



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107778310 A

(43)申请公布日 2018.03.09

(21)申请号 201610793438.9

(22)申请日 2016.08.31

(71)申请人 上海市第一人民医院

地址 200000 上海市武进路85号

(72)发明人 汤静 童双梅 潘佳倩

(74)专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51)Int.Cl.

C07D 471/04(2006.01)

A61K 31/437(2006.01)

A61P 31/20(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图3页

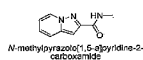
## (54)发明名称

乙型肝炎靶向人La蛋白的抑制剂HBSC11及其衍生物和用途

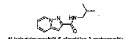
## (57)摘要

本发明属制药领域,涉及以人La蛋白为靶标的抑制剂及其衍生物的抗乙型肝炎病毒的作用。本发明通过对人La蛋白为靶标的抑制剂进行结构改造,筛选得到式(I)的靶向人La蛋白抑制性化合物,经实验验证,所述的化合物具有较强的抗病毒活性,和具有靶向La蛋白的作用,可用于抗乙型肝炎病毒的新药成药性研究,有望开发新的非核苷类抗HBV药。

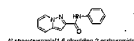
NHBS4:



NHBS7:

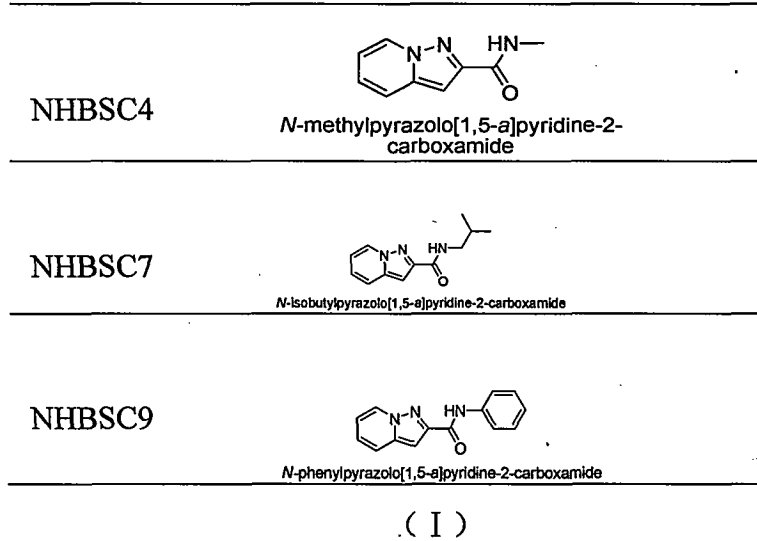


NHBS9:



(1)

1. 式 (I) 结构的 HBSC11 衍生物,



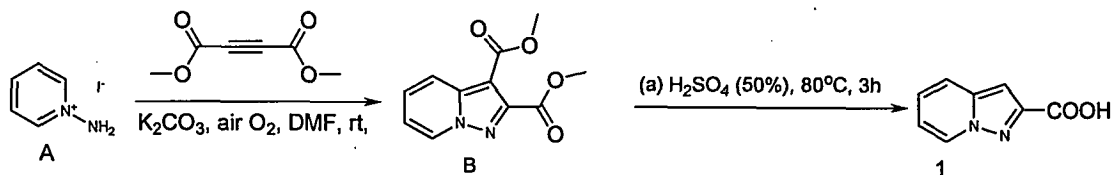
2. 按权利要求1所述的HBSC11衍生物,其特征在于,所述的化合物NHBSC4、7、9,为针对La蛋白与RNA结合位点的小分子结构的化合物。

3. 按权利要求1所述的HBSC11衍生物,其特征在于,所述的化合物NHBSC4化学名为:*N*-甲基吡唑[1,5-*a*]并吡啶-2-甲酰胺(*N*-methylpyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxamide)。

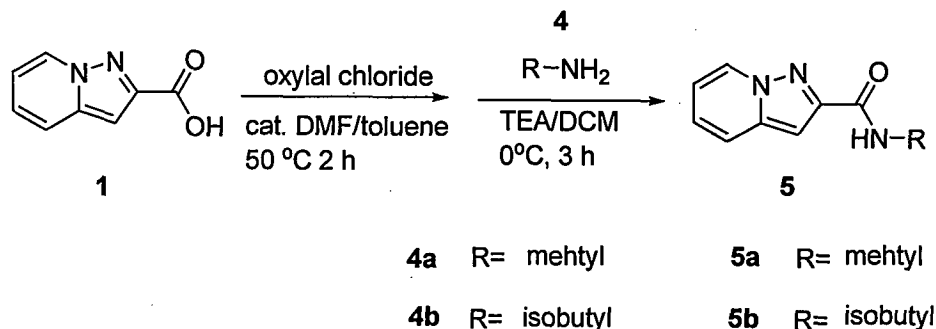
4. 按权利要求1所述的HBSC11衍生物,其特征在于,所述的化合物NHBSC7化学名为:*N*-异丙基吡唑[1,5-*a*]并吡啶-2-甲酰胺(*N*-isobutylpyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxamide)。

5. 按权利要求1所述的HBSC11衍生物,其特征在于,所述的化合物NHBSC9化学名为:*N*-苯基吡唑[1,5-*a*]并吡啶-2-甲酰胺(*N*-phenylpyrazolo[1,5-*a*]pyridine-2-carboxamide)。

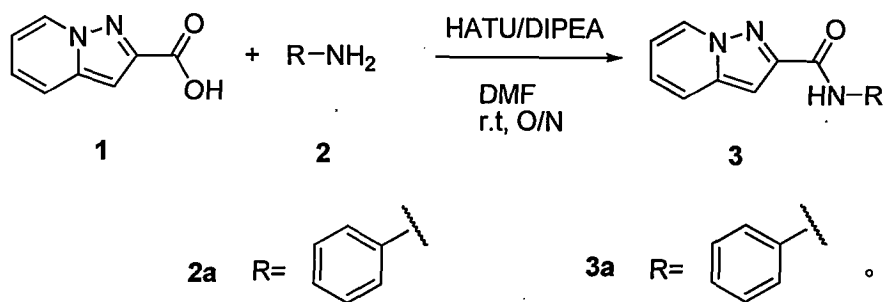
6. 权利要求1的式(I)结构的HBSC11衍生物的制备方法,其特征在于,其中的HBSC11衍生物NHBSC4、7、9,通过下述合成路径制得:



(1) NHBSC4、7的合成路径为:



(2) NHBSC9的合成路径为:



7. 权利要求1的HBSC11衍生物在制备抗乙肝病毒制剂或药物中的用途。
8. 权利要求1的HBSC11衍生物在制备治疗乙型肝炎的药物中的用途。
9. 权利要求1的HBSC11衍生物在制备以La蛋白为靶标的药物中的用途。

## 乙肝病毒靶向人La蛋白的抑制剂HBSC11及其衍生物和用途

### 技术领域

[0001] 本发明属制药领域,涉及乙肝病毒HBV重要靶标La蛋白抑制剂HBSC11及其衍生物和抗乙型肝炎病毒活性的用途,尤其涉及HBSC11及其衍生物在用于制备抗HBV药物中的用途。

### 背景技术

[0002] 乙型肝炎是严重威胁人类健康的传染病之一,据统计,目前世界上约有3.5亿HBV慢性携带者。我国属于HBV感染的高流行区域,携带者超过1.2亿人,携带率为10%,慢性HBV感染为社会和家庭带来沉重的负担。临床实践较常用的核苷类抗乙肝病毒药物通过抑制HBV DNA的复制,达到缓解或治疗乙肝的作用,然而随着药物应用面的拓宽和用药人群的增加,国内外相继报道拉米夫定等核苷类药物长期应用后,存在着病人顺应性问题和诸多不良反应,其耐药率已达到69%,在少数免疫功能缺陷病人中出现了HBV DNA聚合酶基因发生突变的病毒株,导致了体内病毒变异和病情恶化现象,从而限制其长期应用。

[0003] 本申请课题组前期研究关注有关非核苷类新型抗乙肝病毒药物,在长达十年的临床与基础研究中,发现人La蛋白通过空间互补与乙肝病毒RNA结合,保护其免受核酶降解,是乙肝病毒在肝脏复制的重要基础;应用La特异性siRNA,发现可降低病毒稳定性,下调乙肝病毒复制与蛋白质表达,表明La可能是研制抗乙肝病毒新药的重要靶标。课题组根据La晶体结构特点,应用Glide5.5分子对接软件虚拟筛选,获得与La结合的吡啶并吡唑类化合物HBSC11,其能有效抑制细胞中乙肝病毒DNA复制和病毒核心抗原表达,显示良好的抗乙肝病毒活性并且显示较低的细胞毒性,但存在于其在体内不稳定易水解的缺陷。

[0004] 基于现有技术的现状,本申请的发明人拟提供新的乙肝病毒靶向人La蛋白的抑制剂HBSC11及其衍生物和用途。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有技术的缺陷,提供新的HBV重要靶标La蛋白新型抑制剂HBSC11衍生物及其药用用途,本发明通过比较抗病毒活性与细胞毒性,筛选出潜在候选非核苷类抗HBV药物。

[0006] 本发明对HBSC11进行了结构改造,进一步改善代谢稳定性及水溶性,使之结构更加适合体内动物实验,同时筛选最佳抗病毒活性药物。本发明中,采用先导化合物HBSC11、HBSC11的酰胺类衍生物NHBS11、拉米夫定作为对照,通过体外细胞实验验证改造后的新化合物的抗乙肝病毒活性。

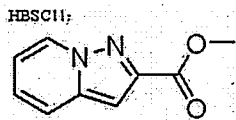
[0007] 本发明中,将酯键中的氧原子用电子等排体的方法替换成氮原子,合成一系列酰胺类化合物,用Schrodinger公司的GLIDE组件将HBSC11与La蛋白显示进行对接,预测了结合模式,结果显示,HBSC11中吡唑环上的氮原子以及酯键中的羰基氧原子分别与Ile140以及Asn139主链上的N原子形成了氢键作用,本发明在结构改造中保留HBSC11中该部分对La蛋白结合起关键作用的特征结构,将酯键中的氧原子用电子等排体的方法替换成氮原子,

合成一系列酰胺类化合物。本发明通过酰胺键分别引入疏水、亲水及含有芳香环的基团等,进一步考察R基团与口袋入口处蛋白表面的相互作用,优化化合物活性,达到增加代谢稳定性,改善水溶性的效果。

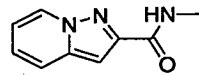
[0008] 本发明对筛选得到的具有新结构的靶向人La蛋白的抑制剂HBSC11进行活性验证与毒性研究,并通过结构改造获得一系列衍生物NHBS4、7、9,通过平行对比研究筛选出活性佳、毒性小的候选药物。

[0009] 本发明中,所述的靶向人La蛋白的抑制剂HBSC11及其衍生物NHBS4、7、9。结构式具有(I)结构:

HBSC11 :

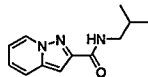


NHBS4:

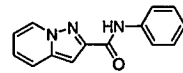


[0010]

NHBS7:



NHBS9:

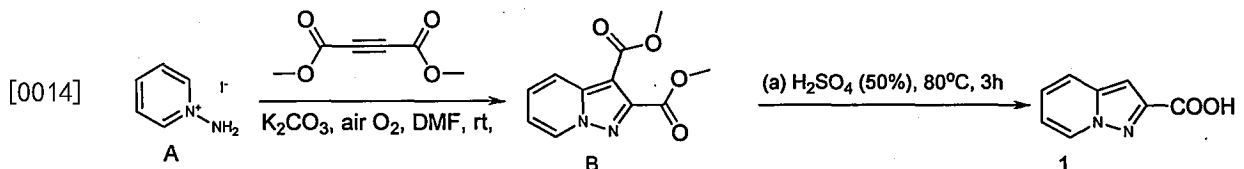


## (I)

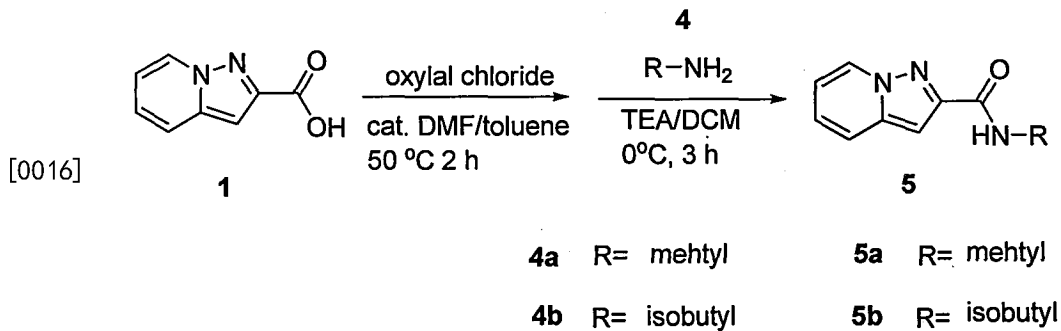
[0011] 本发明中,La蛋白(基因编号NM003142,查询来源于[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_003142](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_003142))与HBV DNA复制密切相关,实验证实La蛋白部分位点的突变或基因沉默,对La蛋白与HBV RNA的结合产生重大影响,使HBV更容易降解。

[0012] 本发明基于La蛋白结构的药物分子设计和虚拟筛选得到的La蛋白抑制剂HBSC11的药理活性,对其进行结构改造,通过将结构中的酯键替换成酰胺键,然后分别引入疏水、亲水及含有芳香环的基团等,进一步考察R基团与口袋入口处蛋白表面的相互作用,优化化合物活性,增加代谢稳定性,改善水溶性,筛选抗病毒活性更强、毒性更低的La蛋白抑制剂,筛选获得具有潜在成药性化合物NHBS4、NHBS7、NHBS9。

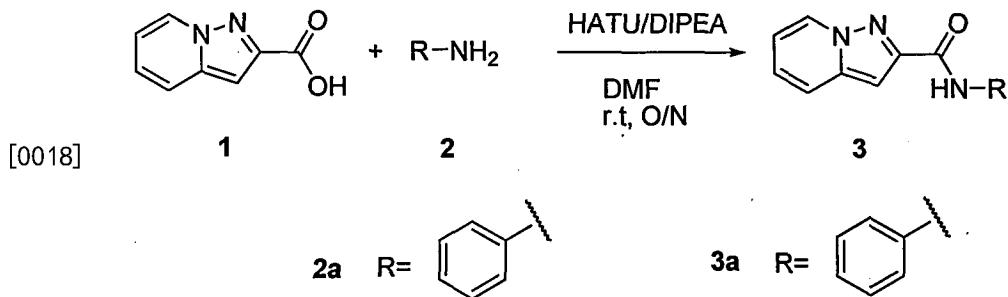
[0013] 本发明中,所述的化合物NHBS4、NHBS7、NHBS9通过下述合成路径制得:



[0015] (1) NHBS4、7的合成路径为:



[0017] (2) NHBS9的合成路径为:



[0019] 本发明的化合物NHBS4、7、9经实验证实,在体外有抗乙肝病毒活性,尤其是NHBS7,在24h内对HepG2.2.15细胞系表达的HBV DNA和HBsAg有较强抑制作用,其作用超过抗病毒药拉米夫定,说明本化合物(HBSC11的衍生物)具有潜在成药性价值,可继续结构优化,制备抗乙肝病毒活性的制剂或药物。

[0020] 本发明的HBV重要靶标La蛋白新型抑制剂化合物的优点有:

[0021] 1. 具有较强的抗病毒活性和靶向La蛋白的作用;

[0022] 2. 在体内稳定性更好、更适合于体内动物实验;

[0023] 3. 所述的化合物及其衍生物可用于制备抗乙肝病毒活性或治疗乙型肝炎的制剂或药物;

[0024] 4. 以及用于制备以La蛋白为靶标的药物。

[0025] 为了便于理解,以下将通过具体的附图和实施例对本发明的靶向人La蛋白抑制剂HBSC11的衍生物进行详细地描述。需要特别指出的是,具体实例和附图仅是为了说明,显然本领域的普通技术人员可以根据本文说明,在本发明的范围内对本发明做出各种各样的修正和改变,这些修正和改变也纳入本发明的范围内。

## 附图说明

[0026] 图1显示了HBSC11经结构改造后的10种不同R基衍生物在24小时、48小时、72小时对HepG2.2.15细胞中HBV DNA的抑制作用,其中,H11、NH7、NH4、NH9药物对2215细胞在24小时,48小时有比较明显的抑制效果,但在72小时抑制效果不再明显。

[0027] 图2显示了本发明中的化合物NHBS4、7、9与La蛋白结合先导化合物HBSC11、市面已售的酰胺类化合物NHBS11、拉米夫定作为对照在24h内对HepG2.2.15细胞中HBV DNA的抑制作用,其中,我们合成的化合物NHBS7、4有较强病毒抑制效果。

[0028] 图3显示了本发明中的化合物NHBS4、7、9与La蛋白结合先导化合物HBSC11、市面已售的酰胺类化合物NHBS11、拉米夫定作为对照在24h内对HepG2.2.15细胞中HBsAg的抑

制作用,其中,我们合成的化合物NHBS7对HBsAg有较强抑制效果。

[0029] 图4显示了本发明中的化合物NHBS4、7、9与La蛋白结合先导化合物HBSC11、市面已售的酰胺类化合物NHBS11、拉米夫定作为对照在24h内对HepG2.2.15细胞中HBeAg的抑制作用,其中,我们合成的化合物NHBS4对HBeAg有较强抑制效果。

[0030] 图5显示了本发明中所述的靶向人La蛋白的抑制剂HBSC11及其衍生物NHBS4、7、9的化学结构式。

[0031] 图6显示了La蛋白结合位点包含Gln20, Tyr23, Arg57, Leu124, Lys128, Asn139和Ile140,其中,HBSC11的两个氢原子与Asn139和Ile140的主链结合, NHBS4的一个氮原子与Ile140的主链氮原子结合,一个氧原子和Lys128的侧链氮原子结合; NHBS7的一个氮原子和Ile140的侧链氧原子结合; NHBS9的一个氮原子与Ile140主链的氮原子结合。

## 具体实施方式

[0032] 实施例1

[0033] 1、HBSC11的结构改造

[0034] (1) HBSC11活性中心预测

[0035] La蛋白靶向抑制剂HBSC11 (methyl pyrazolo [1,5-a] pyridine-2-carboxylate) 是吡唑 [1,5-a] 并吡啶-2-甲酸甲酯,在前期研究中由于其水溶性较差,且化合物结构中包含酯键,易在体内水解成羧酸影响其药效,针对此,对HBSC11的结构进行改造。采用Schrodinger公司的GLIDE组件将HBSC11与La蛋白显示进行了对接,预测结合模式,结果显示,HBSC11中吡唑环上的氮原子以及酯键中的羰基氧原子分别与Ile140以及Asn139主链上的氮原子形成了氢键作用,因此在结构改造中保留HBSC11中这部分对La蛋白结合起关键作用的特征结构(如图6所示);

[0036] (2) HBSC11的结构改造

[0037] 在结构改造中保留HBSC11中对La蛋白起结合作用的活性中心部分,将酯键中的氧原子用电子等排体的方法替换成氮原子,合成一系列酰胺类化合物。从HBSC11(市售)出发,先在碱性条件下将其酯键水解转化为羧酸,然后在偶联试剂TBTU(0-苯并三氮唑-N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯)作用下与相应的胺类化合物进行偶联形成酰胺键,由于HBSC11的吡啶环朝向口袋内侧,酯键伸向口袋入口处,通过酰胺键分别引入疏水、亲水及含有芳香环的基团等10个衍生物NHBS1-10;

[0038] 2. 具有潜在成药性化合物的筛选

[0039] (1) NHBS1-10在细胞水平对HBV DNA复制水平的影响结果

[0040] HBSC11经结构改造后获得10种R基不同的衍生物,进一步进行稳定表达乙肝病毒的HepG2.2.15细胞系的抗病毒活性;通过浓度梯度筛选确定用50 $\mu$ M的10种药物刺激下,分别在24小时、48小时、72小时进行DNA水平的筛选,实验初步结果如图1所示,结果显示,H11、NH7、NH4、NH9药物对2215细胞在24小时有比较明显的抑制效果,在48和72小时的抑制效果与对照药物拉米夫定比较不再明显;

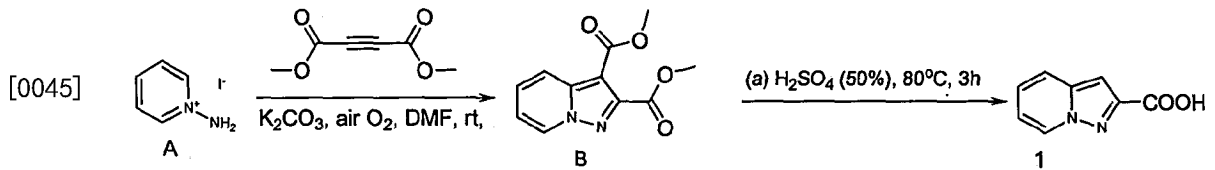
[0041] (2) 生物活性验证的3个改造后衍生物对HBV DNA复制水平的影响结果

[0042] 综合考虑10个化合物的抗病毒活性,本实施例筛选出NH4、NH7、NH9三个化合物进行深入的研究,将NHBS4、7、9与La蛋白结合先导化合物HBSC11、酰胺类化合物NHBS11、

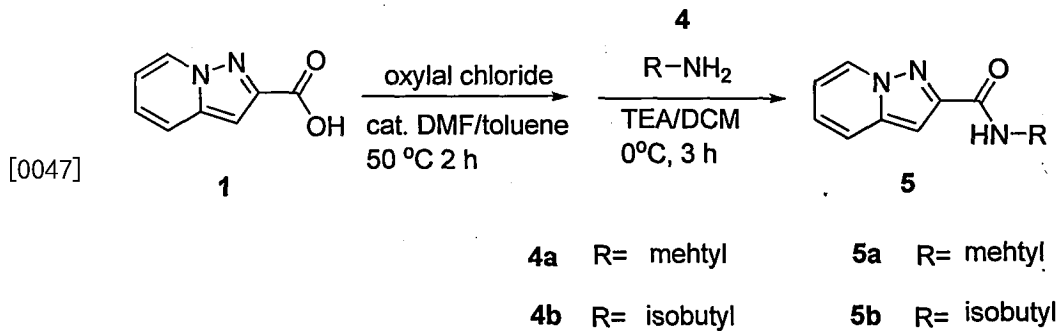
拉米夫定(市售)作为对照在24h内对HepG2.2.15细胞中HBV DNA、HBsAg和HBeAg的抑制作用进行实验,结果显示其中NH4、NH7与拉米夫定比较具有较明显抑制作用(如图2、3、4所示)。

[0043] 实施例2

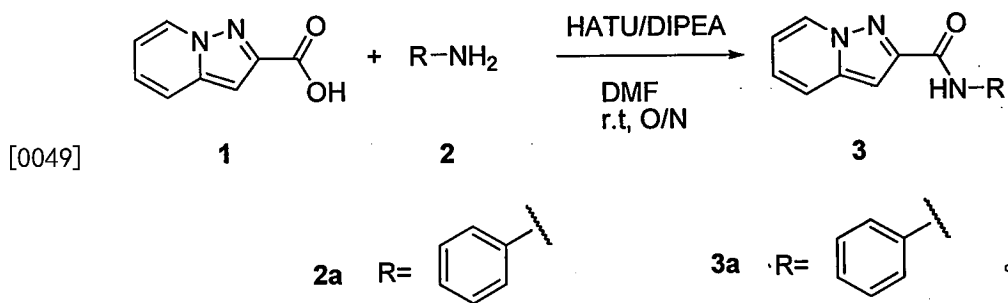
[0044] 按下述合成路径合成先导化合物HBSC11的衍生物NHBS4、7、9化合物:



[0046] (1) NHBS4、7的合成路径为:



[0048] (2) NHBS9的合成路径为:



NH1-10化合物的24h、48h、72h的抗病毒活性

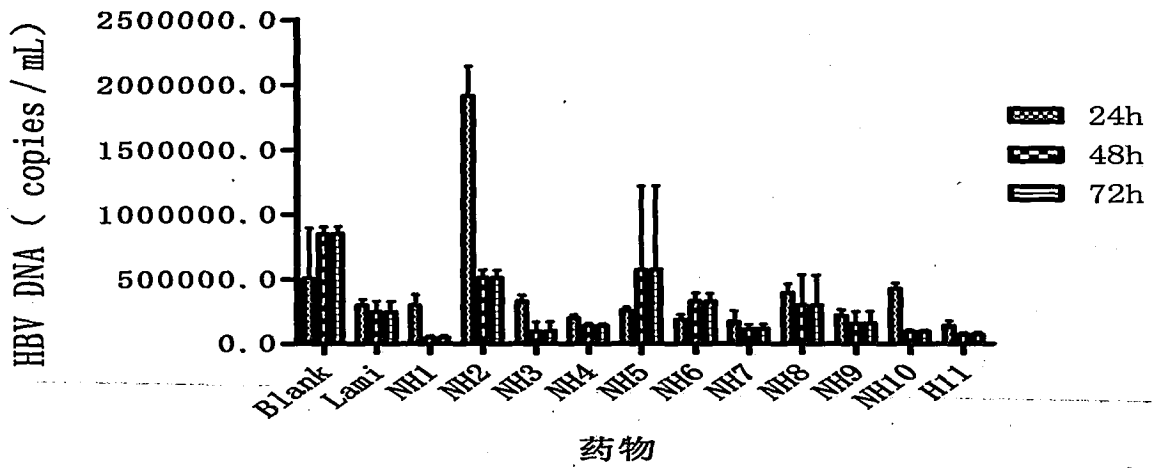


图1

药物作用24h后HepG2 . 2. 15细胞的HBV DNA水平

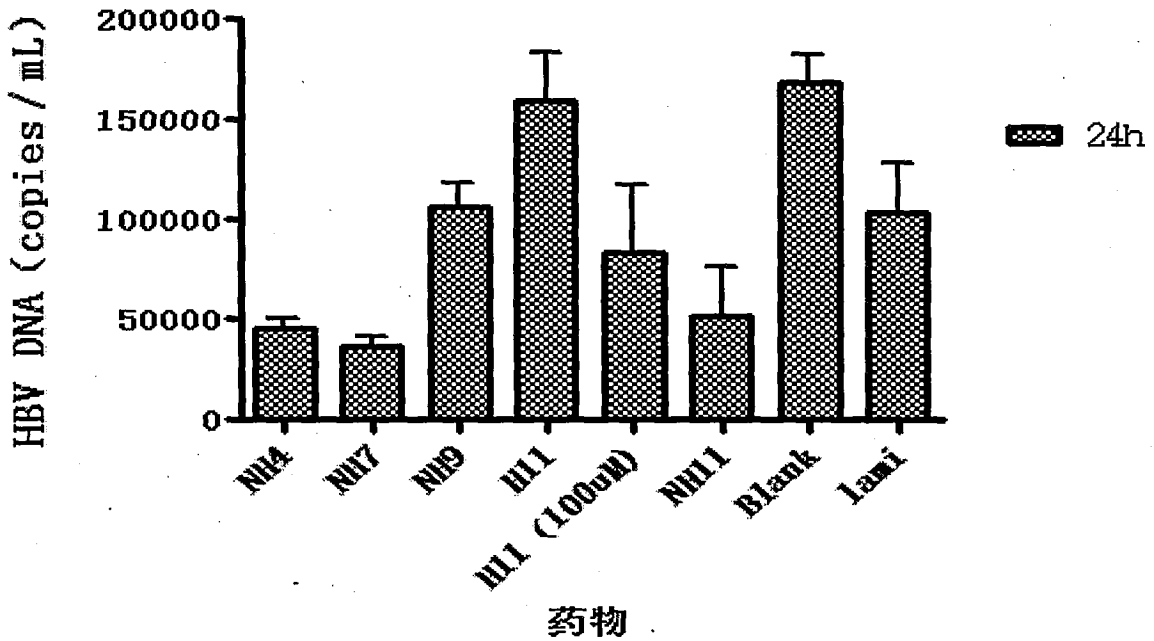


图2

### 药物作用24h后HepG2 . 2. 15细胞的HBsAg水平

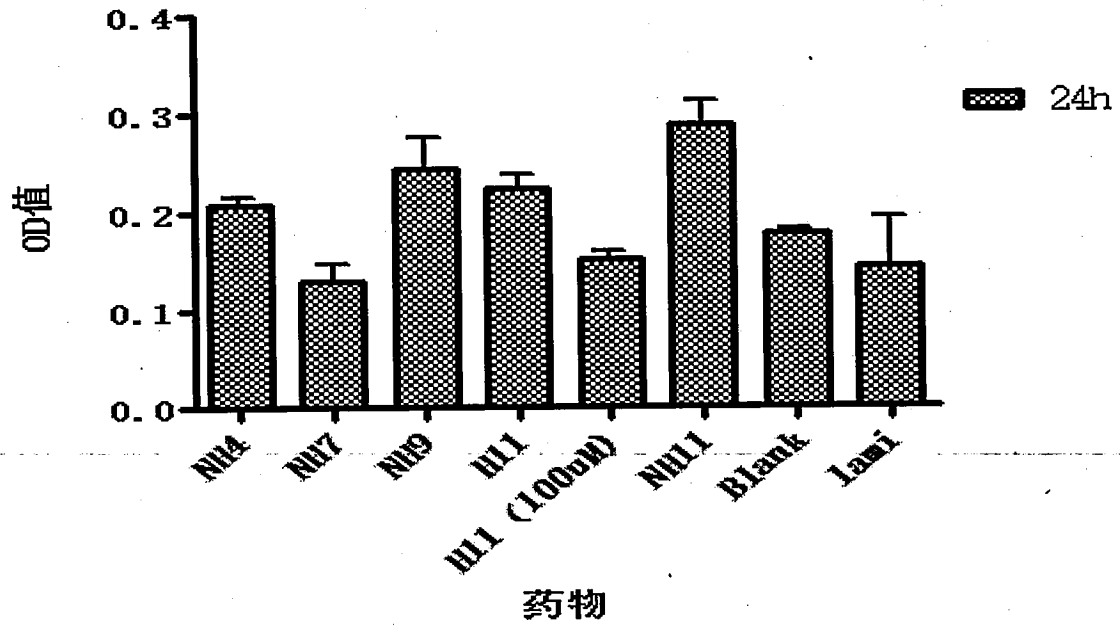


图3

### 药物作用24小时后HepG2 . 2. 15细胞的HBcAg水平

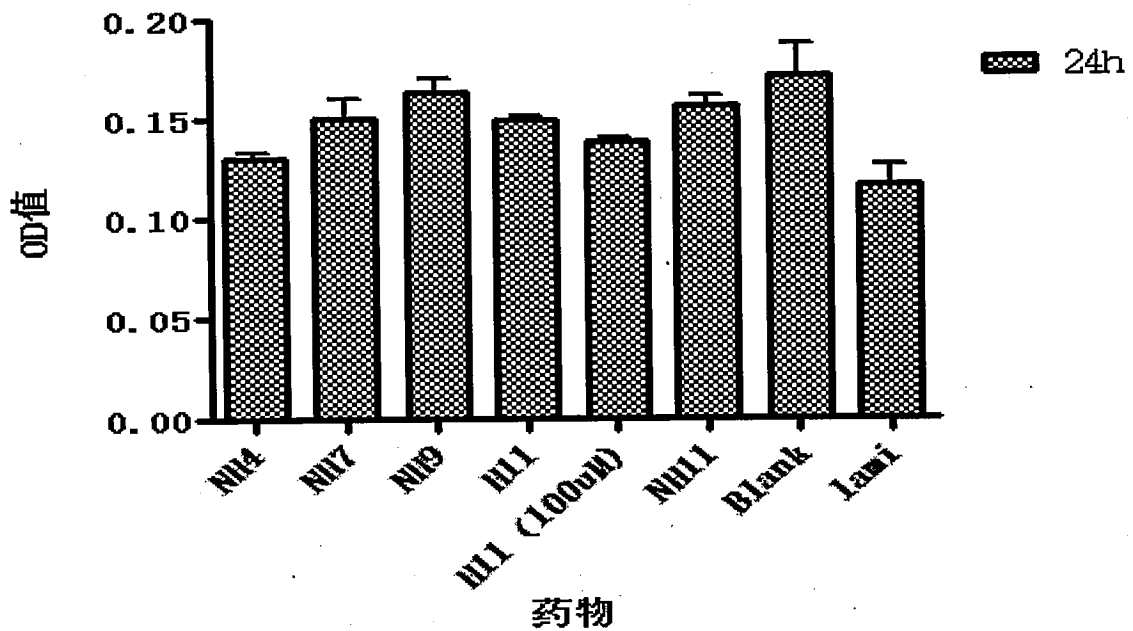


图4

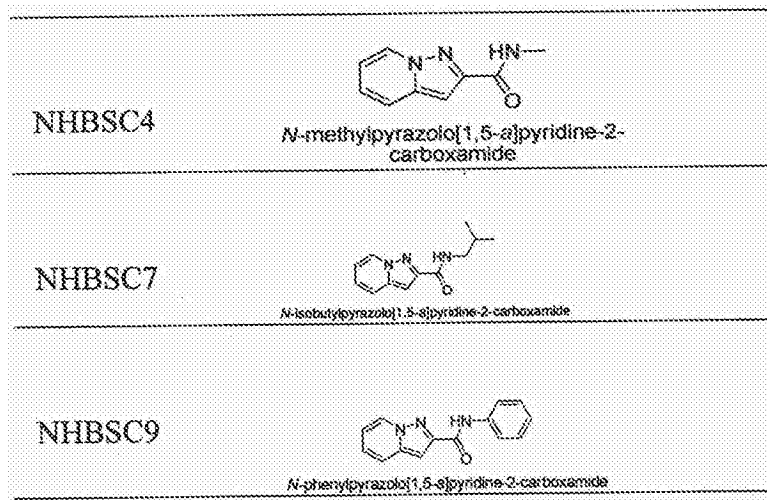


图5

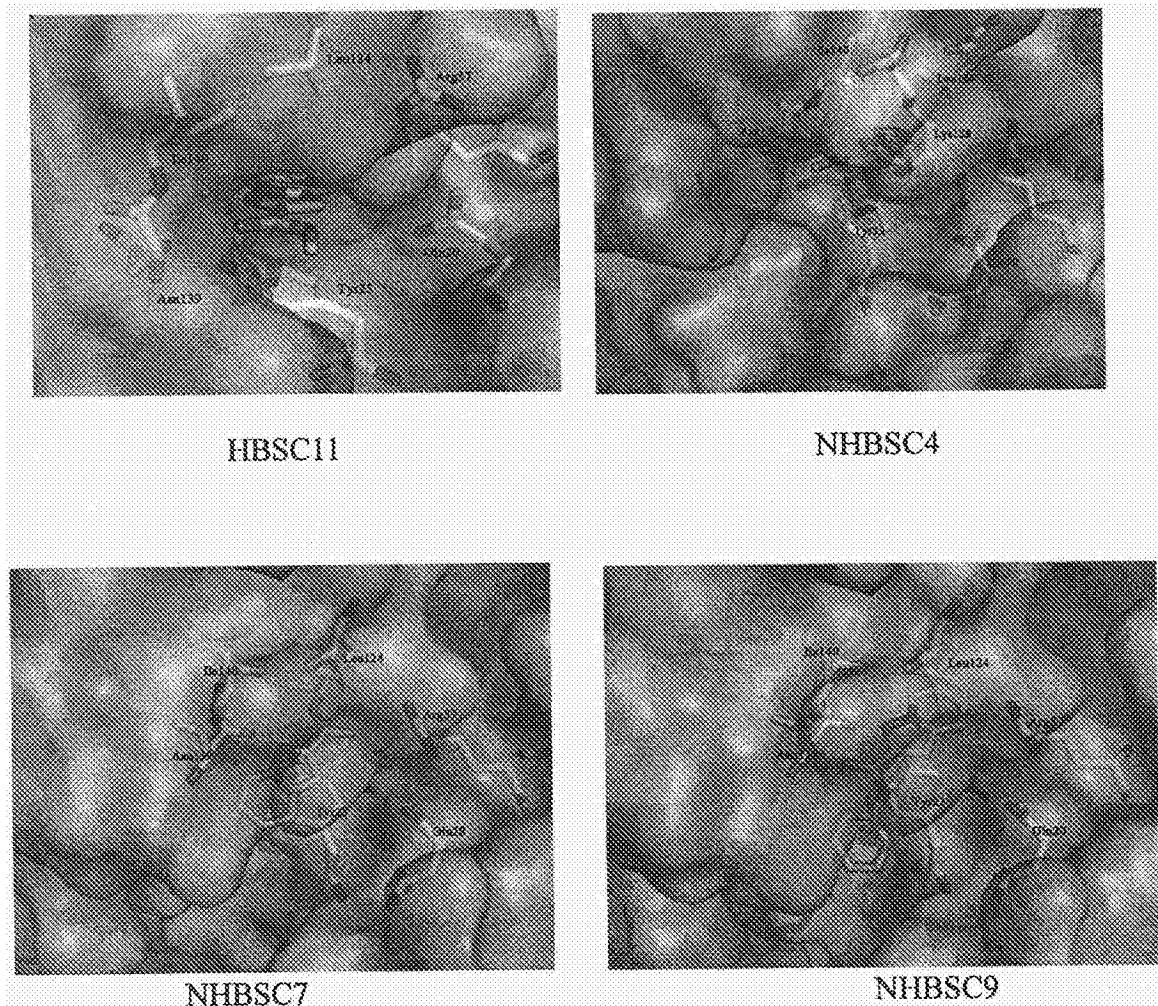


图6