(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119584960 A
(43)申请公布日 2025.03.07

(21)申请号 202380054949.7
(22)申请日 2023.07.31
(30)优先权数据
2022-122769 2022.08.01 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/027926 2023.07.31
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/029481 JA 2024.02.08
(71)申请人 国立研究开发法人理化学研究所
地址 日本
(72)发明人 古谷裕 丹羽节 津田隼平
小川健司 岩崎若菜 细谷孝充
白水美香子 小林薰 金山洋介
中冈贵义 渡边恭良 松浦知和
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 王灵菇
(51)Int.Cl.
A61K 31/167(2006.01)
A61K 31/275(2006.01)
A61K 31/5375(2006.01)
A61K 51/04(2006.01)
A61P 31/20(2006.01)
C07C 237/42(2006.01)
C07C 255/60(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)

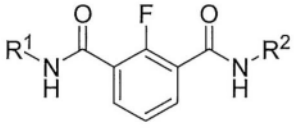
权利要求书2页 说明书29页
序列表（电子公布） 附图5页

(54)发明名称

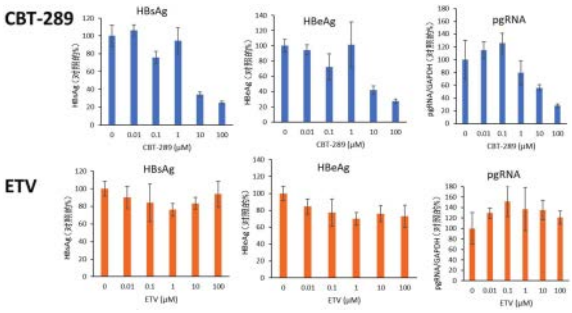
抗HBV剂

(57)摘要

一种抗HBV剂，其包含式(I)的化合物或其盐。[式中，R^1为被-CN或R^3-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基，所述R^3为碳原子数为1～10的烷基或式R^4-$(CH_2)_{n1}$-所示的基团，所述R^4为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基，n1为1～5的整数，R^2为被卤素取代的苯基。]

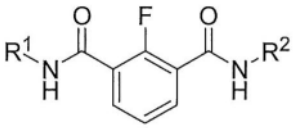


(I)



CN 119584960 A

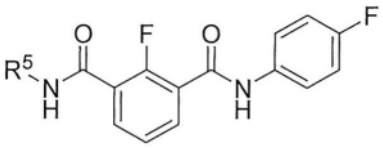
1.一种抗HBV剂,其包含式(I)的化合物或其盐,



(I)

式中,R^1为被-CN或R^3-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基,
所述R^3为碳原子数为1～10的烷基或式R^4-$(CH_2)_{n1}$-所示的基团,
所述R^4为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基,
n1为1～5的整数,
R^2为被卤素取代的苯基。

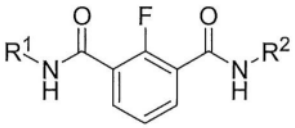
2.根据权利要求1所述的抗HBV剂,其中,所述式(I)的化合物为下述式(II)的化合物,



(II)

式中,R^5为被R^6-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基,
所述R^6为碳原子数为1～10的烷基或式R^7-$(CH_2)_{n2}$-所示的基团,
所述R^7为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基,
n2为1～5的整数。

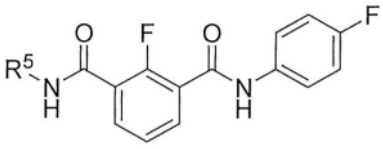
3.一种式(I)的化合物或其盐,



(I)

式中,R^1为被-CN或R^3-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基,
所述R^3为碳原子数为1～10的烷基或式R^4-$(CH_2)_{n1}$-所示的基团,
所述R^4为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基,
n1为1～5的整数,
R^2为被卤素取代的苯基。

4.一种式(II)的化合物或其盐,



(II)

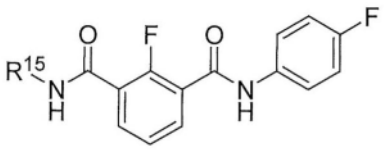
式中,R^5为被R^6-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基,
所述R^6为碳原子数为1～10的烷基或式R^7-$(CH_2)_{n2}$-所示的基团,

所述R^7为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基，

n2为1～5的整数。

5.一种HBV衣壳形成抑制剂，其包含权利要求3所述的式(I)的化合物或其盐、或者权利要求4所述的式(II)的化合物或其盐。

6.一种式(III)的化合物或其盐，



(III)

式中，R^{15}为被R^{16}-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基，

所述R^{16}为碳原子数为1～10的烷基或式R^{17}-$(CH_2)_{n3}$-所示的基团，

所述R^{17}为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基，

n3为1～5的整数。

所述式(III)的化合物用^{11}C标记，或者在含有氟原子的情况下用^{18}F标记。

7.一种成像用PET探针，其以包含权利要求6所述的式(III)的化合物或其盐的乙型肝炎抗原蛋白为靶标。

抗HBV剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型的抗HBV剂。

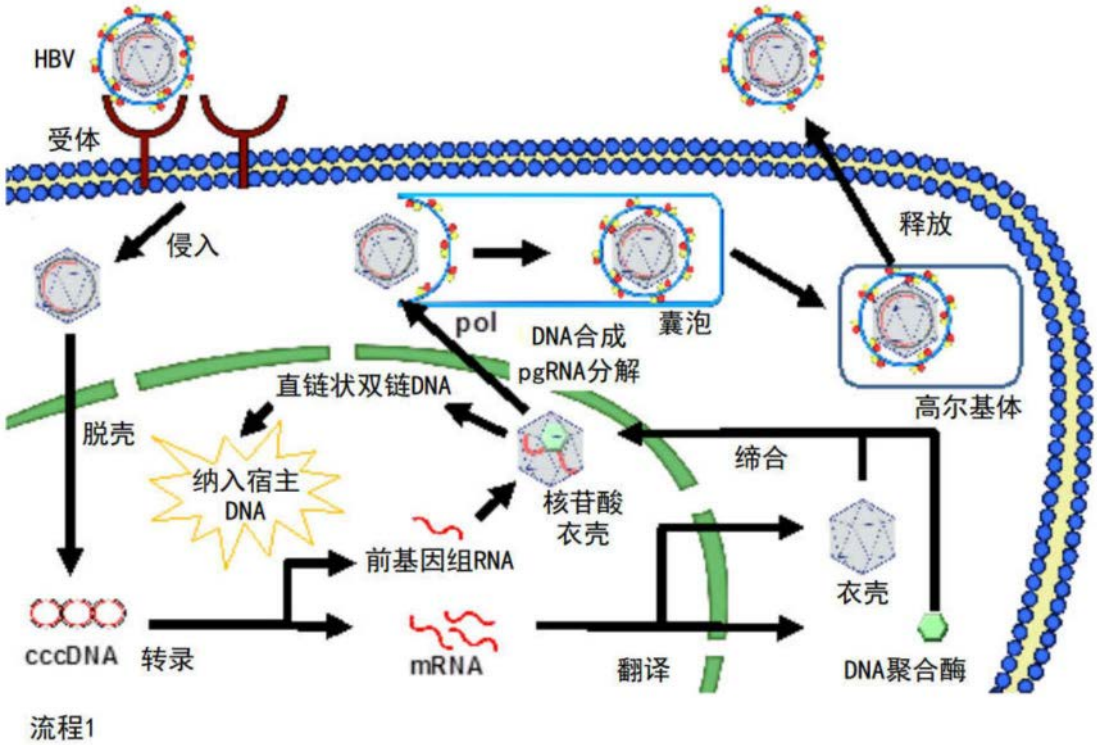
背景技术

[0002] 据说乙型肝炎经由血液、体液感染乙型肝炎病毒(HBV)而发生,感染者中的10%左右转为慢性。慢性乙型肝炎进展会发展为肝硬化、肝功能衰竭或肝细胞癌,是与患者生命相关的疾病,但目前尚不存在根治性治疗方法,只存在在防止新的HBV产生和感染扩散的同时、等待通过免疫或代谢使感染细胞减少、死亡、或者HBV灭活的姑息性治疗方法。

[0003] 慢性乙型肝炎的治疗目前使用通过自然免疫作用除去感染细胞的干扰素制剂和抑制HBV-DNA的逆转录的核酸类似物制剂。特别是核酸类似物制剂通过抑制HBV-DNA增殖而发挥高的治疗效果,但具有判断停药时期非常困难的情况。HBV是DNA病毒,在肝细胞核内以cccDNA(covalently closed circular DNA,共价闭合环状DNA)的形式存在。感染肝细胞时,侵入到核内而制作前基因组RNA,由该RNA合成HBV-DNA和各种抗原蛋白,由此其成为模板而形成新的病毒颗粒并增殖(参照流程)。

[0004] [化学式1]

[0005]



流程1

[0006] 目前,慢性乙型肝炎的治疗广泛使用以恩替卡韦(ETV)为代表的核酸类似物制剂,该药剂使病毒暂时减少,在延缓肝硬化、肝细胞癌的发病方面提高了一定的效果。但是被指出,持续感染的HBV并未从体内完全排除,并出现了长期给药所致的耐药性病毒,因此期望开发出作用机制与核酸类似物不同的新型药剂。

[0007] 近年来,报告了将衣壳蛋白抑制剂用作HBV等病毒感染症的治疗药(专利文献1)。

在该发明中,由于构成核心蛋白二倍体化基序和集合域的N末端的149个氨基酸残基不具有人蛋白同源序列,因此认为衣壳蛋白抑制剂是抗HBV药物开发的新靶标。

[0008] 另外,还报告了治疗与前基因组RNA衣壳形成相关的疾病的治疗药(专利文献2)。在该发明中,还指出了与前基因组RNA衣壳形成相关的疾病为乙型肝炎病毒感染症。

[0009] 另外,还报告了作为HBV的衣壳集合调节剂的N-苯基-3-氨磺酰基苯甲酰胺衍生物的合成和评价(非专利文献1)。

[0010] 现有技术文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献1:国际公开第2019/20070号小册子

[0013] 专利文献2:国际公开第2014/106019号小册子

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献1:Vandyck,Koen等,Journal of Medicinal Chemistry,2018年,61(14)卷,p.6247-6260

发明内容

[0016] 发明所要解决的课题

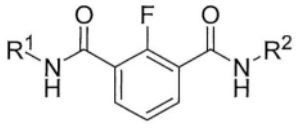
[0017] HBV核心蛋白(HBc)是病毒颗粒的核衣壳的主成分,同时是在基因组复制中也发挥必不可少的作用的重要蛋白。本发明人等着眼于作为HBc的药物研发靶标的可能性,目的在于提供抑制正常的核衣壳形成的新型抗HBV剂。

[0018] 用于解决课题的手段

[0019] 本发明人等发现了抑制正常的核衣壳形成的化合物。还发现基于该化合物的各种衍生物具有抑制HBV复制的活性。另外还发现,其中的某些化合物不仅具有抑制HBV DNA而且抑制cccDNA、HBsAg、HBeAg的效果。对于乙型肝炎而言,即使通过核酸类似物制剂进行治疗,也不能排除cccDNA,再活化成为问题。具有抑制cccDNA的效果的化合物能够抑制所述再活化,因而优选。另外,干扰素制剂作用于宿主的细胞,发挥抗病毒活性,但某些化合物直接作用于HBV的HBc,因此能够期待副作用的降低。基于以上见解,本发明人等发现了抑制正常的核衣壳形成的新型的抗HBV剂,从而完成了本发明。

[0020] 本发明涉及一种抗HBV剂,其包含式(I)的化合物或其盐。

[0021] [化学式2]

[0022] 

(I)

[0023] 式中,R^1为被-CN或R^3-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基,

[0024] 所述R^3为碳原子数为1～10的烷基或式R^4-$(CH_2)_{n1}$-所示的基团,

[0025] 所述R^4为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基,

[0026] n1为1～5的整数,

[0027] R^2为被卤素取代的苯基。

[0028] 发明效果

[0029] 本发明提供一种新型的抗HBV剂。

附图说明

[0030] 图1表示小鼠PET成像的结果。

[0031] 图2表示HBsAg、HBeAg、pgRNA的抑制效果的结果。

[0032] 图3表示cccDNA、pgRNA的抑制效果的结果。

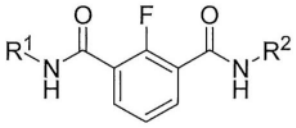
[0033] 图4表示使用了乙型肝炎病毒感染人肝细胞嵌合小鼠的化合物CBT-209的抗HBV活性测定实验的结果。

[0034] 图5表示利用电子显微镜对衣壳形成抑制机制进行解析的结果。

具体实施方式

[0035] 本发明涉及一种抗HBV剂,其包含上述式(I)的化合物或其盐。

[0036] [化学式3]

[0037] 

(I)

[0038] 式中,R^1为被-CN或R^3-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基,

[0039] 所述R^3为碳原子数为1～10的烷基或式R^4-$(CH_2)_{n1}$-所示的基团,

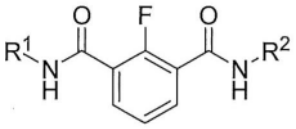
[0040] 所述R^4为CH_2=CH-、苯基、环已基或吗啉基,

[0041] n1为1～5的整数,

[0042] R^2为被卤素取代的苯基。

[0043] 另外,本发明涉及式(I)的化合物或其盐。

[0044] [化学式4]

[0045] 

(I)

[0046] 式中,R^1为被-CN或R^3-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基,

[0047] 所述R^3为碳原子数为1～10的烷基或式R^4-$(CH_2)_{n1}$-所示的基团,

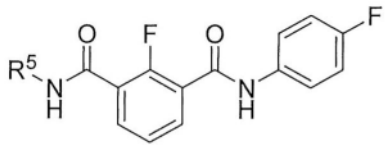
[0048] 所述R^4为CH_2=CH-、苯基、环已基或吗啉基,

[0049] n1为1～5的整数,

[0050] R^2为被卤素取代的苯基。

[0051] 另外,本发明涉及式(II)的化合物或其盐。

[0052] [化学式5]

[0053] 

(II)

[0054] 式中,R^5为被R^6-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基,

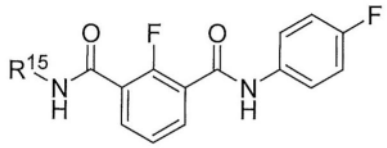
[0055] 所述R^6为碳原子数为1～10的烷基或式R^7-$(CH_2)_{n2}$-所示的基团,

[0056] 所述R^7为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基,

[0057] n2为1～5的整数。

[0058] 另外,本发明涉及式(III)的化合物或其盐。

[0059] [化学式6]

[0060] 

(III)

[0061] 式中,R^{15}为被R^{16}-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基,

[0062] 所述R^{16}为碳原子数为1～10的烷基或式R^{17}-$(CH_2)_{n3}$-所示的基团,

[0063] 所述R^{17}为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基,

[0064] n3为1～5的整数。

[0065] 所述式(III)的化合物用^{11}C标记,或者在含有氟原子的情况下用^{18}F标记。

[0066] 另外,本发明涉及一种HBV衣壳形成抑制剂,其包含所述式(I)的化合物或其盐、或所述式(II)的化合物或其盐。

[0067] 另外,本发明还涉及一种成像用PET探针,其以包含式(III)的化合物或其盐的乙型肝炎抗原蛋白为靶标。

[0068] <定义>

[0069] 本发明中,“卤素”可举出氟、氯、溴或碘,优选为氟、氯、溴,更优选为氟。

[0070] 在本发明中,“碳原子数为1～6的烷基”可举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、2-甲基丙基、正丁基、叔丁基、戊基、己基等。“碳原子数为1～6的烷基”优选为碳原子数为1～5的烷基,更优选为碳原子数为1～4的烷基,进一步优选为碳原子数为1～3的烷基。

[0071] 在本发明中,“碳原子数为1～10的烷基”可举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、2-甲基丙基、正丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基等。“碳原子数为1～10的烷基”优选为碳原子数为2～10的烷基,更优选为碳原子数为1～8的烷基。

[0072] 在本发明中,“碳原子数为1～3的烷基”可举出甲基、乙基、正丙基、异丙基等。“碳原子数为1～3的烷基”优选为碳原子数为1～2的烷基,更优选为碳原子数为2的烷基。

[0073] 在本发明中,作为盐,是无毒性且作为医药可容许的惯用的盐,例如可举出与钠、钾等碱金属的盐、与钙、镁等碱土金属的盐、与铵等无机碱的盐、及与三乙胺、吡啶、甲基吡啶、乙醇胺、三乙醇胺、二环己胺、N,N’-二苄基乙二胺等有机胺的盐、及与盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸等无机酸的盐、及与甲酸、乙酸、三氟乙酸、马来酸、酒石酸等有机羧酸的盐、及与甲

磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸等磺酸的盐、及与精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸等碱性或酸性氨基酸这样的碱的盐或酸的盐。

[0074] <抗HBV剂>

[0075] 式(I)的化合物与现有的化合物相比抗HBV活性高。特别是与现有的化合物相比，在HBV感染人肝细胞嵌合小鼠中的抗HBV活性增高。此外，式(I)的化合物具有cccDNA抑制效果，发挥能够抑制乙型肝炎的再活化的效果。

[0076] 在本发明的抗HBV剂中，所述式(I)的化合物优选：

[0077] 式中，

[0078] R^1为被-CN或R^3-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～3的烷基取代的苯基，

[0079] 所述R^3为碳原子数为1～10的烷基或式R^4-$(CH_2)_{n1}$-所示的基团，

[0080] 所述R^4为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基，

[0081] n1为1～3的整数，

[0082] R^2为被卤素取代的苯基。

[0083] 在本发明的抗HBV剂中，所述式(I)的化合物更优选：

[0084] 式中，

[0085] R^1为被-CN或R^3-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1的烷基取代的苯基，

[0086] 所述R^3为碳原子数为1～10的烷基或式R^4-$(CH_2)_{n1}$-所示的基团，

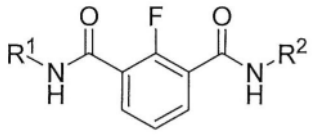
[0087] 所述R^4为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基，

[0088] n1为2的整数，

[0089] R^2为被氟取代的苯基。

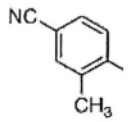
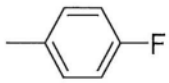
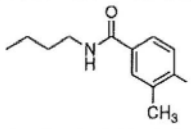
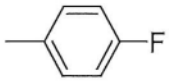
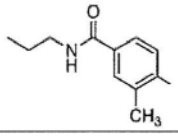
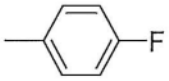
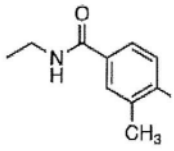
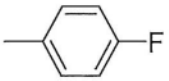
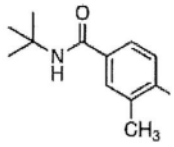
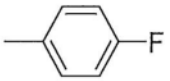
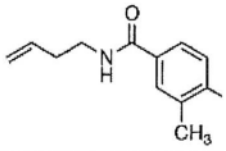
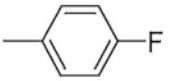
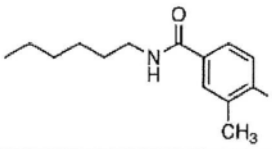
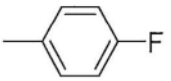
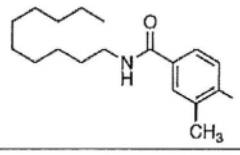
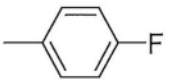
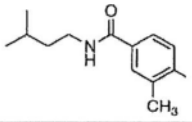
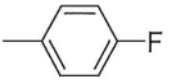
[0090] 在本发明的抗HBV剂中，所述式(I)的化合物优选为以下的表1中所示的化合物。

[0091] [表1]

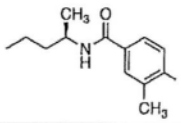
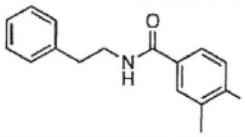
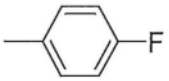
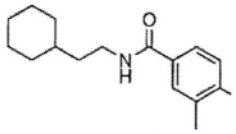
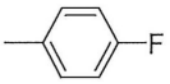
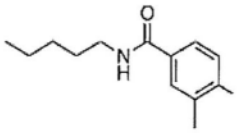
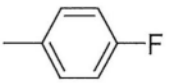
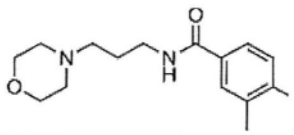
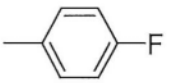
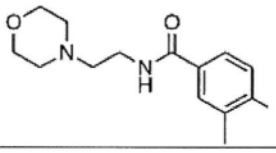
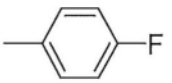
[0092] 

(I)

[0093]

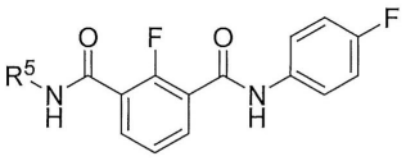
	R^1	R^2
CBT-209		
CBT-289		
CBT-383		
CBT-384		
CBT-385		
CBT-387		
CBT-388		
CBT-389		
CBT-390		

[0094]

CBT-391		
CBT-400		
CBT-401		
CBT-402		
CBT-403		
CBT-404		

[0095] 另外,在本发明的抗HBV剂中,所述式(I)的化合物优选为下述式(II)的化合物。

[0096] [化学式7]

[0097] 

(II)

[0098] 式中,

[0099] R^5为被R^6-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基,所述R^6为碳原子数为1～10的烷基或式R^7-$(CH_2)_{n2}$-所示的基团,所述R^7为CH_2=CH-、苯基、环已基或吗啉基,

[0100] n2为1～5的整数。

[0101] 在本发明的抗HBV剂中,所述式(II)的化合物优选:

[0102] 式中,

[0103] R^5为被R^6-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～3的烷基取代的苯基,

[0104] 所述R^6为碳原子数为1～10的烷基或式R^7-$(CH_2)_{n2}$-所示的基团,

[0105] 所述R^7为CH_2=CH-、苯基、环已基或吗啉基,

[0106] n2为1～3的整数。

[0107] 在本发明的抗HBV剂中,所述式(II)的化合物更优选:

[0108] 式中，

[0109] R^5为被R^6-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1的烷基取代的苯基，

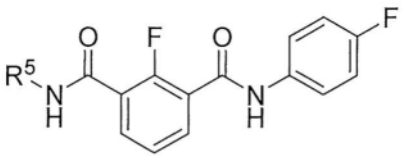
[0110] 所述R^6为碳原子数为1～10的烷基或式R^7-$(CH_2)_{n2}$-所示的基团，

[0111] 所述R^7为CH_2＝CH-、苯基、环己基或吗啉基，

[0112] n2为2的整数。

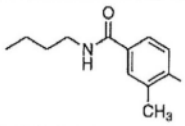
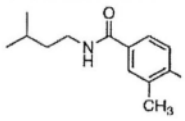
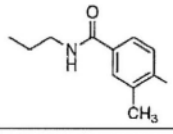
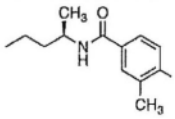
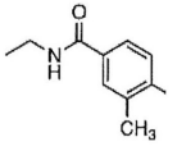
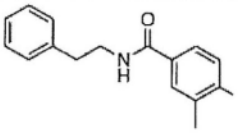
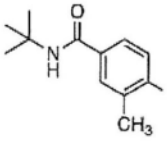
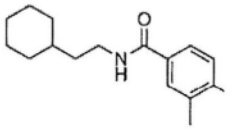
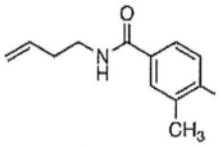
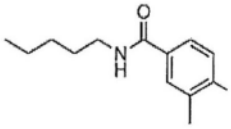
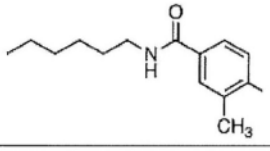
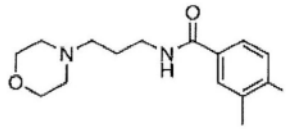
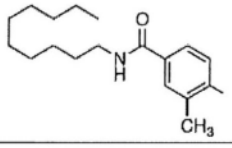
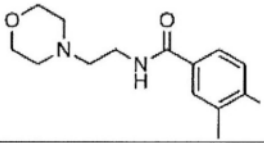
[0113] 在本发明的抗HBV剂中，所述式(II)的化合物优选为以下的表2中所示的化合物。

[0114] [表2]

[0115] 

(II)

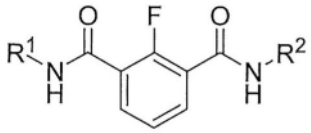
[0116]

	R^5		R^5
CBT-289		CBT-390	
CBT-383		CBT-391	
CBT-384		CBT-400	
CBT-385		CBT-401	
CBT-387		CBT-402	
CBT-388		CBT-403	
CBT-389		CBT-404	

[0117] <化合物>

[0118] 本发明还涉及式(I)的化合物或其盐。

[0119] [化学式8]

[0120] 

(I)

[0121] 式中，

[0122] R^1为被-CN或R^3-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基，

[0123] 所述R^3为碳原子数为1～10的烷基或式R^4-$(CH_2)_{n1}$-所示的基团，

[0124] 所述R^4为CH_2＝CH-、苯基、环己基或吗啉基，

[0125] n1为1～5的整数，

[0126] R^2为被卤素取代的苯基。

[0127] 所述式(I)的化合物例如为所述表1中例示过的化合物。

[0128] 所述式(I)的化合物优选：

[0129] 式中，

[0130] R^1为被-CN或R^3-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～3的烷基取代的苯基，

[0131] 所述R^3为碳原子数为1～10的烷基或式R^4-$(CH_2)_{n1}$-所示的基团，

[0132] 所述R^4为CH_2＝CH-、苯基、环己基或吗啉基，

[0133] n1为1～3的整数，

[0134] R^2为被卤素取代的苯基。

[0135] 所述式(I)的化合物更优选：

[0136] 式中，

[0137] R^1为被-CN或R^3-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1的烷基取代的苯基，

[0138] 所述R^3为碳原子数为1～10的烷基或式R^4-$(CH_2)_{n1}$-所示的基团，

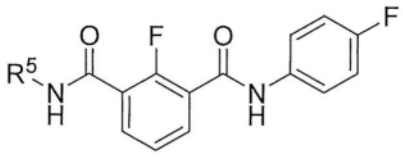
[0139] 所述R^4为CH_2＝CH-、苯基、环己基或吗啉基，

[0140] n1为2的整数，

[0141] R^2为被氟取代的苯基。

[0142] 另外，本发明涉及式(II)的化合物或其盐。

[0143] [化学式9]

[0144] 

(II)

[0145] 式中，

[0146] R^5为被R^6-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基，所述R^6为碳原子数为1～10的烷基或式R^7-$(CH_2)_{n2}$-所示的基团，所述R^7为CH_2＝CH-、苯基、环己基或吗啉基，n2为1～5的整数。

[0147] 所述式(II)的化合物例如为所述表2中例示过的化合物。

[0148] 所述式(II)的化合物优选：

[0149] 式中，

[0150] R^5为被R^6-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～3的烷基取代的苯基，所述R^6为碳原子数为1～10的烷基或式R^7-$(CH_2)_{n2}$-所示的基团，所述R^7为CH_2＝CH-、苯基、环己基或吗啉基，n2为1～3的整数。

[0151] 所述式(II)的化合物更优选：

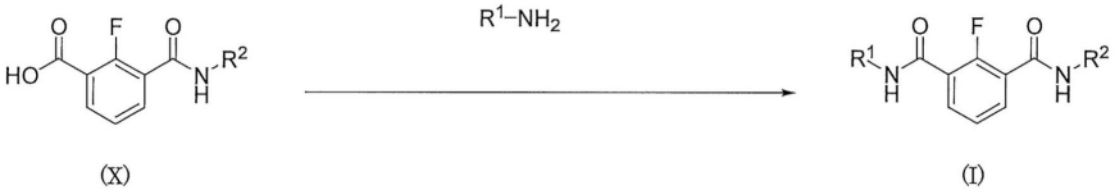
[0152] 式中，

[0153] R^5为被R^6-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1的烷基取代的苯基，所述R^6为碳原子数为1～10的烷基或式R^7-$(CH_2)_{n2}$-所示的基团，所述R^7为CH_2＝CH-、苯基、环己基或吗啉基，n2为2的整数。

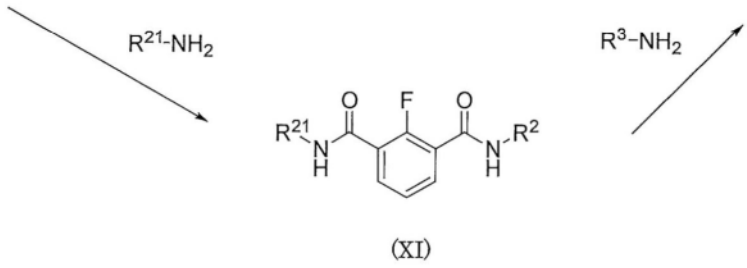
[0154] <化合物的制造方法>

[0155] 本发明的式(I)化合物的制造方法如下。

[0156] [化学式10]



[0157]



[0158] 式中，

[0159] R^1为被-CN或R^3-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基，

[0160] 所述R^3为碳原子数为1～10的烷基或式R^4-$(CH_2)_{n1}$-所示的基团，

[0161] 所述R^4为CH_2＝CH-、苯基、环己基或吗啉基，

[0162] n1为1～5的整数，

[0163] R^2为被卤素取代的苯基。

[0164] R^{21}为被R^3-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基。

[0165] 式(I)的化合物例如可以通过使式(X)的化合物与R^1-NH_2缩合来得到。或者，式(I)的化合物也可以通过使式(X)的化合物与R^{11}-NH_2缩合得到式(XI)的化合物，接着使其与R^3-NH_2缩合来得到。

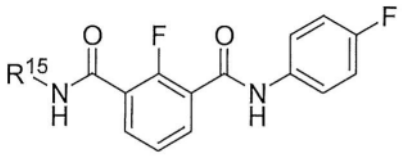
[0166] 所述缩合工序可以使用以往公知的缩合剂来进行。作为缩合剂，例如已知碳二亚胺系、咪唑系、三嗪系、鏻系、脲鎓系、卤鎓系等。作为碳二亚胺系缩合物，可举出1-[3-(二甲基氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺(EDCI)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI·HCl)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)等。作为所述咪唑系缩合剂，可举出N,N'-羰基二咪唑(CDI)、1,1'-羰基二(1,2,4-三唑)(CDT)等。作为所述三嗪系缩合物，可举出4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉鎓氯化物n水合物(DMT-MM)等。作为鏻系缩合剂，可举出1H-苯并三唑-1-基氧基三(二甲基氨基)鏻六氟磷

酸盐(BOP)、1H-苯并三唑-1-基氧基三吡咯烷鎓六氟磷酸盐(Py BOP)等。作为脲鎓系缩合剂,可举出{{[(1-氰基-2-乙氧基-2-氧亚乙基)氨基]氧基}-4-吗啉基亚甲基}二甲基铵己烷氟磷酸盐(COMU)等。作为卤鎓系缩合剂,可举出2-氯-1,3-二甲基咪唑鎓六氟磷酸盐(CIP)。

[0167] 所述式(X)所示的化合物可以按照公知文献、例如WO2020/255425号、日本专利第7072213号制造,也可以通过市售获得。

[0168] 本发明还涉及式(III)的化合物或其盐。

[0169] [化学式11]

[0170] 

(III)

[0171] 式中,

[0172] R^{15}为被R^{16}-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～6的烷基取代的苯基,

[0173] 所述R^{16}为碳原子数为1～10的烷基或式R^{17}-$(CH_2)_{n3}$-所示的基团,

[0174] 所述R^{17}为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基,

[0175] n3为1～5的整数。

[0176] 所述式(III)的化合物用^{11}C标记,或者在含有氟原子的情况下用^{18}F标记。

[0177] 所述式(III)的化合物优选:

[0178] 式中,

[0179] R^{15}为被R^{16}-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1～3的烷基取代的苯基,

[0180] 所述R^{16}为碳原子数为1～10的烷基或式R^{17}-$(CH_2)_{n3}$-所示的基团,

[0181] 所述R^{17}为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基,

[0182] n3为1～3的整数。

[0183] 所述式(III)的化合物更优选:

[0184] 式中,

[0185] R^{15}为被R^{16}-NH-CO-所示的基团和碳原子数为1的烷基取代的苯基,

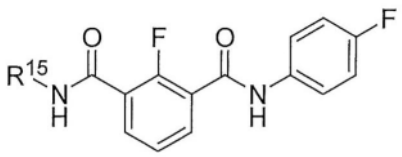
[0186] 所述R^{16}为碳原子数为1～10的烷基或式R^{17}-$(CH_2)_{n3}$-所示的基团,

[0187] 所述R^{17}为CH_2=CH-、苯基、环己基或吗啉基,

[0188] n3为2的整数。

[0189] 在本发明中,“所述式(III)的化合物用^{11}C标记,或者在含有氟原子的情况下用^{18}F标记”是指下述任一含义:

[0190] [化学式12]

[0191] 

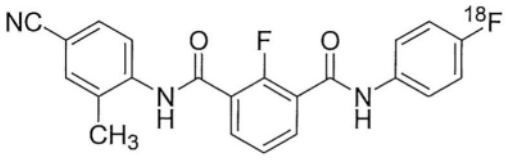
(III)

[0192] (a)所述式(III)中的碳原子中的任一个用^{11}C标记、

[0193] (b)所述式(III)中的氟(F)用^{18}F标记。

[0194] 在本发明中,作为“所述式(III)的化合物用^{11}C标记,或者在含有氟原子的情况下用^{18}F标记”的例子,例如可举出以下的化合物。

[0195] [化学式13]

[0196] 

[^{18}F]CBT-209

[0197] 本发明的“用^{11}C标记的”化合物可以在所述本发明的化合物的制造方法中组合以往公知的高速^{11}C-甲基化反应(Chem.Rec.2014,14,516-541.)来制造。另外,本发明的“在含有氟原子的情况下用^{18}F标记的”化合物可以在所述本发明的化合物的制造方法中组合以往公知的^{18}F-标记法(Org.Lett.2015,17,5780-5783;Chem.Commun.2016,52,8361-8364)来制造。

[0198] 另外,本发明涉及一种成像用PET探针,其以包含式(III)的化合物或其盐的乙型肝炎抗原蛋白为靶标。

[0199] 本发明的成像用PET探针可以通过以往公知的方法制成注射剂等适当的剂型。作为注射剂、例如静脉内给药用注射剂,可以根据需要在通式(III)所示的化合物或其盐中加入介质、pH调节剂、缓冲剂、悬浮剂、增溶剂、抗氧化剂、防腐剂等,通过以往的方法进行处理而制成制剂。

[0200] [缩写]

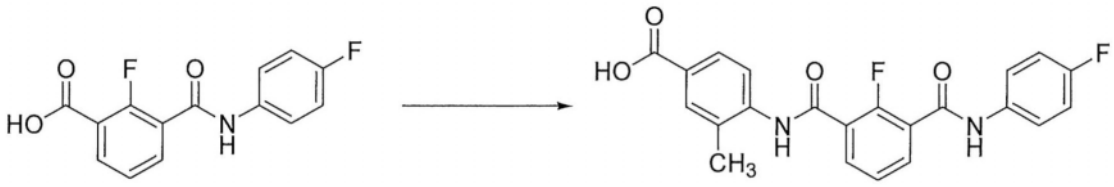
[0201] 在本说明书中,有时使用以下的缩写。

[0202] THF:四氢呋喃

[0203] <制造例1>

[0204] 式(S2)的化合物的合成

[0205] [化学式14]

[0206] 

S1 S2

[0207] 式(S1)的化合物按照日本特开2019-112326号中记载的2-氟-3-((4-氟苯基)氨基甲酰基)苯甲酸(4)的制造方法进行制造。

[0208] 向式(S1)的化合物(1.39g,5.0mmol,1当量)的THF溶液(25mL)中添加亚硫酰氯(3.65mL,7.5mmol,20当量),将得到的混合物加热至80℃,搅拌2小时。将混合物冷却至室温,在减压下从混合物中除去溶剂。向得到的残渣中添加THF(25mL)、3-甲基-4-氨基苯甲酸(0.89mL,5.0mmol,2.0当量)、N,N-二异丙基乙胺(0.89mL,5.0mmol,1.0当量),将混合物在

室温下搅拌19小时。向混合物中加入盐酸溶液(1mol/L,20mL)并搅拌后,用乙酸乙酯萃取三次。合并的有机相用饱和食盐水清洗后,用无水硫酸钠脱水。在减压下从所述有机相蒸馏除去溶剂后,在残渣的固体中加入丙酮,加热至70℃使其溶解于丙酮。冷却后,向丙酮溶液中加入少量的己烷使固体析出。滤取析出的固体,得到式(S2)的化合物(1.31g,3.20mmol,收率为64.0%)。

[0209] ^{1}H NMR(DMSO-d_6)δ2.34(s,3H),7.22(dd,J=8.8,8.8Hz,2H),7.45(dd,J=7.2,8.0Hz,1H),7.72-7.89(m,7H),10.13(s,1H),10.67(d,J=3.6Hz,1H);

[0210] ^{19}F NMR(DMSO-d_6)δ-116.6(1F),-119.8(1F);

[0211] HRMS(ESI^-)m/z 409.0996(计算出为$C_{22}H_{15}F_2N_2O_4^-$、405.1005,$[M]^-$).

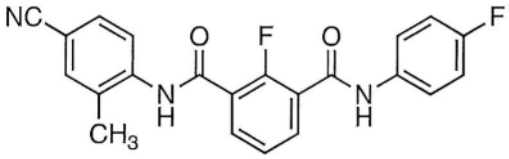
[0212] [实施例中记载的化合物的通常的制造方法]

[0213] 向羧酸(式(S1)的化合物或式(S2)的化合物,1当量)的四氢呋喃(THF)溶液中添加亚硫酰氯(20当量),将得到的混合物加热至80℃,搅拌2小时。将混合物冷却至室温,在减压下从混合物中除去溶剂。向得到的残渣中添加THF、胺化合物(2.0当量)、N,N-二异丙基乙胺(1.0当量),将混合物在室温下搅拌20小时。向混合物中加入盐酸溶液(1mol/L)并搅拌后,用乙酸乙酯萃取三次。合并的有机相用饱和食盐水清洗后,用无水硫酸钠脱水。在减压下从所述有机相蒸馏除去溶剂后,将残渣的固体通过重结晶(利用丙酮和己烷)或硅胶柱色谱法纯化,由此得到CBT化合物。

[0214] [实施例1]

[0215] 化合物CBT-209的制造

[0216] [化学式15]

[0217] 

[0218] 使用式(S1)的化合物(2.77g,10.0mmol)作为所述羧酸,使用2-甲基-4-氰基苯胺(1.98g,15mmol,1.5当量)作为所述胺化合物,按照所述通常的制造方法进行制造(2.99g,7.6mmol,收率为76.3%)。纯化通过硅胶柱色谱法(已烷/乙酸乙酯=9/1至1/1)进行。

[0219] ^{1}H NMR(丙酮-d_6)δ2.46(s,3H),7.16(dd,J=8.8,9.2Hz,2H),7.49(dd,J=8.0,7.6Hz,1H),7.66-7.70(m,2H),7.83-7.86(m,2H),7.96(dd,J=7.6,7.2Hz,1H),8.04(dd,J=7.2,7.6Hz,1H),9.23(s,1H),9.65(s,1H);

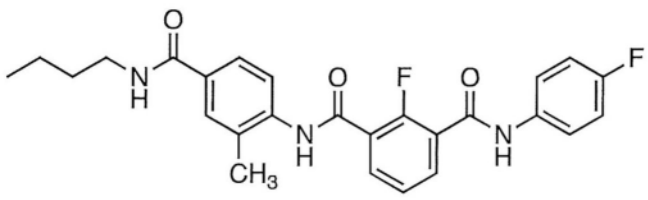
[0220] ^{19}F NMR(DMSO-d_6)δ-116.6(1F),-119.6(1F);

[0221] HRMS(ESI^+)m/z 392.1208(计算出为$C_{22}H_{16}F_2N_3O_2^+$、3992.1205、$[M+H]^+$).

[0222] [实施例2]

[0223] 化合物CBT-289的制造

[0224] [化学式16]

[0225] 

[0226] 使用式(S2)的化合物(205mg,0.5mmol)作为所述羧酸,使用正丁胺(100μL,1.0mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,按照所述通常的制造方法进行制造(127mg,0.27mmol,收率为54.3%)。纯化通过重结晶进行。

[0227] ^{1}H NMR(丙酮-d_6)δ0.93(t,J=7.2Hz,3H),1.32-1.42(m,2H),1.55-1.62(m,2H),2.41(s,3H),1.55-1.62(td,J=7.2,7.2Hz,2H),7.17(dd,J=7.2,8.8Hz,2H),7.48(dd,J=8.0,7.6Hz,1H),7.68(br,1H),7.76-7.80(m,2H),7.84-7.86(m,2H),7.93(dd,J=6.4,6.0Hz,1H),8.01-8.03(m,2H),9.16(d,J=4.4Hz,1H),9.74(s,1H);

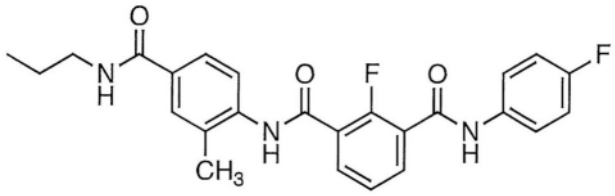
[0228] ^{19}F NMR(丙酮-d_6)δ-116.5(1F),-119.8(1F);

[0229] HRMS(ESI$^+$)m/z 466.1938(计算出为$C_{26}H_{26}F_2N_3O_3^+$、466.1937、$[M+H]^+$).

[0230] [实施例3]

[0231] 化合物CBT-383的制造

[0232] [化学式17]

[0233] 

[0234] 使用式(S2)的化合物(41.1mg,0.100mmol)作为所述羧酸,使用正丙胺(100μL,1.0mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,按照所述通常的制造方法进行制造(26.9mg,61.5μmol,收率为61.5%)。纯化通过重结晶进行。

[0235] ^{1}H NMR(DMSO-d_6)δ0.89(t,J=7.6Hz,3H),1.51-1.56(m,2H),2.33(s,3H),3.21(dt,J=6.4,6.4Hz,2H),7.22(dd,J=7.6,8.8Hz,2H),7.45(dd,J=7.2,8.0Hz,1H),7.61-7.87(m,7H),8.42(t,J=5.2Hz,1H),10.06(s,1H),10.62(s,1H);

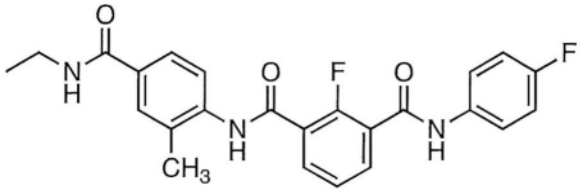
[0236] ^{19}F NMR(DMSO-d_6)δ-116.6(1F),-118.3(1F);

[0237] HRMS(ESI+)m/z 452.1780(计算出为$C_{25}H_{23}F_2N_3O_3^+$、452.1780、$[M+H]^+$).

[0238] [实施例4]

[0239] 化合物CBT-384的制造

[0240] [化学式18]

[0241] 

[0242] 使用式(S2)的化合物(41.1mg,0.100mmol)作为所述羧酸,使用乙胺水溶液(10mol/L,20μL,0.20mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,按照所述通常的制造方法进行制造(37.2mg,85.0μmol,85.0%)。纯化通过重结晶进行。

[0243] ^{1}H NMR(DMSO-d_6)δ1.08(t,J=7.2Hz,3H),2.28(s,3H),3.24(dq,J=6.8,6.8Hz,2H),7.17(dd,J=7.6,6.8Hz,2H),7.41(dd,J=7.6,8.0Hz,1H),7.57-7.85(m,7H),8.39(t,J=5.2Hz,1H),10.02(s,1H),10.58(s,1H);

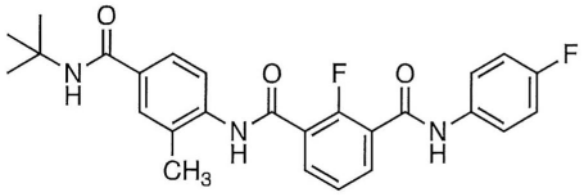
[0244] ^{19}F NMR(DMSO-d_6)δ-116.6(1F),-118.3(1F);

[0245] HRMS(ESI+)m/z 438.1623(计算出为$C_{24}H_{21}F_2N_3O_3^+$、438.1624、[M+H]+).

[0246] [实施例5]

[0247] 化合物CBT-385的制造

[0248] [化学式19]

[0249] 

[0250] 使用式(S2)的化合物(41.1mg,0.100mmol)作为所述羧酸,使用2-氨基-2-甲基丙烷(21μL,0.2mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,按照所述通常的制造方法进行制造(36.0mg,77.2μmol,收率为77.2%)。纯化通过重结晶进行。

[0251] ^{1}H NMR(丙酮-d_6)δ1.45(s,9H),2.39(s,3H),7.08(s,1H),7.16(dd,J=8.8,8.8Hz,2H),7.47(dd,J=8.0,8.0Hz,1H),7.69-7.74(m,2H),7.83-7.87(m,2H),7.91-8.02(m,3H),9.10(d,J=2.0Hz,1H),9.68(s,1H);

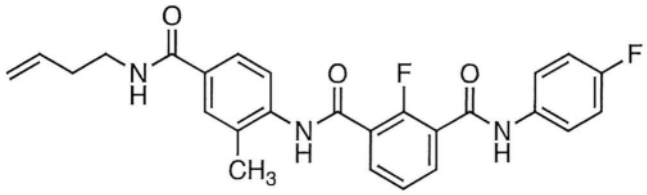
[0252] ^{19}F NMR(丙酮-d_6)δ-116.8(1F),-119.8(1F);

[0253] HRMS(ESI+)m/z 466.1935(计算出为$C_{26}H_{26}F_2N_3O_3^+$、466.1937、[M+H]+).

[0254] [实施例6]

[0255] 化合物CBT-387的制造

[0256] [化学式20]

[0257] 

[0258] 使用式(S2)的化合物(41.1mg,0.100mmol)作为所述羧酸,使用3-丁烯-1-胺盐酸盐(21μL,0.20mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,按照所述通常的制造方法进行制造(14.7mg,31.7μmol,收率为31.7%)。纯化通过重结晶进行。

[0259] ^{1}H NMR(丙酮-d_6)δ2.33-2.41(m,5H),3.50(td,J=6.0,7.2Hz,1H),4.99-5.11(m,2H),5.81-5.92(m,1H),7.16(dd,J=9.2,7.2Hz,2H),7.47(dd,J=7.2,8.0Hz,1H),7.69(br,1H),7.74-7.79(m,2H),7.83-7.86(m,2H),7.93(dd,J=7.2,7.2Hz,1H),8.02(m,2H),9.12(d,J=6.0Hz,1H),9.68(s,1H);

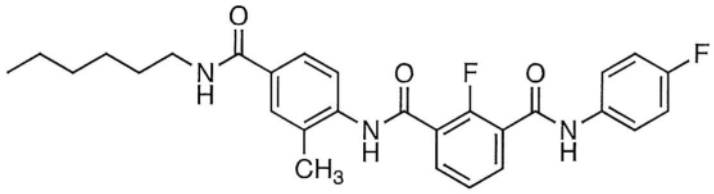
[0260] ^{19}F NMR(丙酮-d_6)δ-116.7(1F),-119.8(1F);

[0261] HRMS(ESI+)m/z 464.1780(计算出为$C_{26}H_{24}F_2N_3O_3^+$、464.1780、[M+H]+).

[0262] [实施例7]

[0263] 化合物CBT-388的制造

[0264] [化学式21]

[0265] 

[0266] 使用式(S2)的化合物(41.1mg,0.100mmol)作为所述羧酸,使用正己胺(26μL,0.20mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,代替N,N-二异丙基乙胺(1.0当量)而使用N,N-二异丙基乙胺(35μL,0.20mmol,2.0当量),按照所述通常的制造方法进行制造(21.0mg,42.5μmol,收率为42.5%)。纯化通过重结晶进行。

[0267] ^{1}H NMR(丙酮-d_6)δ0.89(m,3H),1.32-1.40(m,6H),1.59-1.62(m,2H),2.41(s,3H),3.38-3.39(m,2H),7.17(dd,J=8.4,6.8Hz,2H),7.48(dd,J=7.6,6.6Hz,1H),7.68(br,1H),7.75-7.80(m,2H),7.84-7.86(m,2H),7.93(dd,J=7.2,7.2Hz,1H),8.00-8.02(m,2H),9.14(s,1H),9.71(s,1H);

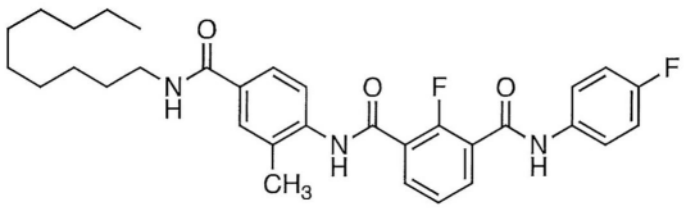
[0268] ^{19}F NMR(丙酮-d_6)δ-116.7(1F),-119.8(1F);

[0269] HRMS(ESI+)m/z 494.2248(计算出为$C_{28}H_{30}F_2N_3O_3^+$、494.2250、[M+H]$^+$).

[0270] [实施例8]

[0271] 化合物CBT-389的制造

[0272] [化学式22]

[0273] 

[0274] 使用式(S2)的化合物(41.1mg,0.100mmol)作为所述羧酸,使用1-氨基癸烷(39μL,0.20mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,代替N,N-二异丙基乙胺(1.0当量)而使用N,N-二异丙基乙胺(35μL,0.20mmol,2.0当量),按照所述通常的制造方法进行制造(11.4mg,19.2mmol,收率为19.2%)。纯化通过重结晶(THF/己烷)实施。

[0275] ^{1}H NMR(丙酮-d_6)δ0.87(t,J=7.2Hz,3H),1.29-1.41(m,14H),1.59-1.63(m,2H),2.41(s,3H),3.39(dt,J=7.2,6.4Hz,2H),7.16(dd,J=9.2,8.4Hz,2H),7.47(dd,J=8.0,7.6Hz,1H),7.64(br,1H),7.76-7.80(m,2H),7.84-7.87(m,2H),7.93(dd,J=6.8,6.0Hz,1H),8.01-8.03(m,2H),9.13(d,J=6.8Hz,1H),9.70(s,1H);

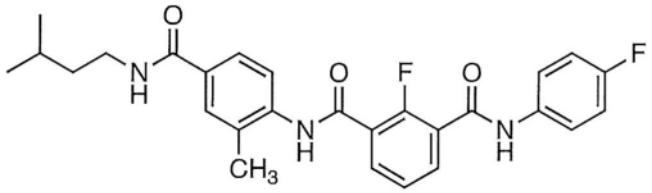
[0276] ^{19}F NMR(丙酮-d_6)δ-116.7(1F),-119.8(1F);

[0277] HRMS(ESI$^+$)m/z 550.2876(计算出为$C_{32}H_{38}F_2N_3O_3^+$、550.2876、[M+H]$^+$).

[0278] [实施例9]

[0279] 化合物CBT-390的制造

[0280] [化学式23]

[0281] 

[0282] 使用式(S2)的化合物(41.1mg,0.100mmol)作为所述羧酸,使用3-甲基-1-丁胺(23μL,0.20mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,代替N,N-二异丙基乙胺(1.0当量)而使用N,N-二异丙基乙胺(35μL,0.20mmol,2.0当量),按照所述通常的制造方法进行制造(9.2mg,18μmol,收率为18%)。纯化通过重结晶(THF/己烷)实施。

[0283] ^{1}H NMR(丙酮-d_6)δ0.93(s,3H),0.95(s,3H),1.52(dt,J=6.8,7.2Hz,2H),1.66-1.71(m,1H),2.41(s,3H),3.42(dt,J=6.0,8.4Hz,2H),7.08(s,1H),7.17(dd,J=8.8,8.8Hz,2H),7.48(dd,J=8.0,8.0Hz,1H),7.64(br,1H),7.76-7.80(m,2H),7.84-7.87(m,2H),7.94(dd,J=6.8,7.6Hz,1H),8.01-8.03(m,2H),9.12(d,J=6.0Hz,1H),9.68(s,1H);

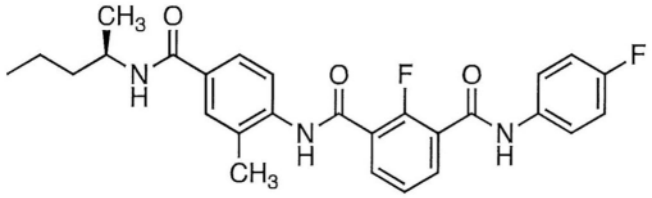
[0284] ^{19}F NMR(丙酮-d_6)δ-116.7(1F),-119.8(1F);

[0285] HRMS(ESI^{+})m/z 480.2093(计算出为$C_{27}H_{28}F_2N_3O_3^{+}$、480.2093、[M+H]$^{+}$).

[0286] [实施例10]

[0287] 化合物CBT-391的制造

[0288] [化学式24]

[0289] 

[0290] 使用式(S2)的化合物(41.1mg,0.100mmol)作为所述羧酸,使用(S)-1-甲基-1-丁胺(23μL,0.20mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,代替N,N-二异丙基乙胺(1.0当量)而使用N,N-二异丙基乙胺(35μL,0.20mmol,2.0当量),按照所述通常的制造方法进行制造(34.1mg,71.1μmol,收率为71.1%)。纯化通过重结晶(THF/己烷)实施。

[0291] ^{1}H NMR(丙酮-d_6)δ0.90-0.94(m,6H),1.15-1.22(m,1H),1.46-1.52(m,1H),1.68-1.73(m,1H),2.42(s,3H),3.17-3.24(m,1H),3.31-3.37(m,1H),7.16(dd,J=9.2,8.8Hz,2H),7.47(dd,J=7.6,8.0Hz,1H),7.67(br,1H),7.76-7.81(m,2H),7.84-7.87(m,2H),7.93(dd,J=6.8,6.4Hz,1H),8.01-8.03(m,2H),9.14(d,J=6.4Hz,1H),9.70(s,1H);

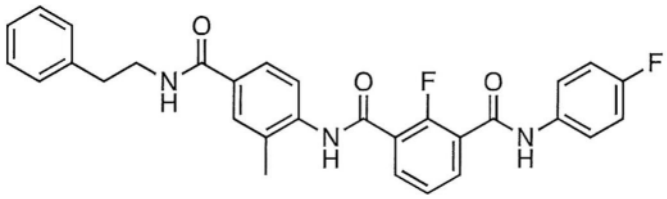
[0292] ^{19}F NMR(丙酮-d_6)δ-116.7(1F),-119.8(1F);

[0293] HRMS(ESI^{+})m/z 480.2093(计算出为$C_{27}H_{28}F_2N_3O_3^{+}$、480.2093、[M+H]$^{+}$).

[0294] [实施例11]

[0295] 化合物CBT-400的制造

[0296] [化学式25]

[0297] 

[0298] 使用式(S2)的化合物(41.1mg,0.100mmol)作为所述羧酸,使用2-苯乙胺(25μL,0.20mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,代替N,N-二异丙基乙胺(1.0当量)而使用N,N-二异丙基乙胺(35μL,0.20mmol,2.0当量),按照所述通常的制造方法进行制造(45.1mg,87.8μmol,收率为87.8%)。纯化通硅胶柱色谱法(已烷/乙酸乙酯=7/3-3/7)实施。

[0299] ^{1}H NMR(丙酮-d_6)δ2.41(s,3H),2.93(t,J=6.4Hz,2H),3.63(dt,J=6.4,6.8Hz,2H),7.15-7.22(m,3H),7.28-7.32(m,4H),7.48(dd,J=5.6,7.6Hz,1H),7.74-7.79(m,3H),7.84-7.87(m,2H),7.94(dd,J=6.8,7.2Hz,1H),8.03-8.04(m,2H),9.13(s,1H),9.70(s,1H);

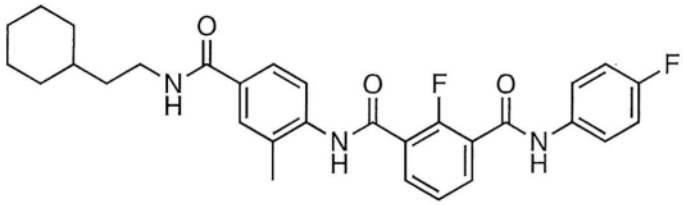
[0300] ^{19}F NMR(丙酮-d_6)δ-116.8(1F),-119.7(1F);

[0301] HRMS(ESI^{+})m/z 514.1942(计算出为$C_{30}H_{26}F_2N_3O_3^{+}$、514.1937、$[M+H]^{+}$).

[0302] [实施例12]

[0303] 化合物CBT-401的制造

[0304] [化学式26]

[0305] 

[0306] 使用式(S2)的化合物(41.1mg,0.100mmol)作为所述羧酸,使用2-环已基乙烷-1-胺(29μL,0.20mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,代替N,N-二异丙基乙胺(1.0当量)而使用N,N-二异丙基乙胺(35μL,0.20mmol,2.0当量),按照所述通常的制造方法进行制造(21.2mg,40.8μmol,收率为40.8%)。纯化通过重结晶(氯仿/乙酸乙酯)实施。

[0307] ^{1}H NMR(DMSO-d_6)δ0.90(tt,J=10.4,11.6Hz,2H),1.08-1.30(m,4H),1.40-1.43(m,2H),1.60-1.74(m,5H),2.33(s,3H),3.27-3.28(m,2H),7.22(dd,J=8.8,8.8Hz,2H),7.45(dd,J=7.6,7.6Hz,1H),7.61-7.87(m,7H),10.08(s,1H),10.64(s,1H);

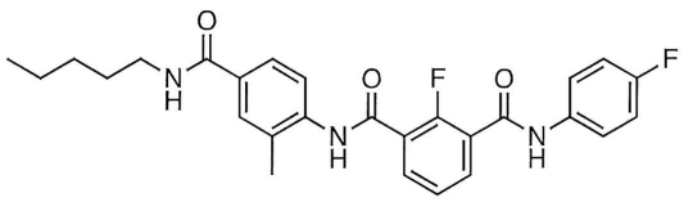
[0308] ^{19}F NMR(DMSO-d_6)δ-116.4(1F),-118.3(1F);

[0309] HRMS(ESI^{+})m/z 520.2407(计算出为$C_{30}H_{32}F_2N_3O_3^{+}$、520.2406、$[M+H]^{+}$).

[0310] [实施例13]

[0311] 化合物CBT-402的制造

[0312] [化学式27]

[0313] 

[0314] 使用式(S2)的化合物(41.1mg,0.100mmol)作为所述羧酸,使用正戊胺(23μL,0.20mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,代替N,N-二异丙基乙胺(1.0当量)而使用N,N-二异丙基乙胺(35μL,0.20mmol,2.0当量),按照所述通常的制造方法进行制造(35.5mg,74.0mmol,收率为74.0%)。纯化通过重结晶(乙酸乙酯)实施。

[0315] ^{1}H NMR(DMSO-d_6)δ0.88(t,J=6.8Hz,3H),1.15-1.19(m,1H),1.30-1.31(m,3H),1.50-1.54(m,1H),2.32(s,3H),3.24(dt,J=6.8,6.4Hz,2H),7.22(dd,J=9.2,8.8Hz,2H),7.45(dd,J=7.6,7.6Hz,1H),7.62(d,J=8.0Hz,1H),7.70(d,J=8.8Hz,1H),7.74-7.77(m,3H),7.80-7.89(m,2H),8.39(t,J=6.0Hz,1H),10.05(s,1H),10.60(s,1H);

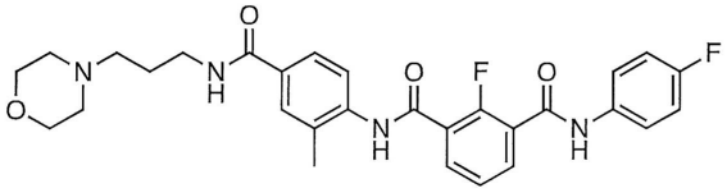
[0316] ^{19}F NMR(DMSO-d_6)δ-116.6(1F),-118.3(1F);

[0317] HRMS(ESI^{+})m/z 486.2093(计算出为$C_{27}H_{28}F_2N_3O_3^{+}$、486.2093、[M+H]$^{+}$).

[0318] [实施例14]

[0319] 化合物CBT-403的制造

[0320] [化学式28]

[0321] 

[0322] 使用式(S2)的化合物(41.1mg,0.100mmol)作为所述羧酸,使用3-(吗啉代)丙胺(29μL,0.20mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,代替N,N-二异丙基乙胺(1.0当量)而使用N,N-二异丙基乙胺(35μL,0.20mmol,2.0当量),按照所述通常的制造方法进行制造(25.4mg,47.3μmol,收率为47.3%)。纯化通过重结晶(乙酸乙酯)实施。

[0323] ^{1}H NMR($CDCl_3$)δ1.77(m,2H),2.25(s,3H),2.61(m,6H),3.35(m,2H),3.76(m,4H),7.03(dd,J=7.6,6.8Hz,2H),7.33(dd,J=7.6,5.2Hz,1H),7.62-7.68(m,4H),7.95-8.20(m,5H),8.96(s,1H);

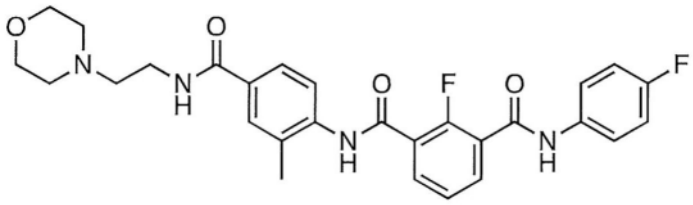
[0324] ^{19}F NMR($CDCl_3$)δ-116.0(1F),-116.9(1F);

[0325] HRMS(ESI$_{+}$)m/z 537.2309(计算出为$C_{29}H_{31}F_2N_3O_3^{+}$、537.2308、[M+H]$^{+}$).

[0326] [实施例15]

[0327] 化合物CBT-404的制造

[0328] [化学式29]

[0329] 

[0330] 使用式(S2)的化合物(41.1mg,0.100mmol)作为所述羧酸,使用2-(吗啉代)乙胺(26.8mg,0.206mmol,2.0当量)作为所述胺化合物,代替N,N-二异丙基乙胺(1.0当量)而使用N,N-二异丙基乙胺(35μL,0.20mmol,2.0当量),按照所述通常的制造方法进行制造(49.2mg,94.2μmol,收率为94.2%)。纯化通过重结晶(氯仿/已烷)实施。

[0331] ^{1}H NMR($CDCl_3$)δ2.26(s,3H),2.50-2.55(m,6H),3.40-3.41(m,2H),3.71(m,4H),

6.86(br,1H),7.04(dd,J＝8.8,8.8Hz,2H),7.32(dd,J＝7.6,7.6Hz,1H),7.50-7.55(m,2H),7.96(m,1H),8.10-8.21(m,3H),8.96(d,J＝5.6Hz,1H)；

[0332] ^{19}F NMR($CDCl_3$)δ-116.2(1F),-116.8(1F)；

[0333] HRMS(ESI^+)m/z 523.2151(计算出为$C_{28}H_{29}F_2N_3O_3^+$、523.2155、$[M+H]^+$).

[0334] <使用乙型肝炎病毒产生培养细胞的抗HBV活性测定实验>

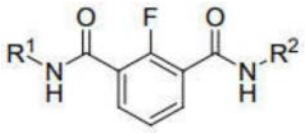
[0335] 将Hep2.2.15.7细胞以1×10^5细胞/孔的密度播撒到96孔板(TPP公司制)上,在37℃、5％CO_2的条件下,使用在DMEM/F12-GlutaMAX(Thermo Fisher Scientific Inc.公司制)中含有10％胎牛血清、100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素(Thermo Fisher Scientific Inc.公司制)、5μg/ml胰岛素(和光纯药公司制)的培养液进行培养,加入待测化合物,每1个条件培养3孔细胞。利用含有待测化合物的培养基在3天后进行更换,6天后,使用细胞增殖试剂盒II(XTT)(Roche公司制),使用酶标仪EnSight(Perkin Elmer公司制)对细胞内线粒体活性的490nm的吸光度进行定量,确定细胞的存活率。同时,使用Agencourt Genfind v2(Beckman Coulter公司制)从细胞培养液中提取、纯化HBV来源的DNA,将DNA溶液(2μL)与Probe qPCR Mix(TAKARA公司制)(5μL)、100μM引物(0.02μL)(HBV DNA Fr:ACTCACCAACCTCCTGTCCT(序列号1)、HBV DNA Rv:GACAAACGGGCAACATACCT(序列号2)、100μM探针(0.01μL)、HBV DNA:[FAM]TATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGT[TAM](序列号3))混合,在95℃下进行qPCR的反应1分钟,然后进行50个循环的“95℃10秒,接着60℃30秒的循环”,使用CFX96 Touch实时PCR检测系统(Bio-rad公司制)检测信号,对HBV DNA量(HBV基因拷贝数)进行定量。

[0336] <使用乙型肝炎病毒感染原代培养人肝细胞的抗HBV活性测定实验>

[0337] 将PXB小鼠来源的新鲜人肝细胞(PXB细胞;Phoenixbio公司制)以0.7×10^5细胞/孔的密度播撒到经胶原涂布的96孔板(FALCON公司制)上,在37℃、5％CO_2的条件下使用dHCGM培养基(自制)培养7天。将基因型C的HBV(Phoenixbio公司制)以最终达到3×10^5拷贝数/孔、或将基因型D的HBV(Hep2.2.15.7细胞来源的自制)以最终达到3×10^7拷贝数/孔的方式与4％PEG8000一起加入到培养液中,1天后更换培养基,其后也每隔3或4天进行更换,28天后加入待测化合物,每1个条件培养3孔细胞。其后也利用含有待测化合物的培养基在3或4天后进行更换,7天后,使用Agencourt RNAdvance(Beckman Coulter公司制)从细胞中提取、纯化总RNA,使用PrimeScript RT ragent kit(Perfect Real Time)进行逆转录,将cDNA溶液(2μL)与TB Green Premix Ex Taq II(TIi RNaseH Plus)(TAKARA公司制)(5μL)、100μM引物(0.02μL)(pg RNA Fr:CT CAATCTCGGGAATCTCAATGT(序列号4)、pgRNA Rv:GGATAGAA CCTAGCAGGCATAAT(序列号5))混合,在95℃下进行qPCR的反应1分钟,然后进行50个循环的“95℃10秒、接着60℃30秒”,使用CFX96Touch实时PCR检测系统(Bio-rad公司制)检测信号,对pgRNA量(pgR NA拷贝数)进行定量。

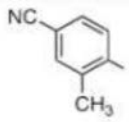
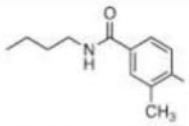
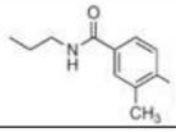
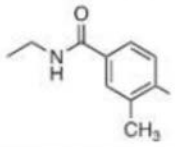
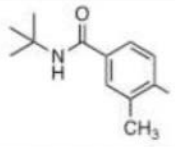
[0338] 将使用PXB细胞或Hep2.2.15.7细胞测定化合物的抗HBV活性的结果汇总于以下的表3。抗HBV活性根据对细胞中或培养液中HBV基因拷贝数进行DMSO处理后的样品的拷贝数计算0％抑制,将0拷贝数作为100％抑制进行计算,求出IC_{50}。

[0339] [表3]

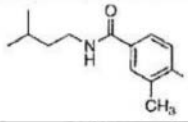
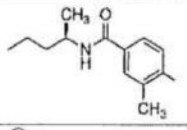
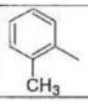
[0340] 

(I)

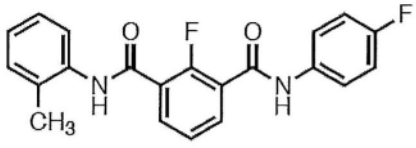
[0341]

CBT编号	R1的结构	IC50（Hep2.2.15.7来源的HBV DNA）μM	IC50（PXB细胞中的pgRNA）μM
CBT-209		0.039	—
CBT-289		0.074	2.48
CBT-383		0.91	2.33
CBT-384		0.075	16.5
CBT-385		0.18	＞100

[0342]

CBT-390		0.061	0.73
CBT-391		0.095	2.48
CBT-078（比较）		0.27	—

[0343] [化学式30]

[0344] 

CBT－078（比较用化合物）

[0345] 如上表所示,式(I)的化合物显示出HBV抑制活性。详细而言,以往的衣壳形成抑制剂CBT-078在乙型肝炎病毒感染原代培养人肝细胞中没有抑制pgRNA、cccDNA的效果,但式(I)的化合物确认到抑制pgRNA和cccDNA的效果。在以往的核酸类似物制剂中,无法排除cccDNA而难以治愈乙型肝炎,但式(I)的化合物具有cccDNA抑制效果,可预想到乙型肝炎的

治疗效果提高。

[0346] <小鼠血药浓度测定实验>

[0347] 将化合物溶解于乙醇与聚山梨醇酯80(1:1)的混合液中,制成10mg/mL的溶液,用生理盐水稀释至1mg/mL,使用探管经口给药至小鼠(ICR系、雄性、6-10周龄)。给药后,在0.25、0.5、1、2、4、7小时时从尾静脉采血,得到血浆。在血浆10μL中加入内标(利托那韦),将除蛋白后的试样供于测定。测定按照使用Shimadzu LCMS8050系统的液相色谱-串联质谱分析法进行。分析条件如下。柱使用COSMOSIL 3C18-MS-II(2.0ID×50mm;Nacalai Tesque公司制)。柱温为40℃,自动进样器温度为4℃。流动相为A相:水/乙腈=9/1(v/v),B相:乙腈,流速为0.6mL/min。注入样品2μL。梯度洗脱条件为:0~0.9分钟5%B;0.9~2.1分钟、5~95%B;2.1~5.5分钟95%B;5.5~5.51分钟、95~5%B;5.51~6.0分钟、5%B。清洗液使用含有0.1%甲酸的异丙醇/甲醇/乙腈/水=1/1/1/1(v/v/v/v,%)溶液。离子化法为ESI,采集的数据使用LabSolutions软件(Version5.97 SP1、岛津制作所)进行处理。

[0348] 将化合物的小鼠血药浓度汇总于以下的表4中。

[0349] [表4]

[0350]

CBT化合物	最大血药浓度（ng/ml）	达到最大血药浓度的时间（分钟）	消失半衰期（分钟）
CBT-193	4.7	30	ND
CBT-213	18	60	118
CBT-215	190	60	105
CBT-209	250	120	825
CBT-300	5700	30	126
CBT-301	33	240	ND
CBT-078（比较）	710	30	32

[0351] 如上表所示,确认到式(I)的化合物的吸收速度缓慢且消失速度慢。

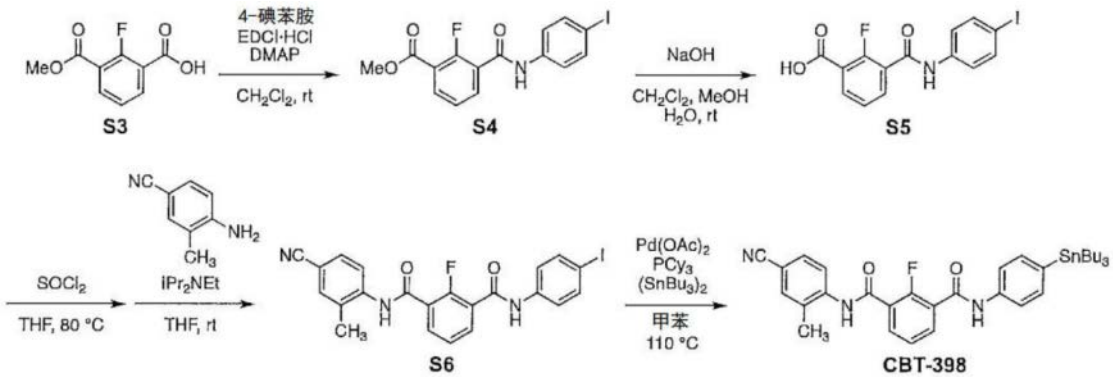
[0352] [实施例16]

[0353] 用^{18}F标记的化合物CBT-209(化合物[^{18}F]CBT-209)的制造

[0354] 按照以下流程,首先合成化合物CBT-398。所使用的试剂类直接使用购买的试剂。单甲基2-氟间苯二甲酸(S3)的合成方法如论文(J.Med.Chem.2009,52,1518-1521)中所记载的。

[0355] [化学式31]

[0356]



流程

[0357] (1)式(S4)的化合物的制造

[0358] 在式(S3)的化合物(594mg,3.00mmol,1当量)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI-HCl,867mg,4.52mmol,1.5当量)和4-二甲基氨基吡啶(DMAP,370mg,3.03mmol,1当量)的二氯甲烷溶液(30mL)中添加4-碘苯胺(1.00g,4.57mmol,1.5当量),将该混合物在室温下搅拌20小时。向该混合物中加入盐酸溶液(1mol/L,20mL)并搅拌后,用氯仿萃取2次。合并的有机相用盐酸溶液和饱和食盐水清洗后,用无水硫酸钠脱水。在减压下从所述有机相蒸馏除去溶剂后,向固体残渣中加入丙酮,加热至70℃使其溶解。将该丙酮溶液冷却后,通过硅胶柱色谱法(正己烷/EtOAc=9/1至6/4)进行纯化,由此得到式(S4)的化合物(1.09g,2.74mmol,收率为91.2%)。

[0359] ^{1}H NMR($CDCl_3$)δ3.98(s,3H),7.40(dd,J_{H-H}=8.0,8.0Hz,1H),7.44-7.47(AA'BB',2H),7.68-7.70(AA'BB',2H),8.12(ddd,J_{H-H}=8.0,2.0Hz,J_{H-F}=8.0Hz 1H),8.34(ddd,J_{H-H}=8.0,2.0Hz,J_{H-F}=8.0Hz 1H),8.41(d,J_{H-F}=15.0Hz,1H);

[0360] ^{19}F NMR($CDCl_3$)δ-112.7(d,JF-H=15.0Hz,1F);

[0361] HRMS(ESI^+)m/z 399.9839(计算出为$C_{10}H_{10}FO_4^+$、399.9840、$[M+H]^+$).

[0362] (2)式(S5)的化合物的制造

[0363] 将式(S4)的化合物(1.09g,2.73mmol,1当量)溶解于二氯甲烷(20mL)、甲醇(5mL)和水(5mL)的混合溶剂中。在该溶液中添加氢氧化钠(3.28g,8.21mmol,30当量),将得到的混合物在室温下搅拌23小时。向该混合物中加入盐酸溶液(1mol/L,100mL),通过减压过滤回收所产生的白色固体,由此得到式(S5)的化合物(980mg,2.54mmol,收率为93.2%)。

[0364] ^{1}H NMR(丙酮-d_6)δ7.44(dd,J_{H-H}=8.0,8.0Hz,1H),7.66-7.74(m,4H),7.96-8.00(m,1H),8.07-8.11(m,1H),9.70(s,1H);

[0365] ^{19}F NMR(丙酮-d_6)δ-113.2(1F);

[0366] HRMS(ESI^-)m/z 383.9540(计算出为$C_{14}H_8FINO_3^-$、383.9538、$[M-H]^-$)

[0367] (3)式(S6)的化合物的制造

[0368] 向式(S5)的化合物(790mg,2.05mmol,1当量)的THF溶液(10mL)中添加亚硫酰氯(1.45mL,20.0mmol,20当量),将得到的混合物加热至80℃,搅拌2小时。冷却至室温,对该混合物进行减压干燥。向得到的残渣中添加THF(10mL)、3-甲基-4-氨基苄腈(397mg,3.00mmol,1.5当量)和N,N-二异丙基乙胺(0.696mL,4.00mmol,2当量),将得到的混合物在室温下搅拌20小时。向该混合物中加入盐酸溶液(1mol/L,10mL)并搅拌后,用乙酸乙酯萃取3次。合并的有机相用盐酸溶液、碳酸氢钠水溶液和饱和食盐水依次清洗后,用无水硫酸钠脱水。在减压下从所述有机相蒸馏除去溶剂后,向固体残渣中加入丙酮,加热至70℃使其溶解。将该丙酮溶液冷却后,加入少量的己烷使固体析出。滤取该固体,由此得到式(S6)的化合物(647mg,1.30mmol,收率为64.8%)。

[0369] ^{1}H NMR(丙酮-d_6)δ2.45(s,3H),7.49(dd,J_{H-H}=8.0,8.0Hz,2H),7.66-7.70(m,4H),7.72-7.75(m,2H),7.92-7.96(m,1H),8.01-8.06(m,1H),8.24(d,J_{H-H}=8.8Hz,1H),9.33(s,1H),9.86(s,1H);

[0370] ^{19}F NMR(丙酮-d_6)δ-116.5(1F);

[0371] HRMS(ESI^-)m/z 498.0122(计算出为$C_{22}H_{14}FIN_3O_2^-$、498.0120、$[M-H]^-$)

[0372] (4)化合物CBT-398的制造

[0373] 在式(S6)的化合物(449mg,0.90mmol,1当量)、乙酸钯(II)(12.5mg,55.7μmol,

0.05当量)和三环己基膦(25.3mg,90.2μmol,0.1当量)的甲苯溶液(9mL)中添加六正丁基锡(1.14mL,2.24mmol,2.5当量),将所得混合物加热至110℃,搅拌24小时。将混合物冷却至室温,加入水(5mL)搅拌后,用乙酸乙酯萃取3次。合并的有机相用饱和食盐水清洗后,用无水硫酸钠脱水。在减压下从所述有机相蒸馏除去溶剂后,将残渣通过硅胶柱色谱法(正己烷/EtOAc=9/1至7/3)进行纯化,由此得到化合物CBT-398(442mg,0.667mmol,收率为74.1%)。

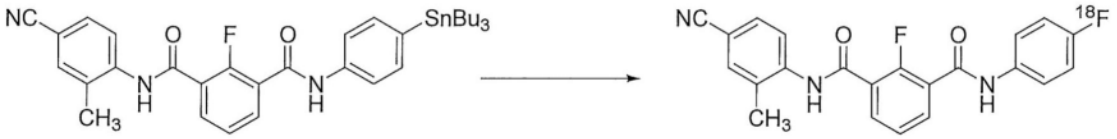
[0374] ^{1}H NMR(丙酮-d_6)δ0.89(t,J_{H-H}=7.6Hz,9H),1.03-1.20(m,6H),1.31-1.40(m,6H),1.59-1.68(m,6H),2.46(s,3H),7.47-7.52(m,3H),7.67-7.70(m,2H),7.78-7.80(AA'BB',2H),7.93-7.97(m,1H),8.02-8.28(m,1H),8.29(d,J_{H-H}=8.4Hz,1H),9.25(d,J_{H-F}=4.8Hz,1H),9.57(s,1H);

[0375] ^{19}F NMR(丙酮-d_6)δ-116.6(1F);

[0376] HRMS(ESI$^-$)m/z 662.2208(计算出为$C_{34}H_{41}FIN_3O_2Sn^-$、662.2210、[M-H]$^-$)

[0377] (5)化合物[^{18}F]CBT-209的制造

[0378] [化学式32]

[0379] 

CBT-398 [^{18}F]CBT-209

[0380] 准备密封小瓶和反应用V形瓶。反应使用经烘箱干燥的器具,在反应开始前一边在150℃下加热反应容器一边反复进行减压、氦气下的加压,由此使流路干燥。

[0381] 在[^{18}F]氟化物离子的制造完成的10分钟前制备化合物CBT-398(5.3mg,8.0μmol)的N,N-二甲基乙酰胺溶液(300μL)和三氟甲磺酸铜(II)(8.7mg,24μmol)、吡啶(9.7μL,120μmol)的N,N-二甲基乙酰胺溶液(300μL)。

[0382] 对[^{18}O]H_2O(2mL,^{18}O:>98atom%,Taiyo Nippon Sanso Corp.,F03-0027)使用住友重机械工业制回旋加速器(CYPRIS HN-12S)照射质子激光(35μA)40分钟,由此合成[^{18}F]氟化物离子(约40GBq)。将合成的[^{18}F]氟化物离子转移到设置在标记用合成装置内部的密闭小瓶内。确认与密闭小瓶邻接的RI检测器的值显示最大值后,用流速为500mL/min的氮气对密闭小瓶进行加压,由此将包含[^{18}F]氟化物离子的[^{18}O]H_2O转移,使其从离子交换树脂(Waters,186004540)中通过,将[^{18}F]氟化物离子捕获。确认与离子交换树脂邻接的RI检测器的值显示最大值后,停止通过氮气进行的加压,将吸附于离子交换树脂的[^{18}F]氟化物离子用含有三氟甲磺酸钾(5mg)、碳酸钾(50μg)的水溶液(500μL)和乙腈(1mL)的混合溶剂洗脱,同时转移至反应用V形瓶内。将洗脱后的[^{18}F]氟化钾溶液在130℃下减压5分钟,蒸馏除去水。向残留的少量溶液中加入乙腈(600μL),在150℃下减压5分钟,将水分共沸。将其再重复一次,在反应用V形瓶内制备无水[^{18}F]氟化钾。

[0383] 在反应用V形瓶内导入化合物CBT-398(5.3mg,8.0μmol)的N,N-二甲基乙酰胺溶液(300μL),接着导入三氟甲磺酸铜(II)(8.7mg,24μmol)、吡啶(9.7μL,120μmol)的N,N-二甲基乙酰胺溶液(300μL),在140℃下加热30分钟。将V形瓶冷却至室温后,将乙腈(500μL)和水(500μL)的混合溶剂导入V形瓶内,将得到的混合物用膜过滤器(PVDF制、0.2μm、直径为13mm、GE Helthcare Life Science,6779-1302)过滤后,导入半制备HPLC。参照HPLC附带的

UV传感器、RI检测器,分取含有化合物[^{18}F]CBT-209的级分。将该级分转移至安置在设置于热单元内的蒸发器上的烧瓶中,在减压下加热并减压蒸馏除去3分钟。在烧瓶内达到常温常压后,将给药用稀释溶液(生理盐水:丙二醇:Tween80=100:10:1,0.7mL)导入烧瓶内,旋转搅拌40秒。使得到的溶液透过膜过滤器(PVDF制、0.45μm、直径为33mm、Merck、SLHV033NB)并转移到给药瓶中,由此获得化合物[^{18}F]CBT-209的溶液。

[0384] 得到的化合物[^{18}F]CBT-209的溶液的总辐射能量用放射线剂量校准器(CAPINTEC,Inc.,5130-3235)测定。另外,纯度检测使用具备UV检测器和RI检测器的HPLC进行。此外,将得到的溶液的密度记为1g/mL,根据HPLC中的化合物[^{18}F]CBT-209的UV吸收量计算其浓度,计算与总辐射能量之比,由此计算出非辐射能。以下示出半制备、纯度检测中的HPLC的详细的分析条件及其结果的例子。

[0385] [半制备HPLC的条件]

[0386] 柱:将COSMOSIL 5C18-MS-II(Nacalai Tesque)10×20mm和10×250mm连接后使用;

[0387] 流速:5mL/分钟;流动相:乙腈/H_2O=48:52;

[0388] UV检测波长:254nm;保留时间:24.9分钟

[0389] [分析HPLC的条件]

[0390] 柱:COSMOSIL 5C18-MS-II(Nacalai Tesque)4.6×150mm;

[0391] 流速:1mL/分钟;流动相:乙腈/H_2O=50:50

[0392] UV检测波长:254nm;保留时间:7.3分钟

[0393] [[^{18}F]CBT-209溶液的分析结果([^{18}F]氟化物离子合成后经过89分钟时的数据)]

[0394] 总辐射能:2190MB1;比辐射能:50.0GBq/μmol;溶液的体积:3.8mL;

[0395] [^{18}F]CBT-209的重量浓度:4.50μg/mL;化学纯度:>99.9%;辐射化学纯度:>99.9%

[0396] <小鼠PET成像>

[0397] 作为没有HBV感染性的模型动物,制作衣壳强制表达模型小鼠以供实验。将仅编码衣壳蛋白HBcAg的质粒pCI-HBc 40μg溶解于每个小鼠个体体重的1/10量+100μL的PBS溶液中(例如如果小鼠体重为20g则合计为2.1mL),通过水流动力学注射法给药至6周龄雄性的BALB/c小鼠,由此制作衣壳强制表达模型小鼠。在PBS溶液给药的约24小时后,在小动物用PET装置(Siemens公司、microPET Focus 220)的摄像床上在异氟烷1.5%吸入麻醉下保持,将化合物[^{18}F]CBT-078制成50MBq/0.03nmol/100μL生理盐水(含有1%Tween80)、或将化合物[^{18}F]CBT-209制成20MBq/0.01nmol/PBS100μL生理盐水(含有1%Tween80)尾静脉给药。与给药同时开始摄像,进行90分钟的数据收集后,暂时唤醒,从给药3小时后起30分钟,再次在异氟烷1.5%吸入麻醉下实施PET摄像。将收集数据转换成动态正弦图之后,通过使用了奈奎斯特频率下的Ramp滤波器截止频率的滤波反投影法重构为三维动态图像。将每30分钟的数据作为整合后的最大密度投影图像(MIP图像)显示在结果中。将得到的结果示于图1。

[0398] 由图1确认到,由于生物体内稳定性提高,化合物[^{18}F]CBT-078时可见的基于F^-的骨集积在化合物[^{18}F]CBT-209的情况下显著降低,肝集积的滞留性提高。另一方面,在化合物[^{18}F]CBT-209的情况下,与化合物[^{18}F]CBT-078相比,还确认到脂肪组织等全身分布的变化,启示蓄积脂肪且通过除法效果体内动态提高。

[0399] 使用肝微粒体,进行化合物CBT-078和化合物CBT-209各自的代谢稳定性试验。操

作如下。

[0400] 向由100mM磷酸缓冲液(pH为7.4)422.5μL、300mM氯化镁溶液5μL及20mg/mL肝微粒体(人、小鼠、大鼠、均为Zeno Tech公司制)12.5μL构成的微粒体反应液中添加50μM的CBT-078或CBT-209 10μL,进行15分钟的预孵育。向其中加入50μL的NADPH再生系统(85mM D-葡萄糖-6-磷酸、10mMβ-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化型、10∪/mL葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、均为Oriental酵母工业公司制)并混合,开始孵育。将孵育开始时间点记为反应0分钟,将反应0、30、60分钟后的反应液50μL分取到经冰冷却的0.5μM普萘洛尔/乙腈溶液200μL中,使反应停止。将得到的分取液移至蛋白除去板(Phenomenex公司制),用96孔板用歧管进行吸引过滤后,将滤液回收到回收用的96孔板中。将回收后的滤液100μL移至96孔板,用氮吹高速浓缩仪(Turbo Vap96,Biotage公司制)干固。对干固后的试样加入初始流动相进行溶解后,通过液相色谱-串联质谱分析法(LC-MS/MS)进行目标化合物的定量。计算出试样中的CBT-078或CBT-209与普萘洛尔(内标)的峰面积值比,通过"残留率(%)=(孵育30分钟或60分钟的峰面积值比/孵育0分钟的峰面积值比)×100"来评价代谢稳定性。作为计数重复(Technical Replicate),各动物种类、每个评价化合物按独立的2个系列计算残留率。

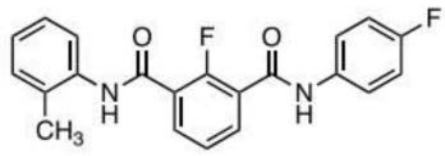
[0401] LC-MS/MS的构成如下。使用高效液相色谱:Nexera X2 UPLC系统(Shimadzu公司制)、柱:ACQUITY UPLC BEH C18 Column、130A、1.7μm、2.1××50mm(Waters公司制)、保护柱:ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard Column、130A、1.7μm、2.1××50mm(Waters公司制)、流动相A:0.1%甲酸水溶液/乙腈(9:1、v/v)、流动相B:0.1%甲酸水溶液/乙腈(1:9、v/v)、梯度条件0-1分钟;30%B、1-1.5分钟;30-100%B、1.5-3.5分钟;100%B、3.5-5分钟;30%B、质谱分析器:QTRAP4500(AB Sciex公司制),测定对象化合物通过ESI法离子化,通过多反应监测技术(Multiple reaction monitoring)进行对象离子的测定。将得到的结果示于表5。

[0402] [表5]

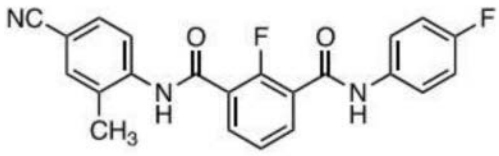
[0403]

使用了肝微粒体的化合物 CBT-078的代谢稳定性试验			
	0分钟	30分钟	60分钟
人	100%	77%	60%
	100%	77%	58%
大鼠	100%	53%	35%
	100%	52%	34%
小鼠	100%	6%	0%
	100%	6%	0%

使用了肝微粒体的化合物 CBT-209的代谢稳定性试验			
	0分钟	30分钟	60分钟
人	100%	91%	84%
	100%	97%	86%
大鼠	100%	87%	73%
	100%	77%	63%
小鼠	100%	88%	70%
	100%	81%	72%



CBT-078



CBT-209

[0404] 由表5确认了,与化合物CBT-078相比,在化合物CBT-209的情况下,肝集积后的代谢稳定性提高。

[0405] <HBsAg、HBeAg、pgRNA的抑制效果>

[0406] 用0.01～100mM的化合物CBT-289或恩替卡韦(Entecavir,ETV)处理感染了HBV的

原代培养人肝细胞,测定培养基中HBsAg、HBeAg量和细胞内的pgRNA量。将其结果示于图2。

[0407] 如图2所示,化合物CBT-289浓度依赖性地抑制HBsAg、HBeAg、pgRNA。另一方面,ETV不抑制。

[0408] <cccDNA、pgRNA的抑制效果>

[0409] cccDNA的抑制效果测定法

[0410] 以0.7×10^5细胞/孔的密度将PXB小鼠来源的新鲜人肝细胞(PXB细胞;Phoenixbio公司制)散布在经胶原涂布的96孔板(FALCON公司制)上,在37℃、5%CO_2的条件下使用dHCGM培养基(自制)培养7天。将基因型C的HBV(Phoenixbio公司制)与4%PEG8000一起加入到培养液中,使其最终达到3.5×10^5拷贝数/孔,1天后更换培养基,其后也每隔3或4天进行更换,28天后加入待测化合物,每1个条件培养3孔细胞。其后也利用含有待测化合物的培养基在3或4天后进行更换,7天后,使用Agencourt DNAdvance(Beckman-Coulter公司制)从细胞中提取、纯化DNA,与DNA溶液(2μL)和Probe qPCR(TAKARA公司制)(5μL)、100μM引物(0.02μL)(ccc DNA Fr:GTGGCTATCCTGCCTTAAT(序列号9)、cccDNA Rv:CAGAGCTGAGGCGGTGTC(序列号10))、100μM探针(0.01μL)(ccc DNA:[FAM]AGTTGGCGAGAAAGTGAAAGCCTGC[TAM](序列号11))混合,在95℃下进行qPCR的反应1分钟,其后进行50个循环的"95℃10秒,接着60℃30秒的循环",使用CFX96 Touch实时PCR检测系统(Bio-rad公司制)检测信号,对HBV DNA量(HBV基因拷贝数)进行定量。

[0411] pgRNA的抑制效果测定法

[0412] 以0.7×10^5细胞/孔的密度将PXB小鼠来源的新鲜人肝细胞(PXB细胞;Phoenixbio公司制)散布在经胶原涂布的96孔板(FALCON公司制)上,在37℃、5%CO_2的条件下使用dHCGM培养基(自制)培养7天。将基因型D的HBV(Hep2.2.15.7细胞来源的自制)与4%PEG8000一起加入到培养液中,使其最终达到3×10^7拷贝数/孔,1天后更换培养基,其后也每隔3或4天进行更换,28天后加入待测化合物,每1个条件培养3孔细胞。其后也利用含有待测化合物的培养基在3或4天后进行更换,7天后,使用A gencourt RNAdvance(Beckman-Coulter公司制)从细胞中提取、纯化总R NA,使用PrimeScript RT ragent试剂盒(Perfect Real Time)进行逆转录,与cDNA溶液(2μL)和TB Green Premix Ex Taq II(TIi RNaseH Plus)(TAKARA公司制)(5μL)、100μM引物(0.02μL)(pg RNA Fr:CT CAATCTCGGGAATCTCAATGT(序列号4)、pgRNA Rv:GGATAGA ACCTAGCAGGCATAAT(序列号5))混合,在95℃下进行qPCR的反应1分钟、其后进行50个循环的"95℃10秒、接着60℃30秒",使用CFX96Touch实时PCR检测系统(Bio-rad公司制)检测信号,对pgRNA量(pg RNA拷贝数)进行定量。将其结果示于图3。

[0413] 如图3所示,化合物CBT-289浓度依赖性地抑制cccDNA、pgRNA。

[0414] <使用乙型肝炎病毒感染人肝细胞嵌合小鼠的化合物CBT-209的抗HBV活性测定实验>

[0415] 使人肝细胞移植嵌合小鼠(PXB小鼠<http://phoenixbio.co.jp/pxb/pxb-mouse.html>;Phoenixbio公司制)每1只感染1×10^7拷贝数的基因型C的HBV(Phoenixbio公司制),使病毒充分增殖达到1×10^8拷贝数/ml血清后,经口给药10mg/kg的化合物CBT-209(溶剂为玉米油),21天中1天2次(每1组的小鼠数量为5只)。在给药开始的第0、7、14、21天从小鼠采集血液,测定血清的HBV DNA量。

[0416] 将血清与血清中的HBV DNA用HBV预处理溶液混合,在98℃下实施5分钟的加热处

理,使HBV失活,并且使HBV DNA露出。PCR反应和解析使用KUBIX HBV qPCR Kit(株式会社KUBIX)和CFX96 Touch(注册商标)实时PCR检测系统(Bio-Rad Laboratories,Inc.,Hercules,CA,USA)。将10μL的HBV 2×PCR溶液(正向引物:CACATCAGGAT TCCTAGGACC(序列号6),反向引物:AGGTTGGTGAGTGATTGGAG(序列号7),探针:CAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC(序列号8))与10μL的加热处理过的标准品或待测试样混合。PCR反应在95℃进行2分钟、之后进行45个循环的"95℃5秒、接着54℃30秒的循环"。血中HBV DNA浓度通过2孔的平均计算。统计计算使用Excel在双尾t检验(Two-tailed t-test)条件下进行。作为对照,给药GLS4或载体以代替化合物CBT-209。将得到的结果示于图4。

[0417] 如图4所示,确认了在给药了化合物CBT-209的、感染了乙型肝炎病毒的人肝细胞嵌合小鼠中,HBV DNA量与GLS4或载体相比统计学上显著地减少。

[0418] <对现有衣壳形成抑制剂体制突变HBc T33N的抑制效果>

[0419] 使用WO2018/30534号"乙型肝炎治疗用组合物及乙型肝炎病毒的复制活性的评价方法"中记载的评价方法、"HBV复制分析",评价化合物的HBV复制抑制活性。通过使用Nepagene公司制Nepa21的电穿孔法,向HeLa细胞中导入报告pgRNA、HBc、HBV-pol及HBx的表达质粒。HBc表达质粒除了野生型(WT)以外,还使用导入了对现有的衣壳抑制剂显示抗性的突变的HBc P25G和HBc T33N表达质粒。在预先添加有经阶段稀释的化合物的板中添加细胞进行培养。培养24小时后用低调液处理细胞,提取细胞质内的DNA,通过使用特异性引物的qPCR测定HBV复制。将得到的HBV复制分析结果(IC_{50})示于表6,将WST-8分析的结果(IC_{25})示于表7。

[0420] [表6]

[0421]

	WT	HBc P25	HBc T33N
CBT-209	0.051	0.433	8.961
CBT-078	0.076	0.530	12.707
GLS4	0.121	0.963	13.179

[0422] [表7]

[0423]

	WT	HBc P25	HBc T33N
CBT-209	＞20.000	＞20.000	＞20.000
CBT-078	＞20.000	＞20.000	＞20.000
GLS4	＞20.000	＞20.000	＞20.000

[0424] 如表6所示,确认了化合物CBT-209与以往的GLS4、化合物CBT-078相比显示出强的抑制活性。另外,如表7所示,确认了化合物CBT-209与以往的GLS4、化合物CBT-078同样,不显示毒性。

[0425] <利用电子显微镜进行的衣壳形成抑制机制的解析>

[0426] 制作在基因型C的HBc的缔合区(1-149)的序列中融合有泛素样蛋白SUMO作为标签的表达质粒,导入到大肠杆菌KRX株中,使重组蛋白表达、纯化。将该重组HBc(1-149)用SUMO蛋白酶切断除去标签后,通过凝胶过滤分取二倍体峰,用于以后的分析。在20mM Tris-HCl(pH为7.5)、100mM NaCl溶液中混合HBc(1-149)11μM和CBT化合物15μM,4℃下孵育过夜后,使用Superose6 10/30GL通过凝胶过滤研究缔合状态。将得到的结果示于图5。

[0427] 在未加入化合物的状态下,HBc(1-149)在相当于二倍体的位置处洗脱,但当添加

化合物CBT-209或化合物CBT-213时,洗脱峰移至相当于衣壳的位置。这是与化合物CBT-078相同的行为。此外,将与化合物的孵育时间延长至7天,在添加有化合物CBT-209或化合物CBT-213的情况下,与孵育过夜的情况同样地仅在衣壳位置处观察到洗脱峰。分取相当于衣壳的位置的洗脱峰,用电子显微镜拍摄负染色图像,结果在添加有化合物CBT-209、化合物CBT-213中的任一者的情况下,均观察到接近于不添加化合物而提高HBc浓度或盐浓度时形成的完整的衣壳的粒径的图像。即,由化合物CBT-209和化合物CBT-213形成的衣壳即使孵育7天也是稳定的。

[0428] 由图5可知,化合物CBT-209和化合物CBT-213与HBc彼此的缔合面结合而促进HBc的缔合,以稳定的状态形成中空的衣壳。另外确认了,化合物CBT-209和化合物CBT-213即使对以往的具有卡壳形成抑制剂抗性突变即HBc T33N突变的病毒也发挥抗病毒活性。

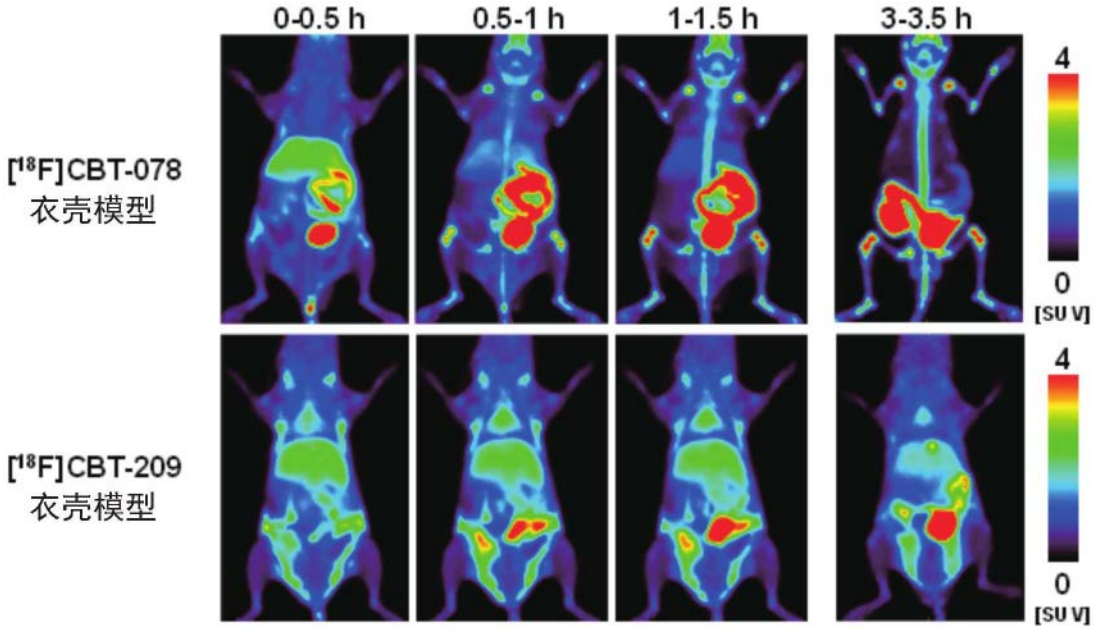

0-0.5 h
0.5-1 h
1-1.5 h
3-3.5 h
[18F]CBT-078
衣壳模型
[18F]CBT-209
衣壳模型
4
0
[SUV]
4
0
[SUV]

图1

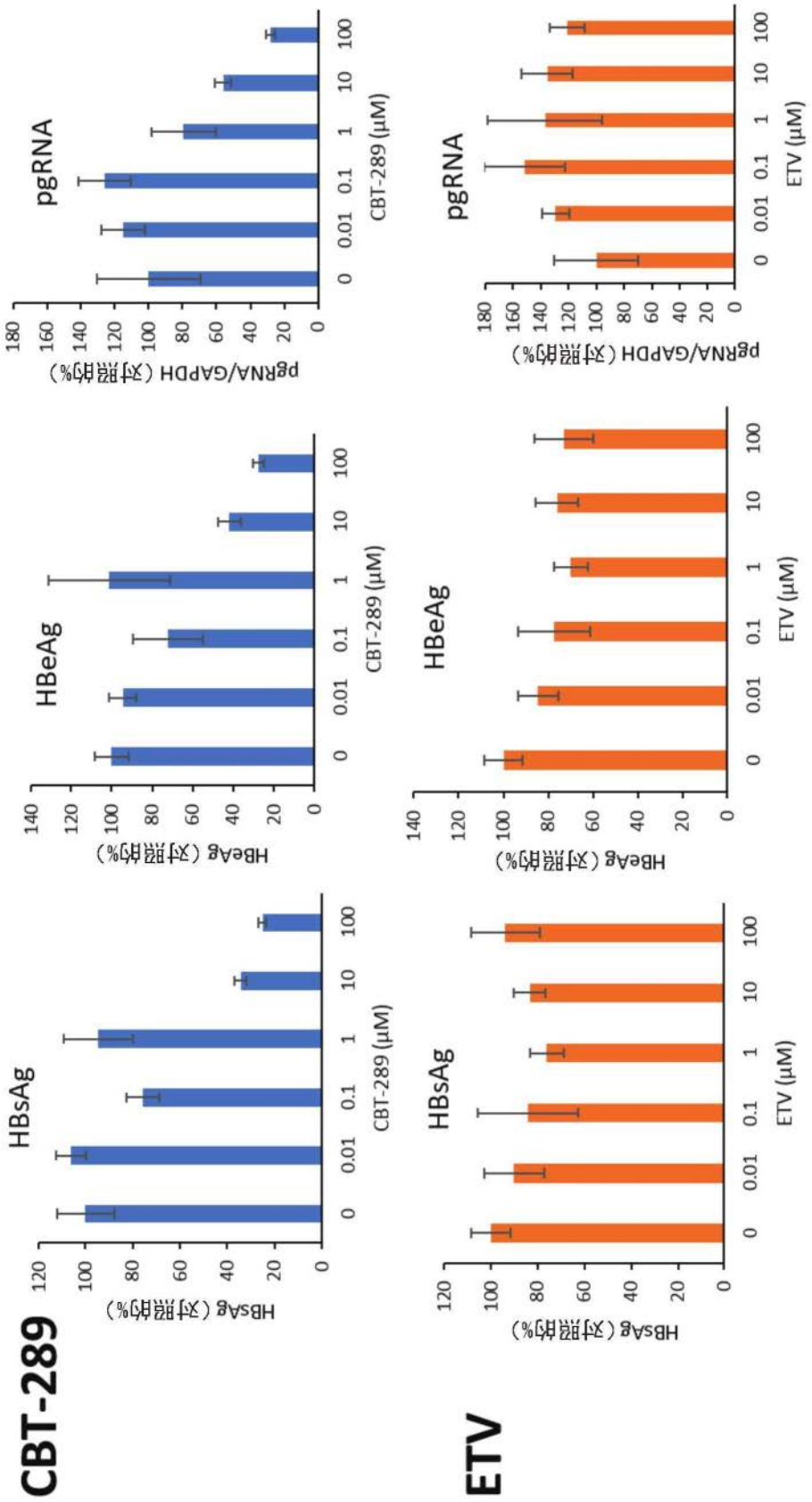

CBT-289
ETV
pgRNA
HBeAg
HBsAg
pgRNA/GAPDH (对照的%)
HBeAg (对照的%)
HBsAg (对照的%)
CBT-289 (μM)
ETV (μM)
0
0.01
0.1
1
10
100
20
40
60
80
120
140
160
180

图2

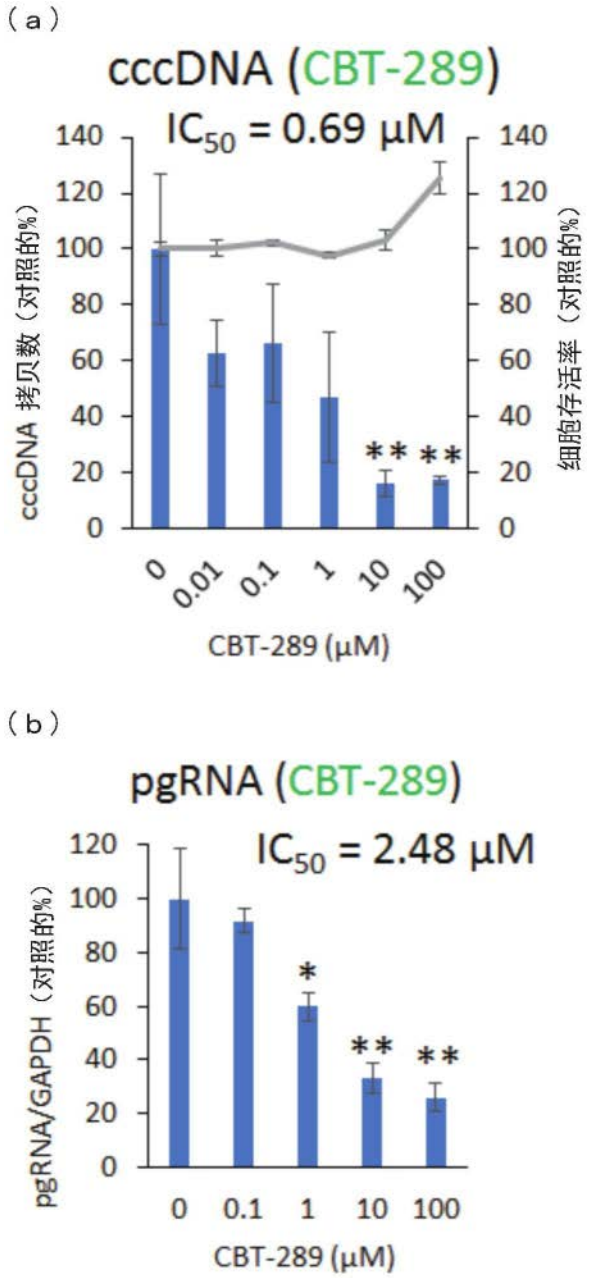

(a)
cccDNA (CBT-289)
IC50 = 0.69 μM
cccDNA 拷贝数（对照的%）
细胞存活率（对照的%）
0
20
40
60
80
100
120
140
**
**
0
0.01
0.1
1
10
100
CBT-289 (μM)
(b)
pgRNA (CBT-289)
IC50 = 2.48 μM
pgRNA/GAPDH（对照的%）
0
20
40
60
80
100
120
*
**
**
0
0.1
1
10
100
CBT-289 (μM)

图3

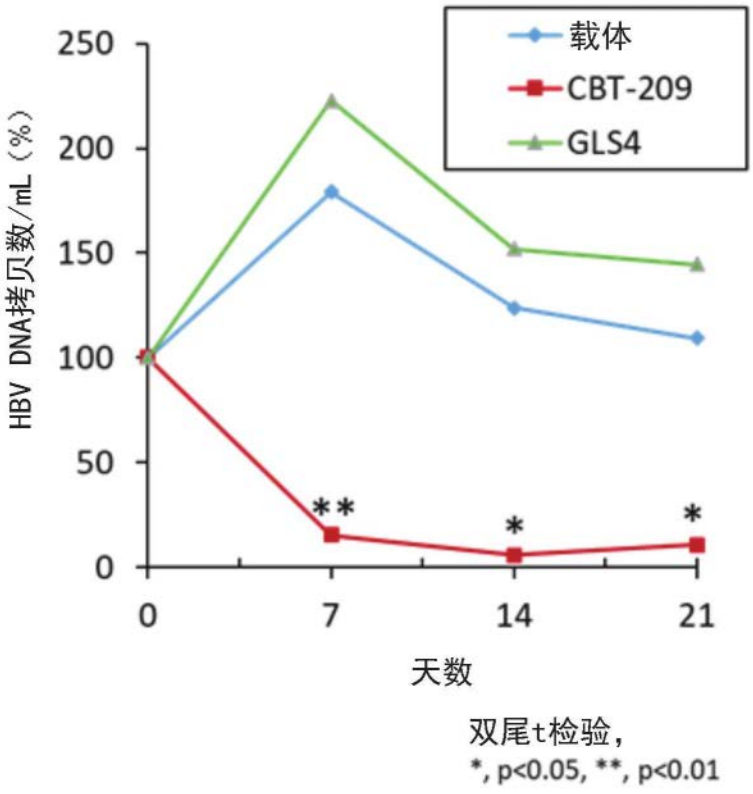

载体
CBT-209
GLS4
HBV DNA拷贝数/mL（%）
250
200
150
100
50
0
0
7
14
21
天数
**
*
*
双尾t检验，
*, p<0.05, **, p<0.01

图4

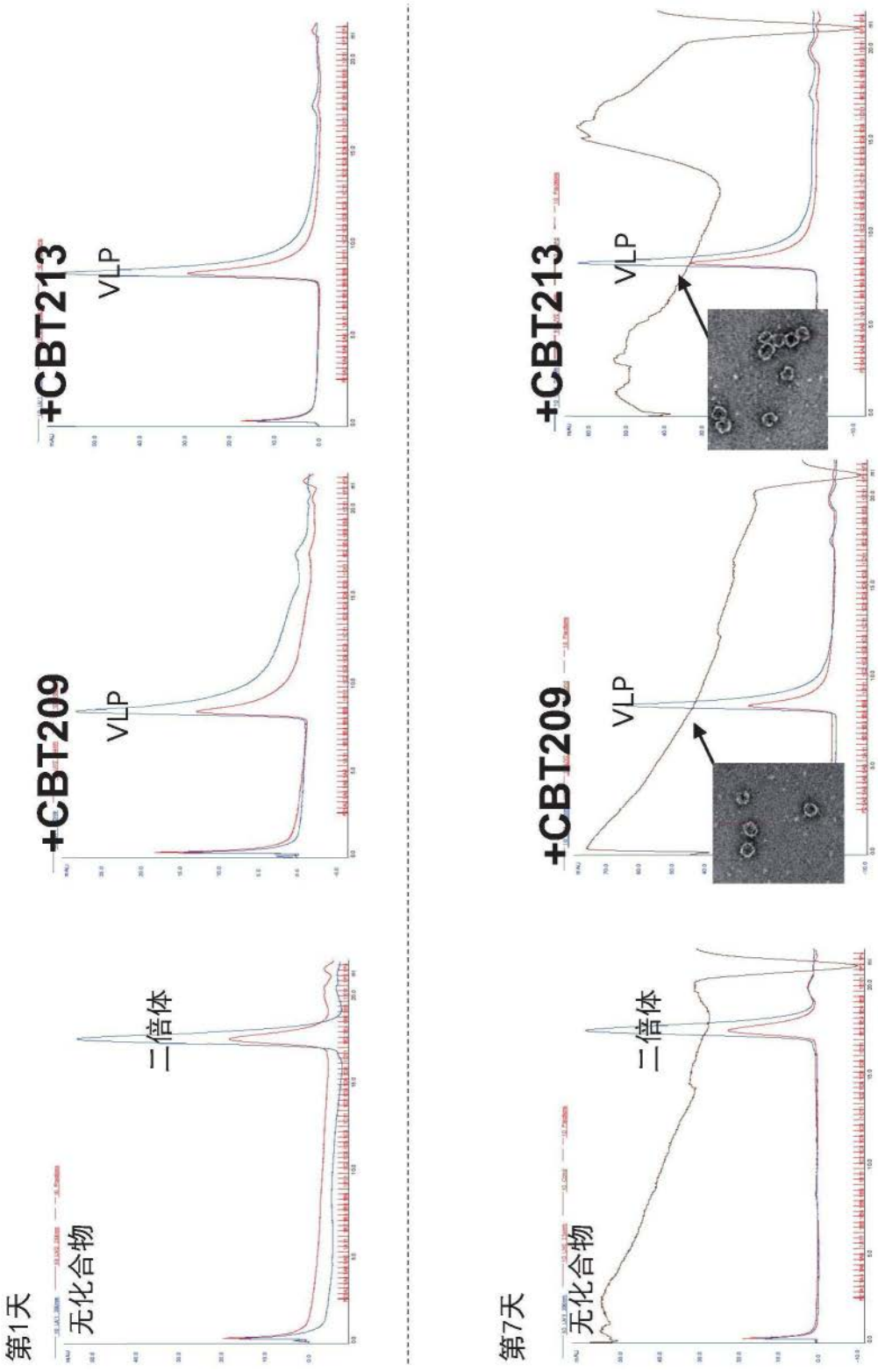

第1天
无化合物
二倍体
+CBT209
VLP
+CBT213
VLP
第7天
无化合物
二倍体
+CBT209
VLP
+CBT213
VLP

图5