(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월07일
(11) 등록번호 10-1945578
(24) 등록일자 2019년01월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/12 (2006.01) *A61K 31/404* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7036640
(22) 출원일자(국제) 2013년05월31일
심사청구일자 2017년02월10일
(85) 번역문제출일자 2014년12월29일
(65) 공개번호 10-2015-0022911
(43) 공개일자 2015년03월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/043691
(87) 국제공개번호 WO 2013/181584
국제공개일자 2013년12월05일
(30) 우선권주장
61/654,374 2012년06월01일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Gastroenterology. Vol. 130, No. 3, pp. 823-837 (2006)*
Angewandte Chemie International Edition. Vol. 48, No. 26, pp. 4718-4724 (2009)
Journal of Medicinal Cehmistry. Vol. 52, No. , pp. 7836-7846 (2009)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
드렉셀유니버시티
미국 펜실베니아주 19104 필라델피아 체스트넛 스트리트 3141
바루쉬 에스. 블럼버그 인스티튜트
미국 18902 펜실베니아주 도일스타운 올드 이스턴 로드 3805
(72) 발명자
구오, 주-타오
미국 19446 펜실베니아주 랜스데일 옥스포드 서클 1426
장, 진홍
미국 18914 펜실베니아주 샬폰트 바버리 코트 101
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

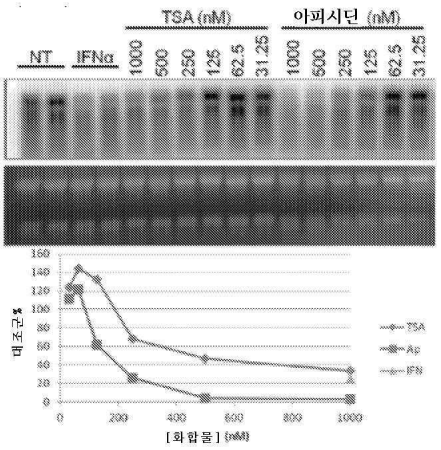
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 **B형 간염 바이러스 CCCDNA 전사의 조절**

(57) 요 약

본 개시내용은 만성 B형 간염 바이러스(HBV)의 관리에서 치료제로서 사용을 위한 "계열최초(first in class)" HBV 공유결합 폐환형(ccc) DNA의 소분자 저해제의 신규한 패밀리의 발견에 관한 것이다. cccDNA의 후성적 변형, 히스톤 변형제, 및 결국 HBV cccDNA를 조절하는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제를 제공하는 작용제가 제공되는데, 이는 결코 약학적 작용제에 의해 달성된 적이 없었다. 또한 HBV cccDNA를 조절하는 방법, 대상체에서 HBV를 치료하거나 또는 예방하는 방법, 및 대상체에서 B형 간염의 cccDNA 전사를 조절하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

블록, 티모씨 엠.

미국 18902 펜실베니아주 도일스타운 폭스크로프트 드라이브 90

킨니, 윌리엄 에이.

미국 18940 펜실베니아주 뉴타운 톰슨 밀 로드 16

아몬드, 해럴드, 알.

미국 19002 펜실베니아주 메이플 글렌 하노버 플레이스 1330

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

트리코스타틴 A, 수베로일 비스 하이드록삼산, 4-(다이메틸아미노)-N-[7-(하이드록시아미노)-7-옥소헵틸] 벤즈아마이드, 또는 아피시딘, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염인 클래스 I 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제를 포함하는, 대상체에서 B형 간염 바이러스의 공유 결합 폐환형 DNA(cccDNA) 전사를 저해하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 치료적 유효량의 추가의 항-B형 간염 감염 작용제를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 15

트리코스타틴 A, 수베로일 비스 하이드록삼산, 4-(다이메틸아미노)-N-[7-(하이드록시아미노)-7-옥소헵틸] 벤즈아마이드, 또는 아피시딘, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염인 클래스 I 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제를 포함하는, 대상체에서 B형 간염을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 치료적 유효량의 추가의 항-B형 간염 감염 작용제를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 17

트리코스타틴 A, 수베로일 비스 하이드록삼산, 4-(다이메틸아미노)-N-[7-(하이드록시아미노)-7-옥소헵틸] 벤즈아마이드, 또는 아피시딘, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염인 클래스 I 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제를 포함하는, B형 간염 바이러스의 공유 결합 폐환형 DNA(cccDNA)를 억제하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 추가의 항-B형 간염 감염 작용제를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련출원과의 상호참조**

[0002] 본 출원은 2012년 6월 1일 출원된 미국 가출원 특허 제61/654,374호에 대한 우선권을 주장하며, 이 기초출원의 전문은 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 개시내용은 B형 간염 바이러스의 공유결합 폐환형 DNA(covalently closed circular DNA)를 조절하기 위한, 그리고 B형 간염을 예방하거나 또는 치료하기 위한 바람직하게는 히스톤 데아세틸라제 활성을 지니는 약학적 작용제(agent)의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 현재 만성 B형 간염의 관리를 위해 미국 식품 의약국(United States Food & Drug Administration: FDA)에 의해 승인된 7가지 의약품이 있는데, 이들은 2가지 범주, 즉, 인터페론(interferon: IFN) 및 폴리머라제 저해제 중 하나에 속한다(*Lok, A. S., and B. J. McMahon. 2007. Chronic Hepatitis B. Hepatology 45:507-539*). 이들은 3억 5천만명 이상의 감염 집단의 대략 50% 이하에서 사용이 권고된다. 이들은 가장 높은 위험 집단이지만, 치료 가이드라인 밖에 속하는 자들은 또한 상당히 상승된 간 질병의 위험에 있기 때문에, 개입으로부터 이익을 얻을 수 있다. IFN은 상당한 부작용에 의해 제한된다. pol 저해제는 동일한 바이러스 라이프사이클 단계를 표적화하며, 따라서 병용요법, 즉, HIV의 방어물과 치유 HCV 요법은 제한된 가치를 가진다. 그것들은 평생 사용을 필요로 하며, HIV 장기간의 의약 사용 및 약물 내성 돌연변이체의 발생에 의해 알 수 있는 바와 같은 독성을 제한하여 최후로 사용하게 된다. 따라서, 의약품의 현재 포트폴리오에 대한 대안 및 보완물이 필요하다.

[0006] HBV의 "치유" 또는 적어도 지속된 약물 제어는 바이러스 핵 게놈인 공유결합 폐환형 DNA(cccDNA)를 제어하는 약물을 필요로 하거나 또는 이 약물로부터 적어도 이익을 얻을 것이라는 믿음이 커지고 있다. 2006 NIDDK 간 작용계획(Liver Action Plan)은 2010년 의학연구 보고서(Institute of Medicine report)에 의해 강화되었으며, 이들 모두는 HBV 약물 개발에 우선하여 cccDNA 저해를 요청한다.

[0007] 그러나, HBV cccDNA 저해제에 대한 선별은, HBV cccDNA가 적은 양으로 편리하게 검출되도록 만들어지고, 배양물에서 통상적으로 형질감염된 세포 내 대부분의 바이러스 유전자 산물은 cccDNA가 아닌 바이러스 게놈의 이식유전자로부터 유래된다는 기술적 이유 때문에 어려웠다. 본 발명자는 창조(created) 세포주를 가지는데, 이때 HBV 유전자 산물, 예컨대 HBeAg는 cccDNA로부터만 생기며, 통합 바이러스 이식유전자로부터는 생기지 않으며, 강하게 검출되는 양으로 생기는데, 이는 선별을 현실적으로 만든다(*Cai, D., et al., 2012. Identification of the Disubstituted Sulfonamide Compounds as Specific Inhibitors of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Formation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy: In Press; Zhou, T., et al., 2006. Hepatitis B virus e antigen production is dependent upon covalently closed circular (ccc) DNA in HepAD38 cell cultures and may serve as a cccDNA surrogate in antiviral screening assays. Antiviral Research 72:116-124*).

[0008] 이러한 도전을 고려하면, HBV cccDNA를 표적화하는 용도의 HBV 치료제가 없다는 것은 놀랍지 않으며, 만약에 있다고 해도, cccDNA 저해제를 선별하고 개발하는 프로그램은 거의 없었다. 이는 주로 기술적 어려움에 기인한다(문헌[*Block, T. M., et al. 2003. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. Oncogene 22:5093-5107; Locarnini, S. 2005. Therapies for hepatitis B: where to from here? Gastroenterology 128:789-792; Lok, A. S. 2011. Does antiviral therapy for hepatitis B and C prevent hepatocellular carcinoma? J Gastroenterol Hepatol 26:221-227*]). 추가로, HBV cccDNA 전사 및 안정성을 조절함에 있어 숙주 기능의 역할은 부족하게 이해되어 치료제의 추가적인 개발을 좌절시킨다. 따라서, 이 영역에서의 임의의 작업은 획기적이며, B형 간염 및 다른 것의 바이러스 핵 게놈을 제어하는 약물에 대한 미해결된, 오랫동안 느꼈던 필요를 처리하고, 다르게는 HBV 감염에 대한 치료를 제공한다.

발명의 내용

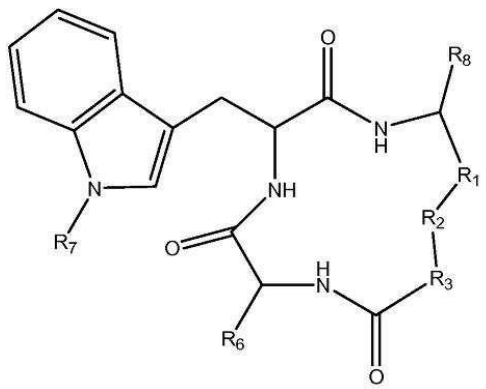
[0009] cccDNA의 후성적 변형을 제공하는 작용제, 히스톤 변형제 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 B형 간염의 cccDNA 전사를 조절하는 방법이 제공된다. 예를 들어, 후성적 변형제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제와 같은 소분자는 약학적일 수 있다.

[0010] 또한 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 B형 간염을 치료하는 방법이 제공된다.

[0011] 본 개시내용은 또한 B형 간염 바이러스를 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제와 접촉시키는 단계를 포함하는, B형 간염 바이러스의 공유결합 폐환형 DNA를 조절하는 방법에 관한 것이다.

[0012] 또한 하기 화학식 II의 화합물이 개시된다:

[0013] [화학식 II]



[0014]

[0015] 식 중, R_1 내지 R_8은 본 명세서에 제공된 바와 같이 정의된다.

도면의 간단한 설명

[0016] **도 1**은 HBV cccDNA가 dstet5 세포에서 효율적으로 형성되고 전사적으로 활성이라는 것을 입증하는 데이터를 제공하는 도면.

도 2는 cccDNA가 IFN-a에 의해 저해될 수 있다는 것을 입증하는 실험에 관한 도면.

도 3은 아피시딘(Apicidin) 및 TSA가 cccDNA 전사를 억제한다는 현재의 발견에 관한 도면.

도 4는 HDAC 저해제가 숙주 세포 염색체에서 통합된 이식유전자로부터의 DHBV pgRNA 합성을 용량-의존적으로 자극한다는 발견에 관한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은, 본 개시내용의 일 부분을 형성하는, 첨부된 도면 및 실시예와 관련하여 취해진 다음의 상세한 설명을 참조로 하여 더 용이하게 이해될 수 있다. 본 발명은 본 명세서에 기재되고/되거나 나타낸 구체적 생성물, 방법, 조건 또는 파라미터로 제한되지 않으며, 본 명세서에 사용된 용어는 단지 예시의 방법에 의해 특정 실시형태를 설명하는 목적을 위한 것일 뿐, 청구된 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0018] 본 문헌에 인용되거나 또는 기재된 각각의 특허, 특허 출원 및 간행물의 개시내용은 그의 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0019] 상기 및 본 개시내용 전체적으로 사용한 바와 같이, 달리 표시되지 않는다면, 다음의 용어 및 약어는 다음의 의미를 갖는 것으로 이해될 것이다.

[0020] 본 개시내용에서, 단수 용어는 복수의 언급을 포함하며, 특정 수치 값에 대한 언급은 문맥에서 달리 명확하게 표시되지 않는다면 적어도 해당되는 특정 값을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "화합물"에 대한 언급은 당업자에게 공지된 이러한 화합물 및 이들의 동등물 중 하나 이상에 대한 언급 등이다. 더 나아가, 특정 화학적 모이어티가 X, Y 또는 Z"일 수 있다"는 것을 나타낼 때, 이러한 어구에 의해 모든 예에서 모이어티에 대한 다른 선택을 제외하는 것으로 의도되지 않으며; 예를 들어, R_1이 "알킬, 아릴 또는 아미노일 수 있다"는 효과에 대한 언급은 할로, 아르알킬 등과 같은 R_1에 대한 다른 선택을 필수적으로 제외하지 않는다.

[0021] 값이 근사값으로서 표현될 때, 선행하는 "약"의 사용에 의해, 특정 값은 다른 실시형태를 형성하는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "약 X"(여기서 X는 수치적 값임)는 바람직하게는 인용된 값의 +10%와 -10%의 값을 포함하여, ±10%의 값을 지칭한다. 예를 들어, 어구 "약 8"은 7.2와 8.8을 포함하여, 7.2 내지 8.8의 값을 지칭하며; 다른 예로서, 어구 "약 8%"는 7.2%와 8.8%의 값을 포함하여 7.2% 내지 8.8%의 값을 지칭한다. 존재한다면, 모든 범위는 포괄적이며, 조합적이다. 예를 들어, "1 내지 5"의 범위가 인용될 때, 인용된 범위는 "1 내지 4", "1 내지 3", "1 내지 2", "1 내지 2 및 4 내지 5", "1 내지 3 및 5" 등의 범위를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 추가로, 대안의 열거가 긍정적으로 제공될 때, 이러한 열거는, 예를 들어 특허청구범위에서 부정적 제한에 의해 임의의 대안이 제외될 수 있다는 의미로 해석될 수 있다. 예를 들어, "1 내지 5"의 범위가 인용될 때, 인용된 범위는 1, 2, 3, 4 또는 5 중 어떤 것이 부정적으로 제외되는 것에 의한 상황을 포함하는 것으로 해석될 수 있고; 따라서, "1 내지 5"의 인용은 "1 및 3 내지 5, 그러나 2는 제외", 또는 단순히 "2는 포함되지 않음"으로서 해석될 수 있다. 다른 예에서, "수소, 알킬 및 아릴" 또는 "수소, 알킬, 또는 아릴"을 포함하는 가능한 치환체의 열거가 제공될 때, 인용된 열거는 "수소, 알킬, 및 아릴" 또는 "수소, 알킬, 또는 아릴" 중 어떤 것에 의한 상황을 포함하는 것으로 해석될 수 있고; 따라서, "수소, 알킬, 및 아릴" 또는 "수소, 알킬, 및 아릴"의 열거는 "수소 및/또는 아릴, 그러나 알킬은 제외", 또는 단순히 "치환체는 알킬이 아님"으로서 해석될 수 있다.

[0022] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "구성성분", "화합물의 조성물", "화합물", "약물", "약학적 활성제", "활성제", "치료적", "요법", "치료" 또는 "의약"은 대상체(인간 또는 동물)에 투여될 때, 국소 및/또는 전신 작용에 의해 원하는 약학적 및/또는 생리학적 효과를 유발하는 화합물 또는 화합물들 또는 물질의 조성물을 지칭하기 위해 본 명세서에서 상호호환적으로 사용된다.

[0023] 본 명세서의 약어는 다음과 같은 기술, 특성 또는 화합물을 측정하기 위한 단위에 대응한다: "분"은 분(들)을 의미하고, "g"은 그램(들)을 의미하며, "㎎"은 밀리그램(들)을 의미하고, "㎍"은 마이크로그램(들)을 의미하며, "eq"은 당량(들)을 의미하고, "h"은 시간(들)을 의미하며, "㎕"는 마이크로리터(들)를 의미하고, "㎖"는 밀리리

터(들)를 의미하며, "mM" 밀리몰을 의미하고, "M"은 몰농도를 의미하며, "mmol" 또는 "mmole"은 밀리몰(들)을 의미하고, "cm"는 센티미터를 의미하며, "SEM"은 평균의 표준오차를 의미하고, "IU"는 국제단위를 의미한다. "IC_{50} 값" 또는 "IC_{50}"은 관찰 조건 또는 효과의 50% 경감 또는 저해를 야기하는 화합물의 용량을 의미한다.

[0024] "아피시딘"은 푸사리움(Fusarium) 종 진균 대사물질로부터 유래된 화합물이다. 이는 구조 사이클로(N-O-메틸-L-트립토파닐-L-아이소류시닐-D-피페콜리닐-L-2-아미노-8-옥소데카노일)을 가진다.

[0025] "아피시딘의 천연 유사체"는 푸사리움 팔리도로세움(Fusarium pallidoroseum) 종 ATCC74322 및 ATCC47289의 발효에서 생성된 아피시딘의 유사체를 지칭한다(아피시딘 A, B, C, D1, D2, D3, 문헌[*JOC 67, 815 (2002)*] 및 문헌[*Tet Lett, 37, 8077 (1996)*] 그리고 WO 1996/9603428호에 기재됨).

[0026] 본 명세서에 기재되는 바와 같이 "알킬"은 약 1 내지 약 20개 탄소 원자(및 그 안의 탄소 원자의 범위 그리고 구체적 수의 모든 조합 및 하위조합)를 갖는 선택적으로 치환된, 포화된 직선 또는 분지 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 적절한 경우, "알킬"은 "알킬렌"을 의미하며; 예를 들어, X가 $-R_1R_2$이고, R_1이 "알킬"이 되는 것으로 언급된다면, "알킬"은 "알킬렌"을 의미하는 것으로 정확하게 이해될 수 있다.

[0027] "아미노"는 $-NH_2$를 지칭하며, 수소를 대체하는 하나 이상의 치환체를 포함할 수 있다. "아미노"는 아민과 상호호환적으로 사용되며, 또한 임의의 약제학적으로 허용가능한 아민염을 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 아미노는 $-NH^+(X)(Y)Cl^-$을 지칭할 수 있으며, 여기서 X 및 Y는 바람직하게 그리고 독립적으로 수소 또는 알킬이며, 알킬은 하나 이상의 할로 치환을 포함할 수 있다.

[0028] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "아릴", "아렌", 및 "방향족"은 약 3 내지 약 50개 고리 구성원(및 그 안의 탄소 원자의 범위 그리고 구체적 범위의 모든 조합 및 하위조합)을 갖는 선택적으로 치환된, 포화 또는 불포화된, 모노사이클릭, 폴리사이클릭 또는 다른 호모-, 카보- 또는 헤테로사이클릭 방향족 고리 시스템을 각각 지칭하며, 약 5 내지 약 10개의 고리 원자 구성원이 바람직하다. 이러한 모이어티는 이하에 정의되는 바와 같은 "헤테로아릴" 및 "헤테로아렌"을 포괄한다(포함한다). 적절한 경우, "아릴"은 "아렌"을 의미할 수 있으며; 예를 들어, X가 $-R_1R_2$이고, R_1이 "아릴"인 것으로 언급된다면, "아릴"은 정확하게는 "아렌"을 의미하는 것으로 이해될 수 있다.

[0029] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "알케닐"은 약 2 내지 약 20개의 탄소 원자 및 하나 이상의 이중 결합(및 그 안의 탄소 원자의 범위 및 구체적 수의 모든 조합 및 하위조합)을 갖는 알킬 라디칼을 지칭하되, 알킬은 앞서 정의된 바와 같다. 일부 실시형태에서, 알케닐기는 약 2 내지 약 6개의 탄소 원자를 가지는 것이 바람직하다. 알케닐기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0030] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "아르알킬"은 하나 이상의 아릴 치환체를 보유하고 약 4 내지 약 50개 탄소 원자(및 그 안의 탄소 원자의 범위 그리고 구체적 수의 모든 조합 및 하위조합)를 갖는 알킬 라디칼을 지칭하되, 아릴 및 알킬은 앞서 정의된 바와 같다. 일부 바람직한 실시형태에서, 아르알킬기의 알킬 모이어티는 약 1 내지 약 4개의 탄소 원자를 가진다. 다른 바람직한 실시형태에서, 알킬 모이어티는 약 1 내지 약 3개의 탄소 원자를 가진다. 아르알킬기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0031] "알킬아미노"는 알킬-(NH)-를 의미하되, 알킬은 앞서 기재된 바와 같고, NH는 아미노의 제공된 정의에 따라 정의된다. "아릴아미노"는 아릴-(NH)-를 나타내되, 아릴은 본 명세서에 정의된 바와 같고, NH는 아미노의 제공된 정의에 따라 정의된다. 마찬가지로, "아르알킬아미노"는 아르알킬-(NH)-를 정의하는데 사용되되, 아르알킬은 앞서 정의된 바와 같고, NH는 아미노의 제공된 정의에 따라 정의된다. "알킬아미도"는 알킬-CH(=O)NH-를 지칭하되, 알킬은 앞서 정의된 바와 같다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "알콕시"는 R-O-기를 지칭하며, 여기서 R은 알킬기이고, 알킬은 앞서 기재된 바와 같다. "아르알콕시"는 R-O-를 나타내며, 여기서 R은 앞서 정의된 바와 같은 아르알킬기이다. "알킬설포닐"은 알킬-SO_2-를 의미하되, 알킬은 앞서 정의된 바와 같다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 "아미노옥시"는 아미노-(O)-기를 지칭하되, 아미노는 상기 정의된 바와 같다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 "아르알킬아미노옥시"는 아릴-알킬-아미노옥시-를 나타내기 위해 사용되되, 아릴, 알킬 및 아미노옥시는 각각 앞서 제공된 바와 같다.

[0032] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "알킬렌"은 화학식 $-(CH_2)_n-$을 갖는 선택적으로 분지된 또는 치환된 2가 알킬 라디칼을 지칭하며, 여기서 n은 1 내지 10이다. 비제한적 예는 메틸렌, 트라이메틸렌, 펜타메틸렌 및 헥사메틸렌

을 포함한다.

[0033] "알킬렌아미노"는 -$(CH_2)_n$-NH-를 지칭하며, 여기서 n은 1 내지 10이고, 2가 알킬 라디칼은 선택적으로 분지되거나 또는 치환될 수 있고, 아미노기는 수소를 대체하는 하나 이상의 치환체를 포함할 수 있다.

[0034] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "헤테로아릴" 또는 "헤테로아렌"은 아릴 라디칼을 지칭하되, 고리 중 적어도 하나에서, 탄소 원자 고리 구성원 중 하나 이상은 S, O, N 및 NH로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로원자기에 의해 독립적으로 대체되고, 아릴은 앞서 정의된 바와 같다. 약 3 내지 약 14개 탄소 원자 구성원 및 헤테로원자 고리 구성원의 전체를 갖는 헤테로아릴/헤테로아렌기가 바람직하다. 마찬가지로, "헤테로사이클릭 고리"는 아릴 라디칼이되, 탄소원자 고리 구성원 중 하나 이상은 S, O, N 및 NH로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로원자기에 의해 독립적으로 대체될 수 있다(필수적으로는 아님). 전체 약 3 내지 14개 고리 구성원 및 헤테로원자 고리 구성원을 갖는 헤테로사이클릭 고리가 바람직하지만, 현재 필수적인 것은 아니며; 예를 들어, "헤테로사이클로헥실"은 헤테로원자기가 있거나 또는 없는 6-원 아릴 라디칼일 수 있다.

[0035] "할로" 및 "할로겐"은 각각 플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도 모이어티를 지칭하며, 플루오로, 클로로 또는 브로모가 바람직하다.

[0036] "할로알킬"은 할로-알킬-을 의미하되, 알킬 및 할로는 각각 앞서 기재한 바와 같다.

[0037] "[모이어티]가 없는"으로 읽혀지는 어구는 모이어티가 부착되는 치환체가 서로 직접적으로 부착되는 것을 의미할 수 있다.

[0038] 전형적으로, 치환된 화학적 모이어티는 수소를 대체하는 하나 이상의 치환체를 포함한다. 예시적인 치환체는, 예를 들어 할로(예를 들어, F, Cl, Br, I), 알킬, 사이클로알킬, 알킬사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 알케닐, 알키닐, 아르알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로아르알킬, 스피로알킬, 헤테로사이클로알킬, 하이드록실 (-OH), 나이트로(-NO_2), 사이아노(-CN), 아미노(-NH_2), -N-치환된 아미노(-NHR"), -N,N-2치환된 아미노(-N(R")R"), 옥소(=O), 카복시(-COOH), -O-C(=O)R", -C(=O)R", -OR", -C(=O)OR", -(알킬렌)-C(=O)-OR", -NHC(=O)R", 아미노카보닐(-$C(=O)NH_2$), -N-치환된 아미노카보닐(-C(=O)NHR"), -N,N-2치환된 아미노카보닐(-C(=O)N(R")R"), 티올, 티올라토(-SR"), 설폰산(-SO_3H), 포스폰산(-PO_3H), -P(=O)(OR")OR", -S(=O)R", -$S(=O)_2R$", -$S(=O)_2NH_2$, -$S(=O)_2$NHR", -$S(=O)_2$NR"R", -NHS$(=O)_2$R", -NR"S$(=O)_2$R", -CF_3, -CF_2CF_3, -NHC(=O)NHR", -NHC(=O)NR"R", -NR"C(=O)NHR", -NR"C(=O)NR"R", -NR"C(=O)R" 등을 포함한다. 앞서 언급한 치환체에 대해서, 각각의 모이어티 R"은 독립적으로, 예를 들어 H, 알킬, 사이클로알킬, 알케닐, 아릴, 아르알킬, 헤테로아릴, 또는 헤테로사이클로알킬 중 어떤 것일 수 있다.

[0039] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "치료" 또는 "요법"(뿐만 아니라 이의 상이한 단어 형태)는 방지적(예를 들어, 예방적), 치유 또는 임시적(palliative) 치료를 포함한다.

[0040] 상기 및 개시내용 전체적으로 사용된 바와 같은 용어 "유효량"은 적절한 장애, 병태 또는 부작용의 치료에 대해 원하는 결과를 달성하기 위한 투약량에서, 필요한 일정 시간 동안의 유효한 양을 지칭한다. 본 발명의 구성성분의 유효량은 선택된 특정 화합물, 성분 또는 조성물, 투여 경로, 및 개체에서 원하는 반응을 유발하는 구성성분의 능력뿐만 아니라 완화되어야 하는 질병 상태 또는 병태의 중증도, 호르몬 수준, 연령, 성별, 개체의 체중, 환자의 상태, 치료 중인 병리학적 병태의 중증도, 동시의 의약 또는 특별한 식이요법, 그 다음에 특정 환자와 같은 인자, 및 당업자가 인식할 다른 인자에 따라 환자마다 다를 것으로 인식될 것이며, 적절한 투약량은 궁극적으로 담당 의사의 판단에 의할 것이다. 투약 요법은 개선된 치료적 반응을 제공하도록 조절될 수 있다. 유효량은 또한 구성성분의 임의의 독성 또는 유해한 효과보다 치료적으로 유리한 효과가 우세하게 되는 것이다. 예로서, 본 발명의 방법에서 유용한 화합물은 혈소판의 활성화 수준 및 부착 활성이 치료 시작 전의 활성 수준에 비해 감소되는 시간 동안 및 투약량에서 투여된다.

[0041] "약제학적으로 허용가능한"은 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 적정한 유익/유해비에 비례하는 다른 문제가 되는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과의 접촉에 적합한 타당한 의학적 판단의 범주 내인 해당 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투약 형태를 지칭한다.

[0042] 본 발명 내에서, 개시된 화합물은 약제학적으로 허용가능한 염의 형태로 제조될 수 있다. "약제학적으로 허용가능한 염"은 개시된 화합물의 유도체를 지칭하되, 모 화합물은 이의 산 또는 염기염을 만드는 것에 의해 변형된다. 약제학적으로 허용가능한 염의 예는 아민과 같은 염기성 잔기의 무기 또는 유기산 염; 카복실산과 같은 산

성 잔기의 알칼리 또는 유기염 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 약제학적으로 허용가능한 염은, 예를 들어 비독성 무기 또는 유기산으로부터 형성된 모 화합물의 통상적인 비독성 염 또는 4차(quaternary) 암모늄염을 포함한다. 예를 들어, 이러한 통상적인 비독성염은 무기산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 황산, 설팜산, 인산, 질산 등으로부터 유래된 것; 및 유기산, 예컨대 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글라이콜산, 스테아르산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스콜브산, 팜산, 말레산, 하이드록시말레산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 설파닐산, 2-아세톡시벤조산, 퓨마르산, 톨루엔설폰산, 메탄설폰산, 에탄 다이설폰산, 옥살산, 이세티온산 등을 포함한다. 이들 생리적으로 허용가능한 염은, 예를 들어 수성 알코올 중에서 유리 아민 염기를 과량의 산으로 용해시킴으로써, 또는 유리 카복실산을 알칼리 금속 염기, 예컨대 수산화물 또는 아민으로 중화시킴으로써 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다.

[0043] 본 명세서 전체적으로 기재된 화합물은 대안의 형태로 사용되거나 또는 제조될 수 있다. 예를 들어, 다수의 아미노-함유 화합물은 산부가염으로서 사용되거나 또는 제조될 수 있다. 종종 이러한 염은 화합물의 단리 및 조작 특성을 개선시킨다. 예를 들어, 시약, 반응 조건 등에 따라서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 화합물은, 예를 들어 이들의 염산염 또는 토실레이트 염으로서 사용되거나 또는 제조될 수 있다. 등정형 결정질 형태, 모든 키랄 및 라세미 형태, N-옥사이드, 수화물, 용매화물 및 산 염 수화물은 또한 본 발명의 범주 내인 것으로 고려된다.

[0044] 본 발명의 특정 산성 또는 염기성 화합물은 양쪽성 이온으로서 존재할 수 있다. 유리산, 유리 염기 및 양쪽성 이온을 포함하는 화합물의 모든 형태는 본 발명의 범주 내인 것으로 고려된다. 아미노기와 카복시기를 둘 다 함유하는 화합물은 그들의 양쪽성 형태와 평형상태로 존재하는 것이 당업계에 잘 알려져 있다. 따라서, 예를 들어 아미노기와 카복시기를 둘 다 함유하는 본 명세서 전체적으로 기재된 화합물 중 어떤 것은 또한 그들의 대응하는 양쪽성 이온에 대한 언급을 포함한다.

[0045] "수화물"은 분자 형태로 물과 관련된 본 발명의 화합물을 지칭하며, 즉, 이때 H-OH 결합은 분할되어 있지 않고, 예를 들어 화학식 $R \cdot H_2O$로 표시되며, 여기서 R은 본 발명의 화합물이다. 주어진 화합물은, 예를 들어, 1수화물($R \cdot H_2O$) 또는 폴리수화물($R \cdot nH_2O$, 여기서 n은 1보다 큰 정수임)(예를 들어, 2수화물($R \cdot 2H_2O$), 3수화물($R \cdot 3H_2O$) 등, 또는 반수화물, 예를 들어, $R \cdot n/_2H_2O$, $R \cdot n/_3H_2O$, $R \cdot n/_4H_2O$ 등(여기서 n은 정수임)을 포함함)을 포함하는 하나 이상의 수화물을 형성할 수 있다.

[0046] "용매화물"은 분자 형태에서 용매와 결합된 본 발명의 화합물을 지칭하며, 이때 용매는 배위적으로 결합되고, 예를 들어, 화학식 R·(용매)로 표시될 수 있으며, 여기서 R은 본 발명의 화합물이다. 주어진 화합물은, 예를 들어 1용매화물(R·(용매)) 또는, 예를 들어 2용매화물(R·2(용매)), 3용매화물(R·3(용매)) 등을 포함하는, 다용매화물(R·n(용매))(여기서 n은 1보다 큰 정수임), 또는 반용매화물, 예를 들어, $R \cdot n/_2$(용매), $R \cdot n/_3$(용매), $R \cdot n/_4$(용매) 등(여기서 n은 정수임)을 포함하는, 하나 이상의 용매화물을 형성할 수 있다. 본 명세서의 용매는 혼합된 용매, 예를 들어, 메탄올/물을 포함하며, 이와 같이, 용매화물은 용매화물 내에 하나 이상의 용매를 혼입시킬 수 있다.

[0047] "산 수화물"은 하나 이상의 염기 모이어티를 갖는 화합물과 하나 이상의 산 모이어티를 갖는 적어도 하나의 화합물의 결합을 통해, 또는 하나 이상의 산 모이어티를 갖는 화합물과 하나 이상의 염기 모이어티를 갖는 적어도 하나의 화합물의 결합을 통해 형성될 수 있는 복합체를 지칭하며, 상기 복합체는 수화물을 형성하도록 물 분자와 추가로 결합되되, 상기 수화물은 앞서 정의된 바와 같고, R은 상기 기재한 본 명세서의 복합체를 나타낸다.

[0048] 용어 "입체이성질체"는 동일한 화학적 구성을 가지지만, 공간에서 원자 또는 기의 부착과 관련하여 상이한 화합물을 지칭한다.

[0049] "라세미"는 반대의 광학적 활성의 형태로 분해능을 갖는 것을 의미한다.

[0050] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "부분적 입체이성질체"는 2 이상의 키랄 중심을 갖는 입체이성질체를 지칭하되, 키랄 중심 중 적어도 하나는 정해진 입체화학(즉, *R* 또는 *S*)을 가지고, 적어도 하나는 정해지지 않은 입체화학(즉, *R* 또는 *S*)을 가진다. 용어 "이의 부분적 입체이성질체"는 본 명세서에서 사용되며, 이는 정해진 입체화학 중심을 지니는 키랄 중심에서의 입체배치가 유지되고, 각각의 정해지지 않은 키랄 중심의 입체배치가 *R* 또는 *S*로부터 독립적으로 선택되는 기재된 속 내의 임의의 화합물을 지칭한다. 예를 들어, 입체이성질체가 3개의 키랄 중심을 가지고, 제1 중심의 입체화학적 입체배치가 "S" 입체화학을 갖는 것으로 정의된다면, 용어 "또는 이의 부분적 입체이성질체"는 3개의 키랄 중심에서 *SRR*, *SRS*, *SSR* 또는 *SSS*를 갖는 입체이성질체, 및 이들의

혼합물을 지칭한다.

[0051] "동위원소적으로 치환된 유사체"는 하나 이상의 원자가 해당 원자의 동위원소로 대체된 본 개시내용의 화합물이다. 예를 들어, 수소(경수소)은 중수소 또는 삼중수소로 치환될 수 있다. 동위원소적으로 치환된 유사체를 형성하기 위해 동위원소로 대체될 수 있는 다른 원자는, 예를 들어, 탄소(C^{13}으로 대체), 질소(N^{15}으로 대체), 요오드(I^{131}로 대체), 불소(F^{18}로 대체), 또는 황(S^{31}로 대체)을 포함한다. 임의의 이용가능한 동위원소를 사용하여 그의 동위원소적으로 치환된 유사체를 형성할 수 있으며, 당업자는 주어진 화합물로부터 이러한 유사체를 형성하기 위한 이용가능한 기법을 인식할 것이다.

[0052] "프로드러그"는 원하는 활성을 위해 그 자체가 불활성이거나 또는 최소로 활성이지만, 생체변환을 통해 생물학적으로 활성인 대사물질로 전환될 수 있는 화합물을 지칭한다. 예를 들어, 본 발명의 프로드러그는 특히 특허청구되거나 또는 본 개시내용에 기재된 화합물에 대한 물질대사 수단에 의해 생체내에서 전환가능한 임의의 화합물을 포함한다.

[0053] "N-옥사이드"는 헤테로방향족 고리 또는 3차 아민 중 하나의 염기성 질소 원자가 산화되어 양의 형식 전하를 보유하는 4차 질소 및 음의 형식 전하를 보유하는 부착된 산소 원자를 제공하는 화합물을 지칭한다.

[0054] 임의의 변수가 임의의 구성성분에서 또는 임의의 화학식에서 1회 이상 생길 때, 각각의 발생에서 그의 정의는 다른 발생마다 그의 정의에 독립적이다. 치환체 및/또는 변수의 조합은 이러한 조합이 안정한 화합물을 초래할 경우에만 허용된다.

[0055] 용어 "투여하는"은 본 발명의 화합물 또는 조성물을 직접 투여하거나, 또는 신체 내에서 동등한 양의 활성 화합물 또는 물질을 형성하는 프로드러그, 유도체 또는 유사체를 투여하는 것을 의미한다.

[0056] "투약량 단위"는 특정 개체가 치료되는 통합된 투약량으로서 적합한 물리적으로 별개의 단위를 지칭한다. 각 단위는 계산된 활성 화합물(들)의 사전 결정된 양을 함유하여 필요한 약제학적 담체와 함께 원하는 치료적 효과(들)를 생성할 수 있다. 본 발명의 투약 단위 형태에 대한 사양은 (a) 활성 화합물(들) 및 달성되어야 하는 특정 치료적 효과(들)의 독특한 특징, 및 (b) 이러한 활성 화합물(들)을 조제하는 당업계에 내재하는 제한에 의해 지시될 수 있다.

[0057] "대상체" 또는 "환자"는 본 발명의 조성물 및/또는 방법에 의해 치료될 수 있는 인간 종을 포함하는 배아, 미숙 또는 성체 동물을 지칭한다.

[0058] 감염 세포의 핵에서 "에피솜"으로서 존재하고 발현되는 B형 간염 바이러스의 공유결합 폐환형 DNA(cccDNA)는 숙주 염색체 내로 통합되는 HBV DNA와 상이하게 조절되고, HBV cccDNA로부터의 RNA 발현은 선택적으로 다른 유전자에 비해 약학적으로 억제될 수 있다는 것을 현재 발견하였다. 사실, 본 발명자들은 재생가능하고, 강한 방식으로 DHBV cccDNA 전사를 억제하며, 저농도에서 및 명확한 독성이 없는 조건 하에 생기는 수많은 화합물을 확인하였다. 이들 결과는 처음에 선택적인 약학적 억제가 설계에 의해, 소분자를 이용하여 달성될 수 있다는 것을 나타낸다. HBV cccDNA로부터의 유전자 발현이 숙주 염색체에 통합된 동일 또는 유사한 DNA와 상이하게 조절된 결과는 놀랍고도 고도로 유용한 관측인데, 즉, 숙주 염색체 DNA를 억제하거나 또는 달리 영향을 미치는 일 없이 cccDNA DNA를 선택적으로 억제하는(예를 들어, 통합된 HBV DNA에 비해) 요법을 가능하게 한다. HBV cccDNA가 약학적으로 억제될 수 있다는 본 발명의 발견은 이전까지는 알려져 있지 않았었고, 유용한 개념의 선행 진술의 증거를 제공하며, 이러한 약학적 억제가 가능하다는 것을 입증한다.

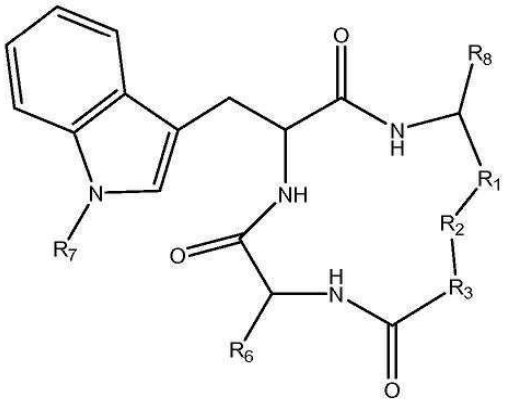
[0059] 따라서, 본 개시내용은 특히 cccDNA의 후성적 변형을 제공하는 작용제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 B형 간염의 cccDNA 전사를 조절하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 후성적 변형제, 히스톤 변형제 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제와 같은 소분자는 약학적일 수 있다. 후성적 변형제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는 통합된 HBV DNA에 비해 cccDNA의 저해에 대해 선택적일 수 있고, 즉, 통합된 HBV DNA를 저해하지 않고/않거나 즉, 세포의 숙주 DNA에 비해, 세포의 숙주 DNA를 저해하지 않는다. 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는 히스톤 데아세틸라제의 다중 클래스의 저해제일 수 있거나, 히스톤 데아세틸라제의 특정 클래스에 대해 선택적일 수 있다. 예를 들어, 저해제는 클래스 I 히스톤 데아세틸라제 활성, 클래스 II 히스톤 데아세틸라제 활성, 또는 둘 다의 저해제일 수 있다. 바람직하게는, 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는 클래스 I 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제이다. 수많은 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제가 공지되어 있으며, 임의의 이러한 HDAC 저해제는 본 방법에 의하여 사용될 수 있다.

[0060] B형 간염의 cccDNA 전사를 조절하는 본 발명의 방법은 또한 - cccDNA의 후성적 변형을 제공하는 작용제, 히스톤 변형제 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제를 대상체에 투여하는 것에 추가로 - B형 간염 바이러스를 조절하는 추가적인 작용제의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 추가적인 작용제는 cccDNA의 후성적 변형을 제공하는 작용제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제와 동시에 또는 단순히 동일한 일반적 치료요법의 부분으로서 투여될 수 있다. 추가적인 작용제는 당업자에게 공지되어 있는 수많은 유형 중에서 HBV의 조절을 위해 현재 사용되고 있는 임의의 물질일 수 있다. 예를 들어, HBV의 조절을 위해 존재하는 약물은 인터페론(예를 들어, 인터페론 알파, 페길화 인터페론), 뉴클레오사이드 유사체(예를 들어, 라미뷰딘, 아데포비어 디피복실, 엔테카비어, 텔비부딘, 테노포비어, 클레부딘, 암독소비어), 비-뉴클레오사이드 항바이러스제(예를 들어, BAM 205, ANA380, 미르클루덱스 B, HAP 화합물 베이 41-4109, REP 9AC, 니타족사나이드, dd-RNAi 화합물, ARC-520, NVR-1221), 비-인터페론 면역 증진제(예를 들어, 티모신 알파-1, 인터류킨-7, DV-601, HBV 코어 항원 백신, GS-9620, GI13000), 및 노출 후 및/또는 간 이식 후 치료 약물(예를 들어, 하이퍼HEP S/D, 나비(Nabi)-GB, 헤파 감 B(Hepa Gam B))을 포함한다.

[0061] 특히, 추가적인 작용제는 임의의 다른 직접적 작용 항바이러스 항 B형 간염 작용제(예컨대, 폴리머라제 저해제 바라클루드(Barraclude), 테노포비어(Tenofovir), 라미뷰딘, 텔비부딘 및 아데포비어) 및/또는 cccDNA 전사의 억제 이외의 바이러스 라이프 사이클에서의 단계에서 작용하는 임의의 다른 직접 작용 항바이러스제, 예컨대 캡시드 저해제, 분비 저해제, 또는 유입 저해제일 수 있다. 추가적인 작용제는 또한 임의의 다른 비직접 작용 항바이러스제, 예컨대 인터페론 또는 다른 면역조절제일 수 있다.

[0062] B형 간염의 cccDNA 전사를 조절하는 본 발명의 방법에 따르면, 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는, 예를 들어 트리코스타틴 A(Trichostatin A), 수베로일 비스 하이드록삼산, 다이메틸아미노 하이드록시-벤즈아마이드, 아피시딘, 아피시딘 유사체(예를 들어, 아피시딘의 천연 유사체 또는 데 노보(de novo) 합성 유사체), 또는 하기 화학식 I에 따른 화합물 또는 이의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염일 수 있다:

[0063] [화학식 I]



[0064]

[0065] 식 중,

[0066] R_1은 $-(CH_2)_n-$ 또는 -C(=O)-이고;

[0067] R_2는 -C(=O)-, 3,5-트라이아졸릴 또는 $-C(Z)N(R_4)-$이며;

[0068] R_4는 수소, 알킬, 아릴, 아르알킬, 다이알킬아미노알킬 또는 카복시알킬이고;

[0069] R_3은 $-CH(R_5)-$이거나, R_2는 질소이고 R_3은 -CH-이며, R_2와 R_3은 함께 피페리디닐을 형성하고;

[0070] R_5는 수소, $-CH_3$, 또는 알파 아미노산 R기이며;

[0071] R_6은 $-(CH_2)_mC(X)Y$, $-(CH_2)_2CH_3$, 또는 $-(CH_2)_q-$페닐$-(CH_2)_mC(=O)NHOH$이고;

[0072] X는 =O, H_2, $=N-NH_2$ 또는 $=N-NH-C(=O)NH_2$이며;

[0073] Y는 NHOH 또는 $-CH_2CH_3$이고;

[0074] Z는 H_2 또는 O이며;

[0075] R_7은 수소 또는 알콕시이고;

[0076] R_8은 알킬 또는 카복시알킬이며;

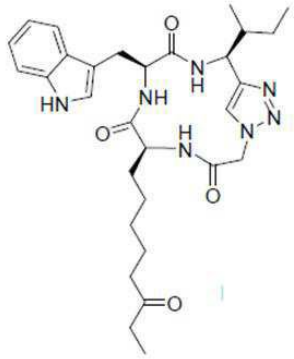
[0077] n은 0 내지 2이고;

[0078] m은 0 내지 6이며; 그리고

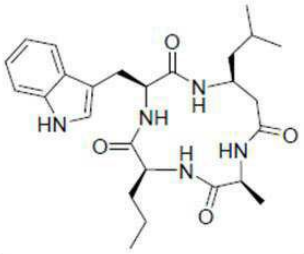
[0079] q는 0 내지 3이다.

[0080] 본 명세서에 사용된 바와 같은 어구 "알파 아미노산 R기"는 천연 또는 비천연 아미노산으로부터의 측쇄기를 지칭한다.

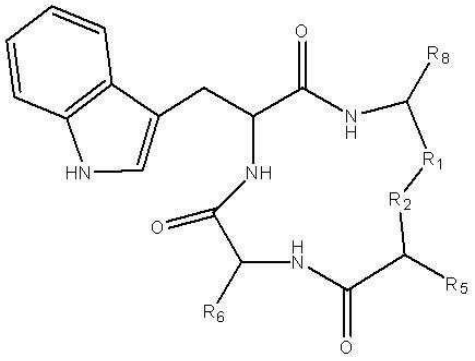
[0081] 특정 실시형태에서, 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는 아피시딘,



,



, 또는



[0082]

[0083] 또는 이의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염이다.

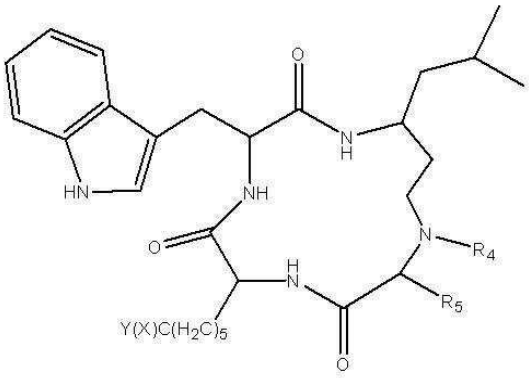
[0084] 식 중,

[0085] R_1은 $-(CH_2)-$이고,

[0086] 그리고

[0087] R_2는 $-C(Z)N(R_4)-$이다.

[0088] 다른 실시형태에서, 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는



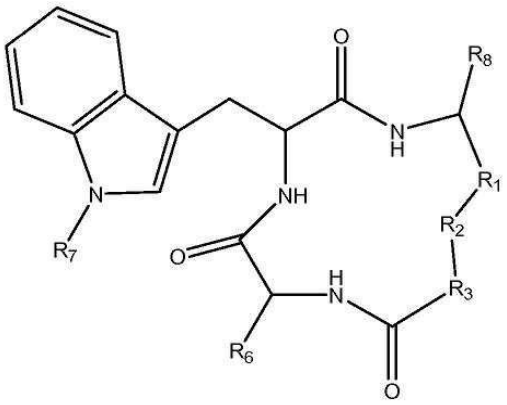
[0089]

[0090] 또는 이의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염이다.

[0091] 본 개시내용은 또한 cccDNA의 후성적 변형을 제공하는 작용제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 B형 간염을 치료하는 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 후성적 변형제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제와 같은 소분자는 약학적일 수 있다. 후성적 변형제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는 통합된 HBV DNA에 비해 cccDNA의 저해에 대해 선택적일 수 있고, 즉, 통합된 HBV DNA를 저해하지 않고/않거나 즉, 세포의 숙주 DNA에 비해, 세포의 숙주 DNA를 저해하지 않는다. 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는 히스톤 데아세틸라제의 다중 클래스의 저해제일 수 있거나, 히스톤 데아세틸라제의 특정 클래스에 대해 선택적일 수 있다. 예를 들어, 저해제는 클래스 I 히스톤 데아세틸라제 활성, 클래스 II 히스톤 데아세틸라제 활성, 또는 둘 다의 저해제일 수 있다. 바람직하게는, 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는 클래스 I 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제이다. 수많은 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제가 공지되어 있으며, 임의의 이러한 HDAC 저해제는 본 방법에 의하여 사용될 수 있다.

[0092] 대상체에서 B형 간염을 치료하는 본 방법에 따르면, 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는, 예를 들어, 트리코스타틴 A, 수베로일 비스 하이드록삼산, 다이메틸아미노 하이드록시-벤즈아마이드, 아피시딘, 아피시딘 유사체(예를 들어, 아피시딘의 천연 유사체 또는 데 노보 합성 유사체), 또는 하기 화학식 I에 따른 화합물 또는 이의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염일 수 있다:

[0093] [화학식 I]



[0094]

[0095] 식 중,

[0096] R_1은 $-(CH_2)_n-$ 또는 -C(=O)-이고;

[0097] R_2는 -C(=O)-, 3,5-트라이아졸릴, 또는 $-C(Z)N(R_4)-$이며;

[0098] R_4는 수소, 알킬, 아릴, 아르알킬, 다이알킬아미노알킬 또는 카복시알킬이고;

[0099] R_3은 -CH(R_5)-이거나, R_2는 질소이고 R_3은 -CH-이며, R_2와 R_3은 함께 피페리디닐을 형성하고;

[0100] R_5는 수소, $-CH_3$, 또는 알파 아미노산 R기이며;

[0101] R_6은 $-(CH_2)_mC(X)Y$, $-(CH_2)_2CH_3$, 또는 $-(CH_2)_q$-페닐-$(CH_2)_mC(=O)NHOH$이고;

[0102] X는 =O, H_2, $=N-NH_2$ 또는 $=N-NH-C(=O)NH_2$이며;

[0103] Y는 NHOH 또는 $-CH_2CH_3$이고;

[0104] Z는 H_2 또는 O이며;

[0105] R_7은 수소 또는 알콕시이고;

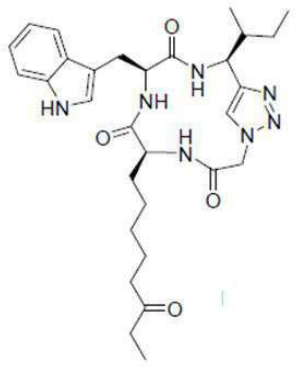
[0106] R_8은 알킬 또는 카복시알킬이며;

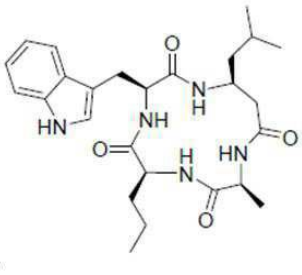
[0107] n은 0 내지 2이고;

[0108] m은 0 내지 6이며; 그리고

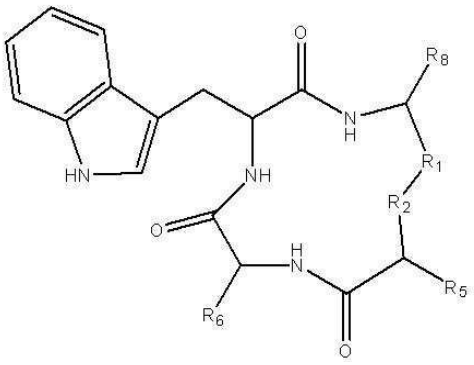
[0109] q는 0 내지 3이다.

[0110] 특정 실시형태에서, 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는 아피시딘,





, 또는



[0111]

[0112] 또는 이의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염이다.

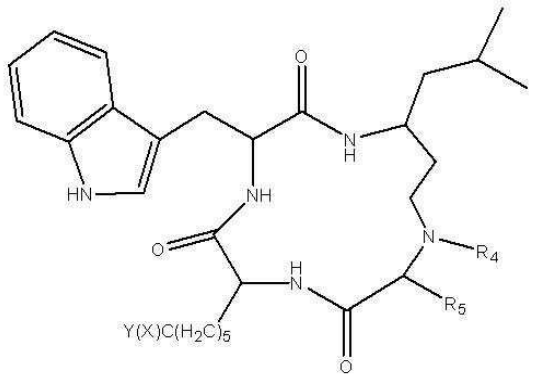
[0113] 식 중,

[0114] R_1은 $-(CH_2)$-이고,

[0115] 그리고

[0116] R_2는 $-C(Z)N(R_4)$-이다.

[0117] 다른 실시형태에서, 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는



[0118]

[0119] 또는 이의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염이다.

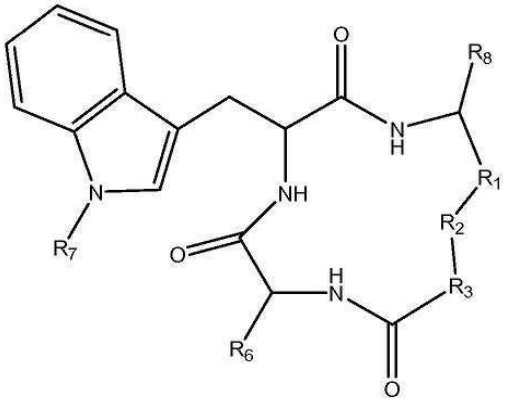
[0120] 대상체에서 B형 간염을 치료하는 본 방법은 또한 - cccDNA의 후성적 변형을 제공하는 작용제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제의 대상체에 대한 투여에 추가로 - B형 간염 바이러스를 조절하는 추가적인 작용제의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 추가적인 작용제는 cccDNA의 후성적 변형을 제공하는 작용제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제와 동시에 또는 단순히 동일한 일반적 치료 요법의 부분으로서 투여될 수 있다. 추가적인 작용제는 당업자에게 공지되어 있는 수많은 유형 중에서 HBV의 조절을 위해 현재 사용되고 있는 임의의 물질일 수 있다. 예를 들어, HBV의 조절을 위해 존재하는 약물은 인터페론(예를 들어, 인터페론 알파, 페길화 인터페론), 뉴클레오사이드 유사체(예를 들어, 라미뷰딘, 아데포비어 디피복실, 엔테카비어, 텔비부딘, 테노포비어, 클레부딘, 암독소비어), 비-뉴클레오사이드 항바이러스제(예를 들어, BAM 205, ANA380, 미르클루덱스 B, HAP 화합물 베이 41-4109, REP 9AC, 니타족사나이드, dd-RNAi 화합물, ARC-520, NVR-1221), 비-인터페론 면역 증진제(예를 들어, 티모신 알파-1, 인터류킨-7, DV-601, HBV 코어 항원 백신, GS-9620, GI13000), 및 노출 후 및/또는 간 이식 후 치료 약물(예를 들어, 하이퍼 HEP S/D, 나비-GB, 헤파 감 B)을 포함한다.

[0121] 특히, 추가적인 작용제는 임의의 다른 직접적 작용 항바이러스 항 B형 간염 작용제(예컨대, 폴리머라제 저해제 바라클루드, 테노포비어, 라미뷰딘, 텔비부딘 및 아데포비어) 및/또는 cccDNA 전사의 억제 이외의 바이러스 라이프 사이클에서의 단계에서 작용하는 임의의 다른 직접 작용 항바이러스제, 예컨대 캡시드 저해제, 분비 저해제, 또는 유입 저해제일 수 있다. 추가적인 작용제는 또한 임의의 다른 비직접 작용 항바이러스제, 예컨대 인터페론 또는 다른 면역조절제일 수 있다.

[0122] 또한 B형 간염 바이러스를 cccDNA의 후성적 변형을 제공하는 작용제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제와 접촉시키는 단계를 포함하는, B형 간염 바이러스의 공유결합 폐환형 DNA를 조절하는 방법이 개시된다. 예를 들어, 후성적 변형제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제와 같은 소분자는 약학적일 수 있다. 후성적 변형제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는 통합된 HBV DNA에 비해 cccDNA의 저해에 대해 선택적일 수 있고, 즉, 통합된 HBV DNA를 저해하지 않고/않거나 즉, 세포의 숙주 DNA에 비해, 세포의 숙주 DNA를 저해하지 않는다. 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는 히스톤 데아세틸라제의 다중 클래스의 저해제일 수 있거나, 히스톤 데아세틸라제의 특정 클래스에 대해 선택적일 수 있다. 예를 들어, 저해제는 클래스 I 히스톤 데아세틸라제 활성, 클래스 II 히스톤 데아세틸라제 활성, 또는 둘 다의 저해제일 수 있다. 바람직하게는, 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는 클래스 I 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제이다. 수많은 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제가 공지되어 있으며, 임의의 이러한 HDAC 저해제는 본 방법에 의하여 사용될 수 있다.

[0123] B형 간염 바이러스의 공유결합 폐환형 DNA를 조절하는 본 방법에 따르면, 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는, 예를 들어, 트리코스타틴 A, 수베로일 비스 하이드록삼산, 다이메틸아미노 하이드록시-벤즈아마이드, 아피시딘, 아피시딘 유사체(예를 들어, 아피시딘의 천연 유사체 또는 데 노보 합성 유사체), 또는 하기 화학식 I에 따른 화합물 또는 이의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염일 수 있다:

[0124] [화학식 I]



[0125]

[0126] 식 중,

[0127] R_1은 $-(CH_2)_n-$ 또는 -C(=O)-이고;

[0128] R_2는 -C(=O)-, 3,5-트라이아졸릴 또는 $-C(Z)N(R_4)-$이며;

[0129] R_4는 수소, 알킬, 아릴, 아르알킬, 다이알킬아미노알킬 또는 카복시알킬이고;

[0130] R_3은 $-CH(R_5)-$이거나, R_2는 질소이고 R_3은 -CH-이며, R_2와 R_3은 함께 피페리디닐을 형성하고;

[0131] R_5는 수소, $-CH_3$, 또는 알파 아미노산 R기이며;

[0132] R_6은 $-(CH_2)_mC(X)Y$, $-(CH_2)_2CH_3$, 또는 $-(CH_2)_q-$페닐$-(CH_2)_mC(=O)NHOH$이고;

[0133] X는 =O, H_2, $=N-NH_2$ 또는 $=N-NH-C(=O)NH_2$이며;

[0134] Y는 NHOH 또는 $-CH_2CH_3$이고;

[0135] Z는 H_2 또는 O이며;

[0136] R_7은 수소 또는 알콕시이고;

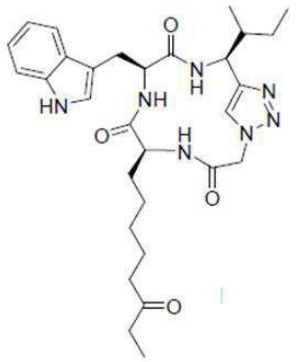
[0137] R_8은 알킬 또는 카복시알킬이며;

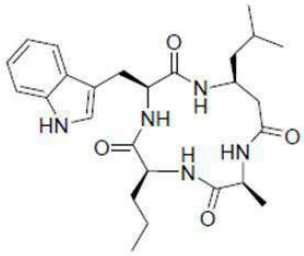
[0138] n은 0 내지 2이고;

[0139] m은 0 내지 6이며; 그리고

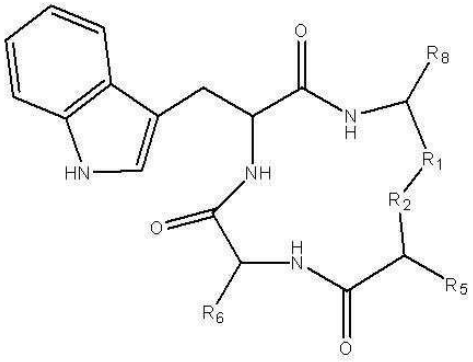
[0140] q는 0 내지 3이다.

[0141] 특정 실시형태에서, 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는 아피시딘,



, 

, 또는



[0142]

[0143] 또는 이의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염이다:

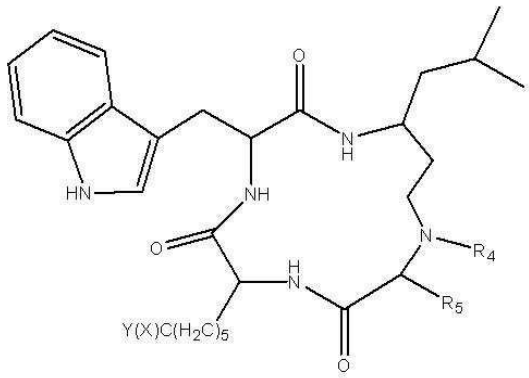
[0144] 식 중,

[0145] R_1은 $-(CH_2)-$이고,

[0146] 그리고

[0147] R_2는 $-C(Z)N(R_4)-$이다.

[0148] 다른 실시형태에서, 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제는



[0149]

[0150] 또는 이의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염이다.

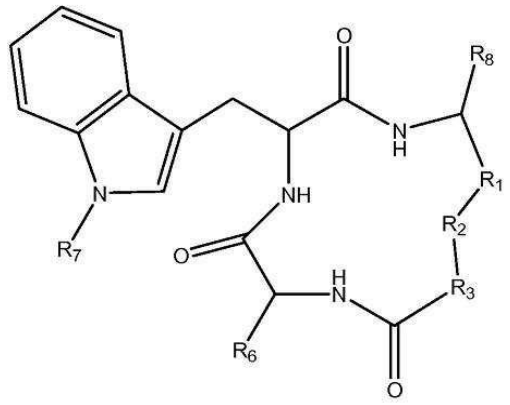
[0151] B형 간염 바이러스의 공유결합 폐환형 DNA를 조절하는 본 방법은 또한 - B형 간염 바이러스를 cccDNA의 후성적 변형을 제공하는 작용제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제와 접촉시키는 단계에 추가로 - B형 간염 바이러스를, 치료적 유효량의, B형 간염 바이러스를 조절하는 추가적인 작용제와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 추가적인 작용제를 HBV와 접촉시키는 것은 HBV를 cccDNA의 후성적 변형을 제공하는 작용제, 히스톤 변형제, 또는 히스톤 데아세틸라제 활성의 저해제와 접촉시키는 단계와 동시에 또는 단순히 이 단계를 수반하는 동일한 절차의 부분으로서 일어날 수 있다. 추가적인 작용제는 당업자에게 공지되어 있는 수많은 유형

중에서 HBV의 조절을 위해 현재 사용되고 있는 임의의 물질일 수 있다. 예를 들어, HBV의 조절을 위해 존재하는 약물은 인터페론(예를 들어, 인터페론 알파, 페길화 인터페론), 뉴클레오사이드 유사체(예를 들어, 라미뷰딘, 아데포비어 디피복실, 엔테카비어, 텔비부딘, 테노포비어, 클레부딘, 암독소비어), 비-뉴클레오사이드 항바이러스제(예를 들어, BAM 205, ANA380, 미르클루덱스 B, HAP 화합물 베이 41-4109, REP 9AC, 니타족사나이드, dd-RNAi 화합물, ARC-520, NVR-1221), 비-인터페론 면역 증진제(예를 들어, 티모신 알파-1, 인터류킨-7, DV-601, HBV 코어 항원 백신, GS-9620, GI13000), 및 노출 후 및/또는 간 이식 후 치료 약물(예를 들어, 하이퍼HEP S/D, 나비-GB, 헤파 감 B)을 포함한다.

[0152] 특히, 추가적인 작용제는 임의의 다른 직접적 작용 항바이러스 항 B형 간염 작용제(예컨대, 폴리머라제 저해제 바라클루드, 테노포비어, 라미뷰딘, 텔비부딘 및 아데포비어) 및/또는 cccDNA 전사의 억제 이외의 바이러스 라이프 사이클에서의 단계에서 작용하는 임의의 다른 직접 작용 항바이러스제, 예컨대 캡시드 저해제, 분비 저해제, 또는 유입 저해제일 수 있다. 추가적인 작용제는 또한 임의의 다른 비직접 작용 항바이러스제, 예컨대 인터페론 또는 다른 면역조절제일 수 있다.

[0153] 본 개시내용은 또한 하기 화학식 II에 따른 화합물 또는 이의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:

[0154] [화학식 II]



[0155]

[0156] 식 중,

[0157] R_1은 $-(CH_2)_n-$ 또는 $-C(=O)-$이고;

[0158] R_2는 $-C(=O)-$ 또는 $-C(Z)N(R_4)-$이며;

[0159] R_4는 수소, 알킬, 아릴, 아르알킬, 다이알킬아미노알킬 또는 카복시알킬이고;

[0160] R_3은 $-CH(R_5)-$이며;

[0161] R_5는 수소, $-CH_3$, 또는 알파 아미노산 R기이고;

[0162] R_6은 $-(CH_2)_mC(X)Y$, $-(CH_2)_2CH_3$, 또는 $-(CH_2)_q-$페닐$-(CH_2)_mC(=O)NHOH$이며;

[0163] X는 =O, H_2, $=N-NH_2$ 또는 $=N-NH-C(=O)NH_2$이고;

[0164] Y는 NHOH 또는 $-CH_2CH_3$이며;

[0165] Z는 H_2 또는 O이고;

[0166] R_7은 수소 또는 알콕시이며;

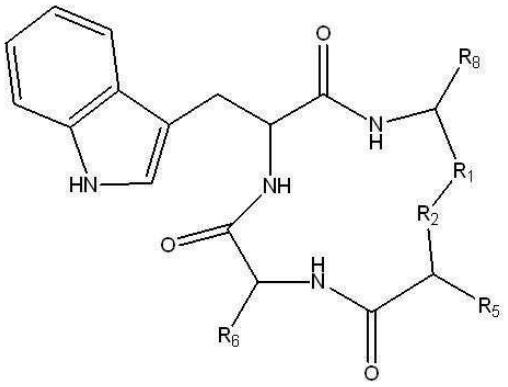
[0167] R_8은 알킬 또는 카복시알킬이고;

[0168] n은 0 내지 2이며;

[0169] m은 0 내지 6이고; 그리고

[0170] q는 0 내지 3이다.

[0171] 예를 들어, 화합물은



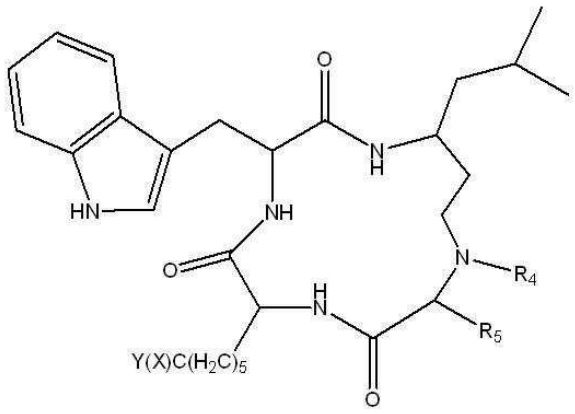
[0172] 일 수 있다.

[0173] 식 중,

[0174] R_1은 -(CH_2)-이고,

[0175] R_2는 -C(Z)N(R_4)-이다.

[0176] 다른 실시형태에서, 화합물은



[0177] 일 수 있다.

[0178] 용이하게 이해될 바와 같이, 존재하는 작용기는 합성 과정 동안 보호기를 함유할 수 있다. 보호기는 그 자체가 하이드록실기 및 카복실기와 같은 작용기에 선택적으로 부착될 수 있고, 제거될 수 있는 화학적 작용기로서 알려져 있다. 이들 기는 화합물이 노출되는 실온 화학적 반응 조건에서 이러한 작용기를 제공하는 화학적 화합물에서 존재한다. 임의의 다양한 보호기가 본 발명에 의해 사용될 수 있다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 보호기는 문헌[*Greene, T.W. and Wuts, P.G.M., Protective Groups in Organic Synthesis 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991*]에 기재되어 있을 수 있다.

[0179] 추가의 양태에서, 본 개시내용은 화학식 I 또는 II에 따른 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 동위원소적으로 치환된 유사체, 또는 입체이성질체 및 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 적용가능한 담체, 희석제 또는 부형제는, 예를 들어, 문헌[*Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1985)*]에 기재된 바와 같은 선택된 투여 경로 및 표준 약제학적 실행에 기반하여 선택될 수 있고, 이의 개시내용은 그의 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다. 약제학적 조성물은, 치료적 유효량의, B형 간염 바이러스를 조절하는 추가적인 작용제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 바이러스를 조절하는 추가적인 작용제는 공지된 항바이러스제일 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 조성물은 HBV의 증상을 예방하거나 또는 줄이는데 효과적인 면역화 또는 백신과 병용하여 투여되는 치료적 유효량의 화학식 I 또는 II에 따른 화합물을 포함한다. 예는 항체, 면역 억제제, 항염증제 등을 포함한다.

[0180] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "접촉시키는"은 함께 시험관내 시스템 또는 생체내 시스템에서 표시된 모이어티의 물리적 또는 화학적 상호작용을 초래하는 것을 지칭한다. 예를 들어, HBV 바이러스를 본 발명에서 화합물과 "접촉시키는"은 HBV 감염을 갖는 개체 또는 환자, 예컨대 인간에 본 발명의 화합물의 투여뿐만 아니라 본 발명의 화합물을 cccDNA를 함유하는 세포의 제제 또는 정제된 제제를 함유하는 샘플에 도입하는 것을 포함할 수 있다.

[0181] 상호호환적으로 사용되는 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "개체" 또는 "환자"는 포유류를 포함하는 임의의 동물, 예컨대 마우스, 래트, 다른 설치류, 토끼, 개, 고양이, 돼지, 소, 양, 말 또는 영장류, 예컨대 인간을 지칭한다.

[0182] 본 명세서에 사용된 바와 같은 어구 "치료적 유효량"은 연구원, 수의사, 의사 또는 다른 임상의에 의해 조직, 시스템, 동물, 개체 또는 인간에서 추구되는 생물학적 또는 의학적 반응을 유발하는 활성 화합물 또는 약제학적 작용제의 양을 지칭하는데, 다음 중 하나 이상을 포함한다:

[0183] (1) 질병을 예방하는 것; 예를 들어, 질병, 병태 또는 장애의 성향을 가질 수 있지만, 아직 질병의 병리 또는 증상을 경험하거나 또는 나타내지 않은 개체에서 질병, 병태 또는 장애를 예방하는 것;

[0184] (2) 질병을 억제하는 것; 예를 들어, 질병, 병태 또는 장애의 병리 또는 증상을 경험하거나 또는 나타내는 개체에서 질병, 병태 또는 장애를 억제하는 것(즉, 병리 및/또는 증상의 추가적인 발생을 저지하는 것을 포함); 및

[0185] (3) 질병을 개선시키는 것; 예를 들어, 질병의 병리 또는 증상을 경험하거나 또는 나타내는 개체에서 질병, 병태 또는 장애를 개선시키는 것(즉, 병리 및/또는 증상을 반전시키는 것을 포함).

[0186] 치료적 화합물의 투여가 질병 또는 장애에 대한 유효한 치료 요법이 되는 대상체 또는 환자는 바람직하게는 인간이지만, 임상 시험 또는 선별 또는 활성 실험과 관련하여 실험실 동물을 포함하는 임의의 동물일 수 있다. 따라서, 당업자에 의해 용이하게 인식될 바와 같이, 본 발명의 방법, 화합물 및 조성물은 인간, 가축, 예컨대 고양이 또는 개 대상체, 농장 동물, 예컨대 이하에 제한되는 것은 아니지만, 소, 말, 염소, 양 및 돼지 대상체, 야생 동물(야생에서든 또는 동물원에서든), 연구 동물, 예컨대 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양, 돼지, 개, 고양이 등, 조류 종, 예컨대 닭, 칠면조, 명금 등을 포함하는 임의의 동물, 특히 포유류에 투여에, 즉 수의학적 용도를 위해 특히 적합하다.

[0187] 본 발명의 화합물은 있는 그대로, 또는 액체 또는 고체일 수 있는 통상적인 약제학적 담체, 희석제, 또는 부형제와 병용하여 경구적으로 또는 비경구적으로 투여될 수 있다. 적용가능한 고체 담체, 희석제, 또는 부형제는 특히 결합제, 붕괴제, 충전제, 윤활제, 활택제, 압축 보조제, 가공 보조제, 착색제, 감미제, 보존제, 현탁제/분산제, 정제-붕해제, 캡슐화 물질, 필름 형성제 또는 코팅제, 향미제 또는 인쇄 잉크로서 작용할 수 있다. 물론, 임의의 투약 단위 형태를 제조하는데 사용되는 임의의 물질은 바람직하게는 약제학적으로 순수하고 사용되는 양에서 실질적으로 비독성이다. 추가로, 활성 화합물은 지속 방출 제제 및 제형에 포함될 수 있다. 이 점에 있어서 비경구 투여는 특히 다음의 경로에 의한 투여를 포함한다: 정맥내, 근육내, 피하, 안구내, 활막내, 경피를 포함하는 상피, 눈, 혀밑 및 구강; 눈, 진피, 안구, 직장 및 흡입제, 에어로졸을 통한 비강 흡수를 통해 국소적으로, 및 직장 전신성.

[0188] 분말에서, 담체, 희석제, 또는 부형제는 미세하게 분할된 활성 성분과 혼합된 미세하게 분할된 고체일 수 있다. 정제에서, 활성 성분은 필요한 압축 특성을 갖는 담체, 희석제 또는 부형제와 적합한 비율로 혼합되고, 원하는 형상 및 크기로 압축된다. 경구 치료적 투여를 위해, 활성 화합물은 담체, 희석제, 또는 부형제와 함께 도입될 수 있고, 삼킬 수 있는 정제, 구강정, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 이러한 치료적으로 유효한 조성물에서 활성 화합물(들)의 양은 바람직하게는 적합한 투약량이 얻어지도록 하는 것이다. 치료적 조성물은 바람직하게는 활성 성분의 약 99%까지를 함유한다.

[0189] 액체 담체, 희석제 또는 부형제는 용액, 현탁액, 에멀전, 시럽, 엘릭시르 등을 제조하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 활성 성분은 약제학적으로 허용가능한 액체, 예컨대 물, 유기 용매, 둘 다의 혼합물, 또는 약제학적으로 허용가능한 오일 또는 지방에서 용해되거나 또는 현탁될 수 있다. 액체 담체, 부형제, 또는 희석제는 다른 적합한 약제학적 첨가제, 예컨대, 가용화제, 유화제, 완충제, 보존제, 감미제, 향미제, 현탁제, 증점제, 착색제, 점도 조절제, 안정제 또는 삼투 조절제를 함유할 수 있다.

[0190] 적합한 고체 담체, 희석제, 및 부형제는, 예를 들어 인산 칼슘, 실리콘 다이옥사이드, 스테아르산마그네슘, 탈크, 당, 락토스, 덱스트린, 전분, 젤라틴, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 에틸셀룰로스, 카복시메틸 셀룰로스 나트

륨, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 저융점 왁스, 이온 교환 수지, 크로스카멜로스 카본, 아카시아, 전호화 전분, 크로스포비돈, HPMC, 포비돈, 티타늄 다이옥사이드, 다결정질 셀룰로스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 한천-한천, 트래거캔스, 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0191] 경구 및 비경구 투여를 위한 액체 담체, 희석제 및 부형제의 적합한 예는 물(특히 상기와 같은 첨가제를 함유하는 것, 예를 들어 셀룰로스 유도체, 바람직하게는 카복시메틸 셀룰로스 나트륨 용액), 알코올(1가 알코올 및 다가 알코올, 예를 들어 글라이콜을 포함) 및 이들의 유도체, 및 오일(예를 들어, 분획화된 코코넛 오일 및 땅콩 오일), 또는 이들의 혼합물을 포함한다.

[0192] 비경구 투여를 위해, 담체, 희석제 또는 부형제는 또한 에틸 올레이트 및 아이소프로필 미리스테이트와 같은 유성 에스터일 수 있다. 또한 비경구 투여를 위한 멸균 액체 형태 조성물에서 사용되는 멸균 액체 담체, 희석제, 또는 부형제가 상정된다. 유리 염기 또는 약학적으로 허용가능한 염으로서 활성 화합물의 용액은 계면활성제, 예컨대 하이드록시프로필셀룰로스와 적당하게 혼합된 수 중에서 제조될 수 있다. 분산물은 또한 글라이세롤, 액체 폴리에틸렌 글라이콜, 및 이들의 혼합물에서 및 오일 중에서 제조될 수 있다. 보통의 저장 및 사용 조건 하에서, 이들 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위한 보존제를 함유할 수 있다.

[0193] 주사용에 적합한 약제학적 형태는, 예를 들어 멸균 주사용액 또는 분산물의 즉석 제제용 멸균 수용액 또는 분산물 및 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에, 형태는 바람직하게는 멸균이고, 용이한 주사능을 제공하는 유체이다. 이는 바람직하게는 제조 및 저장 조건 하에서 안정하며, 바람직하게는 박테리아 및 진균과 같은 미생물유기체의 오염 작용에 대해 보존된다. 담체, 희석제, 또는 부형제는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글라이세롤, 프로필렌 글라이콜, 액체 폴리에틸렌 글라이콜 등), 이들의 적합한 혼합물 및 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅제의 사용에 의해, 분산물의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물유기체의 작용 방지는 다양한 항박테리아 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로뷰탄올, 페놀, 솔브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 다수의 경우에, 등장제, 예를 들어 당 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 달성될 수 있다.

[0194] 멸균 주사용 용액은, 적절한 용매 중에서 상기 열거한 다양한 다른 성분과 함께 필요한 양으로 활성 화합물을 포함시킨 다음 멸균여과에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산물은 상기 열거한 것으로부터 염기성 분산 매질 및 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 멸균 활성 성분을 포함시킴으로써 제조될 수 있다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조방법은 활성 성분 또는 성분들 + 이들의 이전의 멸균-여과 용액으로부터의 임의의 추가적인 원하는 성분의 분말을 수득하는 진공 건조 및 냉동 건조 기법을 포함할 수 있다.

[0195] 본 발명의 화합물은 의학 분야에서 잘 확립된 임의의 통상적인 기법에 의해 유효량으로 투여될 수 있다. 화학식 I 또는 II의 화합물을 포함하는 본 발명의 방법에서 사용되는 화합물은 환자의 신체에서 작용제의 부위 또는 부위들과 활성제의 접촉을 야기하는 임의의 수단에 의해 투여될 수 있다. 화합물은 임의의 통상적인 이용가능한 수단에 의해 투여될 수 있다.

[0196] 바람직하게는 약제학적 조성물은 단위 투약 형태로, 예를 들어 정제, 구강정, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 분말, 용액, 현탁액, 에멀전, 시럽, 웨이퍼, 과립, 좌약 등이다. 이러한 형태에서, 조성물은 적절한 양의 활성 성분을 함유하는 단위 용량으로 하위 분류되며; 단위 투약 형태는 조성물, 예를 들어 포장된 분말, 바이알, 앰플, 사전충전형 주사기 또는 액체를 함유하는 샤셰(sachet)일 수 있다. 단위 투약 형태는, 예를 들어 캡슐 또는 정제 그 자체일 수 있거나, 또는 포장 형태에서 적절한 수의 임의의 이러한 조성물일 수 있다. 추가로, 본 발명의 투약 형태는 캡슐 형태일 수 있되, 하나의 활성 성분은 정제로 또는 복수의 마이크로정제, 입자, 과립 또는 비-페릴(non-peril)의 형태로 압축된다. 이어서 이들 마이크로정제, 입자, 과립 또는 비-페릴은 캡슐에 넣어지거나 또는 캡슐로 압축되고, 가능하게는 다른 활성 성분의 과립화와 마찬가지이다.

[0197] 예방 또는 치료에 가장 적합할 본 발명의 화합물의 투약량은 투여 형태, 선택되는 특정 화합물 및 치료하의 특정 환자의 생리적 특징에 따라 다를 것이다. 일반적으로, 적은 투약량이 초기에 사용될 수 있으며, 필요하다면, 환경 하에서 원하는 효과가 도달될 때까지 적은 증분으로 증가된다. 일반적으로 말해서, 경구 투여는 더 높은 투약량을 필요로 할 수 있다.

[0198] 원하는 투약량은 단일 용량으로 또는 적절한 간격에서 투여되는 분할된 용량으로서, 예를 들어 1일에 2, 3, 4회

이상의 하위 용량으로서 편리하게 존재할 수 있다. 하위-용량 그 자체는, 예를 들어 다수의 별개의 느슨한 간격의 투여로 추가로 분할될 수 있다. 용량은 또한 당업계에 잘 공지된 기법에 의한 화합물의 제어 방출에 의해 제공될 수 있다.

[0199] 본 발명에 따른 조성물의 투여 및 제형화를 위한 본 화합물의 제조에 관한 추가적인 정보는 이하에 제공된다.

[0200] 본 발명의 방법에서 유용한 화합물은 당업자에게 잘 공지된 다수의 방법으로 제조될 수 있다. 화합물은, 예를 들어, 이하에 기재되는 바와 같은 방법 또는 당업자에 의해 인식되는 것과 같은 그의 변형에 의해 합성될 수 있다. 본 발명의 화합물의 제조에서 사용되는 시약은 상업적으로 얻어질 수 있거나 또는 문헌에 기재된 표준방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명과 함께 개시되는 모든 과정은 밀리그램, 그램, 멀티그램, 킬로그램, 멀티킬로그램 또는 상업적인 산업적 규모를 포함하는 임의의 스케일로 실행되어야 하는 것으로 상정된다.

[0201] 변수가 1회 이상 나타나는 본 명세서의 화합물에 대해, 각각의 변수는 변수를 정의하는 마쿠쉬 그룹으로부터 선택된 상이한 모이어티일 수 있다. 예를 들어, 동일 화합물 상에 동시에 존재하는 2개의 R기를 갖는 구조가 기재되는 경우, 2개의 R기는 R에 대해 정의된 마쿠쉬 그룹으로부터 선택된 상이한 모이어티를 나타낼 수 있다.

[0202] 명확함을 위해 별개의 실시형태와 관련하여 기재된 본 발명의 특정 특징은 또한 단일 실시형태와 조합되어 제공될 수 있다는 것이 추가로 인식된다. 대조적으로, 간결함을 위해 단일 실시형태의 내용에서 기재된 본 발명의 다양한 특징은 또한 별개로 또는 임의의 적합한 하위조합에서 제공될 수 있다.

[0203] 본 발명은 다음의 실시예에서 추가로 기재된다. 본 발명의 바람직한 실시형태를 나타내는 동안 이들 실시예는 단지 예시의 방법으로 주어지며, 첨부되는 특허청구범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되는 것으로 이해되어야 한다. 상기 논의 및 이들 실시예로부터, 당업자는 본 발명의 필수적 특징을 확인할 수 있고, 이의 정신과 범주로부터 벗어나는 일 없이, 본 발명의 다양한 변화 및 변형을 다양한 용법 및 조건에 적합하게 할 수 있다.

[0204] **실시예**

[0205] ***HBV cccDNA의 조절***

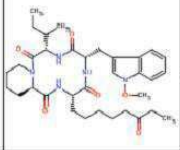
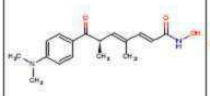
[0206] LMH 유래 dstet5 세포에서의 DHBV cccDNA는 효율적으로 생성되며, 전사적으로 활성이다. 대부분의 HBV 생성 세포주는 숙주 염색체 내로 통합된 HBV 이식유전자로부터 HBV 유전자 산물을 생성하며, 따라서 cccDNA는 바이러스 산물의 주된 공급원이 아니다. 이는 cccDNA를 표적화하는 약물에 대한 선별을 어렵게 한다. 바이러스 유전자 산물은 cccDNA에 의존하는 세포주를 생성하였다. 인간 Hep G2 및 닭 간세포암종(LMH)- 테트라사이클린(tet) 조절된 HBV/DHBV를 이용하는 본 목적을 위해 안정한 세포주를 확립시켰다. 도 1에서 나타내는 바와 같이, 바이러스 역전사를 차단하기 위해 tet의 부재 및 2mM의 포스카네트(PFA)의 존재에서 배양 후, DHBV RNA는 축적되지만, DHBV 복제는 pgRNA-함유 뉴클레오캡시드(레인 0)의 단계에서 저지된다. 이식유전자 전사를 차단하기 위해 배지에 다시 tet을 첨가하고, pgRNA-함유 캡시드에서 바이러스 DNA를 합성시키는 PFA를 제거하였을 때, 바이러스 RNA의 빠른 감소(제1일 및 제2일)가 있으며, 3일 후에 cccDNA가 만들어졌을 때 더 높은 수준으로 종국적인 증가가 있다.

[0207] 이들 결과는 dstet5 세포에서 cccDNA가 효율적으로 형성되고 전사적으로 기능성이라는 것을 나타낸다. 이들 결과는 도 2에서 더 철저하게 입증되는데, 이식유전자 전사가 tet에 의해 차단된 구체화된 조건 하에서, 새로운 HBV RNA의 외관은 cccDNA의 외관과 밀접하게 관련되는 반면(도 2 그룹 II, 나타낸 코어 DNA), 바이러스 전사체는 세포 내에서 빠르게 분해되는데(반감기~3 시간), 이때 cccDNA 합성과 새로운 이식유전자 전사는 둘 다 차단된다(도 2, 그룹 I)

[0208] DHBV cccDNA 전사를 강력하게 억제하는 화합물의 동정. 바이러스 전사체가 cccDNA 의존적 방식으로 생성되는 시스템 및 조건 하에서(도 1, 도 2B), 본 발명자의 인하우스 소 화합물 라이브러리로부터의 화합물, 본 발명자의 천연 생성물 수집에 존재하는 화합물, 및 HDAC, HAT, 시르투인(Sirtuin), 히스톤 메틸트랜스퍼라제, 히스톤 데메틸라제 및 DNA 메틸트랜스퍼라제를 비롯한, 세포의 후성적 변형 효소의 저해제를 포함하는 선택된 화합물을 포함하는, 대략 100종의 화합물을 선별하였다. 표 1에 나타낸 4가지 화합물을 포함하는 수많은 화합물은 cccDNA-유래 DHBV pgRNA의 양을 상당히 감소시켰다. 모두 HDAC 클래스 I 저해제 활성을 소유한다.

표 1

HBV cccDNA 기능 및 HDAC에 대한 그의 활성을 억제하는 화합물[1]

히트	아피시딘	트리코스타틴 A (TSA)	수베로일 비스 하이드록삼산 (SBHA)	다이메틸아미노-하이드록시-벤즈아마이드 (M344)[5]
구조				
HBVcccDNA (EC50, uM)	0.183	0.480	2.50	6.25
독성 (CC50,um)[2]	>20.00	>20.00	>40.00	>100.00
선택성 지수 (SI)[3]	>100	>40	>16	>16
HDAC-I 저해제?	있음[4,5]	있음[5,6,9]	있음[4,6,7,10]	있음[4,7]
HDAC-II 저해제?	없음[3,7]	있음[4,5,6,9]	있음 & HDAC III[11]	있음 & HDAC III,[7,11]

[1] 화합물이 도 2에 도시한 바와 같이 문헌[Prelim Evid]에 기재된 dstet5 시스템에서 HBV cccDNA 기능을 억제하는 것을 발견함.
[2] 본문에서와 같이 dstet5 세포에 대한 본 발명자들의 분석으로부터의 독성; 선택성 지수(SI)는 독성 CC50을 유효성 EC50으로 나눔, 본문 참조.
[3] 선택성 지수(SI)는 세포 생존능력의 50%를 감소시키는 농도(CC_{50})를 HBV 특이적 신호의 50%를 감소시키는 농도(RNA 및/또는 HBeAg)(EC_{50})로 나눔.
[4](7); [5](15)(26); [6](45); [7] 반음 생물학 논문 ; [8](33); [9](13); [10](14); [11](38)

[0209]

[0210] 도 3에서 나타내는 바와 같이, 아피시딘은 5일 동안 20 μM까지에서 독성 없이 cccDNA를 강하게 저해하였고(EC50 ~ 180 nM), 클래스 I에 대해 나노몰 활성을 가지지만, 클래스 II HDAC에 대해서는 나노몰 활성을 가지지 않기 때문에, HDAC II 저해는 이 시스템에서 HBV를 억제할 필요가 없는 것으로 나타난다.

[0211] 아피시딘 및 TSA는 HBV cccDNA 전사를 억제한다. 도 3은 아피시딘 및 TSA가 Dstet5 세포에서 cccDNA 전사를 억제한다는 것을 나타낸다. 이들 화합물은 또한 HepG2 세포에서 HBV cccDNA 전사를 억제한다는 것을 입증하는 증거를 얻었다. 크게 대조적으로, 아피시딘 및 TSA는 숙주 세포 염색체에서 통합된 이식유전자로부터 DHBV pgRNA 전사를 용량-의존적으로 자극하는 것을 관찰하였다(도 4). 이는 더 전형적인 HDAC 저해에 대한 세포 유전자 반응이며, 염색체 DNA와 달리 cccDNA "미니염색체"로부터의 전사가 상이하게 조절된다는 것을 시사한다. 게다가, 오리 시스템에서 알 수 있는 바와 같이, 전사 억제 다음에 탈안정화를 나타내는, cccDNA 수준이 감소되었다는 증거도 있다.

[0212] ***인간 간세포암종 세포에서 HBV cccDNA 전사 시 화합물의 효과.***

[0213] HepDE19 세포를 6-웰 플레이트에 파종하며(seed), 융합(confluence)될 때까지 테트라사이클린의 존재에서 배양시켰다. Tet를 배양 배지로부터 제거하여 pgRNA를 전사시켰고, DNA 합성 및 cccDNA 형성이 일어나게 한다. Tet을 다시 배양 배지에 첨가하여 이식유전자 전사를 중단시킨다. 3일 후, 상이한 웰에서 세포를 2일 동안 "시험" 화합물(표 1로부터 4개 "히트" 및 ~20개의 유사체) 각각의 미처리된 또는 처리된 다른 농도(즉, 0.1 내지 10.0 μM)에 남긴다. 세포내 HBV cccDNA, 바이러스 RNA 및 코어 DNA를 상기 기재한 바와 같은 그리고 공지된 절차에서의 사우던/노던 블롯 혼성화 분석에 의해 정량화한다. 세포내 전장 HBeAg 전구체 및 분비된 HBeAg를 각각 웨스턴 블롯 및 ELISA 분석에 의해 정량화한다. HepG2.2.15 세포를 대조군으로서 사용하는데, 모든 HBV 발현은 이들 세포에서 주로 HBV 이식유전자로부터 유래되기 때문이다. cccDNA 전사를 저해하는 것으로 나타난 인터페론 알파, 및 cccDNA 형성을 저해하는 2치환된-설폰아마이드(DSS) CCC-0975(본 발명자들의 선별로부터, Guo 2012)를 양성 약물 대조군으로서 포함시킬 것이다. 일부 실험에서, 배양물은 배양 배지로부터 "시험" 약물의 제거 후에 다양한 시간(일) 동안 유지시켜 HBV cccDNA의 임의의 약물 유발 억제의 지속성을 결정한다. cccDNA 전사의 시험 화합물의 선택성을 결정하기 위해, 알파1 항트립신, 알부민을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 세포 유전자 패널의 발현에 대한 시험 화합물의 효과를 또한 정량적 RT-PCR 또는 노던 블롯 혼성화에 의해 측정한다. 화합물

의 세포독성을 평행 배양에서 MTT 분석에 의해 결정한다.

[0214] HBeAg 및 HBV 전사체 감소의 양(0 내지 100%)을 HBV cccDNA 전사 억제의 측정으로서 취한다. HBV cccDNA 감소의 양(0 내지 100%)을 HBV cccDNA의 탈안정화 및 분해의 측정으로서 취한다. A1AT의 억제량 및/또는 알부민 mRNA 감소량(0 내지 100%)을 특이성 결정에서 세포 기능 저해의 측정으로서 취한다. MTT(0 내지 100%) 활성의 양을 세포 생존력의 측정 및 세포독성(cell cytoxicity: CC) 기준으로서 취한다. 선별지수(Selectivity Index: SI)는 표 1 범례에서와 같다.

[0215] 1차 마멋 간세포에서 WHV cccDNA 전사 시 화합물의 효과. 마멋 간세포 바이러스(Woodchuck Hepatitis Virus: WHV)는 HBV에 대한 치료를 평가하기 위한 유용한 모델이었다. 따라서, 계획을 위해 선도 화합물이 WHV에 대해 활성인지 여부를 아는 것은 유용하다. 1차 마멋 간세포 배양물(Primary woodchuck hepatocytes culture: PWHC)은 50 내지 90%의 간세포가 WHV를 보유하는 조건 하에서, 만성으로 감염된 마멋으로부터 얻은 작은 절편 생검으로부터 유래된 콜라게나제 처리 조직을 플레이팅함으로써 제조되며, 배양물(90% 이상)은 간세포이고, 앞서 행한 바와 같은 배양에서 적어도 2개월 동안 유지시킬 수 있다(문헌[*Fletcher SP, et al. 2012. Transcriptomic analysis of the woodchuck model of chronic hepatitis B. Hepatology: In press*). 파종 7일 내에, 시험 화합물의 부재 또는 존재에서 배양물을 인큐베이션시키고, 배양 배지(WHV 비리온 결합 DNA; WH)에서 및 세포내로(WHV DNA, WHV RNA 전사체) WHV 유전자 산물의 양을 앞서 사용되고 공개된 바와 유사한 방법을 사용하여 결정한다(*Guo, H., et al. 2010. Production and function of the cytoplasmic deproteinized relaxed circular DNA of hepadnaviruses. J Virol 84:387-396; Guo, et al. 2011. Alkylated porphyrins have broad antiviral activity against hepadnaviruses, flaviviruses, filoviruses, and arenaviruses. Antimicrob Agents Chemother 55:478-486*)

[0216] 조류 및 인간 시스템과 유사한 SI에서 WHV가 아피시딘 및 다른 후보 cccDNA 저해제에 민감하다면, 만성으로 감염된 마멋을 효능 연구의 생체내 증거를 위해 사용한다.

[0217] 저해제는 (i) HBV cccDNA 전사 대 세포 생존력을 저해하는데 가장 선택적인 그들의 선별지수(SI)에 의해, 그 다음에 가장 매력적인 세포 기능에 의해; (ii) cccDNA 전사(가장 낮은 EC50)를 저해하는 그들의 효능에 의해, 그리고 최종적으로, (iii) "중요 화학물질"(critical chemistry)(확장성 유형/제형) 쟁점에 의해 순위 매겨진다. 가장 낮은 값의 EC_{50}(cccDNA-전사 RNA의 50%를 저해하는 농도) 및 가장 큰 SI를 지니는 화합물이 가장 매력적이다.

[0218] ***HDAC 아이소폼(Isoform)의 동정***

[0219] 1차 선별에서 동정된 각각의 화합물은 HDAC 저해제 활성을 갖는 특성을 공유한다(예를 들어, 표 1 참조). HDAC 저해는 이들 화합물의 HBV 항바이러스 작용의 메커니즘의 부분 또는 중심인 가능성이 있다. 화합물의 메커니즘을 정확하게 아는 것이 필요하지는 않지만, 이 정보는 변형된 화합물을 선별하거나 또는 설계하는데 뿐만 아니라 가능한 생체내 독성을 예측하고 감소시키며, 임상 연구를 설계하는데 도움을 준다. 또한 결정 구조가 다수의 HDAC에 대해 이용가능하기 때문에, 장래의 약물 설계가 보조될 수 있다. 합쳐서 생각하면, 연구에서 및 사람에서 HDAC 저해제를 이용하는 증가된 경험은 현재의 임상 설계 및 미래 계획을 위한 방향을 제공할 수 있다.

[0220] HDAC 데아세틸레이트 폴리펩타이드(즉, 히스톤)는 기능 및 DNA 서열 상동성에 기반하여 4가지 범주로 분류된다. 클래스 I 및 II HDAC는 트리코스타틴 A(trichostatin A: TSA)에 의해 저해된다. 아피시딘은 클래스 I을 효율적으로 저해하지만, 클래스 II HDAC는 그렇지 않다. 시르투인으로 불리는 클래스 III HDAC는 TSA에 의해 영향받지 않는 NAD+-의존적 단백질의 패밀리이다. 클래스 IV는 DNA 서열에 기반하여 비전형적 범주로 고려된다. 아피시딘 및 TSA는 cccDNA 전사를 강하게 저해하기 때문에, 클래스 I 및 II에서 HDAC 아이소자임이 가장 적절하다. 그러나, 아피시딘이 클래스 I만을 저해하기 때문에, 초기의 초점은 이 클래스만에 대한 것이다.

[0221] 실험 세부사항: shRNA에 의한 HDAC 아이소자임 전사체의 침묵 및 HBV cccDNA 기능에 대한 영향. 렌티바이러스 형질도입 벡터로부터 발현시킨 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)는 현재 shRNA가 상동성인 전사체의 번역을 억제하기 위한 표준 도구이다. 클래스 I HDAC 아이소자임에 초점이 있다. 따라서, cccDNA 의존적 방식에서(상기 기재한 바와 같음, tet 억제 후) HBV 유전자 산물을 발현시키는 HepDE19 세포의 융합 단일층을 형질도입 혼합물에서 100 ㎕의 렌티바이러스(~5 x 10^7/㎖)를 이용하여 형질도입하며, 적어도 95%의 세포가 shRNA를 수용하거나 발현시키는 조건 하에서 클래스 I-1,2,3 또는 8 아이소자임에 대해 선택적인 shRNA를 발현시킨다. 이는 레트로바이러스 이식유전자로부터 수용체의 발현에 의해 결정한다. shRNA 렌티바이러스 발현 벡터는 준비된 형질도입으로서 공급업자에 의해 제공되며, 각각의 벡터는 서브-클래스 I의 상이한 HDAC를 표적화한다. 그들을 공급업자(예를 들

어, 산타 크루즈 바이오(Santa Cruz Bio), 오픈바이오(OpenBio))로부터 구입하고, 표적화되어야 하는 각각의 HDAC 아이소자임 전사체에 상동성인 19 내지 25nt를 지니는 짧은 헤어핀을 함유하며 발현시킨다. 예를 들어, 하나의 HDAC 1 특이적 shRNA는 5′ -GAT CCC CGC AGA … ATC TGC TTT TTG GAA A-3'을 함유하며, 공급업자에 의해 그리고 이전의 작업으로부터 제공된 바와 같이, 나머지는 유사하게 설계되지만 다른 shRNA에 대해서는 특이적이다. 각각의 HDAC 아이소자임에 대해 4- 및 5-배 적용범위가 있다. 대조군 벡터는 스크램블(scrambled) 서열을 함유하며, 음성 대조군으로서 사용한다. shRNA 렌티바이러스 형질도입의 5일 후, 특이적 HDAC의 억제를 RNA 분석 및 웨스턴 블롯에 의해 정량화하며(공급업자에 의해 제공된 HDAC 특이적 프로브 및 단클론성 항체를 이용함), HBV cccDNA 및 cccDNA 의존적 전사체, 및 HBeAg의 양은 전술한 설명에서 수행한 바와 같이 측정한다. 일시적 형질도입 접근이 불만족스러운 경우, 약간 더 관련됨에도 불구하고, 안정한 형질도입이 사용되는데, 선별마커와 함께 shRNA 작제물이 사용되기 때문이다. 세포 유전자 발현(A1AT 및 알부민 mRNA)의 양은 또한 상기 기재한 바와 같이, 특이성 대조군으로서 정량화시킨다. 양성 대조군은 HBV cccDNA를 억제하는(그리고 HepDE19에 대해 적합한) 농도인 1000nM에서 아피시딘과 함께 HepDE19 세포의 인큐베이션을 포함한다. 각각의 상이한 HDAC는 성공적인 HDAC 하위 클래스 저해의 증거로서, 요망된다면, 정량화된 특이적 세포 기능(즉, 1, p53의 상향 조절, 2 및 3 p21, 8, H4의 탈아세틸화)과 관련되었다.

[0222] 아피시딘의 효능을 고려하면, 클래스 I HDAC 중 적어도 하나의 침묵은 HBV cccDNA 기능의 유의한 억제를 야기할 것으로 예상된다. 다중 HDAC에 대해 작용하는 HDAC 저해제는 단일 HDAC 전사체 녹다운에 의해 달성될 수 있는 것보다 더 큰 효과를 가질 수 있는 것으로 인식된다. 그러나, 본 발명자들은 모든 클래스 I 효소를 다루는 렌티바이러스 조합을 사용하여 실험을 수행한 것을 녹다운시켰는데, 이는 클래스 I 효소가 관련된다면 HBV cccDNA를 억제하여야 하지만(아피시딘이 시사한 바와 같이), 다수 효소가 HBV cccDNA 저해를 검출하도록 억제되어야 하기 때문이다.

[0223] HDAC 전사체의 특이적 또는 그룹의 침묵이 HBV cccDNA 기능의 억제를 초래하는 경우, 이는 HBV 항바이러스 작용에 대한 표적으로서 입증되며, 동정된 화합물의 항-HBV cccDNA 작용 메커니즘이 HDAC 저해를 수반한다는 발견을 제공한다. 화합물은, 물론 HBV cccDNA 억제를 위해 다른 메커니즘을 사용할 수 있었지만, 적어도 HDAC 저해는 HBV cccDNA를 억제하는 것으로 알려질 것이며, 이제 새로운 클래스의 HBV 치료 전략에 대한 문이 열린다.

[0224] 동정된 화합물이 HBV cccDNA 억제를 초래하는 HDAC 아이소자임에 대해 가장 큰 저해 효과를 가진다는 것의 결정. HBV cccDNA를 조절하는 것을 초래하는 특이적 HDAC 아이소자임을 동정한 것은, HBV cccDNA 조절 아이소자임을 저해하는 가장 큰 선택성을 갖는 화합물을 동정하는데 유용하다. 이는 가장 큰 선택성을 지니는 화합물을 진보시키며, 조절 HBV cccDNA에 관련되지 않은 HDAC 아이소자임을 불필요하게 저해하는 것으로부터 초래되는 표적을 벗어나는 효과를 피하게 한다. 본 발명자들은 표 1에서 상기 정의한 4종의 화합물을 주목하며, 아피시딘은 가장 큰 선별지수를 가지고, 또한 가장 좁은 HDAC 저해 프로파일을 지니는 것이다(HDAC 클래스 I에 대해 선택적). 따라서, 넓은 HDAC 저해제를 피하고 HBV cccDNA를 억제하기에 충분한 특이적 HDAC 서브-아이소자임에 대해 확대하는 것에 의해 훨씬 더 큰 선택성을 달성할 수 있다.

[0225] 각각의 HDAC 클래스 I(1,2,3,8) 아이소자임에 대한 효소 분석은 양성 및 음성 경쟁적 저해제 대조군을 이용하여 상업적 키트로서 이용가능하다. 바이오테크(BioTeK), 비피에스 바이오사이언스(BPS Bioscience) 또는 다른 이용가능한 공급원으로부터의 상기 동정한 바와 같은 적절한 아이소자임에 대응하는 키트를 구입한다. 간략하게는, 바이오테크 시스템에 의해, 서브 클래스 특이적 정제 HDAC 효소(재조합체, ~10 내지 50ng/용기에서)가 형광원 기질에 의해 제공되고, 사전혼합한 반응에서 현상액에 의해 탈아세틸화 후 검출된다. HBV cccDNA 억제에 관련되는 것으로 침묵에 의해 나타난 효소를 구입한다. 대조군 또는 각각의 실험 화합물의 양을 달리하여 효소 반응 혼합물과 함께 인큐베이션시킨다.

[0226] 분석 판독을 시간과 효소 농도의 함수로서 선형으로 최적화한다. HDAC 아이소폼의 데아세틸라제 활성의 50%를 억제하는데 필요한 시험 화합물의 농도(즉, IC50)로부터의 키트는 시그마플롯(SigmaPlot) 소프트웨어(캘리포니아주 새너제이에 소재한 시스탯 소프트웨어 인코포레이티드(Systat Software, Inc.))를 사용하는 회귀 분석에 의해 계산한다.

[0227] 동일하게, 그리고 가장 논리적으로, 상기 기재한 절차에 따라 활성이 되는 것으로 발견된 화합물은 HBV cccDNA 조절에 가장 연루되는 것으로 발견된 HDAC에 대해 활성이며, 이들은 선호되는 화합물을 나타낸다. 활성이지만 HDAC를 크게 저해하는 화합물은 다소 덜 선호되는데(이들 중 일부는 HBV cccDNA 조절에 대해 적절하지 않은 것을 발견하였음), 그들은 불필요한 부작용을 초래할 수 있기 때문이다. 반면에, 분리되고, 선행 분석에서 활성인 화합물이 HBV cccDNA 조절에 가장 중요한 것으로 발견된 HDAC를 저해하지 않은 경우, 화합물을 HBV cccDNA 억제

활성에 기반하여(HDAC 저해 순위에는 기반하지 않음) 진행한다.

[0228] ***시험관내 흡수, 분포, 대사 및 독성(Absorption, Distribution, Metabolism and Toxicity: ADMET) 특성 HBV 생성 세포 및 비생성 세포에 대한 선도 화합물의 평가***

[0229] 도입 및 이유 생체내 실험은 비용이 들고, 윤리적으로 제한되어 있다. 동물에서 시험 전, 잠재적 독성 및 다른 세포-혈청- 가능한 정도로 생체내 성능을 예측하는 상호작용 특성에 대해 초기 프로파일 화합물에 신중을 기한다. 이들 연구는 해당 분야에서 표준이 된다. 복제 세포에서의 독성은 또한 독성에 관해 화합물을 순위 매기는 양호한 방법이 되는 것을 발견하였다. 최종적으로, 생체내 작업으로 이동하기 전에 상이한 제형이 또한 보통 필요한데, 조직 배양 설정에서 사용한 용매가 항상 생체내 투여와 양립가능하지는 않기 때문이다. 이들을 하기와 같이 사용한다. 시험관내 "ADMET"에서의 혁신은 현재 제안되고 있는데, 여기서 프로파일링은 일상적인 ADMET에 추가로 현재 승인된 항바이러스 요법의 존재에서 HBV 생성 세포에 의해 수행된다.

[0230] 새로운 항-HBV 약물이 현재의 용도에서 다른 HBV 항바이러스 약물과 병용되어 사용될 가능성이 있다. 병용 요법은 HIV 및 HCV 및 다른 감염성 질병을 나타낸다. HBV를 치료하기 위한 새로운 약물이 현재의 치료 표준의 존재에서 독성 또는 다른 변경된 프로파일을 가지는지 여부를 아는 것은 중요한데, 다수의 달리 잘 용인된 의약이 만성으로 감염된 개체에서 선택적 독성을 가진다는 증거가 있기 때문이다. HBV 생성 세포는 비생성 세포(차단, 진행중)보다 일부 의약에 대해 더 민감할 수 있다. 따라서, 이하의 독성 실험을 HBV 폴리머라제 저해제 및 일부 경우에 인터페론 알파(IFNa)의 부재뿐만 아니라 존재 하에 수행한다.

[0231] 본 선도 화합물의 일부는 동물에서(나머지에 의해) 이미 사용된 적이 있을 수도 있고, 상당한 이용가능한 정보가 있을 수 있다. 다른 한편으로, 선도 화합물의 일부는 동물 데이터가 없는 새로운 화합물일 수 있다. 상기 언급한 이유로 HBV 감염과 관련하여 화합물 프로파일을 또한 시험한다.

[0232] 최종적으로, 야생형 HBV cccDNA를 억제하는 화합물이 기능하며, 시험관내에서 잘 용인되고, HBV 폴리머라제 저해제에 대해 내성이 있는 HBV로부터의 cccDNA를 억제하는 그들의 능력에 대해 시험한다. 선행 연구 결과에 따라서, 인간 및/또는 오리 HBV 형질감염(오리에 대해, 감염) 시스템을 사용한다.

[0233] 이하에 기재하는 모든 실험에 대해, 공지된 독성, 물질대사, 단백질 투과성, 막 수송 및 정해진 제형 특성을 지니는 대조군을 포함시킨다. 예를 들어, 바라클루드 및 FIAU는 HBV 생성 세포에서 검출가능한 독성이 없는 화합물에 대한 그리고 각각 비교될 수 있는 PK 및 TK 특성을 보고하며, 보고했던 화합물에 대한 대조군으로서 포함된다.

[0234] 실험 세부사항: 시험관내 "투여, 분포, 물질대사, "제거" 및 독성"(ADMET) 연구. 이들 실험 중 일부를 공급업자(즉, 압솝션 시스템즈(Absorption Systems)) 및 기타(특히 HBV 생성 세포 및 물질이 사용됨)에 의한 접촉 하에서 수행하며, 이하에 나타내는 바와 같이 본 발명자들에 의해 수행한다.

[0235] *표준 세포독성 분석*: 구성적(HepG2.2.15) 및 테트라사이클린-유도성 HBV 복제(HepDE19 및 HepDES19)를 뒷받침하는 인간 간세포암종(HepG2, Huh7, HepRG) 및 HepG2-유래 세포주를 웰 당 2 x 10^4개 세포의 밀도에서 96-웰 플레이트에 파종한다. 세포를 시험 화합물의 단계희석에 의해 처리한다. 배양 배지를 격일로 변화시킨다. 처리 이후로 MTT 분석을 제2일, 제4일, 제6일, 제8일 및 제10일에 수행한다.

[0236] *증식 세포에 대한 독성*: 선도 화합물(들)의 농도를 달리하여 HBV 생성 및 비생성 조건 하에 저밀도에서(32㎜ 접시의 웰 당 100개 세포) 파종한 HepRG 세포와 함께 인큐베이션시켰고, 3일마다 배지를 바꾸면서 10일 동안 배양시켰다.

[0237] *인간 및 마우스 간 마이크로솜에서의 대사적 안정성*: 화합물은 NADPH의 존재에서 HBV 생성 및 비 생성 세포(상기와 같은 조직 배양물 공급원)로부터의 인간 및 마우스 마이크로솜과 함께 인큐베이션시킨다. 추가로, 화합물의 안정성은 인간 인공 위액 및 인공 장액의 존재에서 평가한다. 이 실험 세트의 목적은 또한 화합물이 분해 효소에 의해 대사되는지 여부를 결정하는 것이다. 경구로 입수가능한 화합물을 추구하기 때문에, 만약에 있다면 대사물질이 GI 관에서 생성되는 것을 발견하는 것이 중요하다.

[0238] 독성 및 대사 안정성 연구를 사람에서 전형적으로 달성된 인터페론 알파(IFNa)의 혈청 수준 또는 동일 내지 몇 배의 라미뷰딘, 바라클루드, 텔비부딘, 테노포비어 및/또는 아데포비어(바라클루드에 대해 ~0.1㎍/㎖, 라미뷰딘에 대해 -10 ㎍/㎖)의 농도의 부재 및 존재에서 수행한다. 상기 기재한 분석에서 결정한 바와 같이 cccDNA 억제 시험 화합물을 그것의 IC50의 10배로 사용한다. 대조군 화합물(확립된 독성 및 확립된 대사 프로파일을 지님)을 또한 각각의 시험 패널을 이용하여 포함시킨다(즉 FIAU, 스타틴 등).

[0239] *혈장 단백질 결합*: 이 분석에서 평형투석을 사용하여 인간 혈장 단백질(공급업자에 의해)에 결합되는 화합물의 백분율을 결정한다.

[0240] *양방향성 침투성*: 이 분석을 사용하여 정점-대-기저외측 및 기저외측-대-정점 방향으로 Caco-2 세포 단일층을 통해 화합물의 침투성을 결정한다. (계약자)

[0241] *인터페론(IFN)의 존재에서 선도 화합물의 항바이러스 활성*. 상기 실험은 미감염 세포에서 폴리머라제 저해제 또는 인터페론과 병용하여 사용할 때, 선도 화합물의 시험관내 ADMET를 탐구한다. 또한 선도 화합물이 확립된 항바이러스제의 항바이러스 특성에 영향을 가지는지 여부를 결정하는 것은 중요하다. pol 저해제와 비교하면, IFN 알파 (a)는 HBV를 관리하는데 덜 빈번하게 사용된다. 사용될 때, 이는 수년동안 사용하며 cccDNA 저해제와 함께 공동 투여될 가능성이 더 높은 pol 저해제와 달리, 일정 개월 동안만 사용된다. 그러나, 항바이러스 작용 및 독성의 IFNa 메커니즘이 HDAC를 수반할 수 있다는 사실을 고려하면, 이것이 시험관내에서 평가될 수 있는 정도로, IFNa와 그들의 상호작용 프로파일을 위해 현재 개시된 cccDNA 저해제를 평가하는 것에 의미가 있다. 따라서, 클로닝 밀도(성장 연구에 대해) 및 반 융합(항바이러스/cccDNA 전사 연구에 대해)에서 파종된 HBV cccDNA(예비 증거 및 Cai 2012에서와 같음)로부터의 전사체를 생성하도록 프로그래밍한 dSTET 세포 및 AD38 세포를 후보 cccDNA 저해제의 여러 농도의 부재 및 존재에서 및 HBV 시험관내를 억제하는 것으로 알려진 조류 IFN 또는 인간 IFNa 중 하나의 양의 존재 및 부재에서 인큐베이션시킨다. 세포 생존력 및 생성된 HBV cccDNA 유래 유전자 산물(전사체)의 양을 앞서 기재한 절차 및 문헌에 공지된 것과 같이 결정한다.

[0242] 또한 화합물을 현재 사용하는 폴리머라제 저해제의 존재에서 시험관내 활성에 대해 시험한다. HBV 폴리머라제의 뉴클레오사이드/타이드 저해제에 내성이 있는 돌연변이체 바이러스의 출현은, 사용한 폴리머라제 저해제에 따라 문제는 다르지만, 만성 감염의 관리에서 문제가 된다. 따라서, 야생형 HBV cccDNA 기능을 억제하는 화합물을 HBV 폴리머라제 저해제에 대해 내성이 있는 HBV로부터의 cccDNA를 억제하는 그들의 능력에 대해 시험한다. 필요한 모든 돌연변이체 바이러스(DHBV 및 WHV)가 이용가능하다. 인간 및/또는 오리 HBV 형질감염(및 오리에 대해, 감염) 시스템을 사용한다. 별개의 작용 메커니즘을 고려하면, 본 화합물은 항바이러스 활성을 보유한다.

[0243] *제형 최적화*: 선택 화합물에 대해, 경구 위관영양법에 적합한 투약 비히클 개발을 평가한다. 시험 비히클은 1) pH 조작, 2) 공-용매(예컨대 글라이신, 폴리에틸렌 글라이콜 프로필렌 글라이콜, 에탄올 등), 3) 계면활성제(예컨대 폴리솔베이트, 폴록사머, 폴리옥실 피마자 오일, 글라이세릴 및 PEG 에스터), 4) 비수성 시스템(예컨대 참깨 오일, 중간쇄 트라이글라이세라이드, 대두 오일, 올레산), 5) 착화제(예컨대 사이클로덱스트린)를 포함한다.

[0244] ADMET 관점으로부터, 내약성에 대해 바라클루드와 유사한 특성을 갖는 화합물이 바람직하다. 또한 HBV 폴리머라제 저해제(라미뷰딘, 바라클루드, 인터페론 등)의 부재시, 그들의 존재에서와 같은 동일한 독성 및 대사 안정성 프로파일을 갖는 화합물이 바람직하다. HBV 생성 세포에 대해 선택적 독성을 지니는 화합물은 선호되지 않거나, 자격이 없거나 또는 별도의 주의에 의해 진행된다. 현재의 HBV 항바이러스제의 독성을 증진시켰거나 증진시키거나, 또는 항바이러스 활성의 해당 화합물을 길항하는 화합물을 여전히 진행하지만, 주의해서 병용으로 증진된 독성의 가능성에 대한 생체내 실험에 대해 시험한다. cccDNA 활성 화합물을 병용하여 사용하지 않을 것(또는 단지 조심해서 사용)을 제안할 수 있다.

[0245] ***바람직한 시험관내 특성을 지니는 선도 화합물의 규모를 확장하고, 생체내 독성, 약물 동력학(Pharmaco kinetics: PK) 및 효능에 대해 확대하고 시험한다.***

[0246] 약물동력학적, 독성-역학적(Toxico-Kinetic: TK), 및 용량 범위 발견 연구. 비용이 들고, 윤리적으로 제한되며, 상당량의 화합물을 소모하는 생체내 효능 연구를 수행하기 전에, 미감염 동물에서 후보 약물의 생체내 최대 내약 용량(maximum tolerated dose: MTD) 및 약물동력학적 특성(PK)을 결정할 필요가 있다. 이는 화합물의 가치의 진보를 동정하게 하며, 적절한 투약 및 투여 경로를 확립시킨다. 만성 헤파드나바이러스 감염의 오리 및/또는 마멋 모델 중 하나(또는 둘 다)에서 화합물을 효능에 대해 시험하는데, 이들은 확립되고 예측되는 동물 모델이기 때문이다. 오리 대 마멋에 대한 이유를 이하에 기재한다. 아피시딘 그 자체에 관하여, 동물에서 아피시딘의 PK/TK에 대해 이미 많이 알려져 있는데, 그것이 이미 마우스에서 사용되었기 때문이다. 그러나, 아피시딘에 대해서 조차 그리고 틀림없이 본 발명의 어떤 다른 것에 대해서, 오리 및 마멋 연구에 대한 새로운 PK, TK가 필요하다. 따라서, 일련의 뮤린 및 래트 PK 및 TK 연구를 다음과 같이 수행한다.

[0247] 실험 세부사항 - *마우스, 오리 및 바람직하다면 마멋에서 단일 용량 약물동력학적 연구*. 본 연구의 목적은 분포 용적, 전신 클리어런스, 반감기(T1/2), 최대 혈장 농도(Cmax) 및 생체이용가능성을 얻기 위한 것이다. 이들 파라미터를 사용하여 각각의 이미노 당의 클리어런스 및 생체이용가능성을 평가하며, 따라서 화합물을 혈장 농도

를 유지하는 그것의 능력에 따라 랭킹할 수 있다. 화합물이 진행하는데 일반적으로 50% 초과의 생체이용가능성이 바람직하다.

[0248] 상기 기재한 바와 같이, 후보를 마우스(6주령 Balb/c; 6 마우스/그룹); 북경 오리(6주령) 또는 마멋(그룹 당 3마리)에 대해 i.v. 주사를 통해(5mg/kg) 또는 경구로(25mg/kg) 투여한다. 투약 후 몇몇 간격으로 임상적 관찰을 기록한다. 약물동력학에 대한 혈액 및 소변 샘플을 투약 전에, 및 투약 후 5, 15 및 30분, 1, 2, 4, 6, 8, 16 및 24시간에 수집한다. 투여 약물(약물 또는 프로드러그)의 존재 및 양에 대해 및 투여 프로드러그의 경우에, "약물" 대사물질의 존재 및 양에 대해서도 샘플을 분석한다. 본 발명자의 다른 화합물에 대해 마우스 혈장 분석을 확립한 압솝션 시스템즈에 의해 샘플을 분석한다.

[0249] *조직 분포(뮤린).* 투여 후 다양한 시점에 화합물의 단일 경구 또는 iv 투여를 받은 마우스(용량 그룹 당 3마리)로부터 조직을 취한다. 화합물의 조직 분포의 지식은 성공적인 약물 후보로서의 가능성을 평가하는 것을 상당히 보조할 수 있다. 다른 시험관내 파라미터, 예컨대 혈장 단백질 결합 및 분포 용적이 혈관 밖 조직에 대한 분포 정도 및 비율에 대한 예측 값을 가지더라도, 약물의 간 조직 농도는 아마도 효능과 가장 관련 있을 것이다. 마우스에서 i.p. 및 경구 경로에 의해 화합물의 단일 투여 후에, 종말점 샘플을 사용하여 후보의 조직 농도에 대해 혈장, 신장 및 복부 지방조직/림프절에 비해 간에서 유지하는데 초점이 있다. 관심 대상의 한 요점은 활성 화합물이 중요 조직을 구성하는지 여부인데, 이는 조직에서 그것의 효과적인 반감기에 대한 이해를 제공한다. 즉, 약물의 혈청 반감기가 ~2 시간일 수 있지만, 이는 간에서 몇 배의 조직 반감기를 가질 수 있었는데, 이는 예상 효능보다 더 크거나(주어진 투약 요법에 대해) 또는 예상 독성보다 더 크다는 것을 설명한다.

[0250] *용량-발견 최대 내약 용량(Maximum Tolerated Dose: MTD) 연구.* 화합물을 뮤린 모델에서의 항바이러스 활성에 대해 평가하기 때문에, 마우스에서 화합물의 내약성을 아는 것은 중요하다. Balb/c 마우스(6주령, 그룹 당 6마리); 오리(6주령, 그룹 당 3마리)를 "비히클" 단독으로 또는 화합물이 용해된 비히클로 경구 위관영양법에 의해(본 발명자들은 경구로 이용가능한 화합물을 추구함) 투약할 것이다. 이전의 경험으로부터, 투여 화합물의 범위는 그룹 당 5마리 마우스에서 100mg/kg 내지 500mg/kg의 가능성이 있다. 동물을 체중 및 생존가능성의 종말점을 매일 판독하면서 14일까지 관찰할 것이다. 일상적인 조직학 및 임상 화학 연구를 수행한다. 임의의 사망률/독성을 초래하지 않는 화합물의 가장 높은 용량이 MTD가 되는 것으로 고려한다. 이 MTD 연구를 위해 마멋을 사용할 수 없으며; PK 마멋 연구와 조합된 뮤린 연구로부터의 외삽법이 필요할 것이다.

[0251] 화합물을 그들의 경구 생체이용가능성, 내약성 및 반감기에 대해 랭킹한다. 이상적인 화합물은 가용성, 경구, 1일 투약에 의해 조직 배양 IC50 농도의 적어도 10배의 혈청 또는 간 조직 수준에 도달하고 지속될 수 있으며, 조직 배양 IC50의 100배 초과의 MTD를 가진다. 이들 특성에 대해 화합물을 랭킹하고, 최선 및 차선을 진행할 것이다.

[0252] *만성적으로 감염된 동물 모델에서 생체내에서 선도 화합물이 효능있는가?* 시험관내 효능 및 생체내 작업을 위해 결정된 안전하고 합리적인 투약을 입증하면, 만성 HBV의 입증된 동물 모델에서 선도 화합물이 바이러스 수준을 제어할 수 있는지 여부를 아는 것이 중요하다. 이는 cccDNA를 표적화하는 소분자 약물이 처음으로 동물에서 시험된다는 것을 나타낸다. 안전하고, 선택적이며, cccDNA 표적화제와 일치되는 결과는 관심 대상이다. 효능 및 종말점은 바이러스혈증, 항원혈증에서의 빠르고 공동작용된 감소뿐만 아니라 간내 cccDNA의 양 및 cccDNA 억제를 나타내는 복제 형태를 포함한다. 이들 목표는 사용한 동물 모델 및 연구한 처리 기간에 영향을 준다.

[0253] 만성 HBV 감염의 몇몇 동물 모델이 존재하며, 각각은 장점뿐만 아니라 단점을 가진다. 오리 및 마멋은 각각 오리 및 마멋 헤파드나바이러스로 실험적으로 만성으로 감염시킬 수 있다. 현재 몇몇 뮤린 모델이 있지만, HBV 이식유전자를 보유하는 유전자이식 마우스는 cccDNA 표적 화합물을 시험하는데 cccDNA 주형으로부터 HBV를 생성하지 않기 때문에, 인간 간세포를 지니는 키메라 마우스, 예컨대 uPA 마우스가 필요하다. 실행적 고려사항은 선택을 필요로 한다. 만성 HBV의 오리 모델에서 평가를 위한 실험을 설계하는데, 화합물은 배양물 내 조류 세포에서 오리 바이러스에 대해 활성이기 때문에, 이미 공지되어 있다. 만성으로 감염된 마멋에서의 연구를 또한 준비하는데, 이는 시험 HBV 치료제에 대해 확립된 모델이며, 천연 감염이기 때문이다. 마멋이 약물에 대해 민감하지 않지만, 인간 HBV에 민감하다면, uPA 마우스는 매우 비용이 들긴 하지만, 행할 것이다.

[0254] 따라서, 바람직한 화합물은 이하에 정하는 바와 같이 다음의 오리, 및 적절하다면 마멋에서 필요한 양까지 확대하며, 효능에 대해 시험한다.

[0255] *실험 세부사항 - 바람직한 화합물 생성의 규모확장.* 아피시딘을 푸사리움(즉, ATCC 74322 종)에 의해 발효로 생

성한다. 균주를 MED5로 불리는 영양 배지에 접종시키고, 제어한 습도 분위기에서 12 내지 16일 동안 220rpm에서 진탕시킨다. 채취 시, 전체 브로스를 메틸에틸케톤을 이용하여 추출하고, 추출물을 세파덱스(Sephadex) 상의 겔 여과 다음에 RP-HPLC에 의한 최종 정제에 의해 분획화한다. 수율은 250 ㎎/ℓ의 규모이고, 따라서 그램 양까지 확대하는 것은 일상적이다.

[0256] *오리 헤파드나바이러스 효능 연구*. 아피시딘은 배양물에서 DHBV에 대해 고도로 활성인 것으로 알려져 있기 때문에, 그것을 만성으로 감염된 오리에서 시험한다. 이 연구의 목적은 바람직한 화합물의 항바이러스 퍼텐셜을 결정하는 것이다. 혈청학 및 조직학은 2차적이다.

[0257] DHBV 16형(알베르타 스트레인(Alberta Strain))으로 만성적으로 감염시킨 6주령 북경 오리를 사용한다. 제6주에, 오리에서 바이러스혈증 및 간 덩어리는 안정화되는 경향이 있다. 오리에 i.m. 또는 경구 위관영양법(목표 4 PK/TK 결과에 따름), 시험 화합물(3 용량 그룹, PK 결과에 따른 투약량 및 빈도에 의하지만, 조직 배양물 IC50의 적어도 10배의 안정한 혈청 수준을 달성하는 것을 목적으로 함)에 의해 제공한다. 용량 그룹 당 5 내지 6마리 동물의 3 용량 그룹이 있다. 대조군 용량 그룹(각 그룹 당 6마리 동물)은 위약 처리 동물 및 1일당 바라클루드(1mg/kg) 또는 라미뷰딘(40mg/kg)으로 처리한 동물을 포함한다. 모든 용량 그룹으로부터 적어도 3마리 동물은 적어도 하나의 처리 전 및 하나의 처리 후 간 생검에 기여한다. 처리는 10주 동안인데, 이는 오리에서 라미뷰딘이 cccDNA의 보고된 반감기 및 검출가능한 수준 이하로 바이러스혈증을 억제하는 시간을 초과하기 때문이다. 오리는 약물의 회수 후 추가 4주 동안 매주 혈청 수집에 따랐다. 혈청을 매주 수집할 것이다.

[0258] 매주 혈청은 표준 "실험실 값"(혈액학, 알부민, AST, ALT)에 대해 결정하였고, 순환에서 DHBV 바이러스 DNA, sAg, sAb의 양을 결정한다. 생검으로부터 유래된 간 조직(동일 동물로부터 일부 처리 전 및 처리의 마지막)을 DHBV DNA(cccDNA, 복제 형태) 및 DHBV 코어(면역염색)에 대해 시험한다.

[0259] *WHV-감염 마멋 연구*. 연구는 그룹마다 5마리 동물이 있는 10개 그룹을 사용하며, 10주 동안 약물 처리 후 10주는 약물을 중단한다(영향의 지속성을 시험함). 바이러스혈증 및 항원혈증의 수준에서의 가변성에 기인하여, 연구 시작 7일 전에 결정한 바와 같은 WHV 바이러스혈증 및 항원혈증 수준에 의한 그룹으로 동물을 계층화하고, 바이러스 마커 둘 다의 평균 수준은 모든 동물 그룹에서 균일하게 분포된다. 비정상적으로 낮은 WHVsAg 수준을 지니는 동물은 본 연구에서 사용하지 않는다. 설치류에서 생체이용가능성 연구 후 화합물을 경로 및 빈도가 종결될 때까지 매일 투여한다. 연구에 대해 투약의 첫번째 날은 연구 제1일이다. 연구 제1일 투약 수준을 사전 검사 체중에 대해 계산하고, 체중을 용량 투여를 위해 매주 측정한다. 용량 범위는 기준 화합물(테넌트(Tennant))로서 바라클루드(Barraclude)로 처리한 그룹 10에 의해 4 용량에 걸쳐서 마우스 연구에 대해서와 같다.

[0260] 1차 종말점은 지속적인 약물 감소를 달성하는 약물 주입 및 약물 중단에 대한 바이러스혈증 및 항원혈증에서의 용량 의존적 감소이다.

[0261] *생존능 및 동물 건강*. 임상적 관찰을 수행하고, 이환율 및 사망률에 대해 매일 1회 기록한다. 혈액학, 혈청 화학 및 조직 시험을 통해 추가적인 독성을 처리한다. 또한 일반적 동물 건강과 관련하여 모든 생물학적 및 면역학적 종말점을 고려하는 것은 바이러스혈증 또는 항원혈증 또는 다른 추정상의 유리한 결과에서의 감소가 2차 결과 프로토콜(화합물) 독성이 아니라는 것을 보장하는데 중요하다. 총체적 신체 특징(체중, 대변 및 소변 배출) 및 특성규명은 매주의 기준에 대해 결정한다. 추가로, 간 기능 검사(매달 수집한 샘플에 대해 수행), 혈액학 및 화학(처리 전, 중간 및 마지막에 수행) 샘플(표에서 기재한 바와 같음) 및 선택 동물에 대해(용량 전에, 용량 중간에 및 처리 마지막 시간), 펀치생검 유래 간 절편에 대한 조직학을 독성뿐만 아니라 효능에 대한 평가에 대해 수행한다.

[0262] 간 생존능력의 마커로서 매달의 샘플에서 상업적 서비스에 의해 간 기능 검사를 결정한다.

[0263] *체액성 반응의 증거*. WHsAg를 인식하는 항체의 존재를 ELISA에 의해 결정한다. 이 분석은 항체와 복합체화된 균일한 WH Ab가 검출되도록 한다.

[0264] *독성학*. 마우스 연구에 대해 기재한 바와 같이 혈액학 및 혈청 화학을 통해 주의 깊은 독성학을 수행한다. 추가로, 염증, 담도 증식, 및 문맥 및 소엽 간염을 포함하는, 간의 펀치생검의 조직학적 시험에 착수한다.

[0265] *혈청에서의 WHV 바이러스 수준*. 매주 평가를 수행한다(슬롯 블롯 혼성화 및 PCR 또는 2개월마다(사우던 블롯).

[0266] *생검*. 처리의 시작 전, 중간에, 마지막에, 그리고 연구의 마지막에 간 생검을 수집하고, 조직학 및 세포내 WHV DNA 시험을 위해 사용한다. 복제 형태 및 간내 공유결합 폐환 WHV DNA(WHV cccDNA)의 수준을 Hirt 추출에 대해 정량적으로 결정한다. 면역염색을 위해, 별개의 조직을 사용하고, 처리 대 미처리 동물에서 코어 및 WHsAg의 축

적을 결정할 것이다.

[0267] 오리와 마멋 연구 둘 다에 대해, 기술적 어려움은 예상되지 않는데, 이들 연구는 상당히 일상적이며, 평가를 위해 필요한 모든 방법 및 시약은 수중에 있다. 오리에 의한 한 가지 가능한 문제는 약물 없이 생기는 바이러스혈증/항원혈증에서의 변화이다. 이는 6주령 후의 오리를 사용함으로써 완화되는데, 바이러스학은 보통 안정화되는 바와 같다.

[0268] 양성 활성의 벤치마크는 LFMAU 처리 동물이다. 이들 동물은 각각 오리와 마멋에서 처리 3주 및 10주까지 균일하게 상실된 HBV 바이러스혈증 및 균일한 항원혈증을 갖는 것으로 예상되며, HBV 감염 간세포의 수는 처리 전 및 미처리 그룹에 비해 크게 감소된다.

[0269] HBV 감염 세포 수에서의 감소가 있기 전 조차도(가능하게는, HBV 감염 세포 손실의 수에 대한 비율을 벗어남), cccDNA 전사(및 안정성)의 저해는 모든 바이러스 유전자 산물의 세포내 및 세포밖 양(그들의 혈청 반감기에 의해 영향받는 비율에서)을 감소시켜야 한다. 현실적으로 말해서, 본 발명자들의 새로운 화합물의 가장 확실한 증거는 HBV DNA 바이러스혈증 및 sAg 항원혈증에서 통계적으로 유의한 시간 및 용량 의존적 감소이다. 본 화합물의 효능을 고려하면, 모델 중 하나 또는 둘 다에서 혈청 표면 항원의 시험관내, 적어도 10배 감소가 예상된다.

[0270] DHBsAgWHsAb 수준을 또한 측정한다. 대조군인 만성으로 감염된 동물은 검출가능한 Ag가 없는 것으로(또는 매우 적게 검출가능) 예상된다. 사람(및 마멋)을 만성으로 감염시킬 수 있고, sAb를 만들지만, 순환 sAg에 의해 억제되거나 또는 결합된다는 증가된 신체의 증거가 있다. 따라서 Ag가 감소된다면, 그리고 감소됨에 따라, sAb는 그 자체를 분명히 할 수 있다.

[0271] 생검 분석은 장착된 간 조직을 사용하여, 그리고 처리 전에 및 처리 후에 HBV 핵산의 양의 시험하기 위해 추출물을 이용하여, HBV 코어, sAg에 대해 면역염색으로 수행한다. 이상적으로는, 감염 세포의 수는 약물 처리의 함수로서 감소할 것이다. 유용한 정보는 이것이 증가된 간염 환경에서(세포 침윤) 일어나는지 여부를 포함한다.

[0272] 10주 및 4주 동안 동물로부터의 혈청(각각 마멋 및 오리)을 또한 약물 처리를 중단한 후 평가한다. 모든 주된 목적을 얻는 sAb의 외관에 의한 항원혈증, 바이러스혈증의 안정한 약물을 벗어난 억제를 고려한다. 임의의 유해한 반응 또는 사건이 없을 때, 과도한 위약의 양에 의한 바이러스혈증 및 항원혈증의 약물 억제에 대해 약물 특이적 영향의 증거를 고려한다.

[0273] 상기 약술한 동물 연구는 화합물이 생체내 환경에서 항원혈증을 감소시키는데 유효한지 여부에 대해 한정적으로 결론을 내렸다.

[0274] HDAC의 저해가 HBV cccDNA 전사를 억제하는지를 결정한다면, 결과는 그것들이 유용하기 때문에 놀라운데, HDAC 저해는 일반적으로 숙주 염색체에 통합된 HBV DNA를 포함하는 유전자 활성화와 관련되었기 때문이다. 결과는 대부분의 세포 유전자로부터의 HBV cccDNA의 조절이 얼마나 상이한지의 예를 나타낼 수 있으며, 본 명세서에서 동정된 저해제가 인간 시스템에서 궁극적으로 사용되지 않는다고 해도, 작은 약학적으로 활성인 화합물에 의해 cccDNA를 비촉매적으로 저해할 수 있다는 것이 입증된다.

[0275] 함께 취합하면, 이 작업은 2가지의 매우 중요한 답을 전달한다. 첫째로, 이는 인간 및 마멋 배양물에서 HBV cccDNA 기능의 선택적 억제를 나타낸다. 둘째로, HDAC(아피시딘의 표적)이 HBV cccDNA를 조절하는 것을 결정한다. 본 발명자들은 HBV 감염 사람에서 HDAC 저해를 주의하면서 진행해야 한다는 것을 이해하며, 이 작업은 혁신적인 새로운 치료 전략에 의해 진행되는 방법에 관한 방향을 나타낸다.

[0276] ***일반적 합성***

[0277] 본 발명의 화합물은 일반적 방법 및 절차를 사용하여 용이하게 입수가능한 출발 물질로부터 준비할 수 있다. 전형적 또는 적합한 처리 조건(즉, 반응 온도, 시간, 반응물의 몰비, 용매, 압력 등)이 주어지는 경우, 달리 언급되지 않는다면, 다른 처리 조건이 또한 사용될 수 있다는 것이 인식될 것이다. 최적의 반응 조건은 사용한 특정 반응물 또는 용매에 따라 다를 수 있지만, 이러한 조건은 일상적인 최적화 절차에 의해 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0278] 본 명세서에 기재된 절차는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 따라 모니터링할 수 있다. 예를 들어, 생성물 형성은 스펙트럼분석 수단, 예컨대 핵 자기 공명 분광학(예를 들어, ^{1}H 또는 ^{13}C NMR), 적외선 분광학(infrared spectroscopy: IR), 분광광도법(예를 들어, UV-가시광선) 또는 질량 분석법, 또는 크로마토그래피, 예컨대 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography: HPLC) 또는 박층 크로마토그래

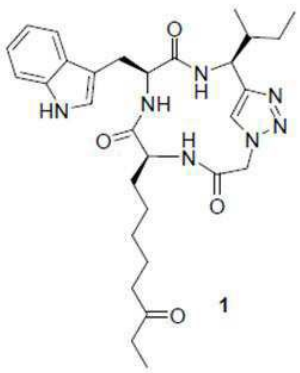
피에 의해 모니터링될 수 있다.

[0279] 화합물의 제조는 다양한 화학기의 보호 및 탈보호를 수반할 수 있다. 보호 및 탈보호에 대한 필요, 및 적절한 보호기의 선택은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 보호기의 화학은, 예를 들어 본 명세서에 전문이 참조로서 포함되는 문헌[P. G. M. Wuts and T. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th. Ed., Wiley & Sons, 2006]에서 찾을 수 있다.

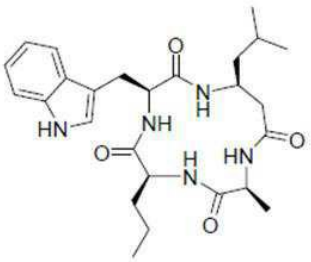
[0280] 본 명세서에 기재된 과정의 반응은 유기합성 분야의 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있는 적합한 용매 중에서 수행될 수 있다. 적합한 용매는 출발 물질(반응물), 중간체 또는 반응이 수행되는 온도에서의, 즉, 용매의 빙점으로부터 용매의 비등점까지 범위의 온도에서의 생성물과 실질적으로 미반응성일 수 있다. 주어진 반응을 하나의 용매 또는 하나 이상의 용매의 혼합물 중에서 수행할 수 있다. 특정 반응 단계에 따라서, 특정 반응 단계에 적합한 용매를 선택할 수 있다. 본 발명의 화합물을, 예를 들어 이하에 기재하는 바와 같은 반응 경로 및 기술을 사용하여 제조할 수 있다.

[0281] ***화합물 합성***

[0282] 아피시딘은 유도체화되었고, 최근의 유사체 **1** 및 **2**:



1

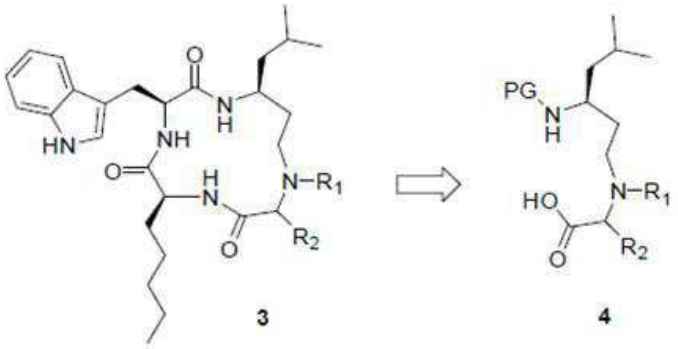


2

[0283]

[0284] (문헌[*Horne, W. S., C. A. Olsen, J. M. Beierle, A. Montero, and M. R. Ghadiri. 2009. Probing the bioactive conformation of an archetypal natural product HDAC inhibitor with conformationally homogeneous triazole-modified cyclic tetrapeptides. Angew Chem Int Ed Engl 48:4718-4724; Vickers, C. J., C. A. Olsen, L. J. Leman, and M. R. Ghadiri. 2012. Discovery of HDAC Inhibitors That Lack an Active Site Zn2+-Binding Functional Group. ACS Medicinal Chemistry Letters*] 참조)는 아피시딘 구조가 항 HDAC 효능의 손실 없이 변형될 수 있다는 것을 입증한다.

[0285] 아피시딘에 비해 개선된 약제학적 특성에 초점을 둔 추가적인 유사체를 제조하였는데, 이는 매우 불량한 수 가용성, 경구 생체이용성, 및 생체내 반감기를 가진다. 아피시딘 유도체를 특히 표준 고체 및 용액 상 방법에 의해 제조하였다. 특정 실시형태에서, 환원된 베타-아이소류신 아미노산 유래 단편 **4**는 용액 상 방법에 의해 적합하게 보호된 형태(PG = 적합한 보호기, 예컨대 Fmoc 또는 Boc)로 제조하였고, 용액 또는 고체상 수단에 의해 아미노산 서열에 도입한 후, 확립된 방법을 사용하여 고리화하였다:

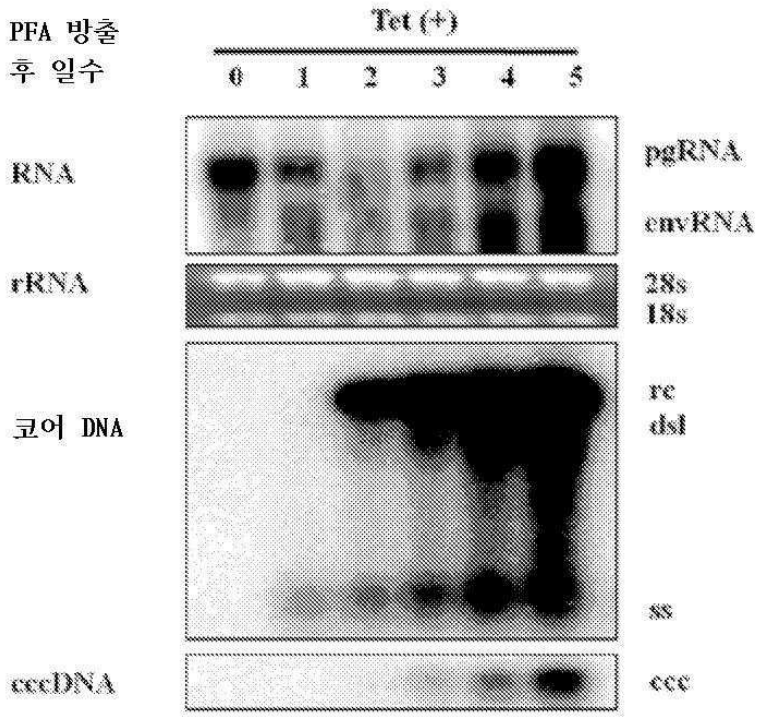


3 **4**

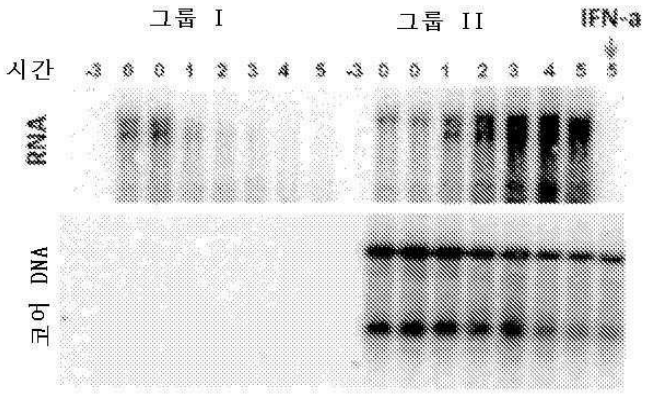
[0286] .

도면

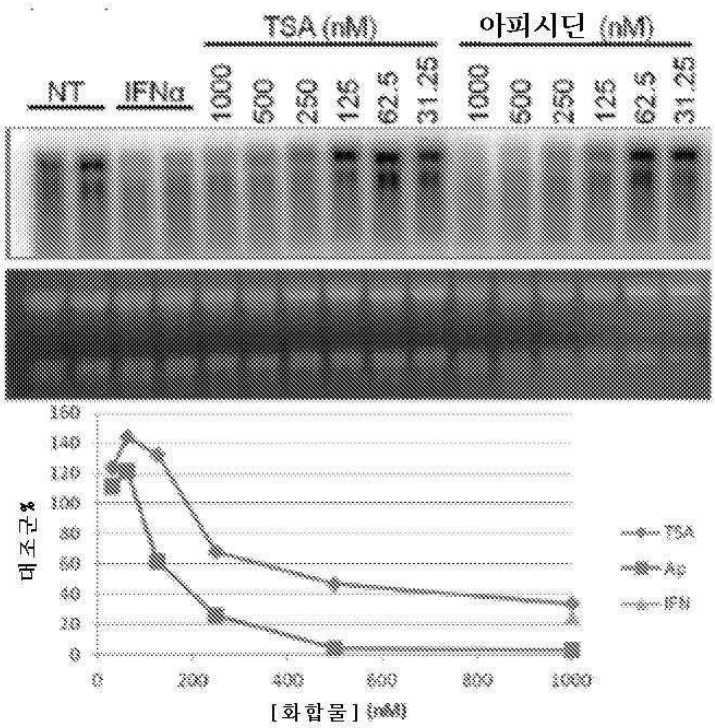
도면1


PFA 방출
후 일수
Tet (+)
0 1 2 3 4 5
RNA
pgRNA
envRNA
rRNA
28s
18s
코어 DNA
rc
dsl
ss
cccDNA
ccc

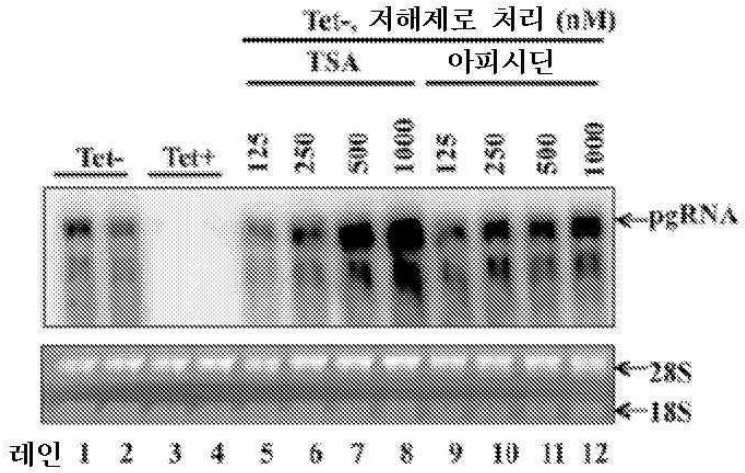
도면2


그룹 I
그룹 II
IFN-a
시간
RNA
코어 DNA

도면3


TSA (nM)
아피시딘 (nM)
NT
IFNα
1000
500
250
125
62.5
31.25
대조군%
[화합물] (nM)
TSA
Ap
IFN

도면4


Tet-, 저해제로 처리 (nM)
TSA
아피시딘
Tet-
Tet+
125
250
500
1000
pgRNA
28S
18S
레인 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12