

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 특허공보(B1)**

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>  
A61K 31/40  
A61K 31/445

(45) 공고일자 1991년12월10일  
(11) 공고번호 91-010020

(21) 출원번호	특1988-0017027	(65) 공개번호	특1989-0009401
(22) 출원일자	1988년12월20일	(43) 공개일자	1989년08월01일
(30) 우선권주장	136.224 1987년12월21일 미국(US) 166.065 1988년03월09일 미국(US) 248.461 1988년09월23일 미국(US)		
(71) 출원인	몬산토 캄파니 아놀드 하비 콜 미합중국 63167 미조리주 세인트루이스시 노스린드버그 불바드 800		
(72) 발명자	레이몬드 알렌 드웁 영국 옥스포드 오엑스1 3큐유 사우스 파크스 로드 옥스포드대학교 조오지 윌리엄 존 플리트 영국 옥스포드 오엑스1 3큐와이 사우스 파크스 로드 옥스포드대학교 토마스 윌리엄 래드메처 영국 옥스포드 오엑스1 3큐유 사우스 파크스 로드 옥스포드대학교		
(74) 대리인	임석재		

**심사관 : 이병현 (책자공보 제2591호)**

**(54) 항바이러스제**

**요약**

내용 없음.

**대표도**

**도1**

**명세서**

[발명의 명칭]

항바이러스제

[도면의 간단한 설명]

제1도는 HIV(human immunodeficiency virus ; 인체 면역결핍증 유발 바이러스)에 감염 혹은 비감염된 T-세포에 대한 실험화합물의 세포독성 효과뿐만 아니라, HIV에 대한 실험화합물의 저해효과를 측정하기 위해 사용된 실험방법의 개략도이다.

제2도는 저해실험화합물을 0.1mg/ml 함유하는 배지에서 배양시에 HIV에 감염된 세포들의 상대비율을 측정하기 위하여 사용된 실험방법의 개략도이다.

제3도는 HIV에 의한 CPE(세리병리효과-%CPE)의 감소저해 정도와 실험할 화합물로 인한 세포독성(-%세포 사멸)을 배지중 몇가지의 실험할 화합물(의약품들)들의 농도(mg/ml)에 따라 그래프로 도시한 것이다.

제4도는 바이러스의 역가(TCID로서 결정된 것)를 제3도의 여러 가지 실험화합물(의약품들)의 농도(mg/ml)에 따라 (a)와 (b)에 그래프로 도시한 것이다.

제5도는 CPE를 생성시키기 위하여, 0.1mg/ml의 N-부틸-데옥시노지리마이신(N-butyl-deoxynojirimycin)(의약품) 존재하에서 한번도 의약품이 첨가되지 않은 배지를 사용하여 성장된 HIV 감염세포로부터 요하는 시간(CPE발현전 일수)과 매일 약물 존재하에 배양한 시간의 관계를 그래프로 표현한 것이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 인체면역결핍증 유발 바이러스(human immuno-deficiency virus : HIV)를 억제시키는 방법에 관한 것으로, 좀더 구체적으로 후천성면역결핍증(acquired immune deficiency syndrome : AIDS)을 치료하기 위한 잠재적인 유용성을 갖는 1,5-디데옥시-1,5-이미노-D-글루시톨(deoxynjiroimycin : 데옥시노지리마이신)의 N-부틸유도체에 관한 것이다.

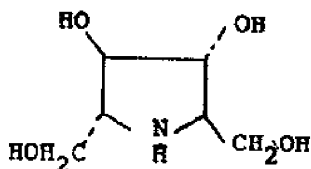
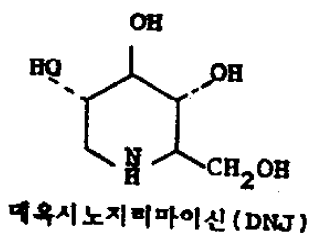
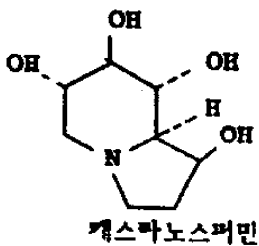
몇 년전만해도 단지 의학에서 호기심 정도로 여겨졌던 AIDS가 이제는 심각한 질병으로 되었으며, 이로 인하여 AIDS 퇴치를 위한 의약품과 백신의 제조에 많은 노력이 투자되고 있다. AIDS 바이러스는 1983년에 처음으로 확인된 이래로 여러 가지의 이름으로 표현되고 있으며, 세 번째로 알려진 T-임파구 바이러스(HTLV-III)로서, 면역계의 세포내에서 복제능을 가지고 있으며, 그로 인해  $T_4^+$  T-세포(혹은  $CD_4^+$  세포)의 심각한 파괴를 유발한다(Gallo 등, Science 224, 500-503(1984)와 Popovic 등., Ibid., 497-500(1984) 참조). 이 레트로바이러스(retrovirus)는 임파선종 관련 바이러스(lymphadenopathy-associated virus ; LAV) 혹은 AIDS 관련 바이러스(AIDS-related virus ; ARV)와 최근에는 인간면역결핍증 유발 바이러스(human immuno-deficiency virus ; HIV)로서 알려져 있다. AIDS 바이러스에는 두 개의 명확한 바이러스 즉, HIV-1과 HIV-2가 동정되어 있는 바, HIV-1은 파리에 위치하고 있는 파스퇴르 연구소에서 몬타그니어(Montagnier)와 그의 동료들에 의하여 1983년에 처음으로 동정된 바이러스(Ann.Virol.Inst.Pasteur 135E, 119-134(1984))인 반면에, HIV-2는 몬타그니어와 그의 동료들에 의하여 1986년에 분리된 것(Nature 326, 662(1987))으로서, 본 발명에 사용되는 HIV는 속(generic sense)의 개념에서 이들 두 바이러스 모두를 의미한다.

현재의 기술수준이 AIDS의 분자생물학이 설명되고 정의되는 기초단계이지만, 이 질병에 관해 연구하고 조사하는 것이 더욱 필요하며, 현재에는 치료가능성이 있는 항-AIDS제제와 백신 개발을 위한 많은 연구가 행하여지고 있지만, AIDS백신의 개발은 HIV에 대하여 보호력이 있는 면역계의 이해부족, 바이러스의 유전적 변이에 대한 무한함, HIV에 감염된 효과적인 동물표본의 부족등으로 실패를 거두지 못하고 있다(Koff와 Hoth, Science 241, 426-432(1988) 참조).

AIDS의 치료용 제제로 미국 식품의약품청(Food and Drug Administration(FDA))으로부터 최초로 인가를 받은 약품으로는 종전에는 아지도티미딘(azidothymidine; AZT)으로 더욱 잘 알려져 있는 지도부딘(Zidovudine)으로서, 화학명은 3'-아지도-3'-데옥시티미딘이다. 이 제제는 시험관내의 실험에서 바이러스의 복제를 억제시키는 것으로 밝혀져 AIDS에 대한 치료가능성이 있는 약품으로 선택되었고, 이러한 시험관내에서의 실험은 항-AIDS제제로서의 가능성 실험과 초기 선별의 실용적인 방법으로만 유용하고 실질적인 방법이었다.

그러나, AZT의 중요한 결점은 독성의 부작용을 나타내는 것이었으며, 이에 따라 더욱 유용한 항-AIDS약품의 연구가 계속되고 있다.

가장 최근에, 일부 글리코시다제 저해제의 AIDS 바이러스에 대한 활성을 실험한 결과, 이들 화합물 중 세가지 화합물이 항-AIDS 약품으로서의 가능성이 인정되었는 바, 이는 캐스타노스퍼민(castanospermin), 1-데옥시노지리마이신(1-deoxy-nojirimycin; DNJ)와 2,5-디하이드록시메틸-3,4-디하이드록시-피롤리딘(DMDP)이다 (Sunkara등., Bipchem.Biochys.Res.Commun.148(1), 206-210(1987); Tyms등., Lancet, Oct.31, 1987, pp. 1025-1026; Walker등., Proc. Natl.Acad.Sci.USA 84, 8120-8124(1987); Gruters등., Nature 330, 74-77(1987) 참고).



한편, 호주산 밤나무의 열매로부터 분리된 알칼로이드인 캐스타노스퍼민은 HIV 비리온(Virions)의 정상적인 글리코실화를 방해하여 HIV가 표적세포(target cell)로 침입하는 것을 방지하고 외피글리코프로테인을 변화시키는 것으로 알려져 있지만, 비리온 감염성에 있어서는 약간의 감소활성이 있음이 발견되었다.

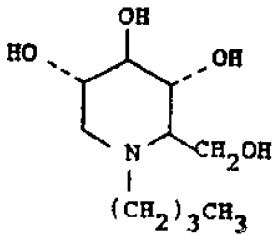
또한, 1987년 7월 2일자로 공고된 PCT국제출원 WO 87/03903에는 데옥시노지리마이신(DNJ)의 N-메틸

유도체가 글루코시다제 I에 저해능이 있기 때문에 HIV에 대한 활성을 가진다는 것을 기재하고 있으나, Fleet 등., FEBS Lett, In Press, 1988에서 글루코시다제 I 저해제 모두가 HIV의 저해제로서 효과적인 것은 아님을 밝히고 있는 바, HIV저해능에 어떤 다른 기작이 관련되어 있을 것이다.

본 발명에 따르면, 데옥시노지리마이신의 N-부틸유도체가 상응하는 N-메틸과 N-에틸유도체에 의한 저해활성과 비교할 때 비독성 농도에서 인체면역결핍증 유발 바이러스(HIV)에 대하여 실제적으로 향상된 저해활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

N-메틸과 N-에틸-데옥시노지리마이신유도체가 감염성 HIV의 생성을 2 내지 4의 대수차수만의 감소를 일으키는 반면에, N-부틸-데옥시노지리마이신만은 비세포독성농도에서 5의 대수차수 이상으로 바이러스의 역가를 감소시키기 때문에, N-부틸유도체는 후천성면역결핍증(AIDS)치료에 예외적으로 각별히 중요한 용도를 갖는다. 글루코시다제 I 저해활성이 AIDS치료의 작용기작이라면, 데옥시노지리마이신의 N-메틸과 N-부틸유도체의 글루코시다제 I 저해활성이 실제적으로 동일하다는 것이 Schweden 등., Arch.Biochem.Biophys.248(1), 335-340(1986)에 기재되어 있는 바, N-부틸유도체의 현저한 HIV 저해활성은 기대치 않았던 매우 놀라운 것임을 알 수 있다.

데옥시노지리마이신의 N-부틸유도체는 다음과 같은 화학구조를 갖는다.



입체이성을 나타내기 위하여 평면을 기준으로 상향 또는 하향의 결합을 각각 실선과 점선으로 표시하였다.

본 명세서가 발명을 이루고 있는 주제를 분명히 특허청구범위로 하고 특별히 지적인 청구범위로 결론을 짓지만, 본 발명은 첨부된 도면들과 연관된 다음의 설명으로부터 더욱 분명하게 이해 되리라 믿어진다.

제1도는 HIV(인체면역결핍증 유발 바이러스)에 감염 혹은 비감염된 T-세포에 대한 실험화합물의 세포 독성 효과뿐만 아니라, HIV에 대한 실험화합물의 저해효과를 측정하기 위해 사용된 실험방법의 개략도로서 TCID<sub>50</sub>는 조직배양감염량(Tissue Culture Infectious Dose)이고, 세포는 100units/ml의 페니실린 G와 100 μg/ml의 스트렙토마이신을 포함하여 10% 소태아 혈청을 함유하는 RPMI-1640 배지에서 배양한 것이다.

제2도는, 저해 실험화합물을 0.1mg/ml 함유하는 배지에서 배양시에 HIV에 감염된 세포의 상대비율을 측정하기 위하여 사용된 실험방법의 개략도로서, 여러시간대서 일정량의 감염된 세포현탁액을 저해제를 함유하지 않는 배지로 옮기고, 세포병리효과(cytopathic effect ; CPE)가 나타난 세포를 취한 시간을 기재한 것이고, 제3도는, HIV에 의한 CPE(세포병리효과-%CPE)의 감소저해 정도와 실험화합물인 데옥시노지리마이신(-%세포 사멸)을 배지중 몇가지의 실험화합물(약품)들의 농도(mg/ml)에 따라 그래프로 도시한 것으로, 세포생존능력 데이터는 HIV로 비감염된 세포들로서 결정하였으며, 실험화합물들은 데옥시노지리마이신(DNJ)의 N-메틸-, N-에틸-, N-부틸유도체와 캐스타노스퍼민(Castanospermine), N-(5-카르복시메틸-1-펜틸)-1,5-아미노-L-후시톨(LFT)과 1,4-디데옥시-1,4-이미노-L-아라비니톨(LAB)이며 ; 제4도는, 바이러스의 역가(TCID<sub>50</sub>로서 결정된 것)를 제3도의 여러 가지 실험화합물(약품)의 농도(mg/ml)에 따라 (a)와 (b)에 그래프로 도시한 것이며, 제5도는, CPE를 생성시키기 위하여, 0.1mg/ml의 N-부틸-데옥시노지리마이신(약품)존재하에서 한번도 약품이 첨가되지 않은 배지를 사용하여 성장된 HIV 감염세포로부터 요하는 시간(CPE 발현전 일수)과 매일 약품 존재하에서 배양한 시간의 관계를 도식적으로 표현한 것으로, 약품 존재하에서 배양(0) 55일 후에는 바이러스가 나타나지 않았으며, 약품부재하에서 (약품을 제거한 후에) 배양을 100일 더하여도 바이러스는 나타나지 않았다.

데옥시노지리마이신의 N-부틸 유도체는 공지의 화합물로서, 1,5-디데옥시-1,5-이미노-D-글루시톨(데옥시노지리마이신)을 N-부틸화 반응시켜 제조할 수 있으며, 제조방법은 미국특허 제4,182,767호와 제4,639,436호에 기재되어 있다.

본 발명의 방법에 있어서 활성 N-부틸-데옥시노지리마이신의 효과는 실험관내에서 실험을 행하여 HIV의 복제에 대하여 양성의 저해 활성을 나타내는 것으로 증명된다. 이 분석체계에 있어서, HIV 감염에 민감한 인간의 T세포를 HIV 감염세포의 복제 저해에 대한 여러 가지 실험화합물의 상대활성을 거시적으로 결정하기 위해 사용하였다. 여러 가지의 유사화합물이 다음에서 설명되는 바와같이 실질적으로 다른 결과를 나타내기 때문에 HIV의 저해제로서 일부 실험된 화합물의 효과는 예측할 수 없음이 명백하다. 종래에 HIV저해제의 효과에 대한 여러 가지 학설이 지금까지 제안되었으나, 여러 실험실에서의 연구에서 외피 당단백(glycoprotein ; 글리코프로테인), gp120과 CD<sub>4</sub> 항원 일부분의 상호작용은 HIV의 인지와 대부분의 세포가 감염되는 것과 HIV와 이들 세포의 결합을 포함하는 것으로 확인되었다.

따라서, 만노시다제 I 저해제인 데옥시만노지리마이신(deoxymannojirimycin ; DMJ) 즉, DNJ의 2-에피머의 효과가 없는데 대비하여 HIV감염증에 글루코시다제 저해제인 데옥시노지리마이신(DNJ)의 양성효과를 비교한 보고서에서는, N-결합된 올리고사카라이드 결합경로를 차단함에 의해 생성된 GP120이나 그의 전구체의 불안한 카르보하이드레이트구조가 효과를 나타내는데 관련되어 있다고 주장한바

있다(Gruter 등., Nature 330, 74-77(1987)참고). HIV에 대한 실험화합물의 예측할 수 없는 효과는 구조적으로 유사한 설탕 유도체의 여러 가지 비교연구에서 증명된다. 예를들어  $\alpha$ -글루코시다제 1 저해제 캐스타노스퍼민이 세포병리효과(CPE)를 저해한다는 것이 확실한 반면, 에피머인 L-1,6-디에피캐스타노스퍼민이나 캐스타노스퍼민의 이성체인 L-6-에피캐스타노스퍼민은 저해하지 못함이 밝혀졌다.(Fleet 등., FEBS Lett., In Press, 1988. 참고). 또한, 비록 1,4-디데옥시-1,4-이미노-아라비니톨의 두가지 에난티오머가 글루코시다제 저해제로 공지되어 있지만(Fleet 등., Tetrahedron Lett.26, 3127-3130(1985)와 Fleet 등., Chemistry Lett. 1051-1054(1986)참고), L-에난티오머는 강한 HIV 저해활성을 갖는 (1987년 12월 21일 출원된 출원번호 제136,219호 참고) 반면, D-에난티오머는 HIV 복제저해에 별로 효과적이지 못한 것이었다. 두 개의 에난티오머를 N-메틸화시킨 화합물은 항-HIV활성이 증가되기 보다는 오히려 감소된다.

글루코오스의 아조푸라노스유사체나 N-벤질유도체도 CPE에 효과를 갖지 못하며, 비슷하게 2-데옥시글루코오스가  $\alpha$ -글루코시다제 저해활성을 갖는 것으로 알려져 있지만(Fleet 등., FEBS Lett., In Press, 1988참고), 2-데옥시글루코스 유도체인 화고민(fagomine)은 HIV저해가 관찰되지 않았다.

N-부틸-데옥시노지리마이신과 유사한 실험화합물의 저해활성과 비교하여 본 발명의 N-부틸-데옥시노지리마이신의 HIV에 대한 저해활성은 적당한 영양배지에서 배양한 다음, 실험화합물이 존재하 혹은 비존재하에서 HIV접종물과 접촉시킨 T-세포에 배양배지에서만 성장한 대조세포군을 사용하여 실험관내의 분석계에서 실험하여 비교함으로써 본 발명에서 확실하게 증명된다. 적당한 기간동안 배양 후에 배양물중에서 거대합포체세포(syncytial cells; 거대세포(giant cells))라고 불리는 세포의 수를 측정하였다.

상술한 바와같은 예의 HIV저해 정도 측정을 위한 실험방법은 Fung 등., Bio/Technology 5, 940-946(1987)과 Tyms 등., Lancet, October31, 1987와 Gruters 등., Nature 330, 74-77(1987)과 Walker 등., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 8120-8124(1987)에 기재되어 있다.

본 발명에 있어서, 인간의 백혈병 T-세포주는 Karpas, Leuk.Res.1, 35-49(1977)에 기재된 것을 사용하였으며, 이 세포주는(T-45)는 급성임파구구성 백혈병을 가진 어린이로부터 얻은 것이다. N-부틸-데옥시노지리마이신의 저해활성을 증명하기 위하여 사용된 다른 T-세포주는 MOLT-4세포주로서, 이 세포주는 원래 급성 임파구구성 백혈병을 가진 환자의 말초혈액으로부터 얻은 것이다. 이 세포주의 기원과 특성에 관한 더욱 상세한 내용은 Minowada, J.Natl.Cancer Inst. 49, 891-895(1972)에 기재되어 있다. MOLT-4세포주는 메릴랜드의 록크빌리주재의 미국모식균배양수집소(American Type Culture Collection)에 ATCC 1582의 기탁번호로 기탁된 것으로 본 발명에 사용되는 이 세포주의 샘플은 분양 신청을 하여 분양 받은 것이다.

HIV의 세포 유리 현탁액은 감염된 배양액으로부터 제조되었으며, 감염성 입자의 농도는 연속적으로 10배로 희석하는 방법을 사용하여 적정분석의 종말점으로 측정하였다. 각각의 제조품에서 감염된 입자의 개략적인 숫자는  $10^4$  개의 T-세포를 10일 동안 배양한 후, 거대세포생성, 세포병리성[Leonard 등., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85, 3570-3574(1988)과 Barre-Sinoussi 등., Science 220, 868-870(1983)참고]과 HIV항체[Karpas 등., Lancet 1, 695-697(1985)참고]함성에 의하여 감염성 HIV를 함유하는 것중 가장 많이 희석된 것으로부터 결정하였다. 이것은 감염성 입자의 농도를 표현하는 것으로 여기서는 조직배양 감염량(tissue culture infectious dose; TCID)로 정의하였다. 분석은  $10^4$  개의 T-세포를 함유하는 배양배지 0.2ml를 각각의 웰(Well)에 파종시킨 96개의 웰을 갖는 플라스틱 마이크로미터 플레이트에서 행하였으며, 10% 소태아 혈청이 함유된 RPMI-1640을 배양배지로 사용하였다.

각각의 분석에서는 6개의 웰을 사용하였는데 3개의 웰(1-3)은 웰당  $10^4$  의 HIV-1이나 HIV-2로 감염시킨 것이고 나머지 3개(4-6)는 배양배지만을 첨가한 것이다. 배지는 각각의 실험 화합물에 대하여 같은 기간에 교환하였으며, 더욱 상세한 분석방법은 제1도와 제2도에 설명되어 있다.

다음의 실시예는 본 발명을 좀더 구체적으로 설명하는 것이지만 이들 실시예나 상세한 설명으로 본 발명의 범주를 한정하는 것은 아니다.

#### [실시예 1]

N-n-부틸-데옥시노지리마이신(BuDNJ)의 HIV 저해 활성을 N-메틸(MeDNJ)와 N-에틸(EtDNJ)유사체와 캐스타노스퍼민(Cast), 1,4-디데옥시-1,4-이미노-1-후시톨(LAB)와 N-(5-카르복시메틸-1-펜틸)-1,5-이미노-L-후시톨(LFT)와 후술하는 다른 아미노슈가 유도체와 여러 가지로 비교하여 측정하였다.

본 실시예에서 사용된 실험화합물의 효능은 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

$10^4$  개의 T-45세포를 함유하는 배양배지 0.2ml를 96-웰을 갖는 평탄저부형의 조직배양용 플라스틱 플레이트의 각각의 웰에 넣은 다음, 세포를 37°C에서 침강시키고(제1도 참조) 4시간 후에 배지를 흡입기로 흡입여과하고  $10^4$  TCID의 바이러스(HIV-1이나 HIV-2)를 각각의 웰에 첨가하여 5%CO<sub>2</sub> 하 37°C에서 1시간동안 배양을 계속한 다음, 여러 가지의 화합물을 함유하는 성장배지를 첨가하고 37°C에서 배양을 계속하였다. 대조군의 배양은 제2도의 기재와 같이 유지시켰다. 4일째에 각각의 웰로부터 세포현탁액을 두 개의 새로운 웰에 접종하고 여러화합물을 함유하는 신선한 배지를 첨가하고 7일째에도 같은 과정을 반복하였다. 1 내지 10일동안 매일 현미경으로 세포를 관찰하여 거대합포체세포의 존재, 성장을, 세포병리효과의 발현(CPE)(거대세포, 농축된핵, 굴절성의 상실)을 측정하였다.

CPE(100%)는 둥글고, 굴절성이 있으며 균일성을 가진 세포는 없고 거대하고, 부푼형상의 농축세포만 존재하는 것으로 정의했다.

HIV로 감염된 배양액의 생존능력도(viability)는 주어진 일정량의 배양액중에서 둥글고, 굴절성이

있으며 균일한 (정상)의 세포에 비하여 CPE를 나타내는 세포들의 개략적인 계산/측정으로 결정했다.

HIV복제를 억제하거나 감소시키는 것으로 보여지는 화합물들을 함께 배양된 웰내의 세포와 세포분열 증식이 현저한 세포들을 더 커다란 웰(24-웰 플레이트)로 옮기거나, 연속적인 세포분열을 증진시키기 위하여 거의 일정한 세포밀도를 유지하도록 분리하였다.

BuDNJ를 함유하는 배양액에서 HIV-감염세포의 점차적인 감소가 나타난다면 이를 측정하기 위하여  $10^4$  TCID<sub>50</sub>의 HIV-1으로 감염되고 여러시간별로 0.1mg/ml의 BuDNJ 존재하에서 성장시킨 일정량의 세포를 웰로부터 분리하여 옮기고 제3도에 도시된 바와같이 약품이 첨가되지 않은 배지에서 배양한 다음, 배양액중에서 CPE 발달과 활성 HIV복제를 나타내는 것을 관찰, 기록하였다.

향상된 CPE의 발현시간도 기재하였다. HIV-1이나 HIV-2가 CPE의 원인임을 확인하기 위해 슬라이드글라스에 고정시켜 Karpas등., Lancet 1, 695-697(1985)에 기재된 방법을 사용하여 상응하는 바이러스 항체의 발현을 확인하였다. T-45 세포내에서 HIV-1나 HIV-2복제를 저해하는 것으로 확인된 화합물을 MOLT-4인간의 백혈병 T-4세포주에 사용하였다.

상술한 실험의 결과는 다음과 같다 ; 여러 가지 농도의 MeDNJ, EtDNJ, Cast, BuDNJ, LFT와 LAB 각각의 CPE 형성에 대한 효과를 제3도에 도시하였다.

이 결과로부터 MeDNJ, EtDNJ와 Cast는 종모양의 약물의존성을 나타내었다. 제3도에 도시된 세포성장능의 결과와 표 1에 기재된 것과 같이 MeDNJ, EtDNJ와 Cast 존재하에서 성장한 비감염세포의 성장률은 이들 화합물이 올리고사카라이드 생합성 저해제로서 기대되었던 것과 같은 선택적인 항 바이러스 활성이 부족하고 세포독성이 있음을 암시하는 것이다. 그러므로 고농도에서의 이 약품들의 항 바이러스 활성도의 명확한 손실은(투여량에 따라 종모양을 나타냄)이들 약품의 세포독성 효과로 인하여 HIV로 감염된 세포 병리효과가 생성되기 때문에 일어난다. 이에 비하여 화합물 BuDNJ, LFT와 LAB는 사용된 농도범위 모두에서 세포 독성이 없음을 나타내는 것이며, BuDNJ는 실험된 모든 농도에서 HIV로 감염된 세포들에서 CPE를 완전히 방지하였다.

BuDNJ와 DNJ의 다른 알킬 유사체들(MeDNJ와 EtDNJ) 사이의 실험결과 차이는 이의 반응기작이 다를 수도 있음을 암시한다. 유사하게, 올리고사카라이드 생합성을 방해하지 않는  $\alpha$ -후코시다제 억제제 LFT도 세포독성이 발견되지 않았으며, LAB의 특성도 LFT와 유사하다.  $\alpha$ -글루코시다제저해제로서 LAB의 활성은 Fleet등., FEBS Lett., In Press, 1988에 기재되어 있으나, 합성  $\alpha$ -글루코시다제(예를 들어 I 과 II)에 대한 활성은 아직 실험되지 않았다.

LFT와 LAB의 HIV 저해활성은 1987년 12월 21일 출원된 미국특허출원 제 136,219호에 기재되어 있다.

비감염된 세포에 대한 여러 화합물들의 효과(세포독성)의 정성분석 자료는 약품처리를 하지 않은 대조세포군의 성장율과 비교하여 얻었다.

제4도와 표 2는 배양 10일후 HIV로 감염된 T-45세포의 배양 상등액의 TCID<sub>50</sub> 역가와 약품의 농도 관계를 나타내는 것으로, LAB와 LFT는 고농도에서까지도 TCID<sub>50</sub>가 부분적으로만 감소되는 것을 알 수 있다. 유사하게, DNJ, MeDNJ와 EtDNJ는 LAB와 LFT보다 더욱 큰 정도로 TCID<sub>50</sub>를 부분적으로 감소시켰다. TCID<sub>50</sub>를 전체적으로 감소시키는 일부 이들 약품의 비활성은 이중 바이러스 생성이나 확산에 기인된다. 제4도와 표 2는 BuDNJ만이 비세포독성인 농도에서 무시할 수 있는 TCID<sub>50</sub>를 얻을수 있음을 보여주고 있다.

제3도에 도시된 실험결과와 이들 결과는 이 화합물이 바이러스에 특이한 활성을 나타냄을 암시한다. 표 2는 HIV-1과 HIV-2에 대한 DNJ와 그것의 유도체의 항 바이러스 활성(TCID<sub>50</sub> 감소)을 함께 비교한 결과를 나타내는 것이며, MOLT-4세포주도 또한 사용되었다. 이 결과는 HIV-1과 HIV-2에 대한 항 바이러스 활성이 비슷하고 이 활성은 T-45세포주에서 성장한 바이러스에 제한을 받지 않는다는 것을 나타낸다.

BuDNJ존재하에서 HIV에 감염된 세포의 실제적인 감소가 있는지의 여부를 결정하기 위하여 약품 존재하에서 여러 시간별로 성장시킨 감염된 세포 현탁액의 일정량을 제2도에 도시된 바와같이 약품이 첨가되지 않은 배지로 옮긴 다음, 배양액을 관찰하여 CPE의 발현과 거대세포 생성(활성 HIV 복제를 나타내는 것)여부를 확인하였다.

한때 약품이 첨가되지 않은 배지에서 세포가 CPE를 발현하는데 걸리는 시간이 증가하는 것은(제5도), BuDNJ하에서 배양시킨 결과, 배양액에서 감염된 세포의 비율이 감소하는 것을 암시한다.

이것이 비감염 T-45세포와 비교하여 감염세포들의 이배화 시간의 감소로 인한 것이든 세포분해와 함께 바이러스 복제가 생체내에서의 세포군을 자연적으로 변경시킨다는 결론을 변경시키지 못하든 간에 결과적으로는 극적으로 많은 감염세포들을 감소시키고 재감염의 사이클을 깨트린다.

[표 1]

## 세포독성과 T-세포성장

화합물 명칭	투여량 (mg/ml)	7일후 바이러스에 비감염된 세포성장 측정치
약용 비두어	—	$1.2 \times 10^6$
DNJ	0.50	$1.4 \times 10^6$
	0.25	$1.4 \times 10^6$
MeDNJ	0.50	$5.0 \times 10^6$
	0.25	$1.0 \times 10^6$
	0.10	$1.0 \times 10^6$
	0.05	$1.2 \times 10^6$
	0.01	$1.2 \times 10^6$
EtDNJ	0.10	$1.3 \times 10^6$
	0.05	$1.2 \times 10^6$
	0.01	$1.2 \times 10^6$
BuDNJ	0.10	$1.4 \times 10^6$
	0.05	$1.2 \times 10^6$
	0.01	$1.2 \times 10^6$
LAE	0.50	$1.0 \times 10^6$
	0.25	$1.5 \times 10^6$
	0.10	$1.5 \times 10^6$
Cast	0.70	측정없음
	0.35	$8.0 \times 10^5$
	0.18	$8.0 \times 10^5$
	0.09	$1.0 \times 10^6$
	0.02	$1.2 \times 10^6$

[표 2]

## DNJ 유도체의 비교\*

바이러스	투여량(mg/ml)	HIV-1 (TCID)	HIV-2 (TCID)
대조군	—	$10^6$	$10^6$
DNJ	0.10	$10^5$	$10^5$
MeDNJ	0.10	$10^5$	$10^5$
EtDNJ	0.10	$10^5$	$10^5$
BuDNJ	0.10	< $10$	< $10$

\* HIV-1과 따로 HIV-2( $10^4$  TCID)로 세포를 감염시키기전에 T-45 세포나 MOLT-4세포를 DNJ와 그것의 3가지 유도체로 처리 했을 때 동일한 결과를 나타내었다.

T-45 세포주를 감염시키는데 사용된 HIV-1은 맨먼저 T-45세포에 계대접종 되었으며, 비슷하게 MOLT-4를 감염시키는데 사용된 HIV-1은 맨먼저 MOLT-4에 계대접종되었다. 같은 방법으로 HIV-2도 처리하였다. 10일 후 TCID를 측정하였다.

## [실시에 2]

비알킬화 데옥시노지리마이신 뿐만 아니라 N-메틸과 N-에틸유도체의 활성, N-부틸-데옥시노지리마이신의 HIV 저해활성과 비처리된 대조군을 비교한 것을 특별히 설명하기 위하여 HIV-1으로 감염된 T-45세포와 MOLT-4세포, HIV-2로 감염된 T-45세포와 MOLT-4세포에 대하여 실시예 1과 같은 방법으로 행한 실험결과를 다음의 표에 기재하였다. 즉, HIV-1은 맨먼저 T-45세포에 계대접종시키고, 비슷하게 HIV-1을 MOLT-4세포에 계대접종 시켰으며, HIV-2도 같은 방법으로 계대접종시켰다. 실험화합물은 0.1mg/ml의 농도로 사용하였으며,  $10^4$  TCID의 HIV-1과 따로 HIV-2를  $10^4$  세포를 감염시키는데 사용하였다.

실험완료 후, 바이러스의 역가를 다음의 표에 기재하였다.

[표 3]

바이러스 역가

	데오노	DNJ	MeDNJ	EtDNJ	BuDNJ
HIV-1	$10^6$	$10^5$	$10^5$	$10^3$	10
HIV-2	$10^6$	$10^5$	$10^5$	$10^3$	10

이 결과는 두 개의 다른 세포에서 두 개의 바이러스종 각각에 대하여 복제실험을 행한 결과, N-메틸-데옥시노지리마이신 보다 3대수 차수 정도 더 효과적인 뿐만아니라 N-메틸-데옥-노리지마이신보다 HIV 저해제로서 2대수 차수 정도 더 효과적인 것을 나타낸다.

## [실시에 3]

방사능표지된 갈락토오즈, 만노오즈, 글루코오즈와 티미딘을 B16-F10쥐의 흑색종 세포에 함유시킨 다음, 실험화합물 존재하에 세포를 배양함으로써 본 발명의 N-부틸-DNJ저해제가 DNJ, N-메틸-DNJ와 더욱 구별된다. 다음의 결과를 얻었다.

1. DNJ, N-부틸-DNJ 각각은 만노스 이용을 저해하는 반면에 N-메틸-DNJ는 함입에 자극되거나 거의 효과가 없다.
2. DNJ, N-부틸-DNJ 각각은 1.0mM 혹은 그 이하에서 갈락토오즈가 세포로 함입되는 것을 실질적으로 저해하는 반면에, N-메틸-DNJ는 미세하게만 저해한다.
3. 글루코오즈 이용/저해실험에 있어서 N-메틸-DNJ는 역아아치형의 투여량-결과치 곡선을 나타내는 반면에, N-부틸-DNJ는 조금 혹은 효과가 거의 없으며 DNJ는 정상적인 투여량-결과치 방법으로 저해한다.
4. 세포내로 함입된 3H-티미딘은 2.0mM까지 N-부틸-DNJ에 영향을 받지 않는 반면에, N-메틸-DNJ는 1.0mM에서 함입을 저해하며 DNJ는 2.0mM에서 함입을 저해한다.

상술한 항 바이러스제는 통상의 방법에 의하여, 바람직하게 제약적으로 허용되는 희석제와 매체(Carriers)를 갖는 제형으로 인간 면역결핍증 유발 바이러스에 감염된 환자에 투여하는데에 사용할 수 있다. 이 제제는 유리아민형이나 그의 염형태로도 사용될 수 있다. 제약적으로 허용되는 염 유도체는 염산염등과 같이 상술되었으며, 투여될 활성 성분의 양은 효과적인 양, 즉 의학적으로 유용하지만 그것의 사용에 따라 수반되는 잇점을 넘어서 독성효과가 나타나지 않은 양이다. 성인의 1회 복용량은 활성화합물이 약 1mg을 상회하는 범위가 정상적이다.

바람직한 투여방법은 캡슐, 정제, 시럽, 엘릭서등으로 경구적으로 투여하는 것이지만, 비경구투여 방법 또한 사용될 수 있다.

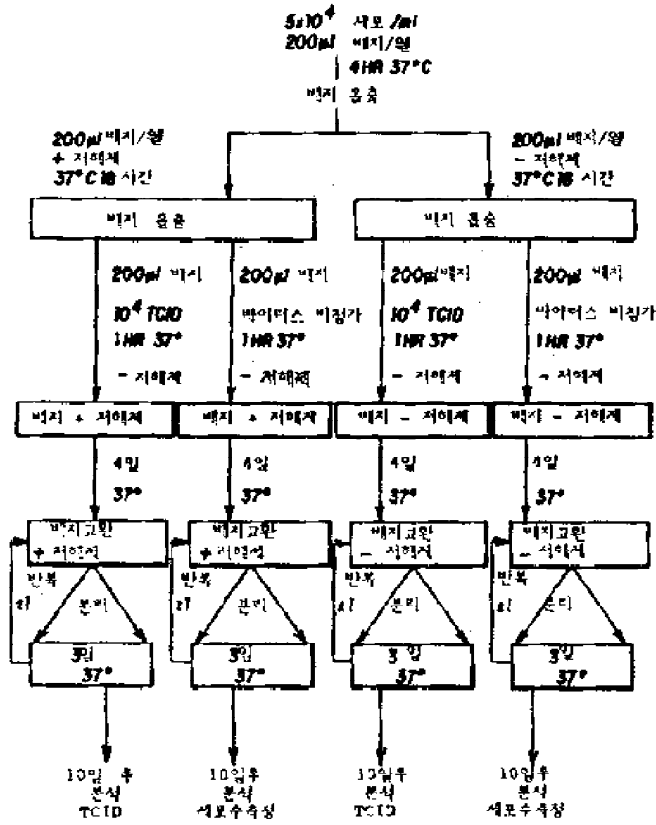
치료학적 투여량에서 제약학적으로 허용되는 희석제와 담체와 활성성분을 함유하는 제형의 바람직한 제조는 예를들어, Remington's Pharmaceutical Science, Ed.Arthur Osol, 16th ed., 1980, Mack Publishing Co., Easton, PA와 같이 본 발명의 기술분야에 해당하는 서적들을 참고로 하여 제조할 수 있다.

**(57) 청구의 범위****청구항 1**

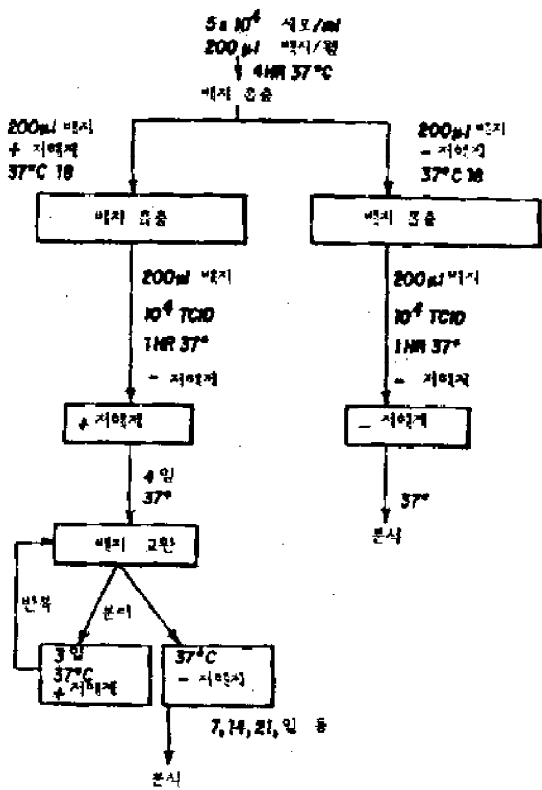
인체면역 결핍증 환자에게 투여해서 인체면역 결핍증 유발바이러스를 저해하는 N-n-부틸-데옥시노지리마이신이나 제약학적으로 허용되는 그의 염 유도체를 함유하는 항 바이러스제.

**도면**

도면1

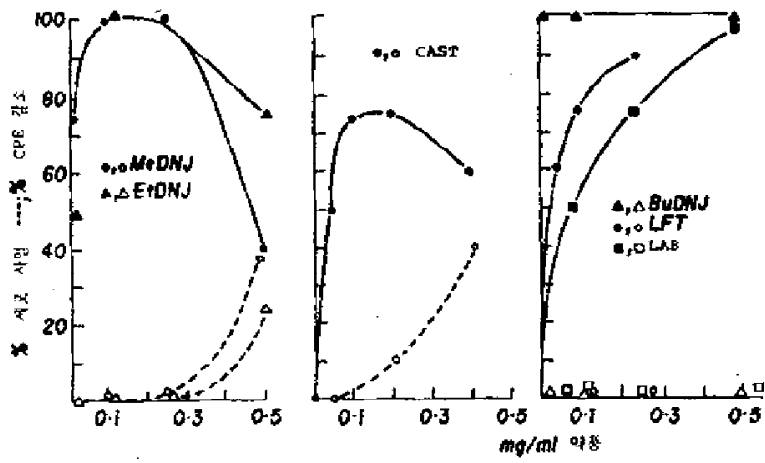


도면2

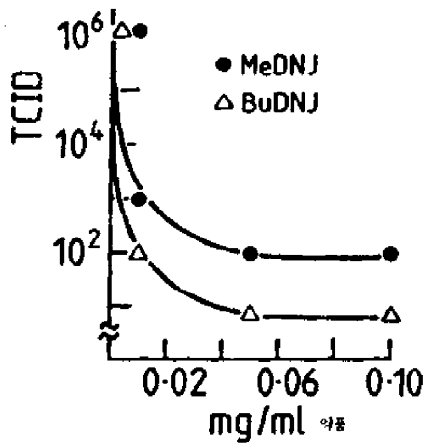




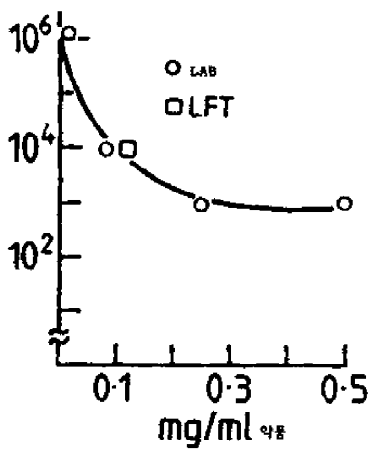
도면3



도면4-a



도면4-b



도면5

