

(22) 출원일자(국제) 2020년01월10일

심사청구일자 2021년08월06일

(85) 번역문제출일자 2021년08월06일

(65) 공개번호 10-2021-0113652

(43) 공개일자 2021년09월16일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2020/071329

(87) 국제공개번호 WO 2020/143740

국제공개일자 2020년07월16일

(30) 우선권주장
201910023472.1 2019년01월10일 중국(CN)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020180009812 A

(73) 특허권자
센젠 잉 바이오과마수티칼 씨오., 엘티디.

중국, 센젠, 평산 디스트릭트, 쉹지 스트리트, 진샤 커뮤니티, 옌오14 진후이 로드, 바이오메디컬 이노베이션 인더스트리얼 파크, 빌딩 10, 룸 1518

(72) 발명자
시, 쟈
중국300071, 난카이 디스트릭트 티안진, 웨이진 로드 94

왕, 쟈후아
중국300071, 난카이 디스트릭트 티안진, 웨이진 로드 94

왕, 단
중국300071, 난카이 디스트릭트 티안진, 웨이진 로드 94

(74) 대리인
이철희

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 변진석

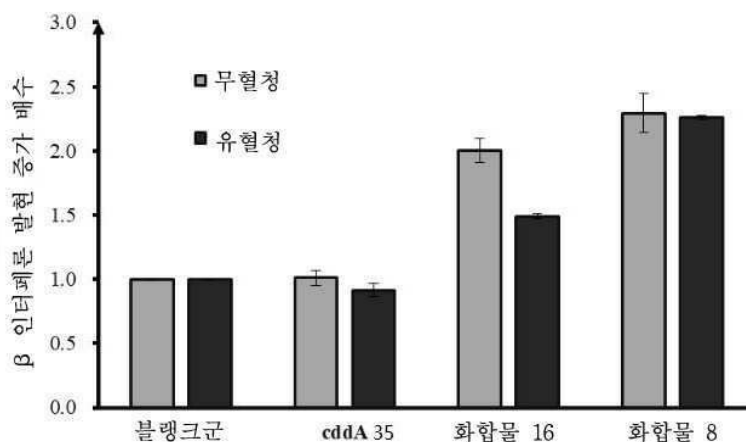
(54) 발명의 명칭 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자 및 이의 제조 방법과 응용

(57) 요약

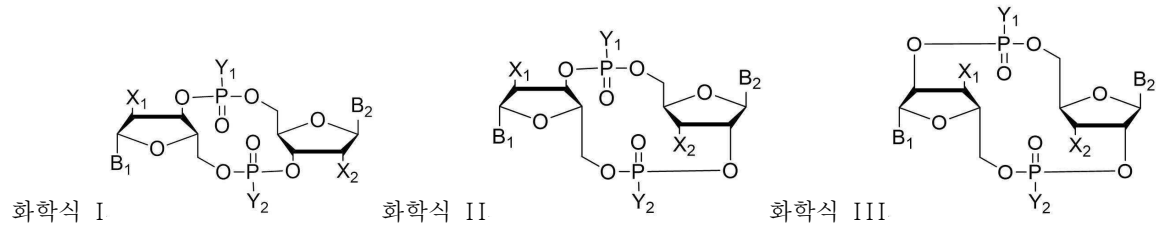
본 실시예들은 약물 분야에 관한 것으로, 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자 및 이의 제조 방법과 응용을 공개하고, 상기 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자는 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III으로 표시되는 구조를 가지며, 자율적으로 세포막을 통과하여 시클릭 디뉴클레오티드를 방출할 수 있고, 높은 세포 활성을 가진

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



다.



(52) CPC특허분류

A61P 31/04 (2018.01)

A61P 31/12 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

명세서

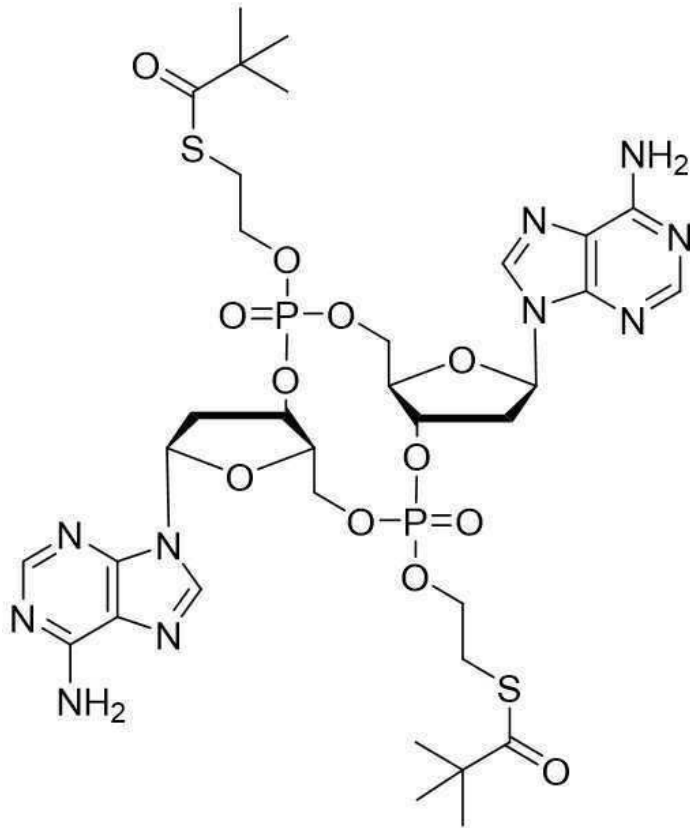
청구범위

청구항 1

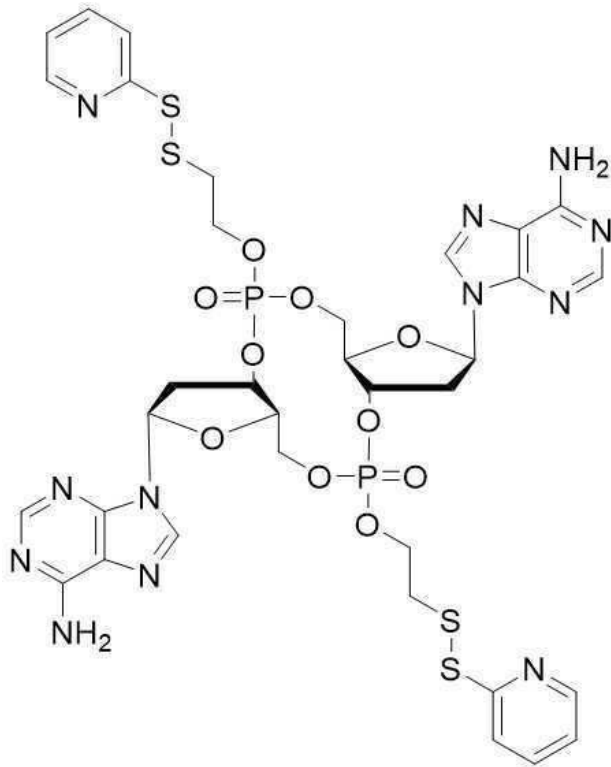
시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 질소 산화물, 용매화물, 약학적으로 허용 가능한 염으로서,

상기 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자는 화학식 11 또는 화학식 12로 표시되는 구조를 가지는 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 질소 산화물, 용매화물, 약학적으로 허용 가능한 염.

[화학식 11]



[화학식 12]



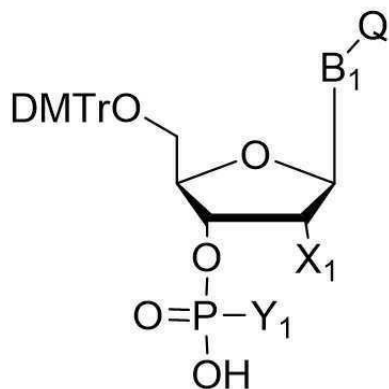
청구항 2

제1항에 따른 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법으로서,

- a) 제1 액상 반응 매질에서 제1 뉴클레오시드 단량체 화합물, 제2 뉴클레오시드 단량체 화합물 및 제1 촉합제를 제1 접촉 반응시켜 선형 디뉴클레오티드 중간체를 얻는 단계;
- b) 알칼리성 조건에서, 상기 선형 디뉴클레오티드 중간체를 데시아노에틸화 반응시킨 다음, 얻은 반응 산물과 제2 촉합제를 제2 액상 반응 매질에서 제2 접촉 반응시키는 단계;
- c) 상기 제2 접촉 반응시켜 얻은 보호기를 가진 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자를 보호기 탈리 반응시키는 단계를 포함하고,

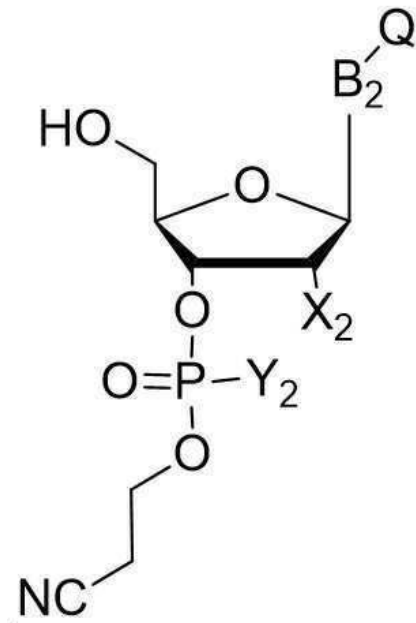
여기서, 상기 제1 뉴클레오시드 단량체 화합물은 화학식 13으로 표시되는 구조를 가지며,

[화학식 13]



상기 제2 뉴클레오시드 단량체 화합물은 화학식 15로 표시되는 구조를 가지고,

[화학식 15]



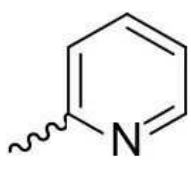
여기서, B₁ 및 B₂는 아데니닐기이고,

X₁ 및 X₂는 모두 -H이고,

Y₁ 및 Y₂는 각각 독립적으로 $\text{R}_1\text{-C(=O)-S-(CH}_2\text{)}_{n_1}\text{-O}$, $\text{R}_2\text{-C(=O)-S-(CH}_2\text{)}_{n_2}\text{-O}$, $\text{R}_3\text{-S-S-(CH}_2\text{)}_{n_3}\text{-O}$ 및

$\text{R}_4\text{-S-S-(CH}_2\text{)}_{n_4}\text{-O}$ 로부터 선택되고;

R₁ 및 R₂는 모두 t-부틸기이고,

R₃ 및 R₄는 모두  이고,

Q는 B₁ 및 B₂로 표시되는 염기에서의 고리 밖의 아미노기에서의 보호기를 나타내고, 화학식 13 및 화학식 15에서의 상기 Q는 각각 독립적으로 아실기인 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 보호기는 페녹시아세틸기 또는 4-이소프로필페녹시아세틸기인 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 제1 접촉 반응의 조건은 온도가 0 ~ 50 ℃이고, 시간이 2 ~ 8 시간인 조건을 포함하는 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 제2 접촉 반응의 조건은 온도가 0 ~ 50 ℃이고, 시간이 2 ~ 8 시간인 조건을 포함하는 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 제1 촉합제 및 상기 제2 촉합제는 각각 독립적으로 1-(메시틸레닐-2-술폰닐)-3-니트로-1,2,4-트리아졸, 2,4,6-트리아이소프로필페닐술폰닐-3-니트로-1,2,4-트리아졸, 2,4,6-트리아이소프로필벤젠술폰닐 클로라이드, 2,4,6-트리메틸벤젠술폰닐 클로라이드, 1H-테트라졸 및 N-메틸이미다졸 중 적어도 하나로부터 선택되는 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

단계 a)에서, 1 mol의 제1 뉴클레오시드 단량체 화합물에 대해, 상기 제1 촉합제의 용량은 2 ~ 3 mol인 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

단계 b)에서, 1 mol의 선형 디뉴클레오티드 중간체에 대해, 상기 제2 촉합제의 용량은 4 ~ 5 mol인 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법.

청구항 9

제2항에 있어서,

단계 b)에서, 상기 알칼리성 조건은 tert-부틸아민의 아세트니트릴 용액에 의해 제공되는 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 알칼리성 조건은 부피비가 1: (1 ~ 5) 인 tert-부틸아민과 아세트니트릴로 형성된 혼합 용액에 의해 제공되는 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법.

청구항 11

제2항에 있어서,

상기 보호기 탈리 반응은 부피비가 1: (5 ~ 20) 인 디이소프로필아민과 메탄올로 형성된 혼합 용액의 존재 하에 진행되는 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법.

청구항 12

제1항에 따른 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 질소 산화물, 용매화물, 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 항바이러스, 항세균감염 또는 항암용 제약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 실시예들은 약물 분야에 관한 것으로, 구체적으로 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자, 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법, 그리고 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 응용에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 이 부분에 기술된 내용은 단순히 본 개시에 대한 배경정보를 제공할 뿐 종래기술을 구성하는 것은 아니다.
- [0003] 시클릭 디뉴클레오티드는 세균 및 포유 동물에서 발견된 신규 2차 메신저 분자이다. 포유 동물 세포에서, 시클릭 디뉴클레오티드는 면역 자극 인자(STING)와 결합하여 면역 반응을 자극할 수 있다. 이는 β 인터페론, NF- κ B와 같은 시토카인의 발현을 유발하고, CD8⁺ T 세포의 증식, 분화 및 성숙을 촉진할 수 있다.
- [0004] 시클릭 디뉴클레오티드는 강력한 면역 자극 작용을 가지므로, 바이러스와 세균 감염 및 암의 치료에 사용할 수 있다. 특히 기존의 면역 요법과 결합하여 항암치료를 수행할 때 우수한 결과를 보일 수 있다. 현재, Aduro사와 노바티스의 ADU-S100은 임상 2상에 진입하였고, MSD의 MK-1454는 임상 1상에 진입하였다.
- [0005] 시클릭 디뉴클레오티드 분자 구조는 2개의 포스포디에스테르 결합을 가지는데, 음전하를 띠는 이러한 포스포디에스테르 결합은 먼저 약물의 낮은 지용성을 유발하고, 시클릭 디뉴클레오티드가 세포막을 효과적으로 통과하는 것을 저해하며, 또한 이러한 포스포디에스테르 결합은 쉽게 가수분해되기 때문에 순환계에서 약물 분자의 불안정성을 초래한다.
- [0006] 현재, 시클릭 디뉴클레오티드 약물 전달 시스템에 주로 보조 물질을 사용한다. 예를 들어, 초기 문헌에서는 렌티바이러스 또는 아데노바이러스를 이용하여 시클릭 디뉴클레오티드의 합성 효소를 패키징하고, 세포에 들어간 후 효소 촉매 작용을 통해 시클릭 디뉴클레오티드를 합성하여 면역 반응을 촉진한다고 보고했지만, 이러한 방법은 큰 위험이 존재하여 광범위하게 적용되지 않는다.
- [0007] 리포솜 또는 지질 나노 입자, 세포 투과성 펩티드, 다가 양이온성 아미노산 함유 단백질 겔 등을 담체로 이용하여 시클릭 디뉴클레오티드 약물의 전달을 구현하는 것이 보고된 바 있으나, 이러한 담체의 사용은 약물의 로딩량을 감소시키는 동시에, 담체의 도입은 일부 잠재적인 세포 독성을 유발할 수 있다.
- [0008] 현재, 시클릭 디뉴클레오티드가 세포에 의해 효과적으로 섭취되도록 임상에서 사용하는 방법은 종양 내 주사인데, 비록 이러한 종양 내 직접 주사는 세포가 시클릭 디뉴클레오티드를 섭취할 수 있도록 한다는 보고가 있지만, 섭취율이 낮으므로, 더 많은 투여량으로 투여해야 하는데, 이러한 많은 투여량의 투여는 면역계의 과도한 활성화를 유발함으로써, 전신적 또는 국소적 염증 반응을 유발할 수 있다.
- [0009] 따라서, 시클릭 디뉴클레오티드가 세포에 의해 효과적으로 섭취되도록 하는 데에는 해결해야 할 문제점들이 남아 있다.

발명의 내용

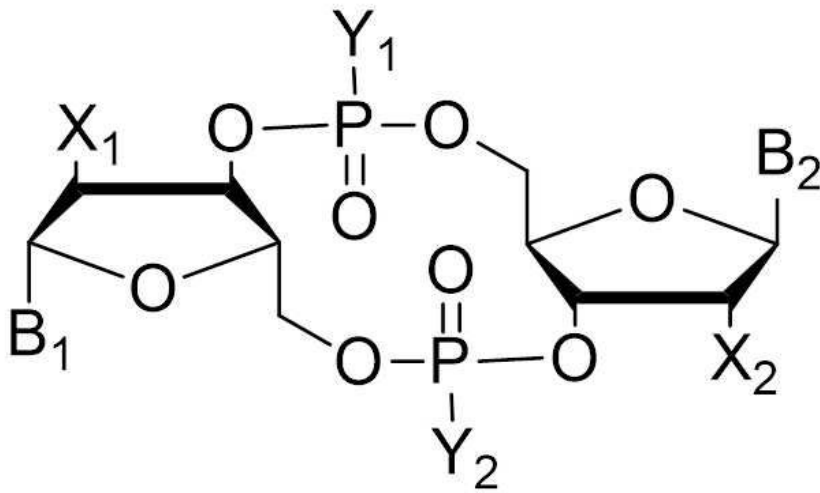
해결하려는 과제

[0010] 본 실시예들의 목적은 선행기술에서 시클릭 디뉴클레오티드가 세포에 의해 효과적으로 섭취되기 어려운 결함을 극복하는 것이다.

과제의 해결 수단

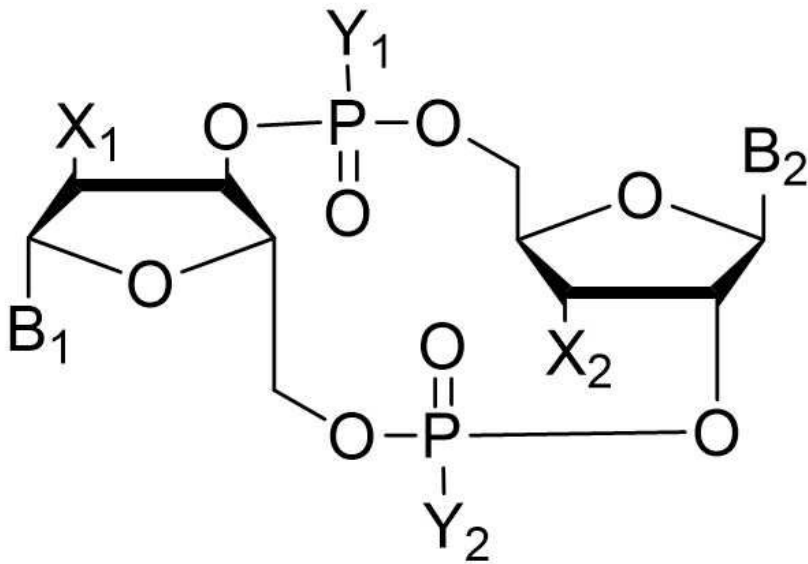
[0011] 이러한 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 제1 양태는 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 질소 산화물, 용매화물, 대사 산물, 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하며, 상기 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자는 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III으로 표시되는 구조를 가지고,

[0012] [화학식 I]



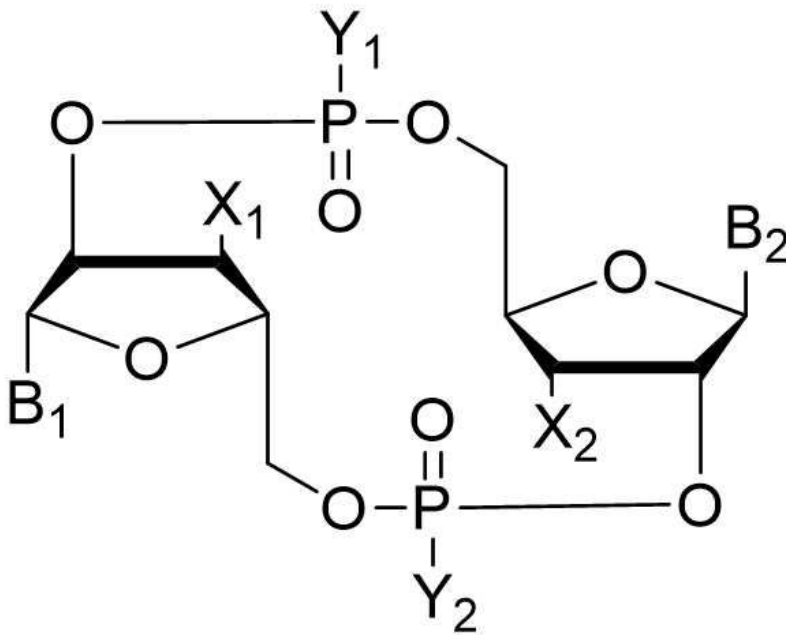
[0013]

[0014] [화학식 II]



[0015]

[0016] [화학식 III]

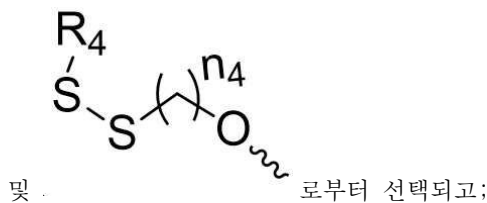
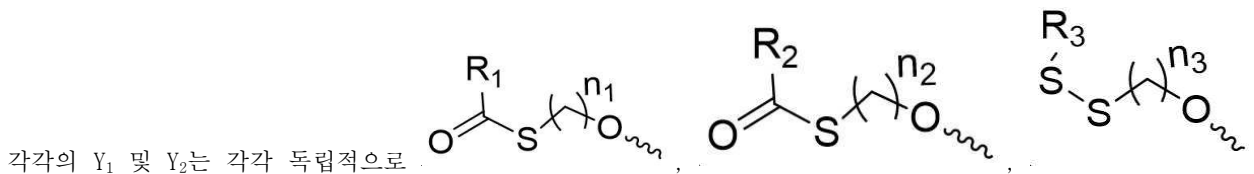


[0017]

[0018] 화학식 I 내지 화학식 III에서, 각각의 B₁ 및 B₂는 각각 독립적으로 천연 염기 또는 인공적으로 변형된 염기이며; 상기 천연 염기는 구아니닐기, 아데니닐기, 시토시닐기, 티미닐기 및 우라실기로부터 선택되고; 상기 인공적으로 변형된 염기는 작용기를 티오화, 할로겐화 또는 메틸화 방법으로 변형시켜 얻은 염기이며, 상기 작용기는 니트로인돌 그룹, 아미노인돌 그룹, 크산틴 그룹 또는 하이포크산틴 그룹이고;

[0019] 각각의 X₁ 및 X₂는 각각 독립적으로 -H, -OCH₃ 또는 -F이며;

[0020]



[0021] 여기서,

[0022] R₁, R₂, R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₁-C₁₀의 지방족 탄화수소기, 치환 또는 비치환된 C₆-C₁₁의 방향족 탄화수소기, 5원 또는 6원 헤테로고리기로부터 선택되며; R₁, R₂, R₃ 및 R₄에 선택적으로 존재하는 치환기는 각각 독립적으로 C₁-C₅의 알킬기, C₁-C₅의 알콕시기 및 할로젠으로부터 선택되고;

[0023] n₁, n₂, n₃ 및 n₄는 각각 독립적으로 1 ~ 5의 정수이다.

[0024] 본 발명의 제2 양태는 전술한 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은,

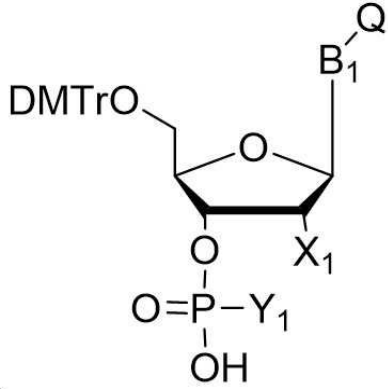
[0025] a) 제1 액상 반응 매질에서 제1 뉴클레오시드 단량체 화합물, 제2 뉴클레오시드 단량체 화합물 및 제1 촉합제를 제1 접촉 반응시켜 선형 디뉴클레오티드 중간체를 얻는 단계;

[0026] b) 알칼리성 조건에서, 상기 선형 디뉴클레오티드 중간체를 테시아노에틸화 반응시킨 다음, 얻은 반응 산물과 제2 촉합제를 제2 액상 반응 매질에서 제2 접촉 반응시키는 단계; 및

[0027] c) 상기 제2 접촉 반응시켜 얻은 보호기를 가진 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자를 보호기 탈리 반응시키는 단계를 포함하되,

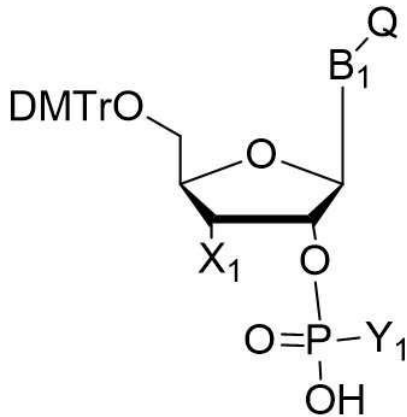
[0028] 상기 제1 뉴클레오시드 단량체 화합물은 화학식 13 또는 화학식 14로 표시되는 구조를 가지며,

화학식 13



[0029]

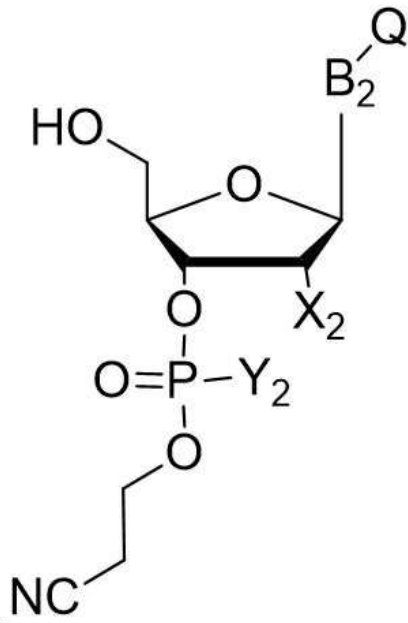
화학식 14



[0030]

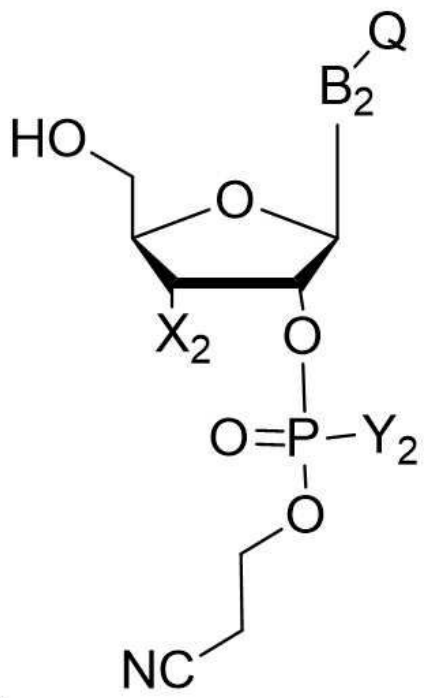
[0031] 상기 제2 뉴클레오시드 단량체 화합물은 화학식 15 또는 화학식 16으로 표시되는 구조를 가지고,

화학식 15



[0032]

화학식 16



[0033]

[0034] 여기서, Q는 B₁ 및 B₂로 표시되는 염기에서의 고리 밖의 아미노기에서의 보호기를 나타내고, 화학식 13 내지 화학식 16에서의 상기 Q는 각각 독립적으로 아실기이다.

[0035] 본 발명의 제3 양태는 약물의 제조에서 전술한 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 질소 산화물, 용매화물, 대사 산물, 약학적으로 허용 가능한 염의 응용을 제공한다.

발명의 효과

[0036] 본 실시예들에 따른 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자는 자율적으로 세포막을 통과하여 시클릭 디뉴클레오티드를 방출할 수 있고, 높은 세포 활성을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 시험에 2에서의 이중 형광 시험 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 시험에 3에서 단핵 세포주 THP-1에서의 I형 인터페론 시험 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 시험에 3에서 화합물이 THP-1 세포에서 I형 인터페론 발현을 유발하는 EC₅₀ 값을 나타낸 도면이다.

도 4에서 a는 시험에 4에서 블랭크 음성 대조군 마우스에 투여 0일째의 종양 영상 이미지이고, b는 시험에 4에서 ADU-S100 투여 실험군 마우스에 투여 0일째의 종양 영상 이미지이며, c는 시험에 4에서 화합물 8 투여 실험군 마우스에 투여 0일째의 종양 영상 이미지이고, d는 시험에 4에서 음성 대조군 마우스에 투여 9일째의 종양 영상 이미지이며, e는 시험에 4에서 ADU-S100 투여 실험군 마우스에 투여 9일째의 종양 영상 이미지이고, f는 시험에 4에서 화합물 8 투여 실험군 마우스에 투여 9일째의 종양 영상 이미지이며, g는 시험에 4에서 각 실험군 마우스에 투여 0일째의 종양 영상의 총 형광량 통계 그래프이고, h는 시험에 4에서 각 실험군 마우스에 투여 9일째의 종양 영상의 총 형광량 통계 그래프이다.

도 5에서 a는 시험에 4에서 상이한 실험군 마우스의 종양 부피 크기를 나타낸 도면이고, b는 시험에 4에서 상이한 실험군 마우스의 생존율을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 본 명세서에서 개시된 범위의 끝 점 및 임의의 값은 상기 정확한 범위 또는 값에 한정되지 않으며, 이러한 범위 또는 값은 이러한 범위 또는 값에 가까운 값을 포함하는 것으로 이해해야 한다. 수치 범위의 경우 각 범위의 끝 점 값 사이, 각 범위의 끝 점 값과 개별 점 값 사이, 그리고 개별 점 값 사이를 서로 조합하여 하나 이상의 새로운 수치 범위를 얻을 수 있고, 이러한 수치 범위는 본 명세서에서 구체적으로 공개된 것으로 간주되어야 한다.

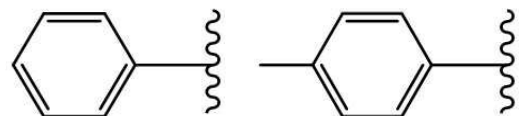
[0039] 진술한 바와 같이, 본 실시예들의 제1 양태는 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 질소 산화물, 용매화물, 대사 산물, 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0040] 본 발명의 발명자는 연구에서, 시클릭 디뉴클레오티드 분자에 Y₁ 및/또는 Y₂로 표시되는 티오에스테르 구조 및/또는 이황화 결합 구조를 함유한 인산에스테르 보호기를 도입하여 인산트리에스테르계 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자를 형성하여, 인산 음전하에 따른 영향을 제거하고, 세포질 내에 들어가 보호기를 탈리하며, 생물학적 활성을 가지는 시클릭 디뉴클레오티드 분자를 방출함으로써, 시클릭 디뉴클레오티드가 세포에 의해 효과적으로 섭취되기 어려운 결함을 극복할 수 있음을 예기치 않게 발견하였다.

[0041] 본 실시예들에서, 상기 "C₁-C₁₀의 지방족 탄화수소기"는 총 탄소 원자 수가 1 ~ 10인 알킬기 또는 알케닐기를 의미하고, 예를 들어, 메틸기, 에틸기, n-프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, sec-부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기, n-펜틸기, 이소펜틸기, tert-펜틸기, 네오펜틸기, n-헥실기, 이소헥실기, n-헵틸기, 이소헵틸기, n-옥틸기, 이소옥틸기, 비닐기, 프로페닐기 등일 수 있다.

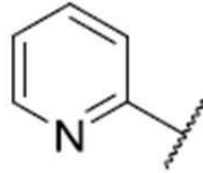
[0042] 상기 "C₁-C₆의 지방족 탄화수소기"는 총 탄소 원자 수가 1 ~ 6인 알칸일기 또는 알킬레닐기를 의미하고, 예를 들어, 메틸기, 에틸기, n-프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, sec-부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기, n-펜틸기, 이소펜틸기, tert-펜틸기, 네오펜틸기, n-헥실기, 이소헥실기, 비닐기, 프로페닐기 등일 수 있다.

[0043] 상기 "C₆-C₁₁의 방향족 탄화수소기"는 다른 작용기 또는 치환기가 연결된 방향족 고리를 포함한 하나 또는 다



수의 수소 원자가 결실된 방향(족) 고리를 의미하고, 예를 들어, 등일 수 있다.

[0044] 본 실시예들에서, 상기 5원 또는 6원 헤테로고리기는 포화 또는 불포화 5원 헤테로고리, 또는 포화 또는 불포



화 6원 헤테로고리기를 의미하고, 예를 들어, ... 동일 수 있다.

[0045] 본 실시예들에서, 상기 “C₁-C₅의 알킬기”는 총 탄소 원자 수가 1 ~ 5인 알킬기를 의미하고, 예를 들어, 메틸기, 에틸기, n-프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, sec-부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기, n-펜틸기, 이소펜틸기, tert-펜틸기, 네오펜틸기일 수 있다.

[0046] 본 실시예들에서, 상기 “C₁-C₅의 알콕시기”는 총 탄소 원자 수가 1 ~ 5인 알콕시기를 의미하고, 예를 들어, 메톡시기, 에톡시기, 프로폭시기, 부톡시기, 펜톡시기 동일 수 있다.

[0047] 본 실시예들에서, 할로겐은 불소, 염소, 브롬, 요오드일 수 있다.

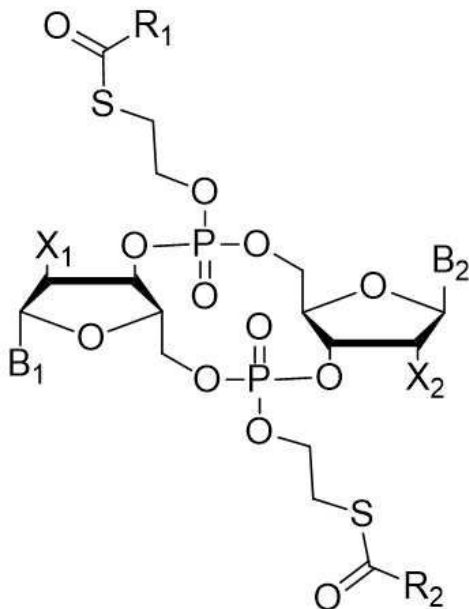
[0048] 바람직하게, R₁, R₂, R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 치환 또는 비치환된 C₁-C₆의 지방족 탄화수소기, 치환 또는 비치환된 C₆-C₁₁의 방향족 탄화수소기, 5원 또는 6원 헤테로고리기로부터 선택되고; 또한 R₁, R₂, R₃ 및 R₄에 선택적으로 존재하는 치환기는 각각 독립적으로 C₁-C₅의 알킬기, C₁-C₅의 알콕시기 및 할로겐으로부터 선택된다.

[0049] 바람직한 구체적인 실시형태에 따르면, 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III으로 표시되는 구조에서, Y₁과 Y₂는 동일하고; B₁과 B₂는 동일하며; X₁과 X₂는 동일하다.

[0050] 다른 바람직한 구체적인 실시형태에 따르면, Y₁ 및 Y₂에서, n₁, n₂, n₃ 및 n₄는 동일하고, 1 ~ 3의 정수이다.

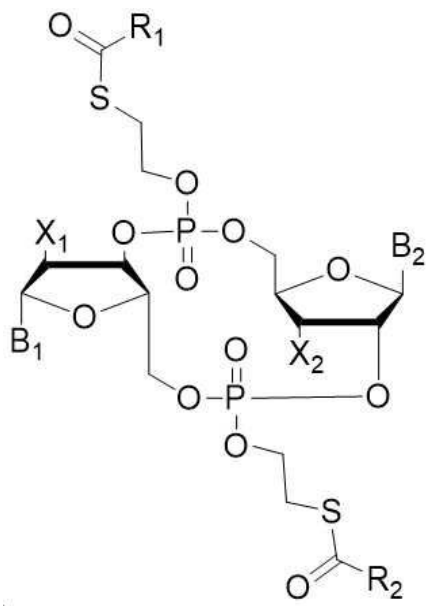
[0051] 다른 바람직한 구체적인 실시형태에 따르면, 상기 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자는 화학식 1 내지 화학식 10으로 표시되는 임의의 하나의 구조를 가지고,

화학식 1



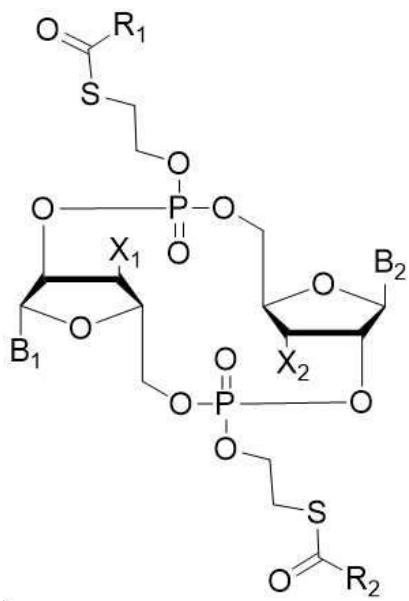
[0052] .

화학식 2



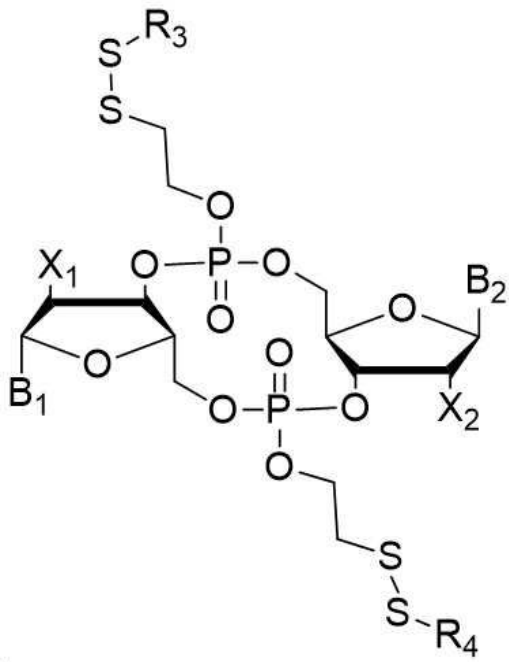
[0053]

화학식 3



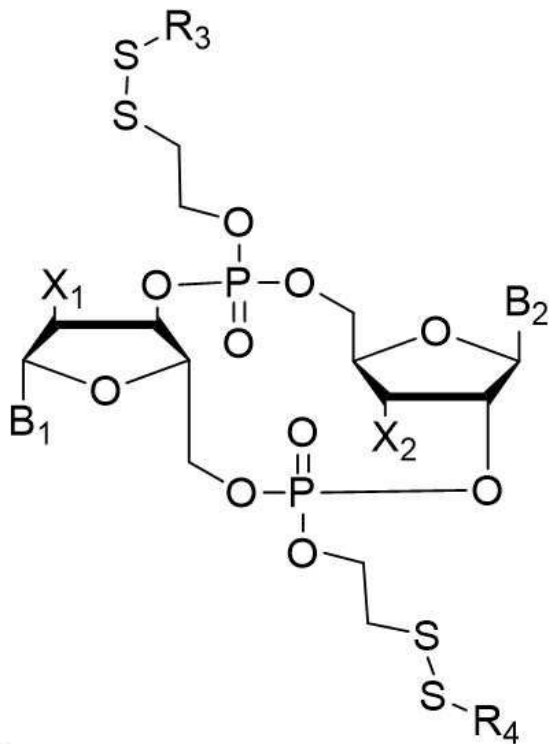
[0054]

화학식 4



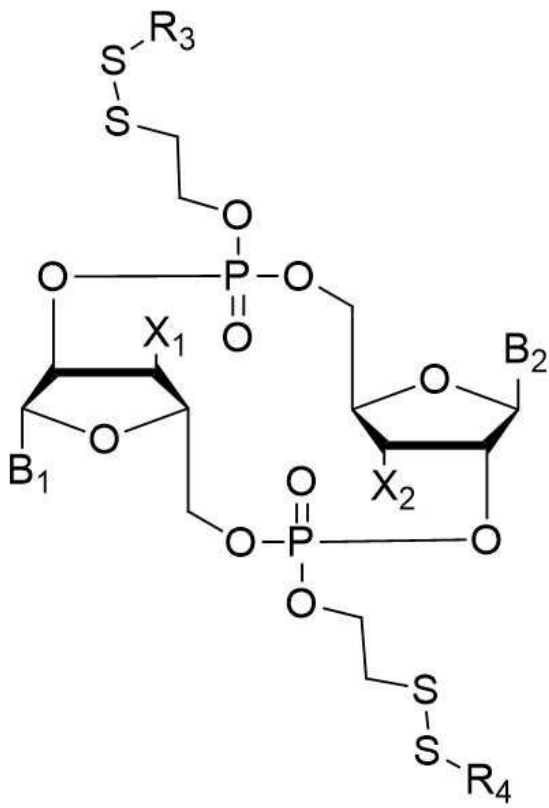
[0055]

화학식 5



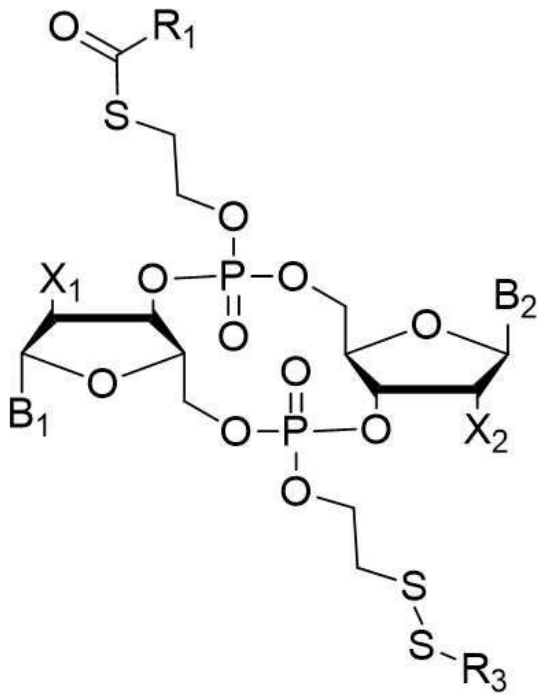
[0056]

화학식 6



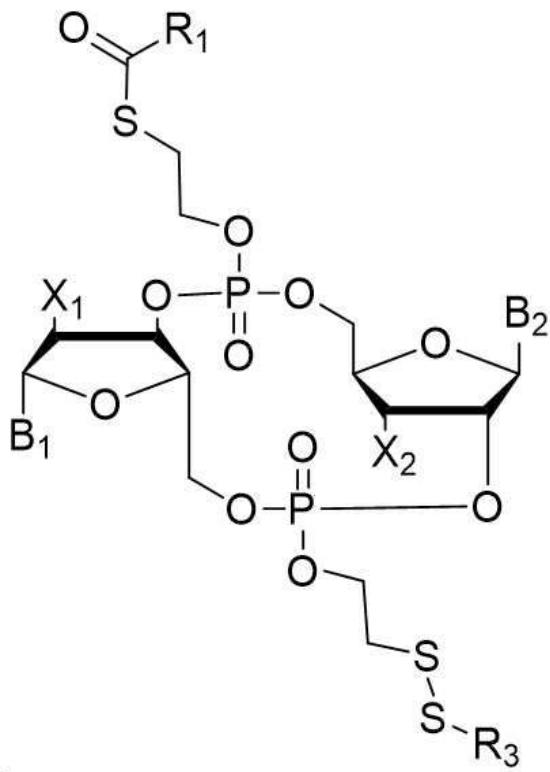
[0057]

화학식 7



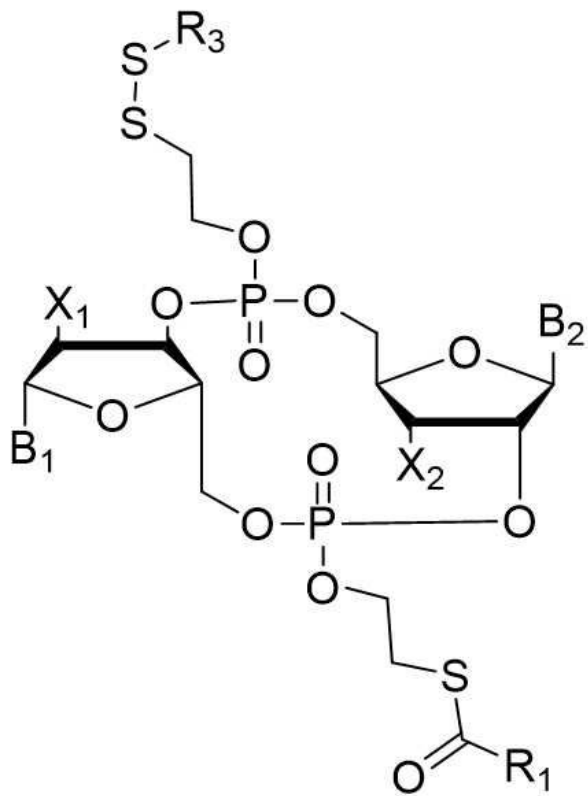
[0058]

화학식 8



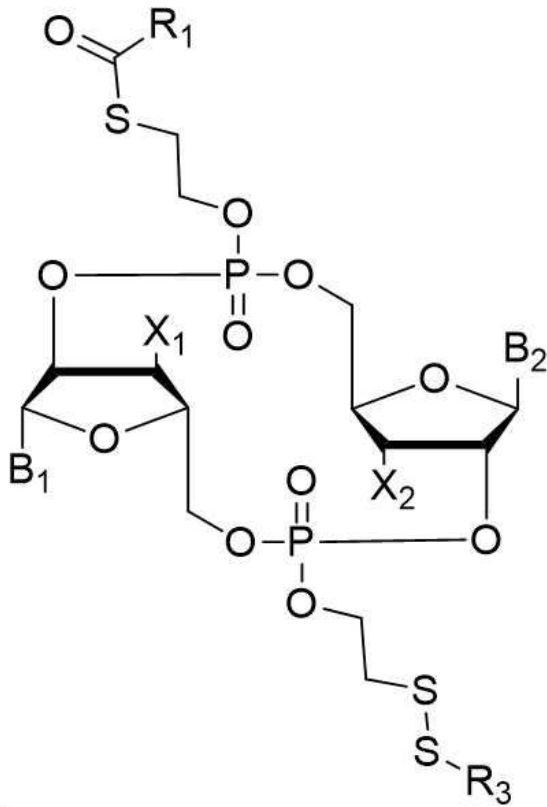
[0059]

화학식 9



[0060]

화학식 10



[0061]

[0062] 여기서, 화학식 1 내지 화학식 10에서의 그룹의 정의는 전술한 정의와 대응되게 같다.

[0063] 특히 바람직한 경우, 상기 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자는 화학식 1 내지 화학식 10으로 표시되는 임의의 하나의 구조를 가지고, 화학식 1 내지 화학식 10에서,

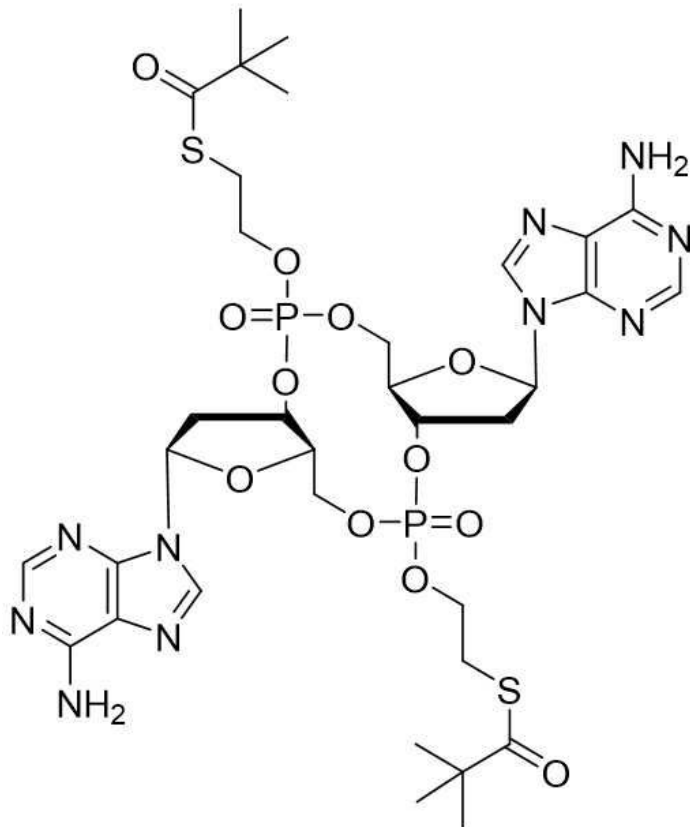
[0064] B₁ 과 B₂ 는 동일하고, 구아니닐기, 아데니닐기, 시토시닐기, 티미닐기 및 우라실기로부터 선택되며;

[0065] X₁ 및 X₂는 모두 -H이고;

[0066] R₁, R₂, R₃ 및 R₄는 동일하며, 치환 또는 비치환된 C₁-C₆의 지방족 탄화수소기, 치환 또는 비치환된 C₆-C₁₁의 방향족 탄화수소기, 5원 또는 6원 헤테로고리기로부터 선택되고; R₁, R₂, R₃ 및 R₄에 선택적으로 존재하는 치환기는 C₁-C₅의 알킬기로부터 선택된다.

[0067] 본 발명은 바람직한 실시형태를 제공하며, 상기 시클릭 디뉴클레오티드는 화학식 11로 표시되는 구조를 가진다.

화학식 11

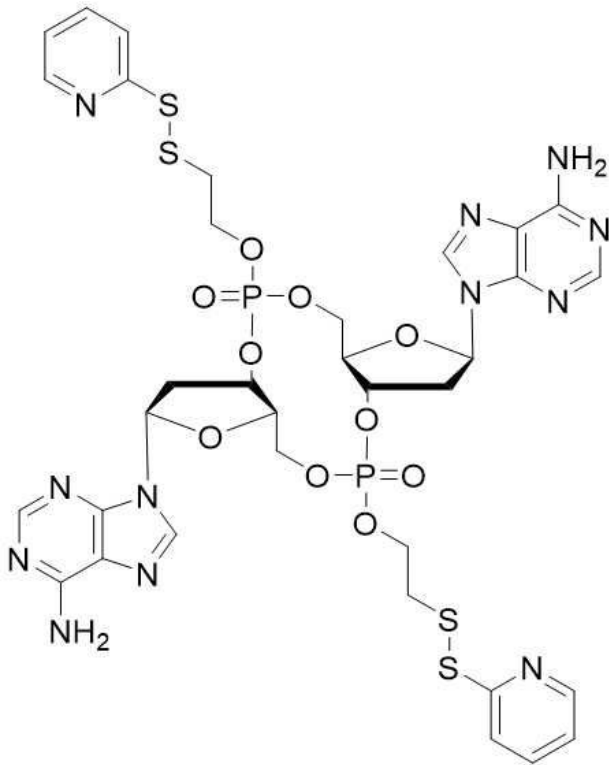


[0068]

[0069]

본 발명의 다른 바람직한 실시형태에 따르면, 상기 시클릭 디뉴클레오티드는 화학식 12로 표시되는 구조를 가진다.

화학식 12



- [0070]
- [0071] 전술한 바와 같이, 본 발명의 제2 양태는 본 발명에 따른 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법을 제공한다.
- [0072] 본 실시예들에 따르면, 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 과정에서 사용된 보호기는 아실기이고, 예를 들어, 벤조일기, 이소부틸릴기, 아세틸기, 페녹시아세틸기, 4-이소프로필페녹시아세틸기 등일 수 있다.
- [0073] 특히 바람직하게, 상기 보호기는 페녹시아세틸기 또는 4-이소프로필페녹시아세틸기로부터 선택된다.
- [0074] 화학식 13 및 화학식 14에서, DMTr-는 4,4'-디메톡시트리페닐메틸기이다.
- [0075] 본 실시예들에서, 상기 방법에서 각 물질의 용량을 특별히 한정하지 않으며, 통상의 기술자는 각 반응의 필요에 따라 선택할 수 있다.
- [0076] 바람직하게, 상기 제1 접축 반응의 조건은 온도가 0 ~ 50 °C이고, 시간이 2 ~ 8 시간인 조건을 포함한다.
- [0077] 바람직하게, 상기 제2 접축 반응의 조건은 온도가 0 ~ 50 °C이고, 시간이 2 ~ 8 시간인 조건을 포함한다.
- [0078] 바람직하게, 상기 제1 축합제 및 상기 제2 축합제는 각각 독립적으로 1-(메시틸레닐-2-술폰닐)-3-니트로-1,2,4-트리아졸, 2,4,6-트리아이소프로필페닐술폰닐-3-니트로-1,2,4-트리아졸, 2,4,6-트리아이소프로필벤젠술폰닐 클로라이드, 2,4,6-트리메틸벤젠술폰닐 클로라이드, 1H-테트라졸 및 N-메틸이미다졸 중 적어도 하나로부터 선택된다.
- [0079] 본 실시예들에서, 상기 제1 액상 반응 매질 및 제2 액상 반응 매질은 본 분야에서 상용하는 반응 매질이고, 예를 들어, 피리딘, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 디옥산, 테트라히드로푸란 등일 수 있으며, 통상의 기술자는 반응의 유형에 따라 선택할 수 있다.
- [0080] 바람직하게, 단계 a)에서, 1 mol의 제1 뉴클레오시드 단량체 화합물에 대해, 상기 제1 축합제의 용량은 2 ~ 3 mol이다.
- [0081] 바람직하게, 단계 b)에서, 1 mol의 선형 디뉴클레오티드 중간체에 대해, 상기 제2 축합제의 용량은 4 ~ 5 mol이다.
- [0082] 단계 b)에서, 상기 알칼리성 조건은 예를 들어 트리에틸아민, tert-부틸아민, 디에틸아민, 디이소프로필아민 등

에 의해 제공될 수 있고, 특히 바람직한 경우, 더 높은 수율의 목표 산물을 얻기 위해, 본 실시예들에 따른 알칼리성 조건은 tert-부틸아민의 아세트니트릴 용액에 의해 제공된다. 특히 바람직하게, 상기 알칼리성 조건은 부피비가 1:(1 ~ 5)인 tert-부틸아민과 아세트니트릴로 형성된 혼합 용액에 의해 제공된다.

[0083] 바람직하게, 상기 보호기 탈리 반응은 부피비가 1:(5 ~ 20)인 디이소프로필아민과 메탄올로 형성된 혼합 용액의 존재 하에 진행된다.

[0084] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따르면, 본 실시예들에 따른 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 제조 방법은 다음과 같은 단계를 포함한다.

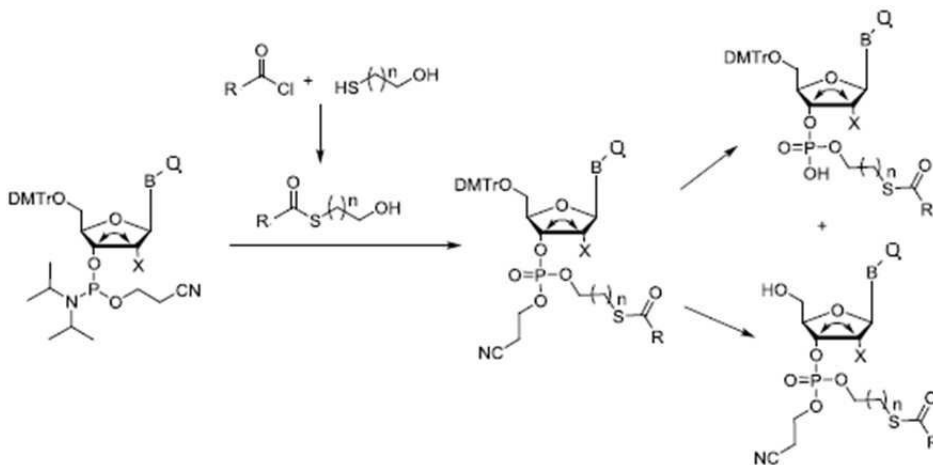
[0085] 1) 상기 제1 뉴클레오시드 단량체 화합물, 상기 제2 뉴클레오시드 단량체 화합물 및 1-(메틸레닐-2-술폰닐)-3-니트로-1,2,4-트리아졸을 피리딘에 넣고, 불활성 가스 분위기에서, 0 ~ 50 °C에서 2 ~ 8 시간 동안 반응시켜 선형 디뉴클레오티드 중간체를 얻는다.

[0086] 2) 단계 1)에서 얻은 선형 디뉴클레오티드 중간체를 tert-부틸아민과 아세트니트릴의 혼합 용액에 넣고 10 ~ 30 분 동안 반응시키며, 용매를 증발 건조시킨 후, 1-(메틸레닐-2-술폰닐)-3-니트로-1,2,4-트리아졸을 넣고, 피리딘으로 용해시키며, 0 ~ 50 °C에서 2 ~ 8 시간 동안 반응시켜 보호기를 가진 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자를 얻으며; 여기서, 상기 tert-부틸아민과 아세트니트릴의 혼합 용액에서 tert-부틸아민과 아세트니트릴의 부피비는 1:(1 ~ 5)이다.

[0087] 3) 보호기를 가진 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자를 디이소프로필아민과 메탄올의 혼합 용액에 용해시키고, 20 ~ 30 °C에서 3 ~ 5 시간 동안 반응시켜 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자를 얻으며; 여기서, 상기 디이소프로필아민과 메탄올의 혼합 용액에서 디이소프로필아민과 메탄올의 부피비는 1:(5 ~ 20)이다.

[0088] 본 실시예들에서, 상기 제1 뉴클레오시드 단량체 화합물 및 상기 제2 뉴클레오시드 단량체 화합물의 합성 방법은 종래 기술에서 상용하는 방법일 수 있고, 통상의 기술자는 본 실시예들에 따른 화학식 13 내지 화학식 16으로 표시되는 구조에 따라 합성 경로를 스스로 설계할 수 있다. 본 실시예들은 여기서 몇 가지의 구체적인 합성 방법을 예시적으로 제공한다.

[0089] [방법 1]



[0090] .

[0091] 방법 1에서, R은 R₁ 또는 R₂일 수 있고, B는 B₁ 또는 B₂일 수 있으며, X는 X₁ 또는 X₂일 수 있고, n은 n₁ 또는 n₂일 수 있다. 방법 1은 다음과 같은 단계를 포함한다.

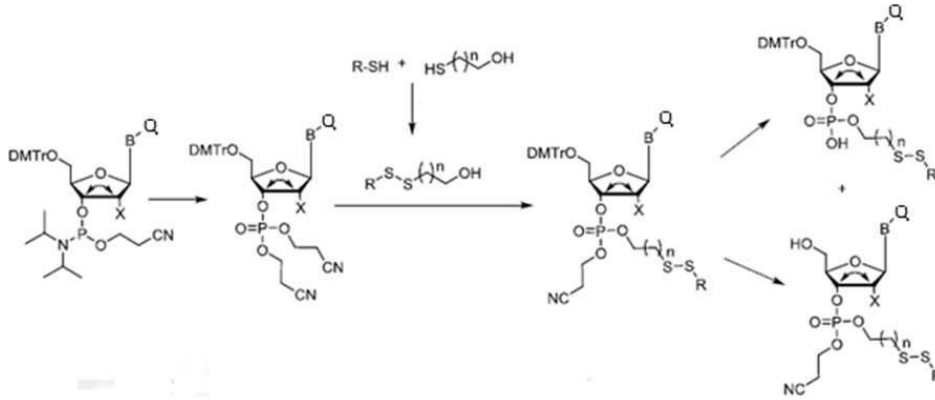
[0092] (i) 메르캅토 치환 알코올 및 트리에틸아민을 디클로로메탄에 용해시키고, -80 °C ~ -70 °C에서 염화 아실의 디클로로메탄 용액을 적가하며, 20 ~ 30 °C까지 승온시켜 1 ~ 3 시간 동안 반응시키고, 물을 넣어 쿨링하며, 유기 용매로 추출하고, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 티오에스테르 치환 알코올을 얻는다.

[0093] (ii) 뉴클레오시드 포스포아미다이트 단량체, 5-에틸메르캅토테트라졸, 단계 (i)에서 얻은 티오에스테르 치환 알코올을 무수 아세트니트릴에 넣고, 불활성 가스 분위기에서 1 ~ 3 시간 동안 반응시킨 후 tert-부틸 퍼옥시산을 넣으며, 30 ~ 60 분 후 아황산나트륨 수용액을 넣어 쿨링하고, 유기 용매로 추출하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 티오에스테르 보호기를 가진 핵산 단량체를 얻는다.

[0094] (iii) 단계 (ii)에서 얻은 티오에스테르 보호기를 가진 핵산 단량체를 디클로로메탄으로 용해시킨 다음, 디클로로아세트산을 넣고, 20 ~ 30 °C에서 1 ~ 3 시간 동안 반응시킨 후, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 상기 제1 뉴클레오시드 단량체 화합물을 얻는다.

[0095] (iv) 단계 (ii)에서 얻은 티오에스테르 보호기를 가진 핵산 단량체를 아세트니트릴로 용해시킨 다음, tert-부틸아민을 넣고, 20 ~ 30 °C에서 1 ~ 3 시간 동안 반응시킨 후, 용매를 회전 건조시켜 상기 제2 뉴클레오시드 단량체 화합물을 얻는다.

[0096] [방법 2]



[0097]

[0098] 방법 2에서, R은 R₃ 또는 R₄일 수 있고, B는 B₁ 또는 B₂일 수 있으며, X는 X₁ 또는 X₂일 수 있고, n은 n₃ 또는 n₄일 수 있다. 방법 2는 다음과 같은 단계를 포함한다.

[0099] (i) N-클로로숙신이미드산 클로라이드 및 메르캅탄(또는 티오페놀)을 디클로로메탄에 넣고, 10 ~ 35 °C에서 1 ~ 3 시간 동안 반응시킨 후, 메르캅탄 치환 알코올을 넣고, 계속 20 ~ 30 시간 동안 반응시킨 다음, 물을 넣어 퀀칭하고, 유기 용매로 추출하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 이황화 결합 구조가 치환된 알코올을 얻는다.

[0100] (ii) 3-히드록시프로피오니트릴, 뉴클레오시드 포스포아미다이트 단량체 및 5-에틸메르캅토테트라졸을 무수 아세트니트릴에 넣고, 불활성 가스 분위기에서 1 ~ 3 시간 동안 반응시킨 후 tert-부틸 퍼옥시산을 넣으며, 계속 30 ~ 60 분 동안 반응시킨 다음, 아황산수소나트륨 수용액을 넣어 퀀칭하고, 유기 용매로 추출하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 디시아노에틸기로 보호된 핵산 단량체를 얻는다.

[0101] (iii) 단계 (ii)에서 얻은 디시아노에틸기로 보호된 뉴클레오티드 단량체를 디클로로메탄으로 용해시킨 후, tert-부틸아민을 넣고, 20 ~ 30 °C에서 10 ~ 30 분 동안 교반한 후 용매를 회전 건조시키며, 1-(메시틸레닐-2-술포닐)-3-니트로-1,2,4-트리아졸 및 단계 (i)에서 얻은 이황화 결합 구조가 치환된 알코올을 넣어, 무수 피리딘으로 용해시키고, 불활성 가스로 반응을 4 시간 동안 보호한 후, 용매를 증발 건조시키며, 유기 용매로 추출하고, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 이황화 결합 치환 알코올로 보호된 인산에스테르를 가진 뉴클레오티드 단량체를 얻는다.

[0102] (iv) 단계 (iii)에서 얻은 이황화 결합 치환 알코올로 보호된 인산에스테르를 가진 뉴클레오티드 단량체를 디클로로메탄으로 용해시키고, 디클로로아세트산을 넣어 20 ~ 30 °C에서 1 ~ 3 시간 동안 반응시키며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 상기 제1 뉴클레오시드 단량체 화합물을 얻는다.

[0103] (v) 단계 (iii)에서 얻은 이황화 결합 치환 알코올로 보호된 인산에스테르를 가진 뉴클레오티드 단량체를 아세트니트릴로 용해시킨 후, tert-부틸아민을 넣고, 20 ~ 30 °C에서 10 ~ 30 분 동안 교반한 후, 용매를 회전 건조시켜 상기 제2 뉴클레오시드 단량체 화합물을 얻는다.

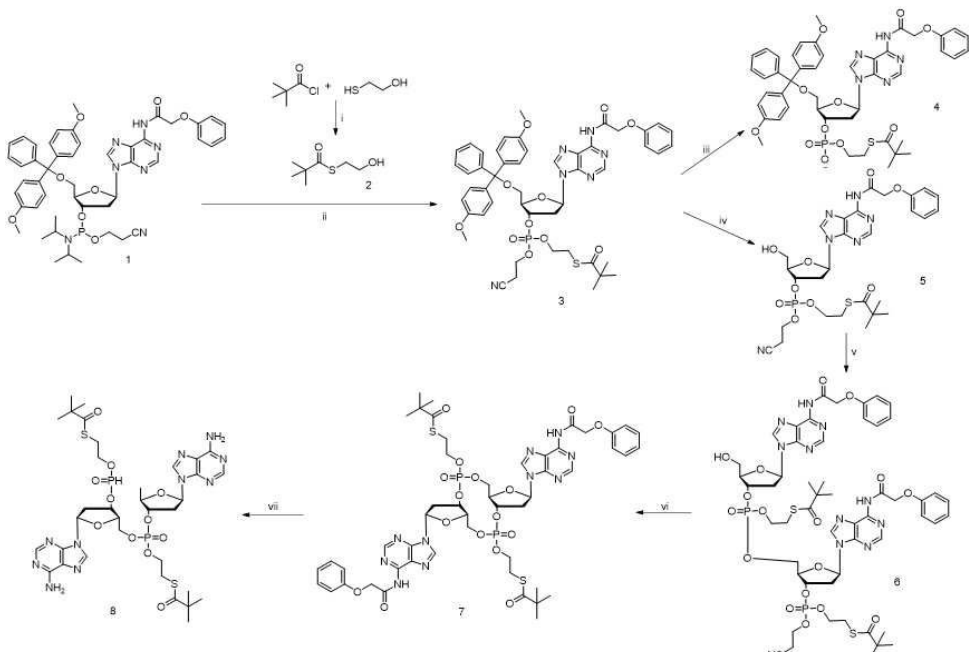
[0104] 방법 1 및 방법 2에서, 각 물질의 용량을 특별히 한정하지 않으며, 통상의 기술자는 반응의 필요에 따라 선택할 수 있다.

[0105] 본 발명의 제3 양태는 약물의 제조에서 본 실시예들에 따른 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자 또는 이의 입체 이성질체, 호변 이성질체, 질소 산화물, 용매화물, 대사 산물, 약학적으로 허용 가능한 염의 응용을 제공한다.

- [0106] 바람직한 경우, 상기 약물은 항바이러스 약물, 항세균감염 약물 또는 항암 약물이다.
- [0107] 본 실시예들에 따른 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자는 자율적으로 세포막을 통과하여 시클릭 디뉴클레오티드를 방출할 수 있고, 방출된 시클릭 디뉴클레오티드는 면역 자극 인자(STING)와 결합하여 면역 반응을 자극할 수 있으므로, 항바이러스, 항세균 감염 및 항암 약물의 제조에 응용될 수 있다.
- [0108] 본 발명의 제2 양태에서 언급된 반응에서 모두 본 분야에서 통상적으로 사용하는 다양한 후처리 방법으로 얻은 산물에 대해 후처리할 수 있다. 상기 후처리 방법은 추출, 재결정, 세척, 건조, 여과 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본 발명은 여기서 더 이상 설명하지 않으며, 실시예에서 언급된 후처리 방법은 예시적으로 예를 들기 위한 것일 뿐, 이들이 반드시 적용해야 할 조각이 아니며, 통상의 기술자는 통상적인 다른 수단으로 대체할 수 있다.
- [0109] 이하 실시예들을 통해 본 실시예들을 상세히 설명한다. 아래의 실시예들에서, 사용된 용매, 원료 및 시약은 특별히 명시되지 않은 한 모두 상업적으로 구매하고, 모두 분석 순도 또는 화학적 순도이다.
- [0110] 실험에서 필요한 무수 용매는 모두 통상적인 방법으로 건조시켰다.
- [0111] 산물 분리, 식별 기기 및 방법:
- [0112] 박막 크로마토그래피 실리카겔 GF254는 중국 텐진 실리다 회사(Tianjin Silida Technology Co., Ltd.)에서 생산하였다.
- [0113] TLC는 254 nm의 자외선에서 분석하고, 컬럼 크로마토그래피 실리카겔은 중국 칭다오 해양 화학 회사(Qingdao Haiyang Chemical Co., Ltd.)에서 생산하였다.
- [0114] 핵자기공명분광기는 Bruker AVANCE 400M Hz를 사용하였고, 내부 표준은 TMS로 하였다.
- [0115] 고분해능 질량 분석기는 Varian 7.0T FTMS 푸리에 변환 플라즈마 사이클로트론 공명 고분해능 질량 분석기를 사용하였다.
- [0116] 상온 및 실온은 모두 (25±3)℃를 의미한다.

실시예 1

- [0117] 펜타노일 티오에틸 에스테르 (pentanoyl thioethyl ester) 로 보호된 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자 (화합물 8) 의 합성.



- [0118]
- [0119] 1) 100 mL의 플라스크에 0.9 mL의 2-메르캅토에탄올, 1.8 mL의 트리에틸아민 및 10 mL의 재증류된 디클로로메탄을 넣어 용해시키고, -78 °C의 조건에서 펜타노일 클로라이드 (1.6 mL, 10 mL의 디클로로메탄으로 용해시킴)를 적가하며, 30 분 동안 적가한 후, 계속 1 시간 동안 반응시킨 후, 천천히 실온까지 승온시키고, 계속 1 시간 동

안 교반하였다. 적당량의 물을 넣어 반응을 퀴칭하고, 추출하며, 수상을 디클로로메탄으로 2회 추출하고, 유기상을 병합하며, 포화 식염수로 세척하고, 무수 황산나트륨으로 건조시키며, 여과하고 농축하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 화합물 2를 얻었다.

[0120] 핵자기 데이터는 다음과 같다.

[0121] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.73 (t, J = 6.1 Hz, 9H), 3.04 (t, J = 6.1 Hz, 9H), 1.23 (s, 4H).

[0122] ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 207.36, 61.91, 46.57, 31.49, 27.40.

[0123] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.

[0124] 2) 화합물 2 (1.12 mmol), 5-에틸메르캅토테트라졸 (3.36 mmol) 및 화합물 1 (1.12 mmol)을 플라스크에 넣고, 10 mL의 무수 아세트니트릴을 넣어 실온에서 1 시간 동안 교반한 후 1 mL의 5.5 M의 tert-부틸 퍼옥시산-데칸 용액을 넣었다. 계속 실온에서 40분 동안 교반한 후, 아황산수소나트륨 수용액을 넣어 교반하고, 디클로로메탄으로 여러 번 추출한 후, 유기상을 병합하여 포화 식염수로 세척하며, 무수 황산나트륨으로 건조시킨 후, 여과하고, 농축하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 화합물 3 (950 mg)을 얻었다.

[0125] 핵자기 데이터는 다음과 같다.

[0126] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.59 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.17 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.46 - 7.23 (m, 10H), 7.21 - 7.14 (m, 3H), 7.06 (t, J = 8.1 Hz, 3H), 6.89 - 6.76 (m, 4H), 6.46 (dd, J = 9.5, 5.3 Hz, 1H), 5.41 - 5.31 (m, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.49 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 4.38 - 4.29 (m, 2H), 4.18 (dd, J = 15.0, 6.9 Hz, 2H), 3.99 (dd, J = 13.0, 1.3 Hz, 1H), 3.89 (d, J = 13.1 Hz, 1H), 3.83 - 3.71 (m, 7H), 3.18 (t, J = 6.9 Hz, 4H), 3.05 (s, 1H), 2.81 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.77 - 2.66 (m, 1H), 1.29 - 1.17 (m, 12H).

[0127] ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 205.84, 205.76, 166.70, 158.57, 158.37, 156.92, 152.07, 150.57, 149.10, 147.35, 143.09, 139.47, 136.15, 130.04, 129.86, 129.16, 129.13, 128.15, 127.82, 127.76, 127.75, 127.05, 124.07, 122.49, 116.44, 116.39, 114.91, 113.20, 113.12, 113.10, 113.09, 113.01, 87.79, 87.74, 87.40, 81.38, 80.69, 80.66, 77.37, 77.26, 77.05, 76.73, 68.07, 66.69, 66.67, 66.62, 63.04, 62.38, 62.33, 61.89, 55.24, 55.22, 55.19, 46.63, 39.06, 31.50, 30.95, 28.32, 28.28, 28.25, 27.45, 27.39, 27.30, 27.27, 19.84, 19.77.

[0128] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.

[0129] 3) 플라스크에 화합물 3 (0.5 mmol)을 넣고, 10 mL의 디클로로메탄을 넣어 용해시킨 후, 아이스 베스 하에 10 mL의 6 부피%의 디클로로아세트산-디클로로메탄 용액을 넣었다. 5 분 동안 반응 시킨 후 소량의 메탄올을 넣어 반응을 퀴칭하였다. 이어서 탄산수소나트륨 포화 수용액을 넣어 중화시키고, 추출 후 건조시키며, 농축하고, 컬럼 크로마토그래피로 신속하게 분리하여 화합물 5 (330 mg)를 얻었다.

[0130] 핵자기 데이터는 다음과 같다.

[0131] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.78 (s, 1H), 8.24 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 7.43 - 7.31 (m, 2H), 7.06 (t, J = 8.0 Hz, 3H), 6.48 (dd, J = 9.4, 5.3 Hz, 1H), 5.35 (dd, J = 8.9, 5.3 Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 4.50 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 4.44 - 4.27 (m, 2H), 4.18 (dd, J = 15.0, 6.9 Hz, 2H), 3.95 (ddd, J = 13.2, 12.1, 1.9 Hz, 2H), 3.18 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 2.83 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.72 (dt, J = 13.9, 5.4 Hz, 1H), 1.25 (s, 10H).

[0132] ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 205.88, 205.79, 166.81, 156.94, 152.09, 150.58, 149.05, 143.11, 129.87, 123.91, 122.49, 116.46, 116.41, 114.91, 87.78, 87.73, 87.37, 80.62, 80.59, 77.37, 77.26, 77.06, 76.74, 68.08, 66.71, 66.69, 66.65, 66.63, 63.00, 62.40, 62.35, 61.89, 46.63, 39.14, 39.10, 31.49, 28.35, 28.32, 28.28, 28.25, 27.39, 27.31, 19.87, 19.85, 19.80, 19.78.

[0133] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.

[0134] 4) 플라스크에 화합물 3 (0.27 mmol), 10 mL의 tert-부틸아민/아세트니트릴 (1:3, v/v)을 넣고, 실온에서 20 분 동안 교반한 후, 회전 증발시켜 용매를 제거하여 화합물 4를 얻었다. 이어서 플라스크에 계속 화합물 2 (0.27 mmol), 1-(메시틸레닐-2-술포닐)-3-니트로-1,2,4-트리아졸 (1.63 mmol)을 넣고, 10 mL의 피리딘을 넣어

실온에서 2 시간 동안 교반한 후 소량의 물을 넣어 반응을 퀸칭하며, 회전 증발시켜 용매를 제거한 후, 20 mL의 디클로로메탄을 넣어 용해시키고, 적당량의 5 질량%의 옥살산 수용액을 넣으며, 유기상을 분리하여 건조시키고, 여과하여 농축하며, 3 부피%의 디클로로아세트산의 디클로로메탄 용액을 넣고, 5 분 동안 교반한 후 적당량의 메탄올을 넣으며, 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 중화시키고, 추출하며, 유기상을 건조시키고, 여과하며, 농축하고, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 화합물 6 (320 mg)을 얻었다.

[0135] 핵자기 데이터는 다음과 같다.

[0136] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.96 - 9.72 (m, 2H), 8.66 (dt, $J = 7.8, 5.3$ Hz, 2H), 8.35 (dd, $J = 13.1, 6.2$ Hz, 2H), 7.24 (ddd, $J = 15.0, 10.1, 2.5$ Hz, 5H), 7.05 - 6.81 (m, 7H), 6.49 (ddd, $J = 25.0, 17.3, 8.7$ Hz, 2H), 5.72 (s, 1H), 5.37 (s, 1H), 5.24 (q, $J = 5.9$ Hz, 2H), 4.90 (s, 4H), 4.51 (s, 1H), 4.46 - 4.21 (m, 6H), 4.20 - 3.99 (m, 5H), 3.84 (t, $J = 14.1$ Hz, 2H), 3.09 (ddd, $J = 52.8, 29.8, 23.2$ Hz, 7H), 2.81 (d, $J = 5.2$ Hz, 4H), 2.62 (td, $J = 13.2, 4.7$ Hz, 1H), 1.18 (dt, $J = 9.7, 6.8$ Hz, 22H).

[0137] ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 205.70, 205.69, 205.64, 167.56, 157.15, 157.10, 157.06, 152.47, 151.75, 151.44, 151.35, 150.60, 150.56, 148.97, 148.57, 148.55, 143.66, 143.62, 142.44, 129.73, 129.69, 123.57, 123.00, 122.15, 116.76, 116.73, 114.81, 114.77, 114.75, 87.44, 87.40, 86.79, 84.57, 83.67, 80.24, 78.10, 77.85, 77.58, 77.46, 77.26, 76.94, 68.29, 68.17, 66.88, 66.82, 66.61, 66.55, 62.76, 62.63, 62.58, 53.57, 46.56, 46.52, 38.90, 38.05, 37.86, 31.87, 29.64, 29.31, 28.38, 28.34, 28.30, 28.27, 28.20, 27.41, 27.25, 22.65, 19.79, 19.72, 14.14.

[0138] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.

[0139] 5) 화합물 6 (0.22 mmol)을 10 mL의 tert-부틸아민/아세트니트릴(1:3, v/v)에 넣고, 실온에서 20 분 동안 교반한 후, 회전 증발시켜 용매를 제거하고, 100 mL의 피리딘을 넣어 용해시키며, 1-(메시틸레닐-2-술포닐)-3-니트로-1,2,4-트리아졸 (1.35 mmol)을 넣고, 실온에서 4 시간 동안 반응시킨 후 용매를 제거하며, 20 mL의 디클로로메탄을 넣어 용해시키고, 적당량의 5 질량%의 옥살산 수용액을 넣으며, 유기상을 분리하여 건조시키고, 여과하여 농축하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 화합물 7 (160 mg)을 얻었다.

[0140] 핵자기 데이터는 다음과 같다.

[0141] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.69 (s, 2H), 8.80 (d, $J = 3.2$ Hz, 2H), 8.43 - 8.15 (m, 2H), 7.30 (td, $J = 15.8, 8.5$ Hz, 7H), 7.14 - 6.85 (m, 9H), 6.49 (ddd, $J = 17.3, 11.7, 5.4$ Hz, 2H), 5.67 - 5.33 (m, 2H), 4.91 (s, 4H), 4.78 (s, 1H), 4.65 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 4.61 - 4.30 (m, 6H), 4.26 - 4.05 (m, 6H), 3.67 - 3.36 (m, 2H), 3.16 (dt, $J = 9.8, 7.1$ Hz, 5H), 2.78 (td, $J = 14.4, 5.6$ Hz, 2H), 1.27 - 1.17 (m, 23H).

[0142] ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 205.76, 205.74, 205.60, 205.53, 172.28, 167.03, 157.76, 157.05, 157.02, 156.60, 152.63, 152.57, 152.48, 152.38, 152.23, 151.49, 151.41, 151.31, 151.20, 148.70, 148.66, 148.58, 143.05, 142.75, 142.55, 142.32, 129.95, 129.81, 129.58, 129.54, 123.57, 123.44, 122.75, 122.38, 122.35, 122.33, 121.78, 121.58, 114.88, 114.77, 114.57, 114.55, 85.60, 85.18, 83.04, 82.55, 78.87, 77.30, 77.10, 76.78, 68.12, 67.19, 67.02, 66.96, 66.92, 66.88, 66.83, 66.74, 65.38, 65.24, 65.10, 52.28, 46.59, 46.56, 36.60, 36.34, 31.90, 29.67, 29.64, 29.34, 28.43, 28.36, 28.29, 28.22, 28.16, 27.29, 27.24, 27.23, 22.68, 14.13.

[0143] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.

[0144] 6) 플라스크에 화합물 7 (150 mg)을 넣고, 5 mL의 메탄올을 넣어 용해시키며, 500 μL 의 디이소프로필아민을 넣고, 실온에서 4 시간 동안 교반하며, 용매를 회전 건조시키고, 컬럼 크로마토그래피로 직접 분리하여 화합물 8 (80 mg)을 얻었다.

[0145] 핵자기 데이터는 다음과 같다.

[0146] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.33 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.94 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.41 (dd, $J = 13.9, 7.4$ Hz, 2H), 6.20 (d, $J = 30.1$ Hz, 4H), 5.45 (d, $J = 59.0$ Hz, 2H), 4.51 (dd, $J = 16.6, 8.1$ Hz, 3H), 4.39 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.16 (tt, $J = 9.5, 4.9$ Hz, 5H), 3.17 (dd, $J = 11.4, 6.6$ Hz, 4H), 2.82 - 2.66 (m, 2H), 2.26 (s, 6H), 1.22 (d, $J = 13.3$ Hz, 18H).

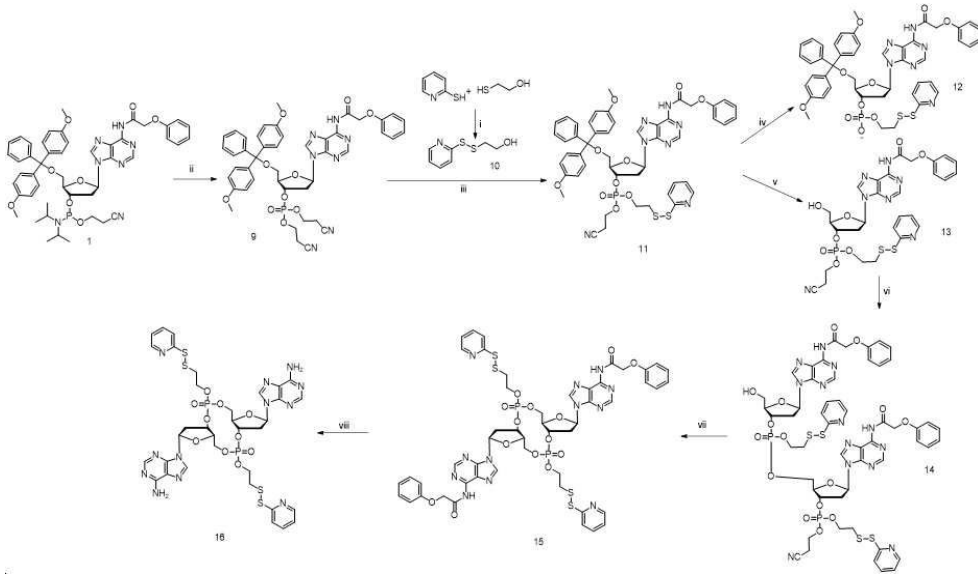
[0147] ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 205.98, 205.90, 155.69, 155.61, 152.81, 149.41, 149.31, 139.68, 139.53, 120.21, 120.08, 85.29, 82.93, 82.55, 79.07, 77.91, 77.49, 77.38, 77.17, 76.85, 67.12, 67.05, 67.00, 65.48, 65.09, 50.41, 46.67, 46.63, 36.67, 36.61, 28.51, 28.44, 28.35, 28.28, 27.31, 27.27.

[0148] MALDI-TOF-HRMS: $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{N}_{10}\text{O}_{11}\text{P}_2\text{S}_2$ 의 상대 분자 질량은 900.2577이고, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 901.2654의 피크를 발견하였다.

[0149] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.

실시예 2

[0150] 피리딘 디설파이드기 치환 에틸 에스테르로 보호된 시클릭 디뉴클레오타이드 프로드러그 분자 (화합물 16)의 합성.



[0151] .

[0152] 1) 플라스크에 3.42 g의 N-클로로숙신이미드를 넣고, 10 mL의 건조한 디클로로메탄을 넣으며, 아이스 베스 하에 2.85 g의 2-메르캅토피리딘(5 mL의 디클로로메탄에 용해시킴)을 적가하고, 30 분 동안 적가한 후, 계속 저온에서 교반하여 1 시간 동안 반응시키고, 이어서 2 g의 2-메르캅토테탄올을 5 mL의 디클로로메탄에 용해시키고, 아이스 베스 하에 플라스크에 적가하며, 적가한 후 상온에서 24 시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후 고속 컬럼 크로마토그래피로 직접 신속하게 분리하여 화합물 10을 얻었다.

[0153] 핵자기 데이터는 다음과 같다.

[0154] ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.32 (s, 2H), 8.52 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 8.00 - 7.89 (m, 2H), 7.39 - 7.30 (m, 1H), 3.63 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.96 (t, J = 6.2 Hz, 2H).

[0155] ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 159.40, 148.84, 139.51, 122.01, 120.57, 59.48, 41.77.

[0156] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.

[0157] 2) 플라스크에 화합물 1 (1.68 mmol), 5-에틸메르캅토테트라졸 (5.07 mmol), 3-히드록시프로피오니트릴(1.68 mmol), 15 mL의 아세토니트릴을 넣고, 상온에서 1 시간 동안 교반한 후 1 mL의 5.5 M의 tert-부틸히드로퍼옥사이드-데칸 용액을 넣으며, 계속 상온에서 40 분 동안 교반한 후, 적당량의 아황산수소나트륨 수용액을 넣었다. 디클로로메탄으로 여러 번 추출하고, 유기상을 병합한 후 포화 식염수로 세척하며, 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하며, 농축하고, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 화합물 9 (1.27 g)를 얻었다.

[0158] 핵자기 데이터는 다음과 같다.

[0159] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.71 (dd, J = 31.2, 1.2 Hz, 1H), 8.21 - 8.10 (m, 1H), 8.01 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.60 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.50 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.26 (dd, J = 5.9, 2.4 Hz, 6H), 7.16 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.87 - 6.75 (m, 4H), 6.57 - 6.37 (m, 1H), 5.36 (dd, J = 19.5, 14.0 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 18.9 Hz, 1H), 4.41 - 4.21 (m, 4H), 3.93 (dd, J = 43.4, 12.6 Hz, 1H), 3.78

(d, J = 5.7 Hz, 6H), 3.53 - 3.37 (m, 1H), 3.18 (ddd, J = 15.2, 13.1, 8.8 Hz, 1H), 2.82 (t, J = 5.8 Hz, 3H), 2.79 - 2.65 (m, 2H).

[0160] ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 164.63, 158.60, 152.16, 150.59, 150.26, 147.39, 142.67, 139.51, 133.32, 133.01, 130.08, 130.03, 129.15, 128.93, 128.11, 127.96, 127.84, 127.79, 127.06, 113.26, 113.14, 87.64, 87.24, 81.05, 77.38, 77.26, 77.06, 76.74, 62.92, 62.76, 62.70, 62.65, 55.26, 39.05, 19.88, 19.81.

[0161] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.

[0162] 3) 화합물 9 (1.37 mmol)를 20 mL의 아세트니트릴에 용해시키고, 5 mL의 tert-부틸아민을 넣으며, 상온에서 20 분 동안 교반한 후, 회전 건조시켰다. 이어서 화합물 10 (1.38 mmol), 1-(메시틸레닐-2-술포닐)-3-니트로-1,2,4-트리아졸 (6.86 mmol), 20 mL의 피리딘을 넣어 용해시키고, 상온에서 2 시간 동안 교반하였다. 적당량의 물을 넣어 반응을 퀸칭하고, 회전 증발시켜 대부분의 용매를 제거하며, 30 mL의 디클로로메탄을 넣어 다시 용해시키고, 5 중량%의 옥살산 수용액을 넣어 pH 값을 3으로 조절하며, 유기상을 분리하고, 유기상을 포화 식염수로 세척한 후, 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과하고, 농축한 후 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 화합물 11 (1.05 g)을 얻었다.

[0163] 핵자기 데이터는 다음과 같다.

[0164] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.57 (d, J = 50.7 Hz, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.52 - 8.44 (m, 1H), 8.18 (dd, J = 13.4, 3.1 Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.71 - 7.61 (m, 2H), 7.42 - 7.33 (m, 4H), 7.32 - 7.23 (m, 6H), 7.21 - 7.17 (m, 2H), 7.11 - 7.02 (m, 4H), 6.92 - 6.76 (m, 4H), 6.54 - 6.40 (m, 1H), 5.41 - 5.26 (m, 1H), 4.89 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 4.54 - 4.18 (m, 5H), 3.99 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 3.88 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 3.84 (s, 1H), 3.82 - 3.76 (m, 5H), 3.46 (dd, J = 17.1, 3.0 Hz, 1H), 3.25 - 3.01 (m, 3H), 2.88 - 2.63 (m, 3H).

[0165] ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.66, 158.82, 158.79, 158.59, 158.55, 156.94, 152.03, 150.57, 149.80, 149.09, 147.36, 146.87, 144.23, 143.14, 141.13, 139.48, 137.32, 135.27, 132.51, 131.39, 130.03, 130.00, 129.85, 129.52, 129.13, 128.70, 128.32, 128.07, 127.92, 127.81, 127.76, 127.03, 124.06, 122.46, 121.26, 121.16, 120.23, 116.47, 116.43, 114.92, 114.90, 113.55, 113.20, 113.13, 113.12, 113.10, 113.08, 113.00, 87.75, 87.69, 87.28, 81.36, 80.69, 80.09, 77.39, 77.27, 77.07, 76.75, 68.09, 65.92, 65.87, 65.83, 62.99, 62.45, 62.40, 55.36, 55.24, 39.07, 38.23, 38.16, 19.84, 19.77.

[0166] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.

[0167] 4) 화합물 11 (0.8 mmol)을 플라스크에 넣고, 10 mL의 디클로로메탄을 넣어 용해시키며, 아이스 워터 베스에 10 mL의 6 부피%의 디클로로아세트산의 디클로로메탄 용액을 넣었다. 계속 5 분 동안 교반한 후, 소량의 메탄올을 넣어 반응을 퀸칭하고, 적색이 사라진 후 포화 탄산수소나트륨 수용액을 넣어 중화시키며, 추출 후 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 농축하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 화합물 13 (540 mg)을 얻었다.

[0168] 핵자기 데이터는 다음과 같다.

[0169] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.74 (s, 1H), 8.62 (d, J = 73.6 Hz, 1H), 8.45 (dd, J = 4.7, 3.5 Hz, 1H), 8.25 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 8.04 - 7.96 (m, 3H), 7.64 (dt, J = 4.6, 1.5 Hz, 2H), 7.53 (ddd, J = 29.9, 14.9, 7.4 Hz, 4H), 7.10 (ddd, J = 5.2, 4.1, 2.4 Hz, 1H), 6.44 (dd, J = 9.1, 5.5 Hz, 1H), 5.34 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 4.52 - 4.36 (m, 3H), 4.31 (dt, J = 12.3, 6.0 Hz, 2H), 3.90 (dd, J = 38.9, 12.8 Hz, 2H), 3.10 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.80 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.69 (dd, J = 14.1, 5.4 Hz, 1H).

[0170] ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166.62, 164.98, 158.92, 152.14, 152.10, 150.81, 150.07, 149.86, 145.25, 144.40, 142.96, 137.29, 133.60, 133.26, 133.10, 132.14, 129.17, 128.95, 127.95, 127.84, 124.24, 121.29, 120.32, 116.49, 116.45, 87.63, 87.58, 87.05, 80.51, 77.28, 66.03, 62.85, 62.54, 62.50, 39.15, 39.11, 38.34, 38.27, 19.87, 19.80.

[0171] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.

[0172] 5) 플라스크에 화합물 11 (0.45 mmol)을 넣고, 6 mL의 아세트니트릴, 2 mL의 tert-부틸아민을 넣으며, 실온에서 30분 동안 교반한 후, 회전 증발시켜 용매를 제거하여 화합물 12를 얻었다. 화합물 13 (0.37 mmol), 1-(메시틸

레닐-2-술포닐)-3-니트로-1,2,4-트리아졸 (1.11 mmol)을 넣고, 15 mL의 초 건조 피리딘을 넣으며, 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. 소량의 물을 넣어 반응을 쿨칭하고, 회전 증발시켜 용매를 제거한 후, 20 mL의 디클로로메탄을 넣어 용해시키며, 적당량의 5 질량%의 옥살산 수용액을 넣고, 유기상을 분리하여 건조시키며, 여과하여 농축하고, 3 부피%의 디클로로아세트산의 디클로로메탄 용액을 넣으며, 5 분 동안 교반한 후 적당량의 메탄올을 넣고, 포화 탄산수소나트륨 수용액으로 중화시키며, 추출하고, 유기상을 건조시키며, 여과하고, 농축하며, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 화합물 14 (350 mg)를 얻었다.

[0173] 핵자기 데이터는 다음과 같다.

[0174] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.67 (dd, J = 29.4, 8.5 Hz, 2H), 8.51 - 8.20 (m, 4H), 7.96 (t, J = 8.9 Hz, 4H), 7.70 - 7.33 (m, 10H), 7.05 (dt, J = 11.0, 7.2 Hz, 2H), 6.51 (dd, J = 13.0, 6.4 Hz, 1H), 6.45 - 6.33 (m, 1H), 5.38 (s, 1H), 5.24 (dd, J = 17.5, 5.5 Hz, 1H), 4.52 - 4.20 (m, 10H), 3.79 (dt, J = 19.8, 11.3 Hz, 3H), 3.23 - 2.89 (m, 6H), 2.78 (d, J = 18.5 Hz, 3H), 2.68 - 2.51 (m, 1H), 1.22 (s, 3H).

[0175] ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 165.07, 158.84, 158.77, 158.70, 152.58, 151.94, 151.49, 150.64, 150.18, 149.83, 149.76, 143.02, 141.81, 137.32, 133.41, 133.36, 132.85, 132.77, 128.77, 128.75, 128.69, 128.08, 128.05, 124.14, 123.59, 121.28, 121.21, 120.21, 120.12, 116.73, 87.40, 86.64, 84.54, 80.22, 77.33, 66.06, 65.77, 62.67, 38.92, 38.15, 38.08, 29.69, 19.86, 19.79, 0.02.

[0176] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.

[0177] 6) 화합물 14 (0.23 mmol)를 10 mL의 tert-부틸아민/아세트니트릴(1:3, v/v)에 넣고, 상온에서 20 분 동안 교반한 후, 회전 증발시켜 용매를 제거하며, 100 mL의 피리딘을 넣어 용해시키고, 1-(메시틸레닐-2-술포닐)-3-니트로-1,2,4-트리아졸 (1.38 mmol)을 넣으며, 상온에서 4 시간 동안 반응시킨 후 용매를 제거하고, 20 mL의 디클로로메탄을 넣어 용해시키며, 적당량의 5 질량%의 옥살산 수용액을 넣고, 유기상을 분리하여 건조시키며, 여과하여 농축하고, 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 화합물 15 (181 mg)를 얻었다.

[0178] 핵자기 데이터는 다음과 같다.

[0179] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.76 (s, 2H), 8.76 (d, J = 9.7 Hz, 2H), 8.53 - 8.36 (m, 2H), 8.36 - 8.18 (m, 2H), 7.68 - 7.55 (m, 3H), 7.37 - 7.26 (m, 5H), 7.14 - 6.98 (m, 8H), 6.45 (dd, J = 13.8, 6.2 Hz, 2H), 5.71 - 5.36 (m, 2H), 4.93 (s, 4H), 4.66 - 4.32 (m, 9H), 4.12 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 3.67 - 3.34 (m, 2H), 3.11 (t, J = 6.2 Hz, 4H), 2.73 (dd, J = 13.3, 7.5 Hz, 2H), 1.26 (s, 2H).

[0180] ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.30, 158.86, 158.68, 158.57, 157.10, 157.06, 152.49, 152.42, 152.35, 151.38, 151.33, 151.24, 151.16, 149.81, 148.67, 148.60, 143.12, 142.92, 142.76, 142.55, 137.22, 137.18, 129.77, 123.49, 123.39, 123.28, 122.28, 122.26, 121.19, 120.10, 120.08, 114.85, 114.55, 85.58, 85.23, 83.03, 82.59, 79.03, 78.17, 77.84, 77.48, 77.36, 77.16, 76.84, 68.21, 66.14, 66.09, 65.93, 65.88, 65.44, 64.99, 53.52, 38.29, 38.23, 38.12, 38.05, 38.00, 36.29, 31.88, 29.65, 29.62, 29.32, 22.66, 14.13.

[0181] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.

[0182] 7) 플라스크에 화합물 15 (100 mg)를 넣고, 5 mL의 메탄올을 넣어 용해시키며, 500 μL의 디소프로필아민을 넣고, 상온에서 4 시간 동안 교반한 후, 용매를 회전 건조시키며, 컬럼 크로마토그래피로 직접 분리하여 화합물 16 (65 mg)를 얻었다.

[0183] 핵자기 데이터는 다음과 같다.

[0184] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.33 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.41 (dd, J = 13.9, 7.4 Hz, 2H), 6.20 (d, J = 30.1 Hz, 4H), 5.45 (d, J = 59.0 Hz, 2H), 4.51 (dd, J = 16.6, 8.1 Hz, 3H), 4.39 (t, J = 8.3 Hz, 2H), 4.16 (tt, J = 9.5, 4.9 Hz, 5H), 3.17 (dd, J = 11.4, 6.6 Hz, 4H), 2.82 - 2.66 (m, 2H), 2.26 (s, 6H), 1.22 (d, J = 13.3 Hz, 18H).

[0185] MALDI-TOF-HRMS: C₃₄H₃₈N₁₂O₁₀P₂S₄의 상대 분자 질량은 964.1192이고, [M+H]⁺ 965.1271의 피크를 발견하였다.

[0186] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.

- [0187] [비교예 1]
- [0188] cddA35 (구조는 표 2와 같음)는 문헌 (Wang, B.; Wang, Z.; Javornik, U.; Xi, Z.; Plavec, J., Computational and NMR spectroscopy insights into the conformation of cyclic di-nucleotides. Sci Rep 2017, 7 (1), 16550.)에서의 방법을 참조하여 제조하였다.
- [0189] cddA35 핵자기 데이터는 다음과 같다.
- [0190] ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.15 (s, 2H), 7.80 (s, 2H), 6.16 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 5.22 - 5.04 (m, 2H), 4.26 (d, J = 9.8 Hz, 4H), 4.02 (dd, J = 11.2, 4.1 Hz, 2H), 3.05 - 2.98 (m, 2H), 2.75 - 2.62 (m, 2H).
- [0191] ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 154.39, 151.78, 146.71, 139.32, 118.08, 84.87, 83.30, 83.19, 70.16, 62.25, 46.71, 39.01, 8.26.
- [0192] 데이터는 화합물의 합성이 정확함을 나타낸다.
- [0193] [시험예 1]
- [0194] 2가지 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 유수 분배 계수 logP의 측정
- [0195] 1) 화합물 용액의 조제: 일정량의 화합물 8, 화합물 16, 화합물 cddA35를 칭량하고, 각각 DMSO 용액으로 용해시켜 질량 농도가 1 mg/mL인 모액을 조제하였다.
- [0196] 2) 조제된 모액에서 20 uL를 취하여 1 mL의 n-옥탄올과 1 mL의 정제수 (10 mM의 K₂HPO₄, pH7.0)의 혼합액이 담긴 EP관에 넣고, 2 시간 동안 진동 소용돌이 (oscillating vortex) 시키며, 4 °C에서 하룻밤 정치하여 분층하였다. 이어서 두 상을 분리하여 각각 400 uL씩 취하였다. 3000 rpm에서 5 분 동안 원심분리하고, 해당하는 0.22 μM의 여과막으로 여과하며, 동일한 HPLC 매개 변수의 조건에서 두 상의 흡수 피크의 면적을 측정하고, 실험을 3회 반복하며, n-옥탄올 상 및 수상 중의 피크 면적 비율에 대해 log를 취하여 목표 화합물의 logP 값을 계산한 결과는 표 2와 같다.
- [0197] 액상 조건: 기기는 Agilent 1260 HPLC를 사용하고, 크로마토그래피 컬럼은 Agilent ZORABX SB-C18 5 μm [4.6 × 150 mm]이며, 칼럼 온도는 25 °C이고, 샘플 주입량은 10 uL이며, 검출 파장은 254 nm이고, 크로마토그래피 구배 방법은 표 1과 같다.

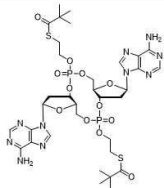
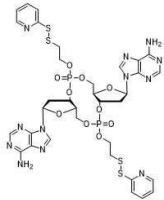
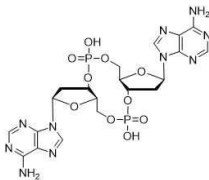
표 1

HPLC 액상 구배 방법

시간 (min)	부피% A (10 mM TEAA 완충액)	부피% B (MeCN)	유속 (mL/min)
1	98	2	1
6	0	100	1
10	0	100	1
13	98	2	1
15	98	2	1

[0198]

표 2

화합물	구조	logP
화합물 8		1.93 ± 0.01
화합물 16		0.85 ± 0.02
cddA35		-3.43 ± 0.06

[0199]

[0200]

표 2로부터 알 수 있듯이, 치환된 머캅토에탄올을 사용하여 인산에스테르를 보호한 후, logP는 크게 향상시켰다. 인산 음전하가 없는 네이키드 cddA35에 비해, logP 값은 -3.43으로, 지용성이 거의 없다. 에틸 티오아실로 보호된 화합물 8 및 디메르캅토에탄올로 보호된 화합물 16의 logP는 각각 1.93 및 0.85로, 지용성이 크게 향상시켰으므로, 화합물이 세포막을 투과하여 세포 내에 들어가 면역 자극 작용을 발휘하는 데 유리하다.

[0201]

[시험예 2]

[0202]

HEK293T 세포에서 2가지 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자의 활성 측정

[0203]

원리: 이중 형광 리포터 유전자 실험: 시클릭 디뉴클레오티드 프로드러그 분자가 세포에 들어간 후, 세포질 내 티오에스테라제 또는 환원성 환경을 통과하며, 티오에스테르 결합이 끊어지거나 이황화 결합이 끊어져 중간체를 얻을 수 있고, β 위치의 황 원자는 α 위치의 탄소 원자에 대해 친핵성 공격함으로써, 에틸렌 설파이드의 탈리를 형성하고, 모약물의 음전하를 띤 포스포디에스테르 구조를 가진 시클릭 디뉴클레오시드를 방출하며, 세포내 STING 단백질과 결합하여 활성화시키고, 인터페론 조절 인자 3 (IRF3)을 인산화하며, 인산화된 IRF3은 세포핵 내에 들어가 β 인터페론 유전자의 프로모터와 결합하여 인터페론의 발현을 유발하고, 이를 기반으로 인터페론 유전자의 프로모터를 반딧불이 루시퍼라제의 프로모터에 도입함으로써, 이중 형광 리포터 유전자 방법을 이용하여 프로드러그 분자의 세포 활성을 측정할 수 있다.

[0204]

- 실험 재료

[0205]

(1) 화합물 용액의 조제: 화합물 8, 화합물 16을 각각 DMSO로 용해시켜 1 mM의 최종 농도로 조제하였다. cddA35는 물로 용해시켜 마찬가지로 1 mM의 농도로 조제하였다.

[0206]

(2) 플라스미드 용액의 조제: pcDNA3.1-hSTING-wt 플라스미드를 400 ng/μL의 농도로 조제하고, pGL3-IFNβ 플라스미드를 400 ng/μL의 농도로 조제하며, pGL4.74-Rluc 플라스미드를 100 ng/μL의 농도로 조제하였다.

[0207]

- 시험 방법

[0208]

HEK 293T 세포 밀집도가 약 70 %에 도달하였을 때, 원래의 배지를 500 mL의 무혈청 배지인 opti-DMEM으로 교체하여 옮겼다. 2 μL의 pcDNA3.1-hsting-wt, 1 μL의 pGL3-IFNβ, 1 μL의 pGL4.74-Rluc를 포함하는 상기 성분 용액을 조제하고, opti-DMEM 배지는 50 uL/웰로 보충하며, 4개의 웰을 평행하게 하였다. 이상의 용액 혼합물을 각각 50 μL의 2/50 Lipo2000 형질감염 용액에 넣어 혼합하고, 혼합물을 실온에서 15 분 동안 정치한 후 균일하게 혼합하며, 100 μL/웰로 형질감염하여 4 시간 후 1 mL의 37 °C DMEM 배지를 넣었다. 18 시간 후 배지를 500

mL의 유험청 또는 무혈청 배지인 opti-DMEM으로 교체하고, 8 μ L (5 μ M)의 화합물 8, 화합물 16 또는 cddA35의 혼합액, 92 μ L의 opti-DMEM을 균일하게 혼합하며, 15분 동안 정치하고, 100 μ L/웰로 형질감염하며 4시간 후 1 mL의 37 $^{\circ}$ C DMEM 배지를 넣으며, 계속 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 이중 형광 결과를 검출하여 결과는 도 1에 도시된 바와 같다.

[0209] 도 1의 결과로부터 알 수 있듯이, 변형되지 않은 고 전기음성도를 가진 시클릭 디뉴클레오타이드 cddA는 세포막을 통과하기 어렵고, 본 실시예들에 따른 인산트리에스테르로 보호된 2가지 시클릭 디뉴클레오타이드 화합물 8 및 화합물 16은 어떠한 형질감염 시약 없이도 세포막을 자율적으로 통과할 수 있고, 세포질 내에서 티오에스테라제 또는 환원성 환경 작용 하에 모약물 분자 cddA35를 방출함으로써, STING 경로를 활성화시키고 인터페론의 발현을 유발한다.

[0210] [시험예 3]

[0211] 단핵 세포주 THP-1 세포에서 2가지 시클릭 디뉴클레오타이드 프로드러그 분자의 활성 측정

[0212] - 시험 방법

[0213] THP-1-Lucia 세포 밀집도가 약 80%에 도달하였을 때, 화합물 8, 화합물 16 및 약물 ADU-S100을 일정한 농도에 따라 직접 배지에 용해시켜 24웰판에 넣고, 4개의 웰을 평행하게 하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건에서 계속 24시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, 루시페라제 활성을 시험하였다. 여기서, 화합물 8, 화합물 16 및 약물 ADU-S100이 10 μ M의 작용 농도 하에 단핵 세포주 THP-1에서의 I형 인터페론 시험 결과는 도 2에 도시된 바와 같다. 화합물 8 및 화합물 16이 THP-1 세포주에서 I형 인터페론 발현을 유발하는 EC₅₀ 값은 여러 농도의 연속 희석물의 용량-반응 곡선에 의해 결정되며, 도 3에 도시된 바와 같다.

[0214] 도 2의 결과로부터 알 수 있듯이, 단핵 세포 THP-1 세포주에서, 어떠한 형질감염 시약 없이도, 10 μ M의 작용 농도 하에, 화합물 8 및 화합물 16은 모두 I형 인터페론의 강한 발현을 유발할 수 있고, 그 활성은 현재 이미 임상 2상에 진입한 약물 ADU-S100보다 훨씬 높다. 도 3으로부터 알 수 있듯이, 화합물 8 및 화합물 16이 THP-1 세포주에서 I형 인터페론 발현을 유발하는 EC₅₀ 값은 각각 4.4 nM 및 355 nM으로, 대조 약물 ADU-S100 (특히 CN108430503A에서의 참조 화합물 2'3'-RR-(A)(A))의 EC₅₀ 값이 41.5 μ M인 것에 비해, 화합물 16 및 화합물 8의 EC₅₀ 값은 각각 9430배 및 117배 증가되었고, 활성은 크게 향상시켰다.

[0215] [시험예 4]

[0216] 화합물 8의 항암 활성 시험

[0217] - 실험 재료

[0218] 마우스: 체중이 18 ~ 22 g인 BABL/C 자성 마우스. 중국 광동성 동물실험센터로부터 공급받았고, 마우스는 과립 사료를 먹었으며, 음식과 물을 자유롭게 섭취시켰다.

[0219] 종양 세포주: CT-26-Luc 세포

[0220] - 마우스 종양 모델의 구축: 세포를 배양, 계대하고, 세포 대수기에 세포를 수집하여 mL당 (1.0X10⁷) 농도의 세포 현탁액을 제조하며, 마우스의 오른쪽 앞다리 겨드랑이에 0.1 mL의 세포 현탁액 (세포 수는 1.0X10⁶개/마리)을 주사하고, 10일 정도 후 종양이 직경이 약 5 mm까지 자라면 성공적으로 암을 유발하였으며, 무작위로 세 그룹으로 나누었다.

[0221] 음성 대조군: 생리식염수 용액

[0222] 양성 대조군: ADU-S100 (임상 2상 약물), 투여량 1 mg/kg

[0223] 실험군: 화합물 8, 투여량 1 mg/kg

[0224] - 투여 방법: 종양 접종 성장 10일 후에 투여하기 시작하고, 마우스당 50 μ L씩 2일 1회 종양 내 주사하여 총 3회 투여하였다. 화학 발광 법으로 IVIS Spectrum Imaging System(소형 동물 생체 이미징 시스템)을 사용하여 마우스 내 종양 성장 상황을 관찰하였다. 이미징 전, 플루오레세인 소분자를 준비하며, PBS 용액으로 15 mg/mL의 플루오레세인 나트륨염을 적당량으로 조제하고, 플루오레세인 나트륨염은 중국 상하이 예센 바이오테크놀로지(Shanghai Yeasen Biotechnology Co., Ltd.)에서 구매하였다. 산소 가스와 이소플루란을 미리 준비하였다. 100

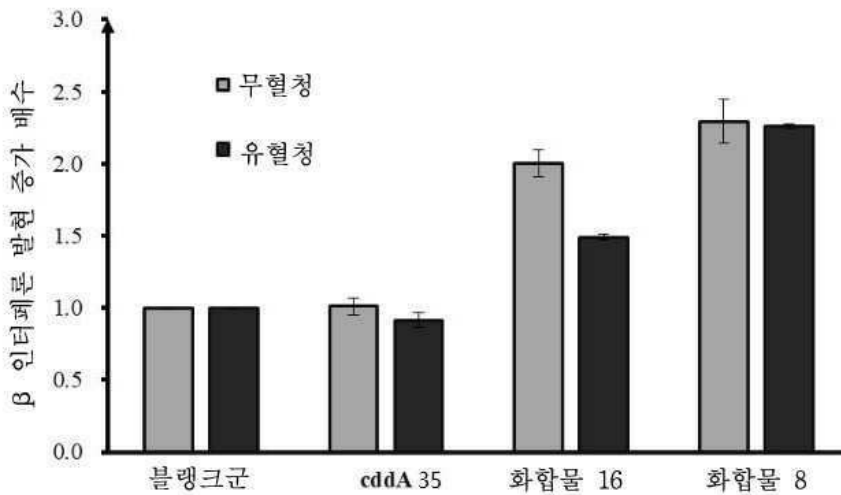
μL의 플루오레세인을 복강에 주사하고, 마우스를 마취 상자에 넣고 마취 후 이미저 중 이미징실 내로 옮겼다. 필요에 따라 마우스의 자세를 조정하였다. 이미징 매개 변수는, 자동 노출, Binning 값이 2이고, F 값이 8인 것이다. 이미징 시간은 10 분으로 선택하였다. 이미징 후, 형광 값을 광자 수로 변환하고, 각 실험군의 총 형광 광자 수를 계산하였다. 이미저는 PerkinElmer사의 IVIS Spectrum 이미징 플랫폼이다. 결과는 도 4에 도시된 바와 같다. 여기서, 도 4a, 4b, 4c, 4d, 4e 및 4f에서의 숫자는 원형 영역 (ROI, 관심 영역) 내 총 형광 광자 수를 나타내고, 도 4g 및 4h는 각각 각 실험군의 총 형광 광자 수의 통계 그래프이다.

[0225] 각 그룹 마우스의 종양 부피 크기 및 생존율 결과는 도 5에 도시된 바와 같다. 여기서, 종양 부피 크기에 대해 버니어 캘리퍼스도 종양의 길이와 폭을 측정하고, 공식 (부피= 길이 × 폭 × 폭/2)에 따라 계산하며, 생존율 = 각 실험군 종양 부피가 2000 mm³ 보다 작은 마우스 수/각 실험군 총 마우스 수.

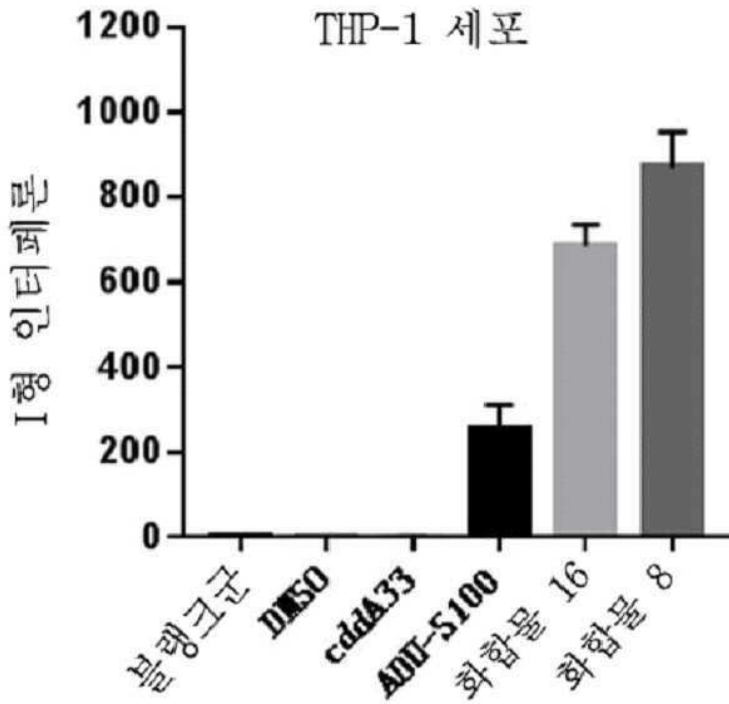
[0226] 도 4 및 도 5로부터 알 수 있듯이, CT-26 마우스 종양 모델에서, 1 mg/kg의 투여량에서, 대조 약물 ADU-S100이 마우스 종양의 성장만 제어할 수 있는 것에 비해, 본 실시예들의 화합물 8을 사용한 실험군 마우스의 종양은 거의 소실되었으므로, 화합물 8이 우수한 항종양 활성을 가지며 그 효과가 임상 약물 ADU-S100보다 우수함을 증명한다.

도면

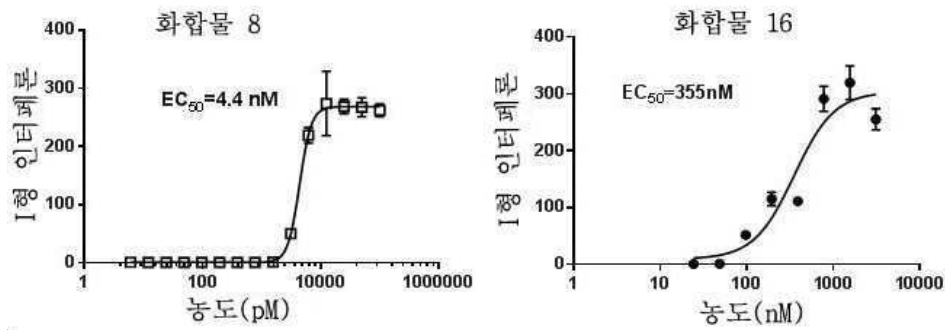
도면1



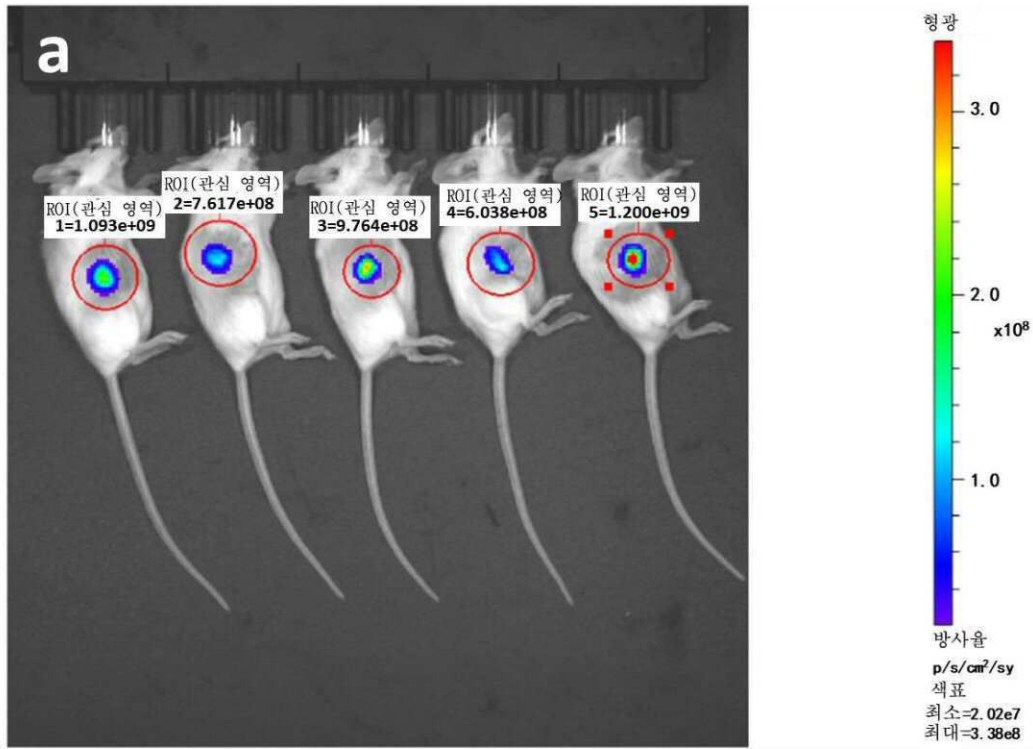
도면2



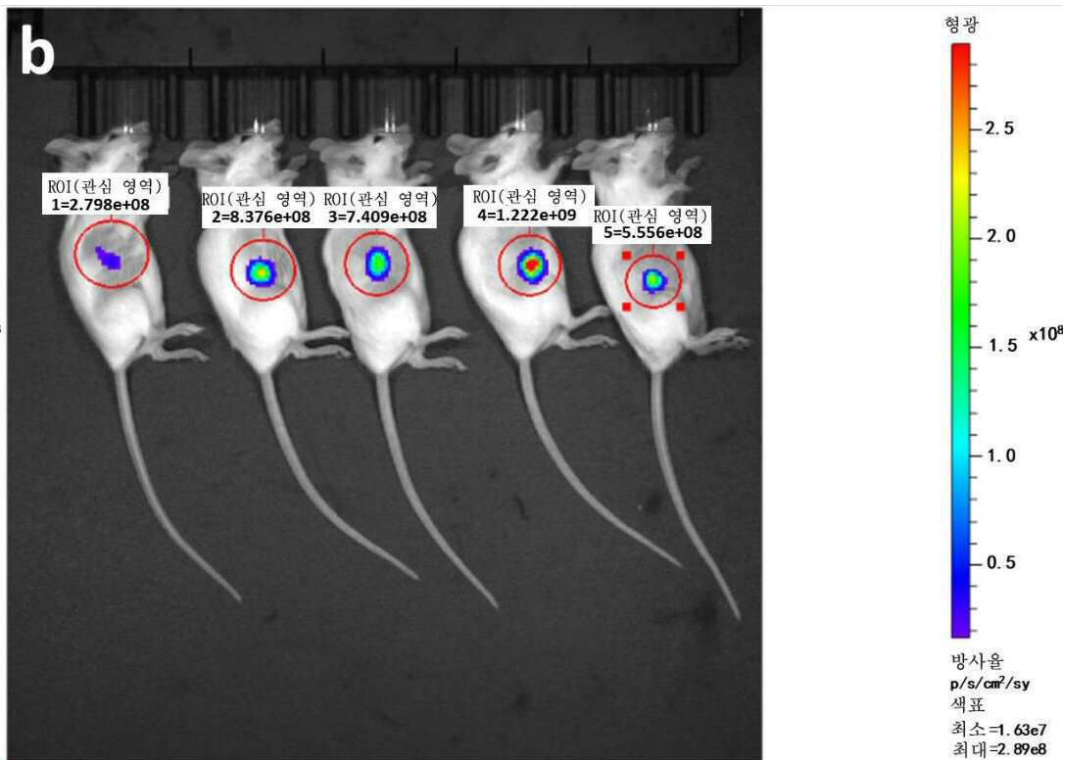
도면3



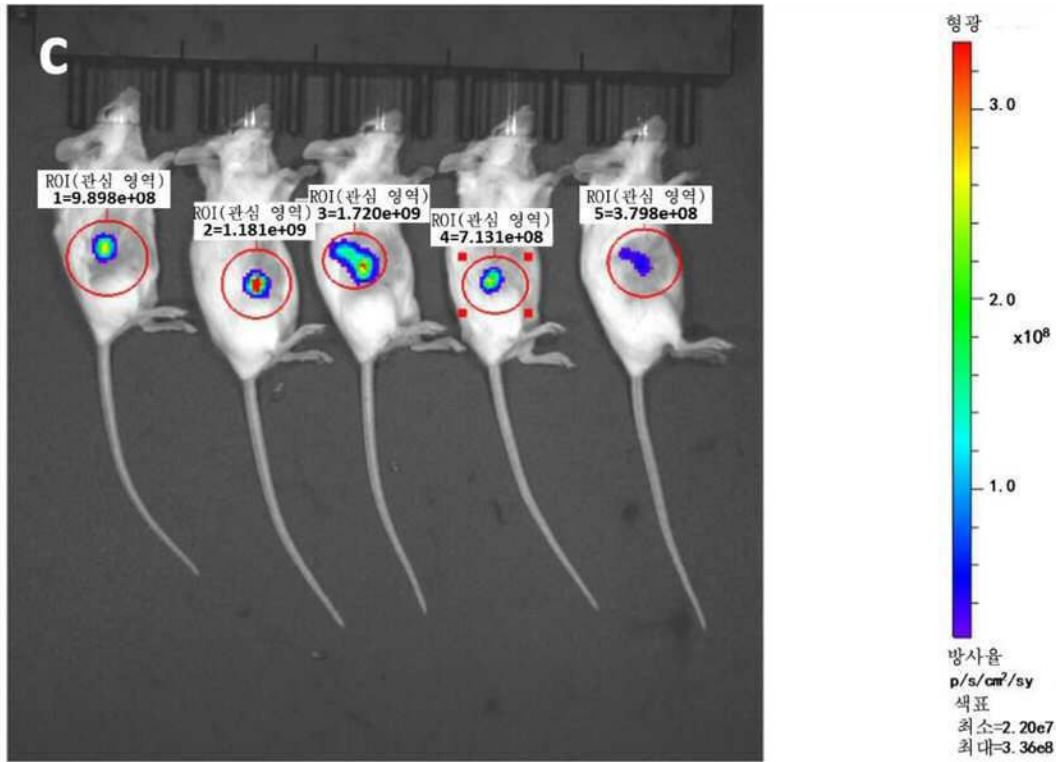
도면4a



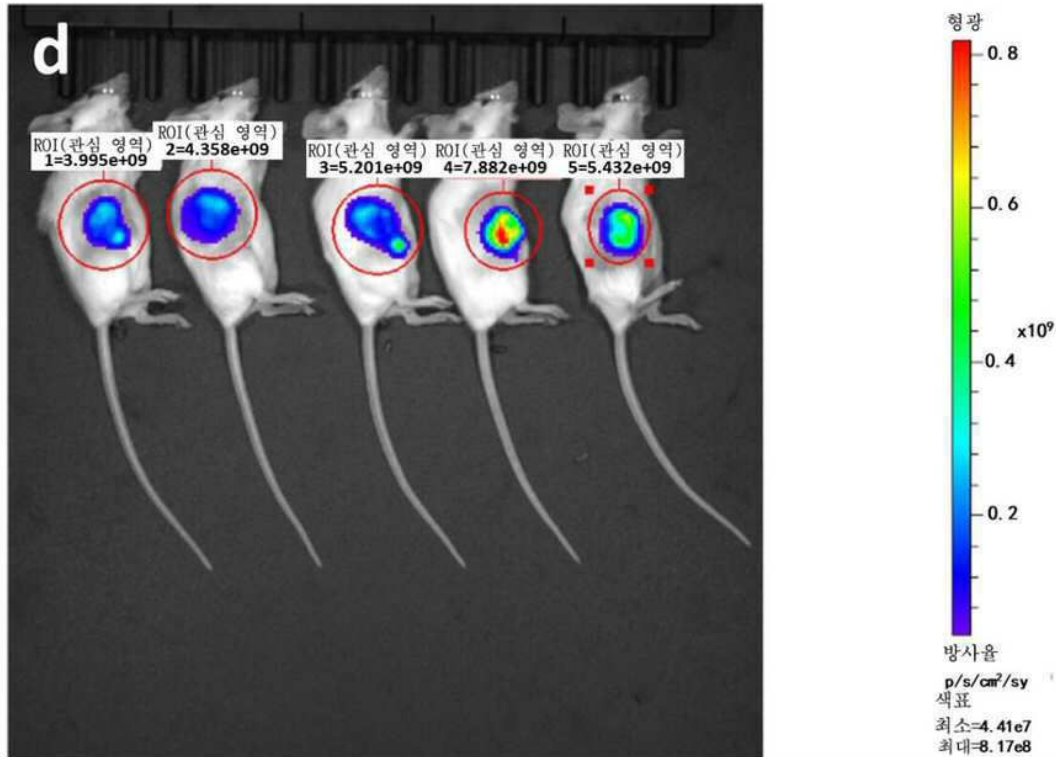
도면4b



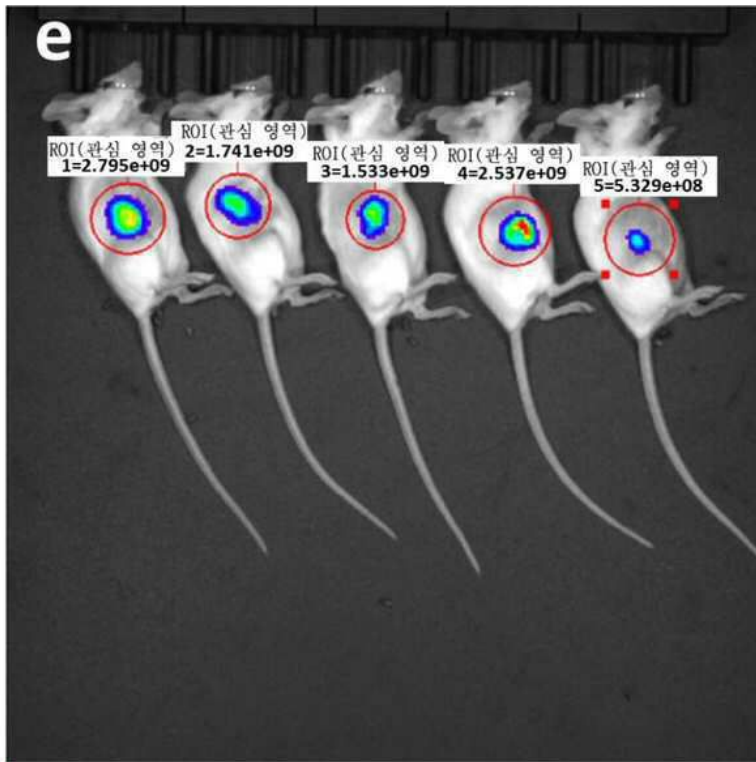
도면4c



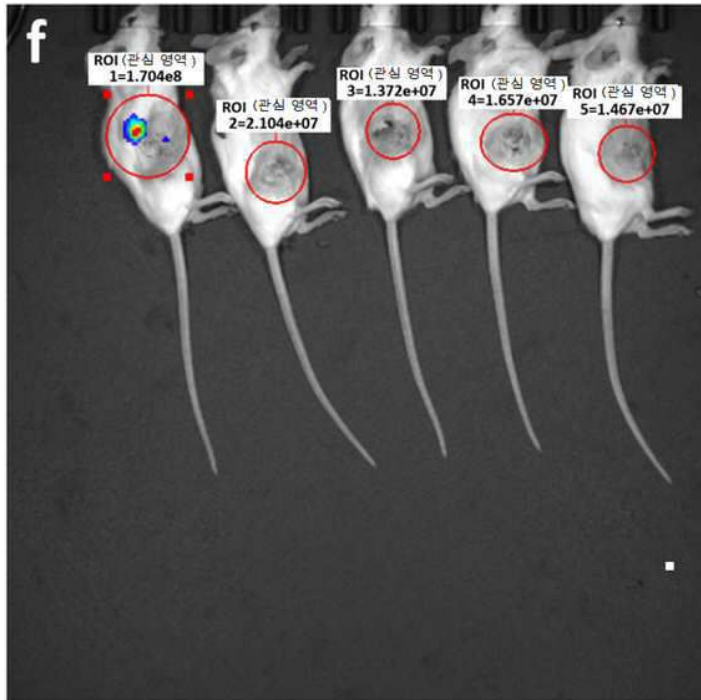
도면4d



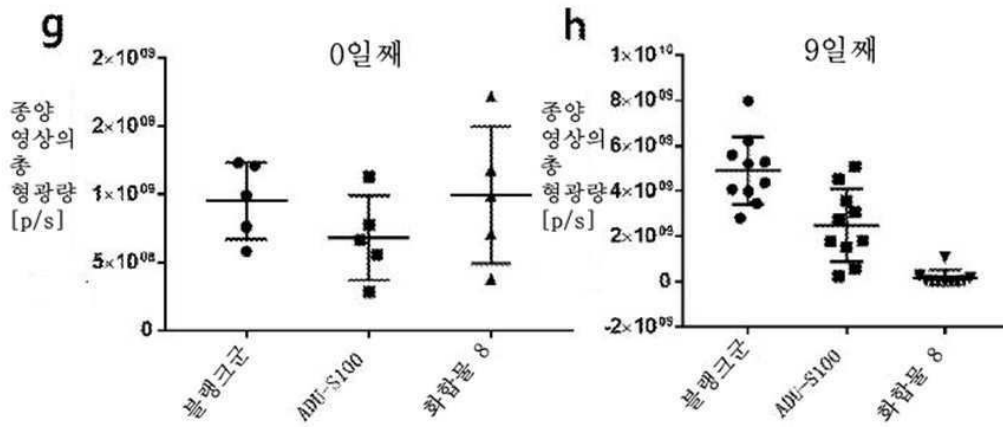
도면4e



도면4f



도면4g



도면5

