

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191219** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.07.28

(51) Int. Cl. *C07D 487/04* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61K 31/4985 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.11.01

(54) **НОВЫЕ МОЧЕВИНО-6,7-ДИГИДРО-4Н-ПИРАЗОЛО[1,5-а]ПИРАЗИНЫ, АКТИВНЫЕ ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV)**

(31) 18000877.3

(32) 2018.11.02

(33) EP

(86) PCT/EP2019/079977

(87) WO 2020/089459 2020.05.07

(71) Заявитель:

АЙКУРИС ГМБХ УНД КО. КГ (DE)

(72) Изобретатель:

**Дональд Аластэр, Урбан Андреас,
Бонсманн Зузанне (DE)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение в целом относится к новым противовирусным средствам. В частности, настоящее изобретение относится к соединениям, которые могут ингибировать белок или белки, кодируемые вирусом гепатита В (HBV), или влиять на функцию цикла репликации HBV, к композициям, содержащим такие соединения, способам ингибирования репликации вируса HBV, способам лечения или профилактики инфекции HBV, а также к способам и промежуточным соединениям для получения указанных соединений.

A1

202191219

202191219

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568438EA/23

НОВЫЕ МОЧЕВИНО-6,7-ДИГИДРО-4Н-ПИРАЗОЛО[1,5-а]ПИРАЗИНЫ, АКТИВНЫЕ ПРОТИВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBV)

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение в целом относится к новым противовирусным средствам. В частности, настоящее изобретение относится к соединениям, которые могут ингибировать белок (белки), кодируемый (кодируемые) вирусом гепатита В (HBV), или влиять на функционирование цикла репликации HBV, к композициям, содержащим такие соединения, способам ингибирования репликации вируса HBV, способам лечения или профилактики инфекции HBV, и к способам получения указанных соединений.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Хроническая инфекция HBV является серьезной глобальной проблемой здравоохранения, и она затрагивает более 5% населения мира (более 350 миллионов человек во всем мире и 1,25 миллиона человек в США). Несмотря на доступность профилактической вакцины против HBV, хроническая инфекция HBV по-прежнему остается серьезной неудовлетворенной медицинской проблемой во всем мире из-за неоптимальных вариантов лечения и устойчивых темпов роста новых инфекций в большинстве частей развивающегося мира. Современные методы лечения не обеспечивают излечения, и они ограничены только двумя классами агентов (интерферон альфа и аналоги нуклеозидов/ингибиторы вирусной полимеразы); устойчивость к лекарствам, низкая эффективность и проблемы с переносимостью ограничивают их действие.

Низкие показатели излечения от HBV объясняются, по крайней мере частично тем фактом, что трудно достичь полного подавления продукции вируса с помощью одного противовирусного агента, а также наличием и сохранением ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК) в ядре гепатоцитов инфицированного человека. Однако постоянное подавление ДНК HBV замедляет прогрессирование заболевания печени и помогает предотвратить гепатоцеллюлярную карциному (HCC).

Современные цели терапии для пациентов, инфицированных HBV, направлены на снижение уровня ДНК HBV в сыворотке до низких или необнаруживаемых уровней и, в конечном итоге, на снижение или предотвращение развития цирроза и HCC.

HBV представляет собой оболочечный, частично двухцепочечный ДНК (дцДНК) вирус семейства гепаднавирусов (Hepadnaviridae). Капсидный белок HBV (HBV-CP) играет важную роль в репликации HBV. Преобладающая биологическая функция HBV-CP заключается в том, чтобы действовать как структурный белок для инкапсидации прегеномной РНК и формирования незрелых капсидных частиц, которые спонтанно самоорганизуются в цитоплазме из множества копий димеров капсидного белка.

HBV-CP также регулирует синтез вирусной ДНК через дифференциальные состояния фосфорилирования его С-концевых сайтов фосфорилирования. Кроме того,

HBV-CP может способствовать ядерной транслокации ослабленного кольцевого генома вируса с помощью сигналов ядерной локализации, расположенных в богатом аргинином домене С-концевой области HBV-CP.

Как компонент вирусной ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК) мини-хромосомы в ядре, HBV-CP может играть конструктивную и регуляторную роль в функционировании ковалентно замкнутой кольцевой ДНК мини-хромосомы. HBV-CP также взаимодействует с белком большой оболочки вируса в эндоплазматическом ретикулуме (ER) и запускает высвобождение интактных вирусных частиц из гепатоцитов.

Сообщалось о соединениях против HBV, связанных с HBV-CP. Например, производные фенилпропенамида, включая соединения, названные AT-61 и AT-130 (Feld J. et al. *Antiviral Res.* 2007, 76, 168), и класс тиазолидин-4-онов от Valeant (WO 2006/033995); и было показано, что они ингибируют упаковку прегеномной РНК (пгРНК).

F. Hoffmann-LA Roche AG представила ряд 3-замещенных 6,7-тетрагидропиразоло[1,5-a]пиразинов для лечения HBV (WO 2016/113273, WO 2017/198744, WO 2018/011162, WO 2018/011160, WO 2018/011163).

Гетероарилдигидропиримидины (НАР) были обнаружены при скрининге с использованием культуры ткани (Weber et al., *Antiviral Res.* 2002, 54, 69). Эти аналоги НАР действуют как синтетические аллостерические активаторы, и они способны вызывать aberrантное образование капсида, которое приводит к деградации HBV-CP (WO 99/54326, WO 00/58302, WO 01/45712, WO 01/6840). Также описаны другие аналоги НАР (*J. Med. Chem.* 2016, 59 (16), 7651-7666).

Подкласс НАР от F. Hoffman-La Roche также проявляет активность против HBV (WO 2014/184328, WO 2015/132276 и WO 2016/146598). Аналогичный подкласс от Sunshine Lake Pharma также проявляет активность против HBV (WO 2015/144093). Также было показано, что другие НАР обладают активностью против HBV (WO 2013/102655, *Bioorg. Med. Chem.* 2017, 25 (3) pp. 1042-1056), и аналогичный подкласс от Enanta Therapeutics показал аналогичную активность (WO 2017/011552). Другой подкласс от Medshine Discovery показал аналогичную активность (WO 2017/076286). Другой подкласс (от Janssen Pharma) также показал аналогичную активность (WO 2013/102655).

Подкласс пиридазонов и триазинонов (от F. Hoffman-La Roche) также проявляет активность против HBV (WO 2016/023877), как и подкласс тетрагидропиридопиридинов (WO 2016/177655). Подкласс трициклических производных 4-пиридон-3-карбоновой кислоты от Roche также показывает подобную активность против HBV (WO 2017/013046).

Подкласс сульфамойлариламидов от Novira Therapeutics (теперь часть Johnson & Johnson Inc.) также проявляет активность против HBV (WO 2013/006394, WO 2013/096744, WO 2014/165128, WO 2014/184365, WO 2015/109130, WO 2016/08169990, WO 2020/109663, WO 2016/109684, WO 2016/109689, WO 2017/059059). Аналогичный подкласс тиоэфир-ариламидов (также от Novira Therapeutics) проявляет активность против HBV (WO 2016/089990). Кроме того, подкласс арилазепанов (также от Novira Therapeutics)

проявляет активность против HBV (WO 2015/073774). Аналогичный подкласс ариламинов от Enanta Therapeutics проявляет активность против HBV (WO 2017/015451).

Также было показано, что сульфоамильные производные от Janssen Pharma обладают активностью против HBV (WO 2014/033167, WO 2014/033170, WO 2017001655, J. Med. Chem, 2018, 61 (14) 6247-6260).

Было показано, что подкласс глиоксамидзамещенных производных пирроламида от Janssen Pharma также обладает активностью против HBV (WO 2015/011281). Также было показано, что аналогичный класс глиоксамидзамещенных производных пирроламинидов (от Gilead Sciences) также обладает активностью против HBV (WO 2018/039531).

Подкласс сульфоамил- и оксалил-гетеробиарилов от Enanta Therapeutics также проявляет активность против HBV (WO 2016/161268, WO 2016/183266, WO 2017/015451, WO 2017/136403 и US 2017/0253609).

Подкласс анилин-пиримидинов от Assembly Biosciences также проявляет активность против HBV (WO 2015/057945, WO 2015/172128). Подкласс конденсированных трициклов от Assembly Biosciences (добензотиазепиноны, дибензодиазепиноны, дибензооксазепиноны) проявляют активность против HBV (WO 2015/138895, WO 2017/048950).

Ряд циклических сульфамидов от Assembly Biosciences были описаны как модуляторы функционирования HBV-CP (WO 2018/160878).

Arbutus Biopharma представила ряд бензамидов для терапии HBV (WO 2018/052967, WO 2018/172852).

Также было показано, что малая молекула бис-ANS действует как молекулярный «клин», препятствуя нормальной геометрии капсидного белка, и она препятствует образованию капсида (Zlotnick A et al. J. Virol. 2002, 4848).

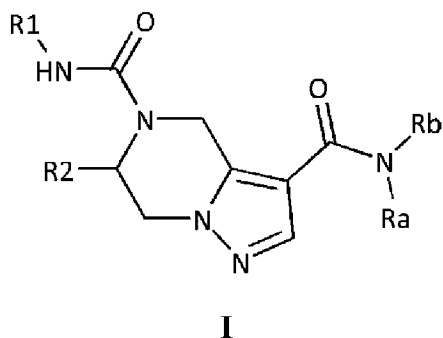
Проблемы, связанные с использованием противовирусных агентов прямого действия против HBV, могут состоять в токсичности, мутагенности, отсутствие селективности, плохой эффективности, плохой биодоступности, низкой растворимости и трудности синтеза. Таким образом, существует потребность в дополнительных ингибиторах для лечения, облегчения или профилактики инфекции HBV, которые могут преодолеть по меньшей мере один из этих недостатков или которые имеют дополнительные преимущества, такие как повышенная эффективность или увеличенное окно безопасности.

Введение таких терапевтических агентов пациенту, инфицированному HBV, либо в виде монотерапии, либо в сочетании с другими видами лечения HBV или в виде вспомогательного лечения, приведет к значительному снижению вирусной нагрузки, улучшению прогноза, снижению прогрессирования заболевания и/или повышению уровня сероконверсии.

Сущность изобретения

В настоящем документе предложены соединения, полезные для лечения или профилактики инфекции HBV у субъекта, нуждающегося в этом, и промежуточные

соединения, используемые для их получения. Объектом изобретения является соединение формулы I:



в котором

- R¹ представляет собой фенил или пиридил, необязательно замещенные одной, двумя или тремя группами галогена, C1-C4-алкила, C3-C6-циклоалкила, C1-C4-галогеналкила или C≡N,

- R² представляет собой H или метил,

- R^a и R^b независимо выбраны из группы, включающей C1-C6-алкил, C1-C6-галогеналкил, C3-C6-циклоалкил, C3-C7-гетероциклоалкил, C2-C6-гидроксиалкил и C2-C6-алкил-O-C1-C6-алкил, необязательно замещенные 1, 2 или 3 группами, каждая из которых независимо выбрана из OH, галогена, карбокси, C3-C7-гетероциклоалкила, C1-C6-алкила, C1-C6-галогеналкила, C1-C6-гидроксиалкила, C1-C6-алкил-O-C1-C6-алкила, C1-C6-алкил-O-C1-C6-галогеналкила, C1-C6-алкил-S-C1-C6-алкила, C1-C6-алкил-SO₂-C1-C6-алкила, C1-C6-алкил-C≡N, C1-C2-алкил-O-C3-C6-циклоалкила, C1-C2-алкил-C3-C7-гетероциклоалкила, C1-C2-алкил-OC(=O)(C3-C7-циклоалкил)NH₂, C1-C2-алкил-OC(=O)(C1-C6-алкил)NH₂, арила и гетероарила, где арил или гетероарил необязательно замещены 1, 2 или 3 группами, каждая из которых независимо выбрана из галогена и C1-C6-алкила,

- R^a и R^b необязательно соединены с образованием C3-C7-гетероциклоалкильного кольца или гетероспироциклической системы, состоящей из 2-х или 3-х C3-C7-колец, необязательно замещенных 1, 2 или 3 группами, выбранными из OH, галогена, карбокси, OCF₃, OCHF₂ и C≡N,

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы I, в котором R¹ представляет собой фенил или пиридил, необязательно замещенные одной, двумя или тремя группами галогена, C1-C4-алкила, C3-C6-циклоалкила, C1-C4-галогеналкила или C≡N.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы I, в котором R² выбран из группы, включающей H и метил.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы I, в котором R^a и R^b независимо выбраны из группы, включающей C1-C6-алкил, C1-C6-галогеналкил, C3-C6-циклоалкил, C3-C7-

гетероциклоалкил, С2-С6-гидроксиалкил, С2-С6-алкил-О-С1-С6-алкил, необязательно замещенные 1, 2 или 3 группами, каждая из которых независимо выбрана из ОН, галогена, карбокси, С3-С7-гетероциклоалкила, С1-С6-алкила, С1-С6-галогеналкила, С1-С6-гидроксиалкила, С1-С6-алкил-О-С1-С6-алкила, С1-С6-алкил-О-С1-С6-галогеналкила, С1-С6-алкил-S-С1-С6-алкила, С1-С6-алкил-SO₂-С1-С6-алкила, С1-С6-алкил-C≡N, С1-С2-алкил-О-С3-С6-циклоалкила, С1-С2-алкил-С3-С7-гетероциклоалкила, С1-С2-алкил-ОС(=О)(С3-С7-циклоалкил)NH₂, С1-С2-алкил-ОС(=О)(С1-С6-алкил)NH₂, арила и гетероарила, где арил или гетероарил необязательно замещены 1, 2 или 3 группами, каждая из которых независимо выбрана из галогена и С1-С6-алкила.

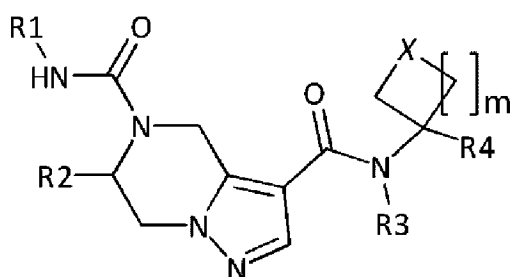
В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы I, в котором R^a и R^b необязательно соединены с образованием С3-С7-гетероциклоалкильного кольца или гетероспироциклической системы, состоящей из 2 или 3 С3-С7-колец, необязательно замещенных 1, 2 или 3 группами, выбранными из ОН, галогена, карбокси, OCF₃, OCHF₂ и C≡N.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с настоящим изобретением, для применения при профилактике или лечении инфекции HBV у субъекта.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль согласно настоящему изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения инфекции HBV у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с настоящим изобретением.

Еще один вариант осуществления изобретения представляет собой соединение формулы II или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с изобретением для применения при профилактике или лечении инфекции HBV у субъекта, нуждающегося в этом



II

в котором

- R1 представляет собой фенил или пиридил, необязательно замещенные одной, двумя или тремя группами галогена, C1-C4-алкила, C3-C6-циклоалкила, C1-C4-галогеналкила или $C\equiv N$,

- R2 представляет собой H или метил,

- R3 представляет собой C1-C4-алкил, где указанный C1-C4-алкил является незамещенным, или он замещен одной, двумя или тремя группами дейтерия, OH или галогена,

- R4 выбран из группы, включающей C1-C2-алкил-O-C1-C4-алкил, C1-C2-гидроксиалкил, C1-C2-алкил-O-C1-C4-галогеналкил, C1-C2-алкил-NH-C1-C4-галогеналкил, C1-C2-алкил-O-C3-C6-циклоалкил, C1-C2-алкил-S-C1-C4-алкил, C1-C2-алкил-SO₂-C1-C4-алкил, C1-C2-алкил-C \equiv N, C1-C2-алкил-C3-C7-гетероциклоалкил, C1-C2-алкил-OC(=O)(C3-C7-циклоалкил)NH₂, C1-C2-алкил-OC(=O)(C1-C6-алкил)NH₂, арил и гетероарил, где арил или гетероарил необязательно замещены одной, двумя или тремя группами галогена или C1-C6-алкила,

- R3 и R4 необязательно соединены с образованием пяти-, шести- или семичленного гетероциклического кольца, где указанное гетероциклическое кольцо является незамещенным, или оно замещено одной, двумя или тремя группами галогена, OH, карбокси, OCF₃, OCHF₂ или $C\equiv N$,

- X представляет собой O, CH₂ или NR₅

- m равно 0, 1, 2 или 3,

- R5 представляет собой H или C1-C4-алкил.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором R1 представляет собой фенил или пиридил, необязательно замещенные одной, двумя или тремя группами галогена, C1-C4-алкила, C3-C6-циклоалкила, C1-C4-галогеналкила или $C\equiv N$.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы I, в котором R2 представляет собой H или метил.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором R3 представляет собой C1-C4-алкил, где указанный C1-C4-алкил является незамещенным, или он замещен одной, двумя или тремя группами галогена или OH.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором R4 представляет собой C1-C2-алкил-O-C1-C4-алкил, C1-C2-гидроксиалкил, C1-C2-алкил-O-C1-C4-галогеналкил, C1-C2-алкил-NH-C1-C4-галогеналкил, C1-C2-алкил-O-C3-C6-циклоалкил, C1-C2-алкил-S-C1-C4-алкил, C1-C2-алкил-SO₂-C1-C4-алкил, C1-C2-алкил-C \equiv N, C1-C2-алкил-C3-C7-гетероциклоалкил, C1-C2-алкил-OC(=O)(C3-C7-циклоалкил)NH₂, C1-C2-алкил-OC(=O)(C1-C6-алкил)NH₂, арил или гетероарил, где арил или гетероарил необязательно замещены одной, двумя или тремя группами галогена или C1-C6-алкила.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором X представляет собой O, CH₂, H или R5.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором R5 представляет собой H или C1-C4-алкил.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором m равно 0, 1, 2 или 3.

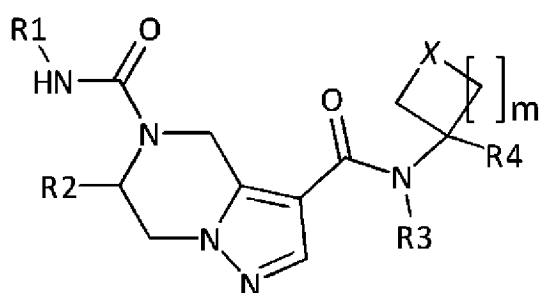
В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором R3 и R4 необязательно соединены с образованием пяти-, шести- или семичленного карбоциклического или гетероциклического кольца, где указанное карбоциклическое или гетероциклическое кольцо является незамещенным или оно замещено одной, двумя или тремя группами галогена, карбокси, OH, OCF₃, OCHF₂ или C≡N.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой соединение формулы II или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с настоящим изобретением, для применения при профилактике или лечении инфекции HBV у субъекта.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы II или его фармацевтически приемлемую соль согласно настоящему изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения представляет собой способ лечения инфекции HBV у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества соединения формулы II или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с настоящим изобретением.

Еще один вариант осуществления изобретения представляет собой соединение формулы II или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с изобретением для применения при профилактике или лечении инфекции HBV у субъекта, нуждающегося в этом



II

в котором

- R1 представляет собой фенил или пиридил, необязательно замещенные одной, двумя или тремя группами галогена, C1-C4-алкила, C3-C6-циклоалкила, C1-C4-галогеналкила или C≡N,

- R2 представляет собой H или метил,
- R3 представляет собой C1-C4-алкил, где указанный C1-C4-алкил является незамещенным, или он замещен одной, двумя или тремя группами дейтерия или галогена,
- R4 выбран из группы, включающей C1-C2-алкил-O-C1-C4-алкил, C1-C2-гидроксиалкил, C1-C2-алкил-O-C1-C4-галогеналкил, C1-C2-алкил-O-C3-C6-циклоалкил, C1-C2-алкил-S-C1-C4-алкил, C1-C2-алкил-SO₂-C1-C4-алкил, C1-C2-алкил-C≡N, C1-C2-алкил, -C3-C7-гетероциклоалкил, C1-C2-алкил-OC(=O)(C3-C7-циклоалкил)NH₂, C1-C2-алкил-OC(=O)(C1-C6-алкил)NH₂, арил и гетероарил, где арил или гетероарил необязательно замещены одной, двумя или тремя группами галогена или C1-C6-алкила,
- R3 и R4 необязательно соединены с образованием пяти-, шести- или семичленного гетероциклического кольца, где указанное гетероциклическое кольцо является незамещенным, или оно замещено одной, двумя или тремя группами галогена, OH, карбокси, OCF₃, OCHF₂ или C≡N,
- X представляет собой O, CH₂ или NR₅,
- m равно 0, 1 или 2,
- R5 представляет собой H или C1-C4-алкил.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором R1 представляет собой фенил или пиридил, необязательно замещенные одной, двумя или тремя группами галогена, C1-C4-алкила, C3-C6-циклоалкила, C1-C4-галогеналкила или C≡N.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором R2 представляет собой H или метил.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором R3 представляет собой C1-C4-алкил, где указанный C1-C4-алкил является незамещенным, или он замещен одной, двумя или тремя группами галогена.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором R4 представляет собой C1-C2-алкил-O-C1-C4-алкил, C1-C2-гидроксиалкил, C1-C2-алкил-O-C1-C4-галогеналкил, C1-C2-алкил-O-C3-C6-циклоалкил, C1-C2-алкил-S-C1-C4-алкил, C1-C2-алкил-SO₂-C1-C4-алкил, C1-C2-алкил-C≡N, C1-C2-алкил-C3-C7-гетероциклоалкил, C1-C2-алкил-OC(=O)(C3-C7-циклоалкил)NH₂, C1-C2-алкил-OC(=O)(C1-C6-алкил)NH₂, арил или гетероарил, где арил или гетероарил необязательно замещены одной, двумя или тремя группами галогена или C1-C6-алкила.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором X представляет собой O, CH₂, H или R₅.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором R₅ представляет собой H или C1-C4-алкил.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором m равно 0, 1 или 2.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объектом изобретения является соединение формулы II, в котором R3 и R4 необязательно соединены с образованием в пяти-, шести- или семичленного карбоциклического или гетероциклического кольца, где указанное карбоциклическое или гетероциклическое кольцо является незамещенным, или оно замещено одной, двумя или тремя группами галогена, карбокси, OH, OCF₃, OCHF₂ или C≡N.

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой соединение формулы II или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с настоящим изобретением для применения при профилактике или лечении инфекции HBV у субъекта.

Один вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы II или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с настоящим изобретением вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ лечения инфекции HBV у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества соединения формулы II или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых вариантах выполнения изобретения доза соединения по изобретению составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 2500 мг. В некоторых вариантах выполнения доза соединения по изобретению, используемого в композициях, описанных здесь, составляет менее приблизительно 10000 мг, или менее приблизительно 8000 мг, или менее приблизительно 6000 мг, или менее приблизительно 5000 мг, или менее приблизительно 3000 мг, или менее приблизительно 2000 мг, или менее приблизительно 1000 мг, или менее приблизительно 500 мг, или менее приблизительно 200 мг, или менее приблизительно 50 мг. Аналогичным образом, в некоторых вариантах доза второго соединения (т.е. другого лекарственного средства для лечения HBV), как описано здесь, составляет менее приблизительно 1000 мг, или менее приблизительно 800 мг, или менее приблизительно 600 мг, или менее приблизительно 500 мг, или менее приблизительно 400 мг, или менее приблизительно 300 мг, или менее приблизительно 200 мг, или менее приблизительно 100 мг, или менее приблизительно 50 мг, или менее приблизительно 40 мг, или менее приблизительно 30 мг, или менее приблизительно 25 мг, или менее приблизительно 20 мг, или менее приблизительно 15 мг, или менее приблизительно 10 мг, или менее приблизительно 5 мг, или менее приблизительно 2 мг, или менее приблизительно 1 мг, или менее приблизительно 0,5 мг, и любые целые или дробные промежуточные значения. Все вышеупомянутые дозы относятся к суточным дозам для пациента.

В общем случае предполагается, что суточное противовирусное эффективное количество должно быть от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мг/кг, или от приблизительно 0,01 до приблизительно 30 мг/кг массы тела. Может быть целесообразно

вводить требуемую дозу в виде двух, трех, четырех или более субдоз с соответствующими интервалами в течение дня. Указанные субдозы могут быть представлены в виде единичных дозированных лекарственных форм, содержащих, например, от приблизительно 1 до приблизительно 500 мг, или от приблизительно 1 до приблизительно 300 мг, или от приблизительно 1 до приблизительно 100 мг, или от приблизительно 2 до приблизительно 50 мг активного ингредиента на единичную дозированную лекарственную форму.

Соединения по изобретению могут, в зависимости от их структуры, существовать в виде солей, сольватов или гидратов. Следовательно, изобретение также включает соли, сольваты или гидраты и их соответствующие смеси.

Соединения по изобретению могут, в зависимости от их структуры, существовать в таутомерных или стереоизомерных формах (энантиомеры, диастереомеры). Таким образом, изобретение также включает таутомеры, энантиомеры или диастереомеры и их соответствующие смеси. Стереоизомерно однородные компоненты могут быть выделены известным способом из таких смесей энантиомеров и/или диастереомеров.

Определения

Ниже перечислены определения различных терминов, используемых для описания настоящего изобретения. Эти определения применяются к терминам в том виде, в котором они используются в данном описании и формуле изобретения, если не указано иное в отношении конкретных случаев индивидуально или в отношении части большей группы.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые здесь, обычно имеют значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Обычно используемая здесь номенклатура и лабораторные процедуры в отношении культуры клеток, молекулярной генетики, органической химии и химии пептидов хорошо известны, и они обычно используются в данной области.

Используемые здесь определения и термины, представленные в единственном числе, относятся к одному или более чем одному (то есть по меньшей мере к одному) объекту. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более чем один элемент. Кроме того, использование термина «включает», а также другие формы, такие как «включая», «включающий» и т.п., не является ограничивающим указанием.

Используемый здесь термин «модулятор сборки капсида» относится к соединению, которое нарушает, или ускоряет, или ингибирует, или препятствует, или задерживает, или уменьшает, или модифицирует нормальную сборку капсида (например, во время созревания) или нормальную разборку капсида (например, во время инфекционного процесса) или нарушает стабильность капсида, вызывая тем самым aberrantную морфологию капсида или aberrantное функционирование капсида. В одном варианте осуществления изобретения, модулятор сборки капсида ускоряет сборку или разборку капсида, вызывая тем самым aberrantную морфологию капсида. В другом варианте осуществления изобретения модулятор сборки капсида взаимодействует (например, связывается с активным сайтом, связывается с аллостерическим сайтом или

модифицирует и/или препятствует процессу фолдинга и т.п.), с главным белком сборки капсида (HBV-CP), тем самым нарушая сборку или разборку капсида. В еще одном варианте осуществления изобретения модулятор сборки капсида вызывает нарушение структуры или функционирования HBV-CP (например, способность HBV-CP к сборке, разборке, связывания с субстратом, складываться в подходящую конформацию или т.п., что снижает инфекционность вируса и/или является летальным для вируса).

Используемый здесь термин «лечение» или «лечить» определяется как применение или введение терапевтического агента, то есть соединения по изобретению (отдельно или в комбинации с другим фармацевтическим агентом/средством), пациенту, или применение или введение терапевтического агента в изолированную ткань или клеточную линию от пациента (например, для диагностики или применения *ex vivo*), у которого имеется инфекция HBV, симптом инфекции HBV или у которого имеется возможность развития инфекции HBV, с целью лечения, излечения, облегчения, ослабления, улучшения состояния или с целью повлиять на инфекцию HBV, симптомы инфекции HBV или возможность развития инфекции HBV. Такие методы лечения могут быть специально адаптированы или модифицированы на основе знаний в области фармакогеномики.

Используемый здесь термин «предотвращение» или «профилактика» означает отсутствие нарушения или развития заболевания, если оно еще не произошло, или отсутствие дальнейшего развития нарушения или заболевания, если уже имело место развитие нарушения или заболевания. Также считается, что можно предотвратить некоторые или все симптомы, связанные с нарушением или заболеванием.

Используемый здесь термин «пациент», «индивидуум» или «субъект» относится к человеку или млекопитающему, не являющемуся человеком. Млекопитающие, не являющиеся человеком, включают, например, домашний скот и домашних животных, таких как овцы, коровы, свиньи, кошки и млекопитающие, относящиеся к подсемейству мышинных. Предпочтительно пациентом, субъектом или индивидуумом является человек.

Используемые здесь термины «эффективное количество», «фармацевтически эффективное количество» и «терапевтически эффективное количество» относятся к нетоксичному, но достаточному количеству агента для обеспечения желаемого биологического результата. Этим результатом может быть уменьшение и/или облегчение признаков симптомов или причин заболевания, или любым другим желательным изменением биологической системы. Соответствующее терапевтическое количество в каждом отдельном случае может быть определено специалистом в данной области техники с использованием обычного экспериментирования.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый» относится к такому материалу, как носитель или разбавитель, который не меняет биологической активности или свойств соединения, и который является относительно нетоксичным, т.е. такой материал может быть введен индивидууму, не вызывая нежелательных биологических явлений и не взаимодействуя с любым из компонентов композиции, в которой он содержится.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к производным описанных соединений, в которых исходное соединение модифицировано путем преобразования существующей кислотной или основной группы в ее солевую форму. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но без ограничения, соли неорганических или органических кислот основных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и тому подобное. Фармацевтически приемлемые соли настоящего изобретения включают обычные нетоксичные соли исходного соединения, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Фармацевтически приемлемые соли настоящего изобретения могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную группу, обычными химическими методами. Обычно такие соли могут быть получены взаимодействием свободных кислот или оснований этих соединений со стехиометрическим количеством соответствующего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе или в их смеси; как правило, неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол, или ацетонитрил являются предпочтительными. Перечень подходящих солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences 17th ed. Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985 p.1418 и в Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Используемый здесь термин «композиция» или «фармацевтическая композиция» относится к смеси по меньшей мере одного соединения, используемого в рамках изобретения, с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтическая композиция облегчает введение соединения пациенту или субъекту. В данной области существует множество методик введения соединения, включая, но без ограничения, внутривенное, пероральное, аэрозольное, ректальное, парентеральное, офтальмологическое, легочное и местное введение.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, стабилизатор, диспергирующий агент, суспендирующий агент, разбавитель, эксципиент, загуститель, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующие в переносе или транспортировка соединения, полезного в рамках изобретения, внутри пациента или к пациенту таким образом, чтобы оно могло выполнять предполагаемую функцию. Обычно такие конструкции переносятся или транспортируются из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами композиции, включая соединение, используемое в рамках изобретения, и не причинять вреда пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза

и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод, желатин, тальк; эксципиенты, такие как масло какао и воски для суппозиторий; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; поверхностно-активные вещества; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических препаратах.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый носитель» также включает любые без исключения покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, агенты, замедляющие абсорбцию, и т.п., которые совместимы с активностью соединения, используемого в рамках изобретения, и которые являются физиологически приемлемыми для пациента. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в композиции. «Фармацевтически приемлемый носитель» может дополнительно включать фармацевтически приемлемую соль соединения, полезного в рамках изобретения. Другие дополнительные ингредиенты, которые могут быть включены в фармацевтические композиции, используемые при осуществлении изобретения, известны в данной области и описаны, например, в публикации Remington's Pharmaceutical Sciences (Genaro, Ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985), которая включена в описание посредством ссылки.

Используемый здесь термин «замещенный» означает, что атом или группа атомов замещают водород в качестве заместителя, присоединенного к другой группе.

Используемый здесь термин «включающий/содержащий» также включает понятие «состоящий».

Используемый здесь термин «алкил» как таковой или как часть другого заместителя означает, если не указано иное, углеводород с прямой или разветвленной цепью, имеющий указанное число атомов углерода (т.е. «C1-C6-алкил» означает алкил, содержащий от одного до шести атомов углерода) и включает прямые и разветвленные цепи. Примеры включают метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, пентил, неопентил и гексил. Кроме того, термин «алкил» как таковой или как часть другого заместителя, также может означать углеводород с прямой цепью C1-C3, замещенный C3-C5-карбоциклическим кольцом. Примеры включают (циклопропил)метил, (циклобутил)метил и (циклопентил)метил. Во избежание сомнений, если в группе присутствуют два алкильных остатка, алкильные остатки могут быть одинаковыми или разными.

Используемый здесь термин «алкенил» означает одновалентную группу, полученную из углеводородного остатка, содержащего по меньшей мере два атома углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь с E или Z

стереохимией. Двойная связь может являться или может не являться точкой присоединения к другой группе. Алкенильные группы (например, C2-C8-алкенил) включают, но без ограничения, например, этенил, пропенил, проп-1-ен-2-ил, бутенил, метил-2-бутен-1-ил, гептенил и октенил. Во избежание сомнений, когда в группе присутствуют два алкенильных остатка, алкильные остатки могут быть одинаковыми или разными.

Как используется здесь, C2-C6-алкинильная группа или остаток представляет собой линейную или разветвленную алкинильную группу или остаток, содержащий от 2 до 6 атомов углерода, например, C2-C4 алкинильная группа или остаток содержит от 2 до 4 атомов углерода. Типичные алкинильные группы включают $-C\equiv CH$ или $-CH_2-C\equiv C$, а также 1- и 2-бутинил, 2-пентинил, 3-пентинил, 4-пентинил, 2-гексенил, 3-гексенил, 4-гексенил и 5-гексинил. Во избежание сомнений, когда в группе присутствуют два алкинильных остатка, они могут быть одинаковыми или разными.

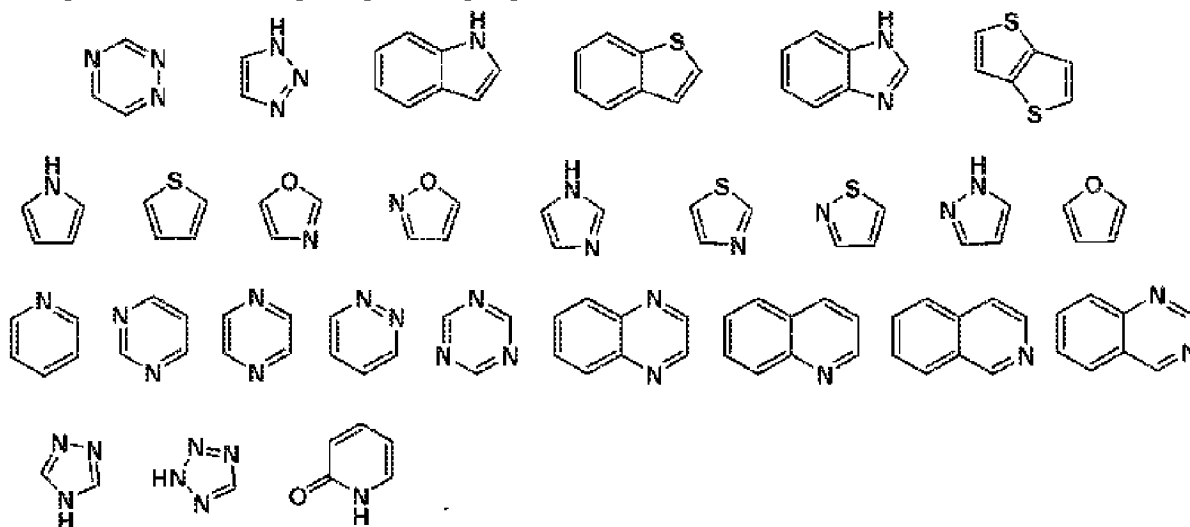
Как используется здесь, термин «галоген» или «гало» как таковой или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, атом фтора, хлора, брома или иода, предпочтительно фтора, хлора или брома, более предпочтительно - фтора или хлора. Во избежание сомнений, если в группе присутствуют два галогеновых остатка, они могут быть одинаковыми или разными.

Как используется здесь, группа C1-C6-алкокси или группа C2-C6-алкенилокси обычно представляет собой указанную C1-C6-алкильную (например, C1-C4 алкильную) группу или указанную C2-C6-алкенильную (например, C2-C4 алкенильную) группу, соответственно, которая присоединена к атому кислорода.

Используемый здесь термин «арил», используемый отдельно или в сочетании с другими терминами, означает, если не указано иное, карбоциклическую ароматическую систему, содержащую одно или несколько колец (обычно одно, два или три кольца), где такие кольца могут быть соединены вместе в виде боковой цепи, образуя, например, бифенил, или могут быть конденсированными, образуя, например нафталин. Примеры арильных групп включают фенил, антрацил, и нафтил. Предпочтительными примерами являются фенил (например, C6-арил) и бифенил (например, C12-арил). В некоторых вариантах выполнения арильные группы содержат от шести до шестнадцати атомов углерода. В некоторых вариантах выполнения изобретения арильные группы содержат от шести до двенадцати атомов углерода (например, C6-C12-арил). В некоторых вариантах осуществления изобретения арильные группы имеют шесть атомов углерода (например, C6-арил).

Используемые здесь термины «гетероарил» и «гетероароматический» относятся к гетероциклу, имеющему ароматический характер, содержащему одно или несколько колец (обычно одно, два или три кольца). Гетероарильные заместители могут быть определены числом атомов углерода, например, «C1-C9-гетероарил» показывает количество атомов углерода, содержащихся в гетероарильной группе, без учета количества гетероатомов. В частности, C1-C9-гетероарил может включать от одного до

четырёх дополнительных гетероатомов. Полициклический гетероарил может включать одно или несколько колец, которые являются частично насыщенными. Неограничивающие примеры гетероариллов включают:



Дополнительные неограничивающие примеры гетероарильных групп включают пиридил, пиазинил, пиримидинил (включая, например, 2- и 4-пиримидинил), пиридазинил, тиенил, фурил, пирролил (включая, например, 2-пирролил), имидазолил, тиазолил, оксазолил, пиазолил (включая, например, 3- и 5-пиазолил), изотиазолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,4-триазолил, 1,3,4-триазолил, тетразолил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-тиадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил. Неограничивающие примеры полициклических гетероциклов и гетероариллов включают индолил (включая 3-, 4-, 5-, 6- и 7-индолил), индолинил, хинолил, тетрагидрохинолил, изохинолил (включая, например, 1- и 5-изохинолил), 1,2,3,4-тетрагидроизохинолил, циннолинил, хиноксалинил (включая, например, 2- и 5-хиноксалинил), хиназолинил, фталазинил, 1,8-нафтиридинил, 1,4-бензодиоксанил, кумарин, дигидрокумарин, 1,5-нафтиридинил, бензофурил (включая, например, 3-, 4-, 5-, 6- и 7-бензофурил), 2,3-дигидробензофурил, 1,2-бензизоксазолил, бензотиенил (включая, например, 3-, 4-, 5-, 6- и 7-бензотиенил), бензоксазолил, бензотиазолил (включая, например, 2-бензотиазолил и 5-бензотиазолил), пуринил, бензимидазолил (включая, например, 2-бензимидазолил), бензотриазолил, тиоксантенинил, карбазолил, карболинил, акридинил, пирролидинил и хинолизинил.

Используемый здесь термин «галогеналкил» обычно представляет собой указанную алкильную, алкенильную, алкокси или алкенокси группу, где любой один или несколько атомов углерода замещены одним или несколькими указанными атомами галогена, как определено выше. Термин «галогеналкил» охватывает моногалогеналкил, дигалогеналкил и полигалогеналкильные радикалы. Термин «галогеналкил» включает, но без ограничений, фторметил, 1-фторэтил, дифторметил, 2,2-дифторэтил, 2,2,2-трифторэтил, трифторметил, хлорметил, дихлорметил, трихлорметил, пентафторэтил, дифторметокси и трифторметокси.

Как используется здесь, C1-C6-гидроксиалкильная группа представляет собой указанную C1-C6 алкильную группу, замещенную одной или несколькими

гидроксильными группами. Как правило, она замещена одной, двумя или тремя гидроксильными группами. Предпочтительно, когда она замещена одной гидроксильной группой.

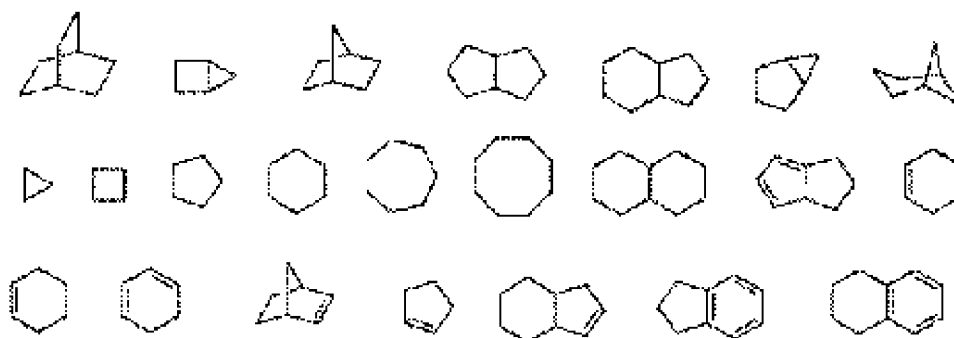
Как используется здесь, С1-С6-аминоалкильная группа представляет собой указанную С1-С6 алкильную группу, замещенную одной или несколькими аминогруппами. Как правило, она замещена одной, двумя или тремя аминогруппами. Предпочтительно, когда она замещена одной аминогруппой.

Как используется здесь, С1-С4-карбоксиалкильная группа представляет собой указанную С1-С4-алкильную группу, замещенную карбоксильной группой.

Как используется здесь, С1-С4-карбоксамидоалкильная группа представляет собой указанную С1-С4-алкильную группу, замещенную замещенной или незамещенной карбоксамидной группой.

Как используется здесь, С1-С4-ацилсульфонамидоалкильная группа представляет собой указанную С1-С4-алкильную группу, замещенную ацилсульфонамидной группой общей формулы $C(=O)NHSO_2CH_3$ или $C(=O)NHSO_2-c-Pr$.

Как используется здесь, термин «циклоалкил» относится к моноциклической или полициклической неароматической группе, в которой каждый из атомов, образующих кольцо (т.е. скелетные атомы), представляет собой атом углерода. В одном варианте осуществления изобретения циклоалкильная группа является насыщенной или частично ненасыщенной. В другом варианте циклоалкильная группа конденсирована с ароматическим кольцом. Циклоалкильные группы включают группы, содержащие от 3 до 10 атомов в кольце (С3-С10-циклоалкил), группы, содержащие от 3 до 8 атомов в кольце (С3-С8-циклоалкил), группы, содержащие от 3 до 7 атомов в кольце (С3-С7-циклоалкил) и группы, содержащие от 3 до 6 атомов в кольце (С3-С6-циклоалкил). Иллюстративные примеры циклоалкильных групп включают, но без ограничения, следующие остатки:

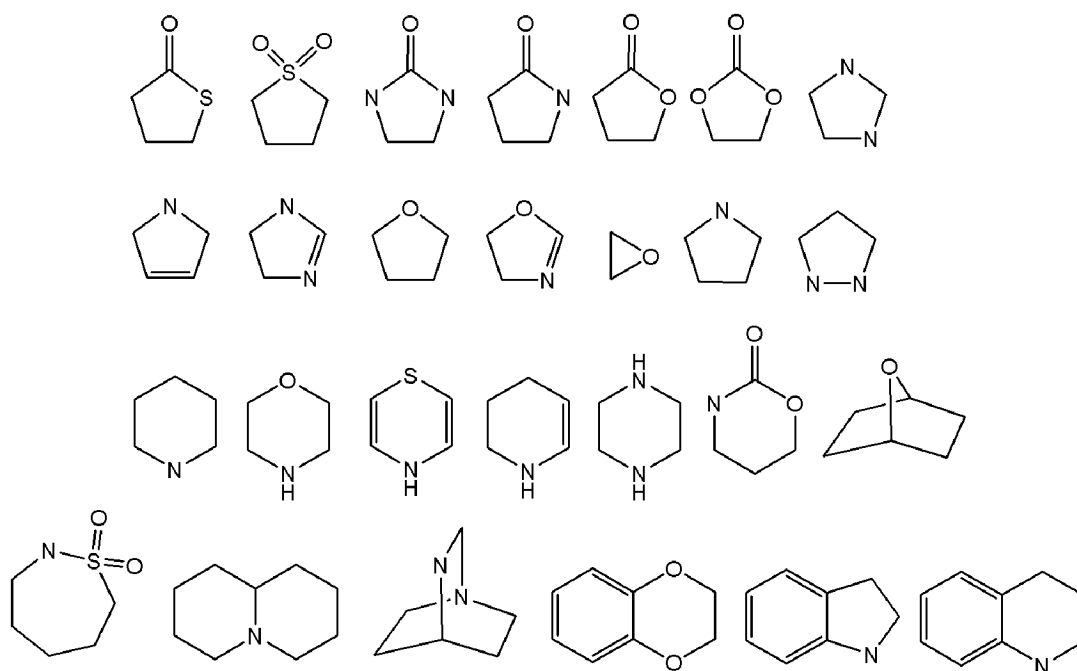


Моноциклические циклоалкилы включают, но без ограничения, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил и циклооктил. Двухциклические циклоалкилы включают, но без ограничения, тетрагидронафтил, инданил и тетрагидропентален. Полициклические циклоалкилы включают адамантан и норборнен. Термин «циклоалкил» включает в себя «ненасыщенный неароматический карбоциклил» или «неароматический ненасыщенный карбоциклил», оба из которых относятся к неароматическому карбоциклу, как определено здесь, который содержит, по меньшей

мере, одну углерод-углеродную двойную связь или одну углерод-углеродную тройную связь.

Используемый здесь термин «спироциклический» относится к любому соединению, содержащему два или более колец, в которых два кольца имеют один общий кольцевой атом углерода.

Как используется здесь, термины «гетероциклоалкил» и «гетероциклил» относятся к гетероалициклической группе, содержащей одно или несколько колец (обычно одно, два или три кольца), которая содержит от одного до четырех кольцевых гетероатомов, каждый из которых выбран из кислорода, серы и азота. В одном варианте каждая гетероциклильная группа имеет от 3 до 10 атомов в кольцевой системе, при условии, что кольцо указанной группы не содержит двух смежных атома кислорода или серы. В одном варианте каждая гетероциклильная группа имеет конденсированную бициклическую кольцевую систему с 3-10 атомами в кольцевой системе, и при условии, что кольцо указанной группы не содержит двух смежных атома кислорода или серы. В одном варианте каждая гетероциклильная группа имеет мостиковую бициклическую кольцевую систему с 3-10 атомами в кольцевой системе, и при условии, что кольцо указанной группы не содержит двух смежных атома кислорода или серы. В одном варианте осуществления каждая гетероциклильная группа имеет спиробициклическую кольцевую систему с 3-10 атомами в кольцевой системе, и при условии, что кольцо указанной группы не содержит двух смежных атома кислорода или серы. Гетероциклильные заместители могут быть альтернативно определены числом атомов углерода, например, C2-C8-гетероциклил указывает на число атомов углерода, содержащихся в гетероциклической группе, не включая гетероатомов. Например, C2-C8-гетероциклил будет включать дополнительно от одного до четырех гетероатомов. В другом варианте осуществления изобретения гетероциклоалкильная группа сконденсирована с ароматическим кольцом. В другом варианте гетероциклоалкильная группа сконденсирована с гетероарильным кольцом. В одном варианте гетероатомы азота и серы могут быть необязательно окислены, и атом азота может быть необязательно кватернизован. Гетероциклическая система может быть присоединена, если не указано иное, по любому гетероатому или атому углерода, образуя стабильную структуру. Пример 3-членной гетероциклической группы включает, без ограничения, азиридин. Примеры 4-членных гетероциклоалкильных групп включают, но без ограничения, азетидин и бета-лактамы. Примеры 5-членных гетероциклических групп включают, без ограничения, пирролидин, оксазолидин и тиазолидиндион. Примеры 6-членных гетероциклоалкильных групп включают, без ограничения, пиперидин, морфолин, пиперазин, N-ацетилпиперазин и N-ацетилморфолин. Другими неограничивающими примерами гетероциклильных групп являются



Примеры гетероциклов включают моноциклические группы, такие как азиридин, оксиран, тиран, азетидин, оксетан, тиепан, пирролидин, пирролин, пиразолидин, имидазолин, диоксолан, сульфолан, 2,3-дигидрофуран, 2,5-дигидрофуран, тетрагидрофуран, тиофан, пиперидин, 1,2,3,6-тетрагидропиридин, 1,4-дигидропиридин, пиперазин, морфолин, тиоморфолин, пиран, 2,3-дигидропиран, тетрагидропиран, 1,4-диоксан, 1,3-диоксан, 1,3-диоксолан, гомопиперазин, гомопиперидин, 1,3-диоксин, 4,7-дигидро-1,3-диоксепин и гексаметиленоксид. Термины «С3-С7-гетероциклоалкил» включают, но без ограничения, тетрагидрофуран-2-ил, тетрагидрофуран-3-ил, 3-оксабицикло[3.1.0]гексан-6-ил, 3-азабицикло[3.1.0]гексан-6-ил, тетрагидропиран-4-ил, тетрагидропиран-3-ил, тетрагидропиран-2-ил и азетидин-3-ил.

Используемый здесь термин «ароматический» относится к карбоциклу или гетероциклу с одним или несколькими полиненасыщенными кольцами и имеющими ароматический характер, т.е. имеющие $(4n+2)$ делокализованные π (пи) электроны, где n представляет собой целое число.

Используемый здесь термин «ацил», отдельно или в сочетании с другими терминами, означает, если не указано иное, алкильную, циклоалкильную, гетероциклоалкильную, арильную или гетероарильную группу, связанную через карбонильную группу.

Используемые здесь термины «карбамоил» и «замещенный карбамоил», отдельно или в сочетании с другими терминами, означают, если не указано иное, карбонильную группу, связанную с аминогруппой, необязательно моно-или дизамещенной водородом, алкилом, циклоалкилом, гетероциклоалкилом, арилом или гетероарилом. В некоторых вариантах заместители азота могут быть соединены, образуя гетероциклическое кольцо, как определено выше.

Используемый здесь термин «карбоксии», как таковой или как часть другого заместителя означает, если не указано иное, группу формулы $C(=O)OH$.

Используемый здесь термин «сложный эфир карбоновой кислоты» и «карбокисильный эфир» как таковой или как часть другого заместителя означает, если не указано иное, группу формулы $C(=O)OX$, где X выбран из группы, состоящей из C1-C6-алкила, C3-C7-циклоалкила и арила.

Используемый здесь термин «пролекарство» означает производное соединения формулы I или формулы II, которое вводят в указанной форме, и которое после введения метаболизируется в условиях *in vivo* в активный метаболит соответственно формулы I, или формулы II.

Различные формы пролекарства известны в данной области техники. Примеры таких пролекарств представлены в: Design of Prodrugs, edited by H. Bundgaard, (Elsevier, 1985) и Methods in Enzymology, Vol. 42, p. 309-396, edited by K. Widder, et al. (Academic Press, 1985); A Textbook of Drug Design and Development, edited by Krogsgaard-Larsen and H. Bundgaard, Chapter 5 "Design and Application of Prodrugs" by H. Bundgaard p. 113-191 (1991); H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews 8, 1-38 (1992); H. Bundgaard, et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 285 (1988); и N. Kakeya, et al., Chem. Pharm. Bull., 32, 692 (1984).

Примеры пролекарств включают расщепляемые сложные эфиры соединений формулы I или формулы II. Расщепляемый в условиях *in vivo* сложный эфир соединения по изобретению, содержащего карбоксигруппу, представляет собой, например, фармацевтически приемлемый сложный эфир, который расщепляется в организме человека или животного с образованием исходной кислоты. Подходящие фармацевтически приемлемые сложные карбокисильные эфиры включают C1-C6-алкиловые сложные эфиры, например метиловые или этиловые эфиры; C1-C6-алкоксиметиловые эфиры, например метоксиметиловый эфир; C1-C6-ацилоксиметиловые эфиры; фталидилловые эфиры; C3-C8-циклоалкоксикарбонилокси-C1-C6 алкиловые сложные эфиры, например 1-циклогексилкарбонилоксиэтил; 1-3-диоксолан-2-илметиловые эфиры, например 5-метил-1,3-диоксолан-2-илметил; C1-C6-алкоксикарбонилоксиэтиловые эфиры, например 1-метоксикарбонилоксиэтил; аминокарбонилметиловые эфиры и их моно- или ди-N-(C1-C6-алкил) варианты, например N, N-диметиламинокарбонилметиловые эфиры и N-этиламинокарбонилметиловые эфиры; и эфир может быть образован по любой карбоксигруппе соединений по изобретению.

Расщепляемый в условиях *in vivo* сложный эфир соединения по изобретению, содержащего гидроксигруппу, представляет собой, например, фармацевтически приемлемый сложный эфир, который расщепляется в организме человека или животного с образованием исходной гидроксигруппы. Подходящие фармацевтически приемлемые сложные гидрокси эфиры включают C1-C6-ациловые эфиры, например ацетиловые эфиры; и бензоиловые эфиры, в которых фенильная группа может быть замещена

аминометилом или N-замещенным моно-или ди-C1-C6-алкиламинометилом, например 4-аминометилбензоиловые эфиры и 4-N, N-диметиламинометилбензоиловые эфиры.

Предпочтительные пролекарства по настоящему изобретению включают ацетилоксипроизводные и карбонатные производные. Например, гидроксигруппа соединений формулы I или формулы II, может присутствовать в пролекарстве как -O-CORⁱ или -O-C(O)ORⁱ, где Rⁱ представляет собой незамещенный или замещенный C1-C4-алкил. Заместители в алкильных группах являются такими, как определено ранее. Предпочтительно алкильные группы в Rⁱ являются незамещенными, и предпочтительными являются метил, этил, изопропил или циклопропил.

Другие предпочтительные пролекарства по изобретению включают аминокислотные производные. Подходящие аминокислоты включают α-аминокислоты, связанные с соединениями формулы I или формулы II через их C(O)OH группы. Такие пролекарства расщепляются в условиях *in vivo* с образованием соединений формулы I или формулы II, несущих гидроксильную группу. Соответственно, такие аминокислотные группы предпочтительно используются в соединениях формулы I или формулы II, где в конечном итоге требуется гидроксильная группа. Таким образом, типичные пролекарства этого варианта выполнения изобретения представляют собой соединения формулы I или формулы II, несущие группу формулы -OC(O)-CH(NH₂)Rⁱⁱ, где Rⁱⁱ представляет собой боковую цепь аминокислоты. Предпочтительные аминокислоты включают глицин, аланин, валин и серин. Аминокислота может быть также функционализирована, например аминогруппа может быть алкилирована. Подходящей функционализированной аминокислотой является N, N-диметилглицин. Предпочтительно, когда аминокислота представляет собой валин.

Другие предпочтительные пролекарства по изобретению включают фосфорамидатные производные. В данной области известны различные формы фосфорамидатных пролекарств. Например, такие пролекарства описаны в Serpi et al., *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 2013, Chapter 15, Unit 15.5 и Mehellou et al., *ChemMedChem*, 2009, 4 pp. 1779-1791. Подходящие фосфорамидаты включают (фенокси)-альфа-аминокислоты, связанные с соединениями формулы I или формулы II через их -ОН-группу. Такие пролекарства расщепляются в условиях *in vivo* с образованием соединений формулы I или формулы II, несущих гидроксигруппу. Соответственно, такие фосфорамидатные группы предпочтительно используют в положениях соединений формулы I или формулы II, где гидроксигруппа в конечном счете необходима. Следовательно, примерами пролекарств данного варианта осуществления изобретения являются соединения формулы I или формулы II, несущие группу формулы -OP(O)(ORⁱⁱⁱ)R^{iv}, где Rⁱⁱⁱ представляет собой алкил, циклоалкил, арил или гетероарил, а R^{iv} представляет собой группу формулы -NH-CH(R^v)C(O)OR^{vi}, где R^v представляет собой боковую цепь аминокислоты, а R^{vi} представляет собой алкил, циклоалкил, арил или гетероцикл. Предпочтительные аминокислоты включают глицин, аланин, валин и

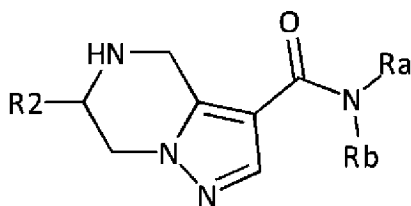
серин. Предпочтительно аминокислота представляет собой аланин. R^v предпочтительно представляет собой алкил, и наиболее предпочтительно - изопропил.

Объектом настоящего изобретения также является способ получения соединений по изобретению. Таким образом, объектом изобретения является способ получения соединения формулы I в соответствии с настоящим изобретением, путем взаимодействия соединения формулы III



III

в котором R1 имеет значения, указанные выше, с соединением формулы IV



IV

в котором R2, R^a и R^b имеют значения, указанные выше.

ПРИМЕРЫ

Далее изобретение описывается со ссылкой на следующие примеры. Эти примеры представлены только с целью иллюстрации, и изобретение не ограничивается этими примерами, а, скорее, охватывает все варианты, которые очевидны в результате представленных здесь раскрытий.

Модуляторы корового белка HBV можно получить разными способами. На Схемах 1 и 2 показаны основные пути синтеза, используемые для их получения для целей настоящего изобретения. Для специалиста-химика в данной области очевидно, что существуют другие методики, которые также позволяют получить эти промежуточные соединения и соединения по примерам.

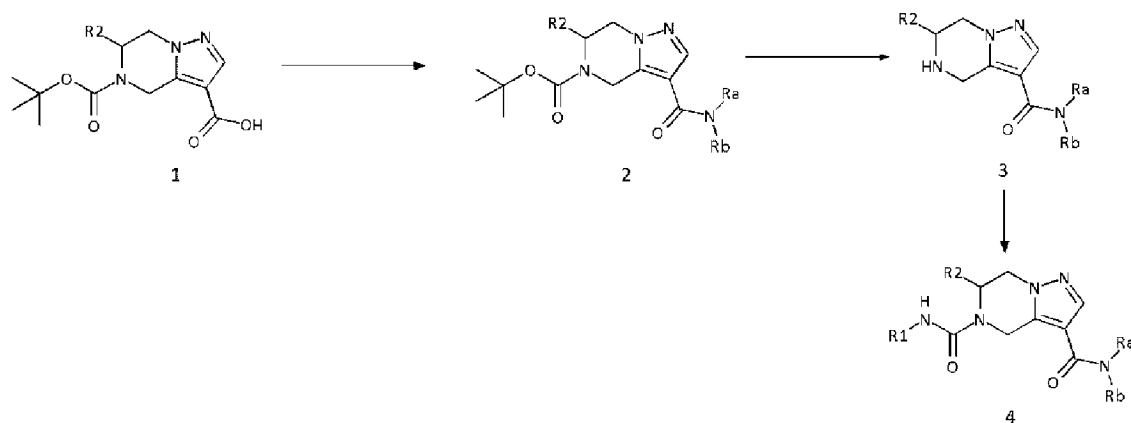


Схема 1: Синтез соединений формулы I

Взаимодействие соединения 1, показанного на стадии 1 Схемы 1, с амином осуществляли с помощью методов, известных из литературы (A. El-Faham, F. Albericio, Chem. Rev. 2011, 111, 6557-6602), например, с НАТУ, получая соединение общей структуры 2. На стадии 2 удаляли защитную группу азота (WO 2018/011162, A. Isidro-Llobet et al. Chem. Rev. 2009, 109, 2455-2504) представляющую собой, как показано, но без ограничения, Вос, например, с использованием HCl, получая амин общей структуры 3. Образование производного мочевины на стадии 3 осуществляли методами, хорошо известными из литературы (Pearson, A. J.; Roush, W. R.; Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Activating Agents and Protecting Groups), например, с использованием фенилизоцианата, получая соединение формулы I.

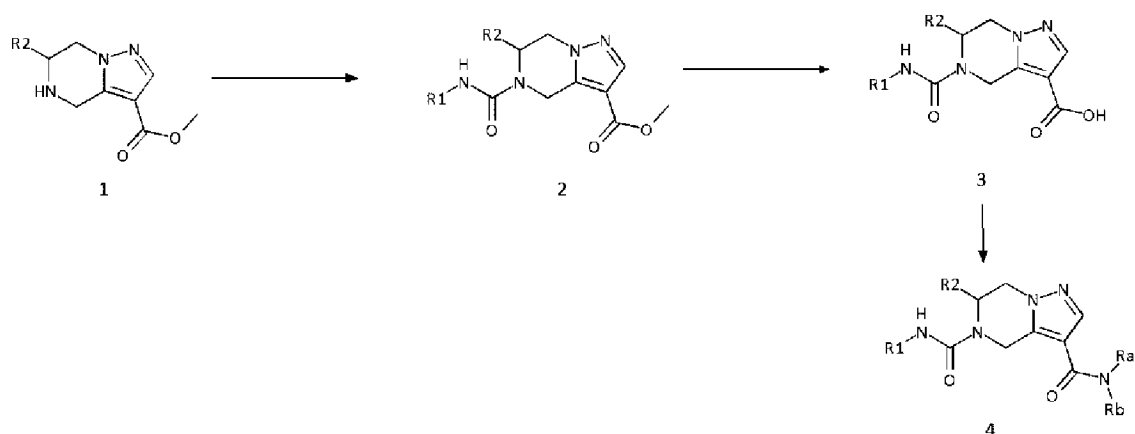


Схема 2: Синтез соединений формулы I

Соединение 1, показанное на стадии 1 Схемы 2, превращали в производное мочевины общей структуры 2 методами, хорошо известными из литературы (Pearson, AJ; Roush, WR; Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Activating Agents and Protecting Groups), например, с помощью фенилизоцианата. Эфирную группу соединения 2 на стадии 2 гидролизовали с использованием способов, известных из литературы, например, с помощью LiOH (WO 2015/0133428), получая карбоновую кислоту общей структуры 3. Связывание амида на стадии 3 осуществляли методами, известными из литературы (A. El-Faham, F. Albericio, Chem. Rev. 2011, 111, 6557-6602), например, с НАТУ, получая соединение формулы I.

Приведенные ниже примеры иллюстрируют получение и свойства некоторых конкретных соединений настоящего изобретения.

При описании изобретения используются следующие сокращения и аббревиатуры:

A - аденин, азотистое основание ДНК

ACN - ацетонитрил

Ar - аргон

BODIPY-FL - 4,4-дифтор-5,7-диметил-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен-3-пропионовая кислота (флуоресцентный краситель)

Woc - трет-бутоксикарбонил

BnOH - бензиловый спирт

- n-BuLi - н-бутиллитий
 t-BuLi - трет-бутиллитий
 С - цитозин, азотистое основание ДНК
 CC₅₀ - полумаксимальная цитотоксическая концентрация
 CO₂ - диоксид углерода
 CuCN - цианид меди (I)
 DCE - дихлорэтан
 DCM - дихлорметан
 Периодинан Десса-Мартина - 1,1-триацетокси-1,1-дигидро-1,2-бензидоксол-3(1H)-он
 DIPEA - диизопропилэтиламин
 DIPE - диизопропиловый эфир
 DMAP - 4-диметиламинопиридин
 DMF - N, N-диметилформамид
 DMP - периодинан Десса-Мартина
 DMSO - диметилсульфоксид
 ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
 DPPA - дифенилфосфорилазид
 DTT - дитиотреитол
 EC₅₀ - полумаксимальная эффективная концентрация
 EDCI - гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида
 Et₂O - диэтиловый эфир
 EtOAc - этилацетат
 EtOH - этанол
 FL- - 5'-конец, меченый флуоресцеином
 NEt₃ - триэтиламин
 ELS - испарительное рассеяние света
 г - грамм (граммы)
 G - гуанин, азотистое основание ДНК
 HBV - вирус гепатита В
 HATU - гексафторфосфат 2-(1H-7-азабензотриазол-1-ил)-1,3,3-тетраметилурония
 HCl - хлористоводородная кислота
 HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
 HOAt - 1-гидрокси-7-азабензотриазол
 HOBT - 1-гидроксибензотриазол
 HPLC - высокоэффективная жидкостная хроматография
 IC₅₀ - полумаксимальная ингибирующая концентрация
 LC640- - модификация 3'-конца флуоресцентным красителем LightCycler® Red 640
 LC/MS - жидкостная хроматография/масс-спектрометрия
 LiAlH₄ - алюмогидрид лития

LiOH - гидроксид лития
MeOH - метанол
MeCN - ацетонитрил
MgSO₄ - сульфат магния
мг - миллиграмм (миллиграммы)
мин - минуты
моль - моль
ммоль - миллимоль (миллимоли)
мл - миллилитр (миллилитры)
MTBE - метил-трет-бутиловый эфир
N₂ - азот
Na₂CO₃ - карбонат натрия
NaHCO₃ - гидрокарбонат натрия
Na₂SO₄ - сульфат натрия
NdeI - рестрикционный фермент, распознает сайты CA[^]TATG
NEt₃ - триэтиламин
NaNH - гидрид натрия
NaOH - гидроксид натрия
NH₃ - аммиак
NH₄Cl - хлорид аммония
ЯМР - ядерный магнитный резонанс
PAGE - электрофорез в полиакриламидном геле
ПЦР - полимеразная цепная реакция
qPCR - количественная ПЦР
Pd/C - палладий на угле
-PH - фосфатная модификация 3'-конца
pTSA - 4-толуолсульфоновая кислота
Rt - время удерживания
к.т., Rt - комнатная температура
нас. - насыщенный водный раствор
SDS - додецилсульфат натрия
SI - индекс селективности (= CC₅₀/EC₅₀)
STAB - триацетоксиборгидрид натрия
Т - тимин, азотистое основание ДНК
TBAF - фторид тетрабутиламония
TFA - трифторуксусная кислота
THF - тетрагидрофуран
TLC - тонкослойная хроматография
Трис - трис(гидроксиметил)аминометан
XhoI - рестрикционный фермент, распознает сайты C[^]TCGAG

Идентификация соединений - ЯМР

Спектры ЯМР для ряда соединений регистрировали с использованием спектрометра Bruker DPX 400, снабженного 5-мм обратной трехрезонансной головкой зонда, работающего при 400 МГц для протонов и 100 МГц для углерода. Дейтерированные растворители представляют собой хлороформ-d (дейтерированный хлороформ, CDCl₃) или d₆-DMSO (дейтерированный DMSO, d₆-диметилсульфоксид). Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.) по отношению к тетраметилсилану (TMS), который использовали в качестве внутреннего стандарта.

Идентификация соединений - HPLC/MS

Спектры LC-MS для ряда соединений регистрировали с использованием следующих методов анализа.

Метод А

Колонка - обращенно-фазовая Waters Xselect CSH C18 (50×2,1 мм, 3,5 микрон)

Скорость потока - 0,8 мл/мин, 25 градусов Цельсия

Элюент А - 95% ацетонитрила+5% 10 мМ карбоната аммония в воде (pH 9)

Элюент В - 10 мМ карбоната аммония в воде (pH 9)

Линейный градиент t=0 мин 5% А, t=3,5 мин 98% А, t=6 мин 98% А

Метод А2

Колонка - обращенно-фазовая Waters Xselect CSH C18 (50×2,1 мм, 3,5 микрон)

Скорость потока - 0,8 мл/мин, 25 градусов Цельсия

Элюент А - 95% ацетонитрила+5% 10 мМ карбоната аммония в воде (pH 9)

Элюент В - 10 мМ карбоната аммония в воде (pH 9)

Линейный градиент t=0 мин 5% А, t=4, 5 мин 98% А, t=6 мин 98% А

Метод В

Колонка - обращенно-фазовая Waters Xselect CSH C18 (50×2,1 мм, 3,5 микрон)

Скорость потока - 0,8 мл/мин, 35 градусов Цельсия

Элюент А - 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле

Элюент В - 0,1% муравьиной кислоты в воде

Линейный градиент t=0 мин 5% А, t=3,5 мин 98% А, t=6 мин 98% А

Метод В2

Колонка - обращенно-фазовая Waters Xselect CSH C18 (50×2,1 мм, 3,5 микрон)

Скорость потока - 0,8 мл/мин, 40 градусов Цельсия.

Элюент А - 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле

Элюент В - 0,1% муравьиной кислоты в воде

Линейный градиент t=0 мин 5% А, t=4, 5 мин 98% А, t=6 мин 98% А

Метод С

Колонка - обращенно-фазовая Waters Xselect CSH C18 (50×2,1 мм, 3,5 микрон)

Скорость потока - 1 мл/мин, 35 градусов Цельсия

Элюент А - 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле

Элюент В - 0,1% муравьиной кислоты в воде

Линейный градиент t=0 мин 5% А, t=1,6 мин 98% А, t=3 мин 98% А

Метод D

Колонка - Phenomenex Gemini NX C18 (50×2,0 мм, 3,0 мкм)

Скорость потока - 0,8 мл/мин, 35 градусов Цельсия

Элюент А - 95% ацетонитрила+5% 10 мМ бикарбоната аммония в воде

Элюент В - 10 мМ бикарбоната аммония в воде, рН=9,0

Линейный градиент t=0 мин 5% А, t=3,5 мин 98% А, t=6 мин 98% А

Метод E

Колонка - Phenomenex Gemini NX C18 (50×2,0 мм, 3,0 мкм)

Скорость потока - 0,8 мл/мин, 25 градусов Цельсия

Элюент А - 95% ацетонитрила+5% 10 мМ бикарбоната аммония в воде

Элюент В - 10 мМ бикарбоната аммония в воде (рН 9)

Линейный градиент t=0 мин 5% А, t=3,5 мин 30% А, t=7 мин 98% А, t=10 минут 98% А

Метод F

Колонка - Waters XSelect HSS C18 (150×4,6 мм, 3,5 микрон)

Скорость потока - 1,0 мл/мин, 25 градусов Цельсия

Элюент А - 0,1% TFA в ацетонитриле

Элюент В - 0,1% TFA в воде

Линейный градиент t=0 мин 2% А, t=1 мин 2% А, t=15 мин 60% А, t=20 мин 60% А

Метод G

Колонка - картридж Zorbax SB-C18 1,8 мкм 4,6×15 мм Rapid Resolution (PN 821975-932)

Скорость потока - 3 мл/мин

Элюент А - 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле

Элюент В - 0,1% муравьиной кислоты в воде

Линейный градиент t=0 мин 0% А, t=1,8 мин 100% А

Метод H

Колонка - Wat ERS Xselect CSH C18 (50×2,1 мм, 2,5 мкм)

Скорость потока - 0,6 мл/мин

Элюент А - 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле

Элюент В - 0,1% муравьиной кислоты в воде

Линейный градиент t=0 мин 5% А, t=2,0 мин 98% А, t=2,7 мин 98% А

Метод J

Колонка - обращенно-фазовая Waters Xselect CSH C18 (50×2,1 мм, 2,5 мкм)

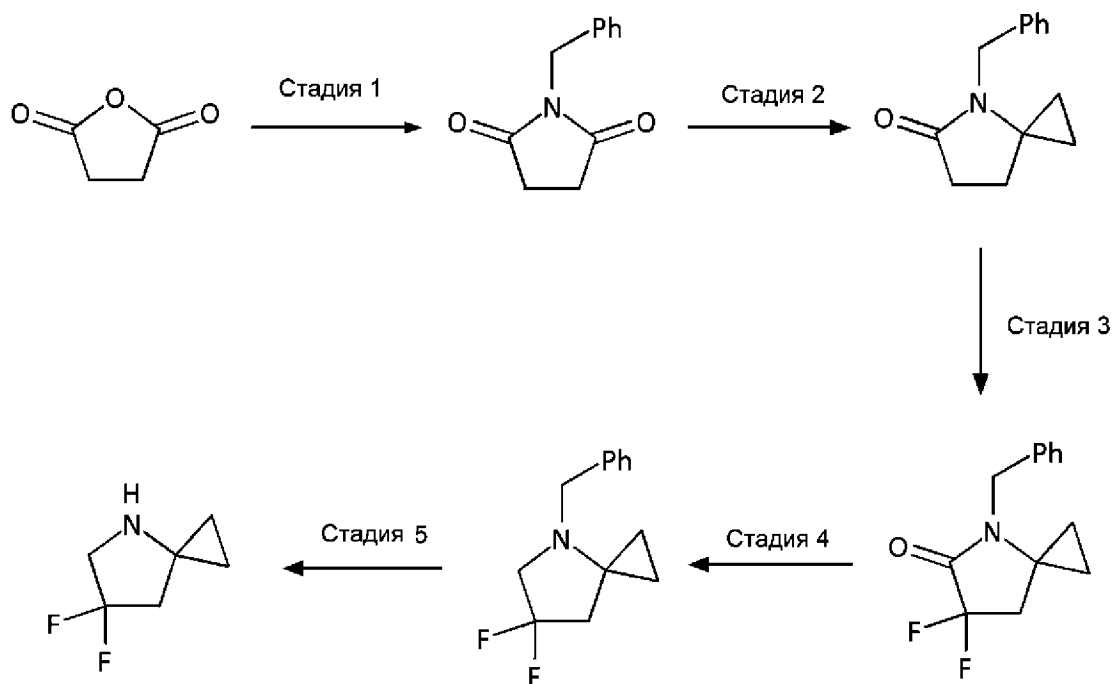
Скорость потока - 0,6 мл/мин

Элюент А - 100% ацетонитрил

Элюент В - 10 мМ бикарбоната аммония в воде (рН 7,9).

Линейный градиент t=0 мин 5% А, t=2,0 мин 98% А, t=2,7 мин 98% А

Получение 6,6-дифтор-4-азаспиро[2.4]гептана



Стадия 1: К раствору янтарного ангидрида (100 г, 1000 ммоль) в толуоле (3000 мл) добавляли бензиламин (107 г, 1000 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов, затем нагревали с обратным холодильником в аппарате Дина-Старка в течение 16 часов. Смесь затем концентрировали при пониженном давлении, получая 1-бензилпирролидин-2,5-дион (170 г, 900 ммоль, выход 90%).

Стадия 2: К охлажденной (0°C) смеси 1-бензилпирролидин-2,5-дион (114 г, 600 ммоль) и $Ti(Oi-Pr)_4$ (170,5 г, 600 ммоль) в безводном THF (2000 мл) в атмосфере аргона добавляли по каплям 3,4М раствор этилмагнийбромида в THF (1200 ммоль). Смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали 4 часа. Затем добавляли по каплям $BF_3 \cdot Et_2O$ (170 г, 1200 ммоль), и раствор перемешивали в течение 6 часов. Смесь охлаждали (0°C) и добавляли 3 н. хлористоводородную кислоту (500 мл). Смесь дважды экстрагировали Et_2O , и объединенный органический экстракт промывали насыщенным соевым раствором, сушили и концентрировали при пониженном давлении, получая 4-бензил-4-азаспиро[2.4]гептан-5-он (30,2 г, 150 ммоль, выход 25%).

Стадия 3: К охлажденному (-78°C) раствору 4-бензил-4-азаспиро[2.4]гептан-5-она (34,2 г, 170 ммоль) в безводном THF (1000 мл) в атмосфере аргона добавляли LiHMDS в THF (1,1М раствор, 240 ммоль). Смесь перемешивали в течение 1 часа, затем добавляли по каплям раствор N-фторбензолсульфонимида (75,7 г, 240 ммоль) в THF (200 мл). Смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 6 часов. Затем смесь повторно охлаждали (-78°C) и добавляли LiHMDS (1,1М раствор в THF, 240 ммоль).

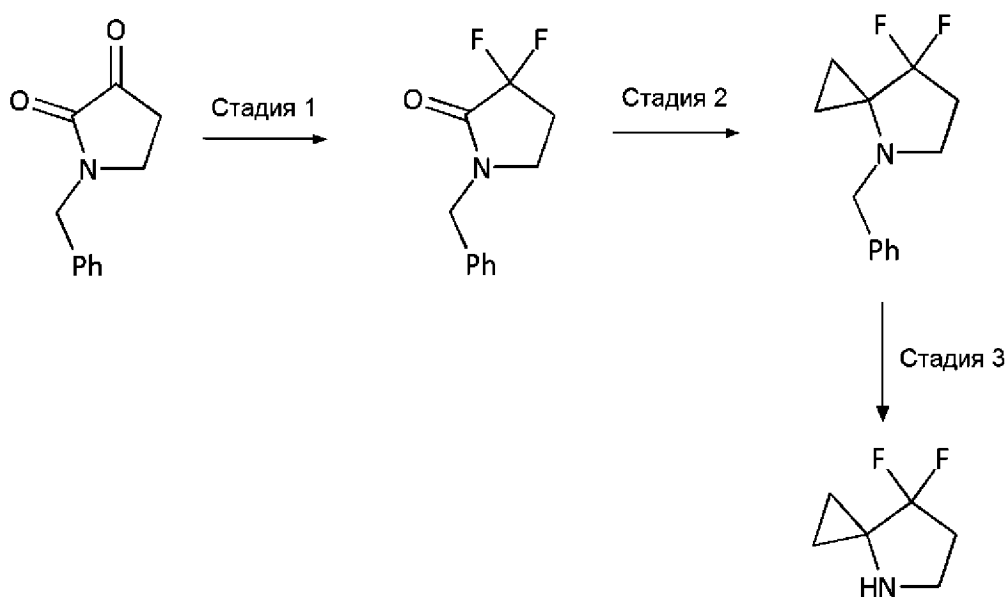
Раствор перемешивали в течение 1 часа, а затем добавляли по каплям N-фторбензолсульфонимид (75,7 г, 240 ммоль) в THF (200 мл). Смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 6 часов. Смесь выливали в насыщенный раствор NH_4Cl (300 мл) и дважды экстрагировали Et_2O . Объединенные

органические экстракты промывали насыщенным солевым раствором и концентрировали при пониженном давлении. Продукт очищали колоночной хроматографией, получая 4-бензил-6,6-дифтор-4-азаспиро[2.4]гептан-5-он (18 г, 75,9 ммоль, выход 45%).

Стадия 4: К раствору подогретого (40°C) $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ (3,42 г, 45 ммоль) в THF (200 мл) добавляли по каплям 4-бензил-6,6-дифтор-4-азаспиро[2.4]гептан-5-он (11,9 г, 50 ммоль). Смесь перемешивали 24 часа при 40°C, затем охлаждали до комнатной температуры. Добавляли по каплям воду (50 мл) и смесь экстрагировали Et_2O (2 x 200 мл). Объединенные органические экстракты промывали насыщенным солевым раствором, разбавляли 10%-ным раствором HCl в диоксане (50 мл) и выпаривали при пониженном давлении, получая 4-бензил-6,6-дифтор-4-азаспиро[2.4]гептан (3 г, 13,4 ммоль, выход 27%).

Стадия 5: 4-бензил-6,6-дифтор-4-азаспиро[2.4]гептан (2,68 г, 12 ммоль) и гидроксид палладия (0,5 г) в метаноле (500 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере H_2 в течение 24 часов. Смесь фильтровали, и затем фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая 6,6-дифтор-4-азаспиро[2.4]гептан (0,8 г, 6,01 ммоль, выход 50%).

Получение 7,7-дифтор-4-азаспиро[2.4]гептана

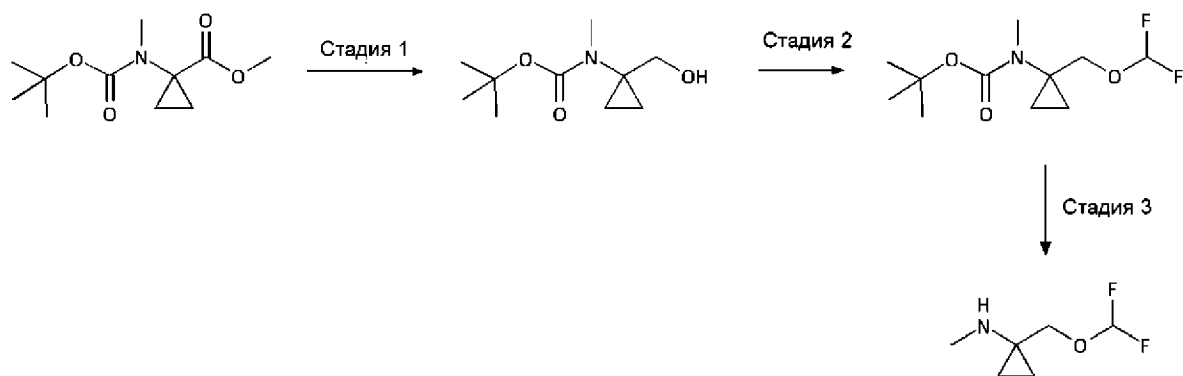


Стадия 1: К охлажденному (0°C) раствору 1-бензилпирролидин-2,3-диона (8 г, 42,3 ммоль) в DCM (100 мл) в течение 30 минут добавляли по каплям DAST (20,4 г, 127 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем гасили, добавляя по каплям насыщенный NaHCO_3 . Органический слой отделяли, а водную фракцию дважды экстрагировали DCM (2 x 50 мл). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении, получая 1-бензил-3,3-дифторпирролидин-2-он (26,0 ммоль, выход 61%), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия 2: К раствору неочищенного 1-бензил-3,3-дифторпирролидин-2-она (5,5 г, 26 ммоль) и $Ti(Oi-Pr)_4$ (23,4 мл, 78 ммоль) в THF (300 мл) в атмосфере аргона добавляли по каплям 3,4М раствор $EtMgBr$ в 2-МеТНФ (45,8 мл, 156 ммоль). После перемешивания в течение 12 часов добавляли воду (10 мл), получая белый осадок. Осадок промывали МТВЕ (3 x 50 мл). Объединенные органические фракции сушили над Na_2SO_4 , концентрировали и очищали с помощью флэш-хроматографии (гексан- $EtOAc$ 9:1), получая 4-бензил-7,7-дифтор-4-азаспиро[2.4]гептан (1,3 г, 5,82 ммоль, выход 22%) в виде бледно-желтого масла.

Стадия 3: 4-бензил-7,7-дифтор-4-азаспиро[2.4]гептан (0,55 г, 2,46 ммоль) растворяли в растворе $CHCl_3$ (1 мл) и $MeOH$ (20 мл) и добавляли Pd/C (0,2 г, 10%). Эту смесь перемешивали в атмосфере H_2 в течение 5 часов, а затем фильтровали. Фильтрат концентрировали, получая 7,7-дифтор-4-азаспиро[2.4]гептан (0,164 г, 1,23 ммоль, выход 50%).

Синтез 1-[(диформетокси)метил]-N-метилциклопропан-1-амина



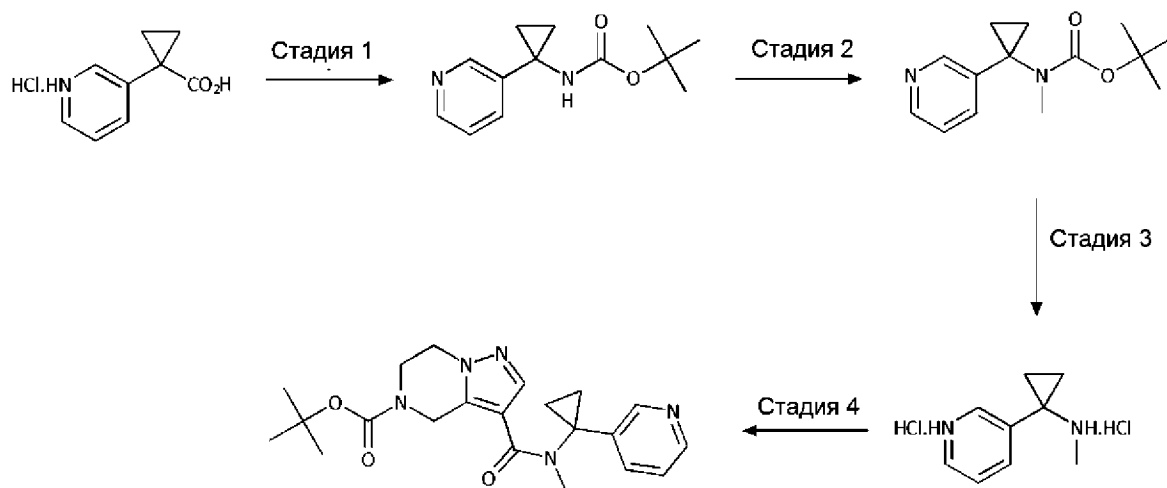
Стадия 1: К раствору метил-1-((третбутоксикарбонил)(метил)амино)циклопропан-1-карбоксилата (1,05 г, 4,58 ммоль) в безводном THF (5 мл) в атмосфере N_2 добавляли боргидрид лития (1,259 мл, 4М в THF, 5,04 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 дней. Добавляли сульфат натрия и воду, смесь фильтровали через слой сульфата натрия, который промывали дихлорметаном. Фильтрат концентрировали, получая трет-бутил(1-(гидроксиметил)циклопропил)(метил)карбамат в виде белого твердого вещества (0,904 г, выход 95%).

Стадия 2: К раствору трет-бутил(1-(гидроксиметил)циклопропил)(метил)карбамата (0,100 г, 0,497 ммоль) и (бромдиформетил)триметилсилана (0,155 мл, 0,994 ммоль) в дихлорметане (0,5 мл) добавляли одну каплю раствора ацетата калия (0,195 г, 1,987 ммоль) в воде (0,5 мл). Смесь перемешивали в течение 40 часов. Смесь разбавляли дихлорметаном и водой, органический слой отделяли и концентрировали. Очистку осуществляли методом флэш-хроматографии (20% этилацетат в гептане), получая трет-бутил-N-{1-[(диформетокси)метил]циклопропил}-N-метилкарбамат в виде бесцветного масла (0,058 г, выход 46%).

Стадия 3: К трет-бутил(1-((дифторметокси)-метил)циклопропил)(метил)карбамату (0,058 г, 0,231 ммоль) добавляли HCl в диоксане (4М раствор, 2 мл, 8,00 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем концентрировали, получая целевой продукт, который использовали без дополнительной очистки.

LC-MS: m/z 152,2 (M+H)⁺

Синтез трет-бутил-3-{метил[1-(пиридин-3-ил)циклопропил]карбамоил}-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиразин-5-карбоксилата



Стадия 1: К раствору гидрохлорида 1-(пиридин-3-ил)циклопропан-1-карбоновой кислоты (498,46 мг, 2,5 ммоль) в смеси толуола (30 мл) и трет-БуОН (10 мл) добавляли дифенилфосфорилазид (687,14 мг, 2,5 ммоль) и триэтиламин (631,62 мг, 6,24 ммоль, 870,0 мкл). Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали и фильтровали. Фильтрат промывали водой (3 x 10 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме, получая трет-бутил-N-[1-(пиридин-3-ил)циклопропил]карбамат (250,0 мг, чистота 95,0% 1,01 ммоль, выход 40,6%) в виде светло-коричневого масла.

Стадия 2: Гидрид натрия (154,24 мг, 6,43 ммоль) суспендировали в безводном DMF (5 мл), и затем охлаждали до 0°C. Добавляли по каплям раствор трет-бутил-N-[1-(пиридин-3-ил)циклопропил]карбамата (1,51 г, 6,43 ммоль) в безводном DMF (5 мл). Полученную смесь перемешивали до прекращения выделения газа. Добавляли по каплям иодметан (1,0 г, 7,07 ммоль, 440,0 мкл) при той же температуре. Полученную смесь нагревали до комнатной температуры, а затем перемешивали в течение ночи. После израсходования исходного материала (контроль по ¹H ЯМР) реакционную смесь выливали в воду. Полученную смесь дважды экстрагировали МТВЕ (2 x 50 мл). Органические фазы объединяли, промывали водой, сушили над сульфатом натрия и концентрировали, получая трет-бутил-N-метил-N-[1-(пиридин-3-ил)циклопропил]карбамат (1,1 г, 4,43 ммоль, выход 68,9%). Продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия 3: К раствору трет-бутил-N-метил-N-[1-(пиридин-3-ил)циклопропил]карбамата (1,1 г, 4,43 ммоль) в метаноле (10 мл) добавляли 4М раствор

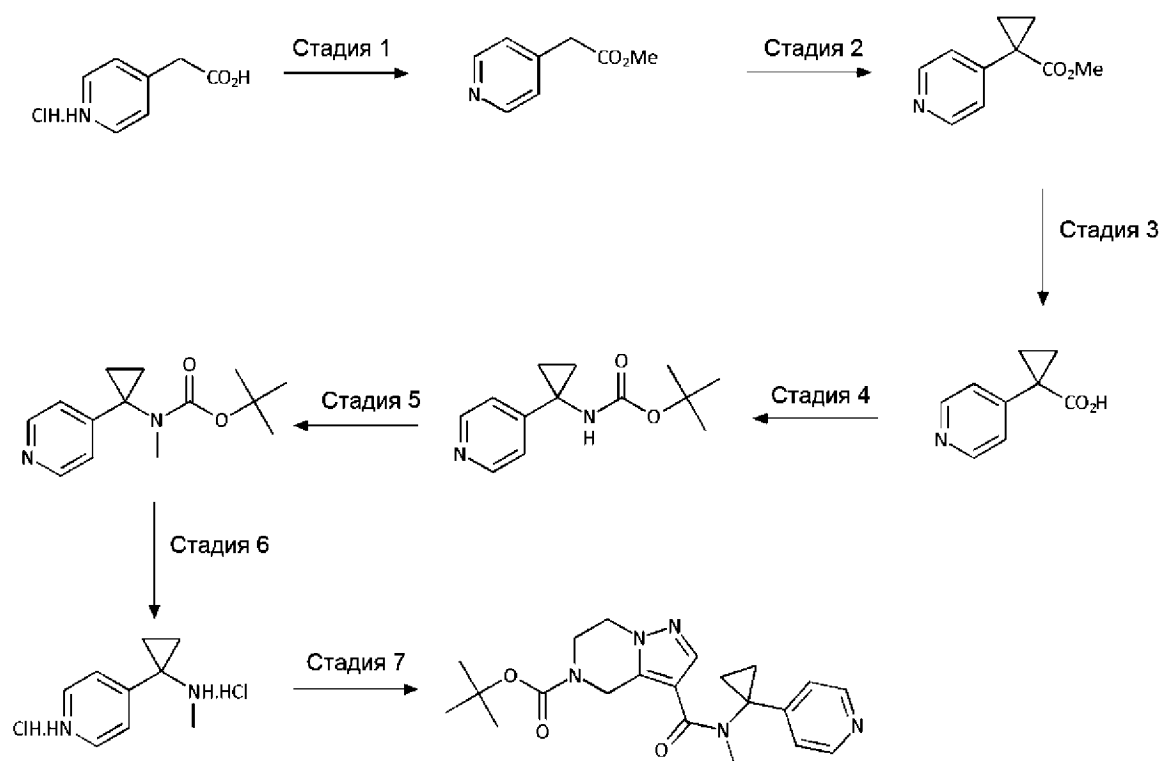
HCl в диоксане (2 мл). Полученный раствор перемешивали в течение 12 часов при 25°C. После завершения реакции (контроль по ¹H ЯМР или LCMS) реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Продукт растирали с МТВЕ и собирали с помощью фильтрации, затем сушили в вакууме при 40°C, получая дигидрохлорид N-метил-1-(пиридин-3-ил)циклопропан-1-амина (900,0 мг, чистота 95,0%, 3,87 ммоль, выход 87,2%).

Стадия 4: К перемешиваемому раствору дигидрохлорида N-метил-1-(пиридин-3-ил)циклопропан-1-амина (398,89 мг, 1,8 ммоль) и 5-[(трет-бутокси)карбонил]-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиразин-3-карбоновой кислоты (482,15 мг, 1,8 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли НАТУ (891,67 мг, 2,35 ммоль) и триэтиламин (638,88 мг, 6,31 ммоль, 880,0 мкл). Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, затем выливали в воду и экстрагировали МТВЕ (2 x 15 мл). Объединенные органические фракции трижды промывали водой, сушили над безводным сульфатом натрия и растворитель удаляли в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью HPLC, получая трет-бутил-3-метил[1-(пиридин-3-ил)циклопропил]карбамоил-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиразин-5-карбоксилат (230,0 мг, чистота 82,0%, 474,5 мкмоль, выход 26,3%).

¹H ЯМР (400 МГц, d₆-DMSO) δ 1,41 (м, 2H), 1,43 (с, 9H), 1,56 (м, 2H), 3,07 (м, 3H), 3,82 (м, 2H), 4,07 (м, 2H), 4,75 (м, 2H), 6,99 (м, 1H), 7,37 (м, 1H), 7,48 (д, 1H), 8,31 (с, 1H), 8,44 (с, 1H).

LCMS: m/z 398,2

Синтез трет-бутил-3-{метил[1-(пиридин-4-ил)циклопропил]карбамоил}-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиразин-5-карбоксилата



Стадия 1: Гидрохлорид 2-(пиридин-4-ил)уксусной кислоты (5,0 г, 28,8 ммоль) растворяли в MeOH (20 мл), затем добавляли H₂SO₄ (0,5 мл). Реакционную смесь нагревали при 85°C в течение ночи. Удаляли MeOH, получая остаток, который тщательно нейтрализовали насыщенным водным раствором NaHCO₃, а затем экстрагировали с помощью EtOAc (3 x 100 мл). Органические экстракты объединяли, сушили и концентрировали, получая метил-2-(пиридин-4-ил)ацетат (4,0 г, чистота 95,0%, 25,14 ммоль, выход 87,3%) в виде желтого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия 2: Метил-2-(пиридин-4-ил)ацетат (4,0 г, 26,46 ммоль) растворяли в DMF (5 мл) и добавляли по каплям к охлажденной (0°C) суспензии гидрида натрия (825,52 мг, 34,4 ммоль) в DMF (5 мл). Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 минут, а затем обрабатывали 1,2-дибромметаном (6,46 г, 34,4 ммоль) при той же температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов. Затем реакционную смесь разбавляли этилацетатом, промывали водой и насыщенным солевым раствором. Органическую фазу отделяли, сушили над Na₂SO₄ и фильтровали; фильтрат концентрировали. Полученное масло растирали с гексаном, получая метил-1-(пиридин-4-ил)циклопропан-1-карбоксилат (2,3 г, 12,98 ммоль, выход 49,1%) в виде твердого вещества.

Стадия 3: Метил-1-(пиридин-4-ил)циклопропан-1-карбоксилат (2,3 г, 12,98 ммоль) растворяли в MeOH (20 мл), и добавляли раствор гидроксида натрия (778,67 мг, 19,47 ммоль) в воде (20 мл). Смесь перемешивали при 20°C в течение 20 часов. MeOH удаляли выпариванием, и водный остаток нейтрализовали хлористоводородной кислотой (до pH 7) при охлаждении льдом. Смесь концентрировали досуха, остаток трижды растирали с CHCl₃, и объединенные фильтраты концентрировали досуха, получая гидрохлорид 1-(пиридин-4-ил)циклопропан-1-карбоновой кислоты (2,0 г, 10,02 ммоль, выход 77,2%).

Стадия 4: К раствору 1-(пиридин-4-ил)циклопропан-1-карбоновой кислоты (599,43 мг, 3,67 ммоль) в смеси толуола (30 мл) и трет-БуОН (10 мл) добавляли дифенилфосфорилазид (1,01 г, 3,67 ммоль) и триэтиламин (929,28 мг, 9,18 ммоль, 1,28 мл). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи, затем охлаждали и фильтровали. Фильтрат промывали водой (3 x 10 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали, получая трет-бутил-N-[1-(пиридин-4-ил)циклопропил]карбамат (300,0 мг, 1,28 ммоль, выход 34,9%) в виде светло-коричневого масла. Продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия 5: Гидрид натрия (94,22 мг, 3,93 ммоль) суспендировали в DMF (5 мл) и затем охлаждали до 0°C. Затем добавляли по каплям раствор трет-бутил-N-[1-(пиридин-4-ил)циклопропил]карбамата (919,93 мг, 3,93 ммоль) в DMF (5 мл). Полученную смесь перемешивали до прекращения выделения газа. При той же температуре добавляли по каплям иодметан (613,04 мг, 4,32 ммоль). Полученную смесь нагревали до комнатной температуры и затем перемешивали в течение ночи. После израсходования исходного материала (контроль по ¹H ЯМР) реакционную смесь выливали в воду. Смесь дважды

экстрагировали МТВЕ (50 мл). Органические фазы объединяли, промывали водой, сушили над сульфатом натрия и концентрировали, получая трет-бутил-N-метил-N-[1-(пиридин-4-ил)циклопропил]карбамат (900,0 мг, чистота 98,0%, 3,55 ммоль, выход 90,5%). Продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

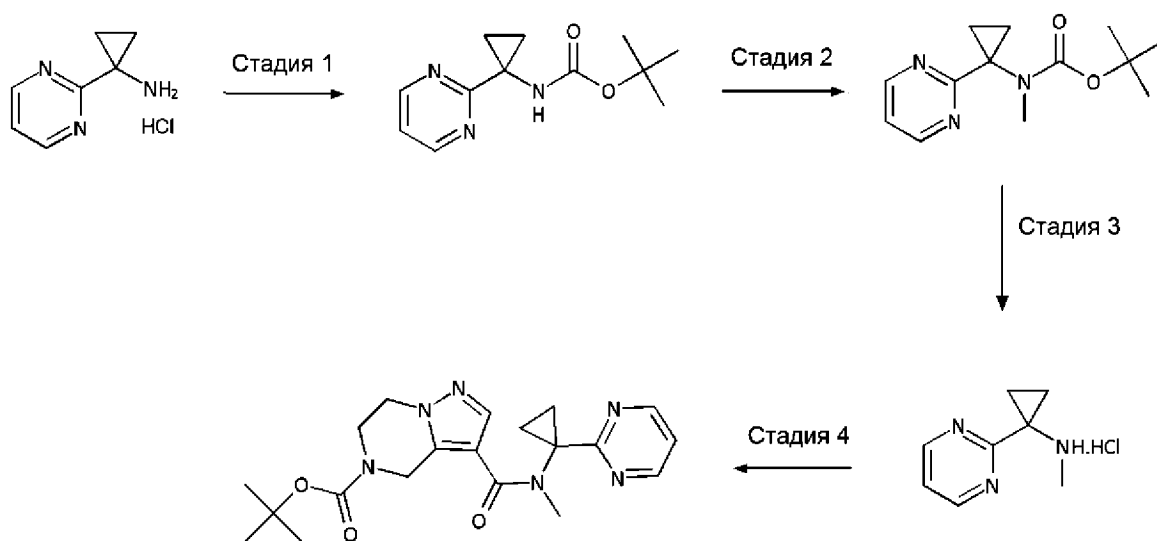
Стадия 6: К раствору трет-бутил-N-метил-N-[1-(пиридин-4-ил)циклопропил]карбамата (900,0 мг, 3,62 ммоль) в метаноле (10 мл) добавляли 4М HCl в диоксане (2 мл), и полученный раствор перемешивали 12 часов при 25°C. После завершения реакции (контроль по ¹H ЯМР) реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Продукт обрабатывали МТВЕ и собирали фильтрованием, затем сушили в вакууме при 40°C, получая дигидрохлорид N-метил-1-(пиридин-4-ил)циклопропан-1-амина (600,0 мг, 2,71 ммоль, выход 74,9%).

Стадия 7: К перемешиваемому раствору дигидрохлорида N-метил-1-(пиридин-4-ил)циклопропан-1-амина (600,0 мг, 2,71 ммоль) и 5-[(трет-бутоксикарбонил]-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиразин-3-карбоновой кислоты (724,91 мг, 2,71 ммоль) в DMF (5 мл) добавляли HATU (1,34 г, 3,53 ммоль) и триэтиламин (960,55 мг, 9,49 ммоль, 1,32 мл). Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, затем выливали в воду и экстрагировали МТВЕ (3 x 15 мл). Объединенные органические фракции трижды промывали водой, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный продукт очищали с помощью HPLC, получая трет-бутил-3-метил[1-(пиридин-4-ил)циклопропил]карбамоил-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиразин-5-карбоксилат (169,0 мг, 425,19 мкмоль, выход 15,7%).

¹H ЯМР (400 МГц, d₆-DMSO) δ 1,38 (м, 1H), 1,44 (с, 9H), 1,60 (м, 3H), 3,03 (м, 3H), 3,71 (м, 1H), 3,84 (м, 1H), 4,06 (м, 2H), 4,75 (м, 2H), 6,92 (м, 1H), 7,07 (м, 2H), 8,52 (м, 2H).

LCMS: m/z 398,4.

Синтез трет-бутил-3-{метил[1-(пиримидин-2-ил)циклопропил]карбамоил}-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиразин-5-карбоксилата



Стадия 1: К охлажденной (0°C) суспензии гидрохлорида 1-(пиримидин-2-ил)циклопропан-1-амина (996,43 мг, 5,81 ммоль) в безводном DCM (30 мл) добавляли ди-

трет-бутилдикарбонат (1,27 г, 5,81 ммоль). Затем добавляли по каплям триэтиламин (646,14 мг, 6,39 ммоль, 890,0 мкл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре и разбавляли водой (5 мл). Органическую фазу отделяли, промывали водой, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали, получая трет-бутил-N-[1-(пиримидин-2-ил)циклопропил]карбамат (1,17 г, 4,97 ммоль, выход 85,7%) в виде светло-желтого твердого вещества.

Стадия 2: К перемешиваемому раствору трет-бутил-N-[1-(пиримидин-2-ил)циклопропил]карбамата (499,99 мг, 2,13 ммоль) в безводном DMF (4 мл) добавляли гидрид натрия (127,49 мг, 5,31 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем охлаждали до 0°C. Добавляли иодметан (603,26 мг, 4,25 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь выливали в насыщенный солевой раствор, и затем экстрагировали с помощью EtOAc (2 x 10 мл). Объединенные органические фазы промывали насыщенным солевым раствором, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали, получая трет-бутил-N-метил-N-[1-(пиримидин-2-ил)циклопропил]карбамат (400,0 мг, 1,6 ммоль, выход 75,5%) в виде желтого твердого вещества.

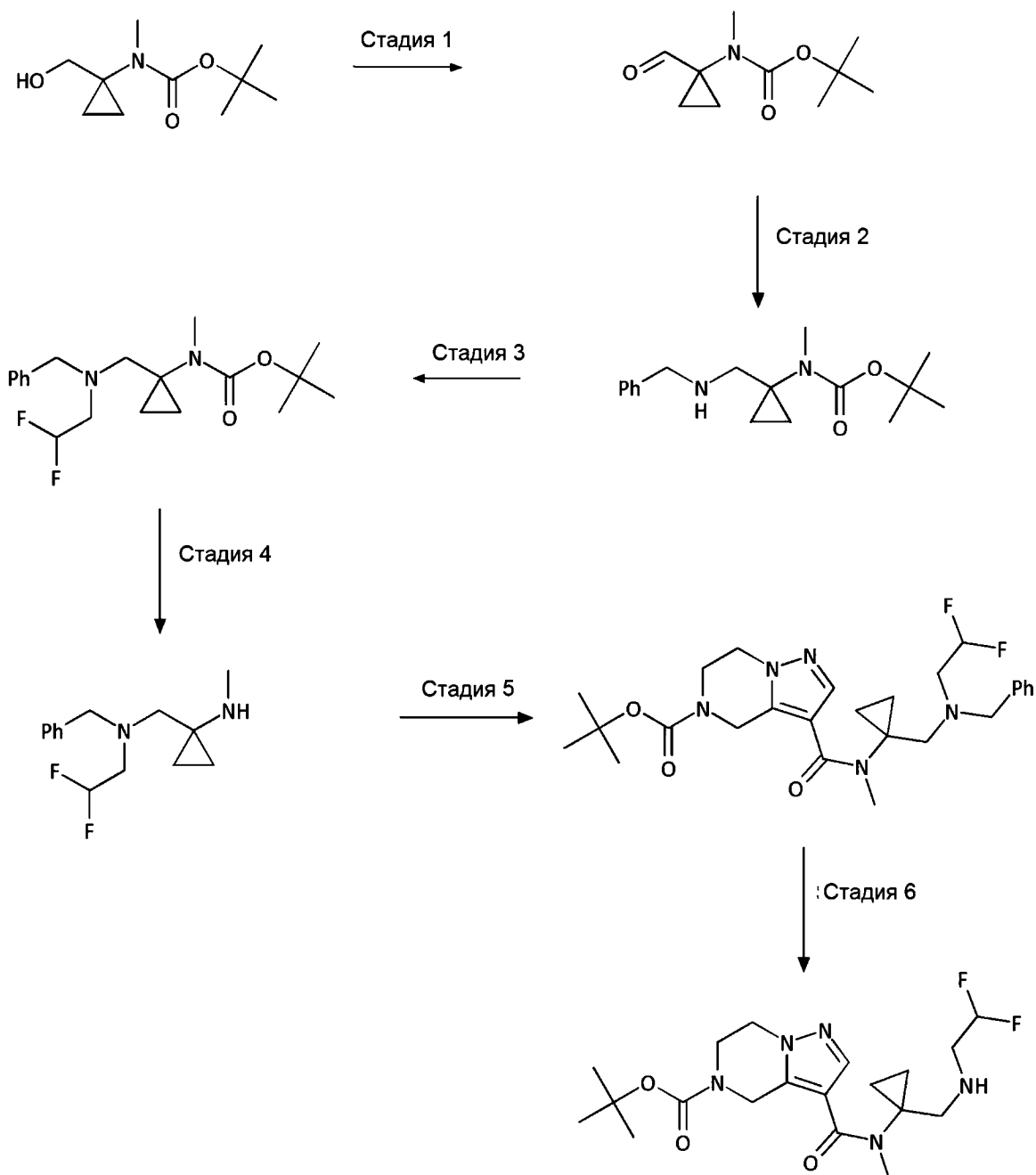
Стадия 3: К перемешиваемому раствору трет-бутил-N-метил-N-[1-(пиримидин-2-ил)циклопропил]карбамата (400,0 мг, 1,6 ммоль) в безводном DCM (5 мл) добавляли 4M HCl в диоксане. (2 мл, 8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 часов. Смесь концентрировали, остаток растирали с гексаном и отфильтровывали, получая гидрохлорид N-метил-1-(пиримидин-2-ил)циклопропан-1-амина (280,0 мг, 1,51 ммоль, выход 94%) в виде серого твердого вещества.

Стадия 4: К охлажденному (0°C) раствору HATU (573,46 мг, 1,51 ммоль) и 5-[(трет-бутоксикарбонил]-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-a]пиразин-3-карбоновой кислоты (403,11 мг, 1,51 ммоль) в DMF (3 мл) последовательно добавляли по каплям гидрохлорид N-метил-1-(пиримидин-2-ил)циклопропан-1-амина (280,0 мг, 1,51 ммоль) и N, N-диизопропилэтиламин (779,69 мг, 6,03 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и разбавляли насыщенным солевым раствором. Смесь экстрагировали EtOAc (2 x 10 мл), объединенные органические фазы промывали насыщенным солевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Остаток очищали с помощью HPLC, получая трет-бутил-3-метил[1-(пиримидин-2-ил)циклопропил]карбамоил-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-a]пиразин-5-карбоксилат (332,9 мг, 835,47 мкмоль, выход 55,4%) в виде твердого вещества желтого цвета.

¹H ЯМР (400 МГц, d₆-DMSO) δ 1,43 (с, 9H), 1,57 (м, 2H), 1,89 (м, 1H), 3,31 (м, 2H), 3,71 (м, 1H), 3,83 (м, 2H), 4,03 (м, 2H), 4,12 (м, 1H), 4,69 (м, 1H), 4,78 (м, 1H), 6,78 (с, 1H), 7,36 (т, 1H), 8,78 (д, 2H).

LCMS: m/z 399,2.

Синтез **трет-бутил-3-[(1-[(2,2-дифторэтил)амино]метил}циклопропил)(метил)карбамоил]-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-a]пиразин-5-карбоксилата**



Стадия 1: К раствору трет-бутил-N-[1-(гидроксиметил)циклопропил]-N-метилкарбамата (2,25 г, 11,18 ммоль) в безводном DCM (30 мл) при комнатной температуре добавляли порциями 1,1,1-трис(ацетокси)-1,1-дигидро-1,2-бензиодоксол-3(1H)-он (4,74 г, 11,18 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, а затем охлаждали до 0°C. Затем добавляли по каплям раствор гидроксида натрия (2,01 г, 50,3 ммоль) в воде (5 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут. Органическую фазу отделяли, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали, получая трет-бутил-N-(1-формилциклопропил)-N-метилкарбамат (2,2 г, 11,04 ммоль, выход 98,8%) в виде желтого масла.

Стадия 2: К перемешиваемому раствору трет-бутил-N-(1-формилциклопропил)-N-метилкарбамата (2,2 г, 11,04 ммоль) в безводном DCM (50 мл) добавляли фенилметанамин

(1,18 г, 11,04 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 часов. К охлажденной реакционной смеси добавляли одной порцией бис(ацетилокси)борануидилацетат натрия (7,02 г, 33,12 ммоль) и перемешивание продолжали в течение 5 часов. Смесь охлаждали до 0°C и добавляли 15% водн. раствор NaOH (20 мл). Смесь перемешивали в течение 30 мин, и органическую фазу отделяли, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали, получая трет-бутил-N-1-[(бензиламино)метил]циклопропил-N-метилкарбамат (2,75 г, выход 85%) в виде желтого масла.

Стадия 3: К перемешиваемому охлажденному (0°C) раствору трет-бутил-N-1-[(бензиламино)метил]циклопропил-N-метилкарбамата (1,75 г, 6,02 ммоль) в безводном ацетонитриле (10 мл) добавляли карбонат калия (1,67 г, 12,05 ммоль) с последующим добавлением по каплям 2,2-дифторэтил-трифторметансульфоната (1,68 г, 7,83 ммоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Смесь выливали в воду (30 мл) и экстрагировали DCM (3 x 10 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией на диоксиде кремния, используя в качестве элюента гексан-МТВЕ (4:1), получая трет-бутил-N-(1-[бензил(2,2-дифторэтил)амино]метилциклопропил)-N-метилкарбамат (900,0 мг, 2,54 ммоль, выход 42,2%) в виде бесцветного масла.

Стадия 4: К раствору трет-бутил-N-(1-[бензил(2,2-дифторэтил)амино]метилциклопропил)-N-метилкарбамата (199,9 мг, 564,0 мкмоль) в CH₂Cl₂ (3 мл) добавляли 4M HCl в диоксане (1 мл). Полученный раствор перемешивали в течение 12 часов при комнатной температуре, затем концентрировали. Остаток растирали с гексаном и собирали фильтрованием, получая дигидрохлорид 1-[бензил(2,2-дифторэтил)амино]метил-N-метилциклопропан-1-амин (156,0 мг, выход 95,1%) в виде белого твердого вещества.

Стадия 5: К раствору дигидрохлорида 1-[бензил(2,2-дифторэтил)амино]метил-N-метилциклопропан-1-амин (155,96 мг, 476,58 мкмоль) и гексафтор-лямбда-5-фосфанид[(диметиламино)(3H-[1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин-3-илокси)метилен]диметилазана (181,21 мг, 476,58 мкмоль) в DMF (2 мл) добавляли триэтиламин (241,13 мг, 2,38 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут. Добавляли 5-[(трет-бутоксикарбонил]-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-a]пирозин-3-карбоновую кислоту (127,38 мг, 476,58 мкмоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов, затем разбавляли насыщенным соевым раствором. Смесь экстрагировали EtOAc (2 x 20 мл). Объединенные органические фазы промывали насыщенным соевым раствором, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали, получая неочищенный трет-бутил-3-[(1-[бензил(2,2-дифторэтил)амино]метилциклопропил)(метил)карбамоил]-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-a]пирозин-5-карбоксилат (200,0 мг, 397,15 мкмоль, выход 83,3%) в виде

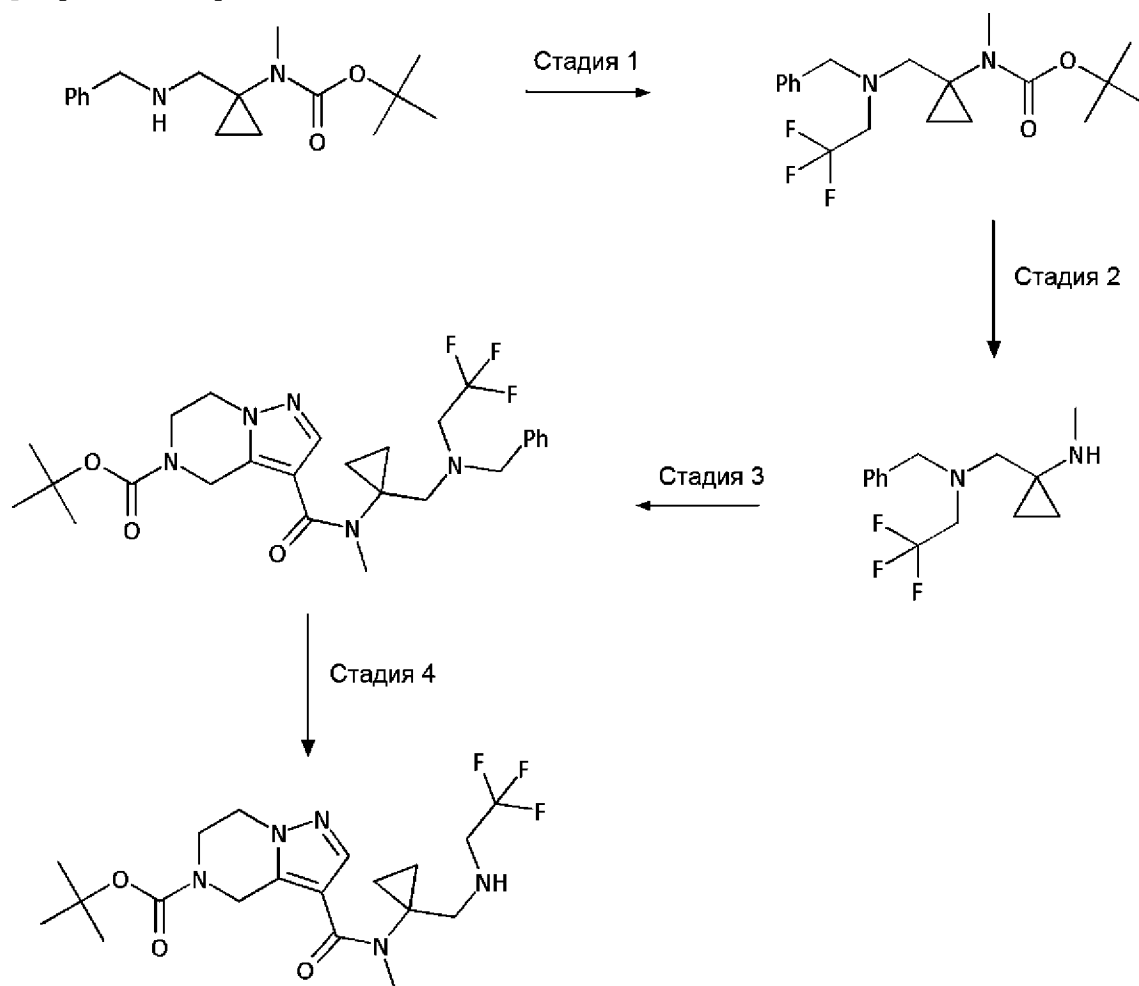
коричневого масла, и его использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия 6: К перемешиваемому раствору трет-бутил-3-[(1-[бензил(2,2-дифторэтил)амино]метилциклопропил)(метил)карбамоил]-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиазин-5-карбоксилата (200,0 мг, 397,15 мкмоль) в MeOH (5 мл) добавляли палладий на угле (10%, 0,05 г). Смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода (баллон) в течение 48 часов. Смесь продували азотом, затем фильтровали и фильтрат концентрировали. Остаток очищали с помощью HPLC, получая трет-бутил-3-[(1-[(2,2-дифторэтил)амино]метилциклопропил)(метил)карбамоил]-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиазин-5-карбоксилат (70,0 мг, выход 42,7%) в виде бесцветного масла.

^1H ЯМР (400 МГц, d_6 -DMSO) δ 0,76 (м, 3H), 1,43 (с, 9H), 2,26 (м, 1H), 2,90 (м, 4H), 3,05 (с, 3H), 3,80 (с, 2H), 4,10 (д, 2H), 4,71 (с, 2H), 5,96 (тт, 1H), 7,84 (с, 1H).

LCMS: m/z 414,1.

Синтез **трет-бутил-3-[метил(1-[(2,2,2-трифторэтил)амино]метил}циклопропил)карбамоил]-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиазин-5-карбоксилата**



Стадия 1: К перемешиваемому раствору трет-бутил-N-1-[(бензиламино)метил]циклопропил-N-метилкарбамата (537,25 мг, 1,85 ммоль) в безводном ацетонитриле (10 мл) добавляли карбонат калия (767,06 мг, 5,55 ммоль), а

затем 2,2,2-трифторэтил-трифторметансульфонат (644,56 мг, 2,78 ммоль, 400,0 мкл). Реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение ночи. Затем смесь охлаждали, концентрировали, и полученный остаток растворяли в DCM (10 мл). Органическую фазу промывали водой (3 мл), сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (гексан-МТВЕ 10:1), получая трет-бутил-N-(1-[бензил(2,2,2-трифторэтил)амино]метилциклопропил)-N-метилкарбамат (410,0 мг, 1,1 ммоль, выход 59,5%) в виде бесцветного масла.

Стадия 2: К перемешиваемому раствору трет-бутил-N-(1-[бензил(2,2,2-трифторэтил)амино]метилциклопропил)-N-метилкарбамата (410,0 мг, 1,1 ммоль) в DCM (5 мл) добавляли 4М HCl в диоксане (3 мл, 12 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение ночи, затем упаривали досуха, получая дигидрохлорид 1-[бензил(2,2,2-трифторэтил)амино]метил-N-метилциклопропан-1-амина (330,0 мг, 955,88 мкмоль, выход 86,8%) в виде желтого масла.

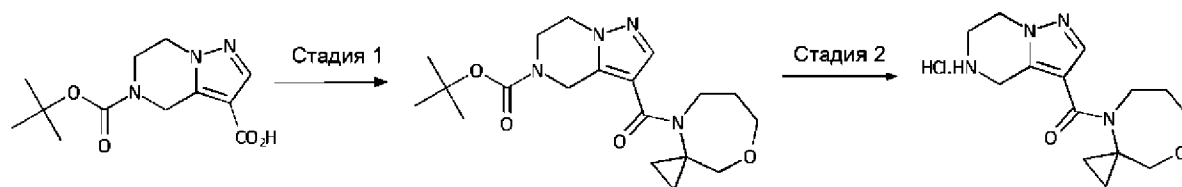
Стадия 3: К раствору HATU (381,96 мг, 1,0 ммоль) в DMF (3 мл) добавляли триэтиламин (484,05 мг, 4,78 ммоль) и 5-[(трет-бутокси)карбонил]-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пирозин-3-карбоновую кислоту (255,71 мг, 956,72 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут, затем добавляли раствор дигидрохлорида 1-[бензил(2,2,2-трифторэтил)амино]метил-N-метилциклопропан-1-амина (330,29 мг, 956,72 мкмоль) в DMF (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, а затем выливали в воду (5 мл). Смесь экстрагировали EtOAc (2 x 5 мл). Объединенные органические фазы промывали водой, водн. NaHCO₃, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали, получая неочищенный трет-бутил-3-[(1-[бензил(2,2,2-трифторэтил)амино]метилциклопропил)(метил)карбамоил]-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пирозин-5-карбоксилат (600,0 мг, чистота 77,0%, 885,78 мкмоль, выход 92,6%) в виде коричневого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия 4: К перемешиваемому раствору трет-бутил-3-[(1-[бензил(2,2,2-трифторэтил)амино]метилциклопропил)(метил)карбамоил]-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пирозин-5-карбоксилата (600,0 мг, 1,15 ммоль) в MeOH (10 мл) добавляли палладий на угле (10%, 70 мг). Смесь перемешивали в атмосфере H₂ (баллон) в течение 5 дней. Смесь фильтровали, концентрировали и очищали с помощью HPLC, получая трет-бутил-3-[метил(1-[(2,2,2-трифторэтил)амино]метилциклопропил)карбамоил]-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пирозин-5-карбоксилат (218,5 мг, 506,43 мкмоль, выход 44,1%) в виде коричневого масла.

¹H ЯМР (400 МГц, d₆-DMSO) δ 0,76 (с, 3H), 1,43 (с, 9H), 2,65 (м, 1H), 2,90 (м, 1H), 3,11 (м, 3H), 3,27 (м, 3H), 3,80 (м, 2H), 4,10 (м, 2H), 4,71 (м, 2H), 7,83 (м, 1H).

LCMS: m/z 432,2.

Синтез 4-{4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пирозин-3-карбонил}-8-окса-4-азаспиро[2.6]нонана



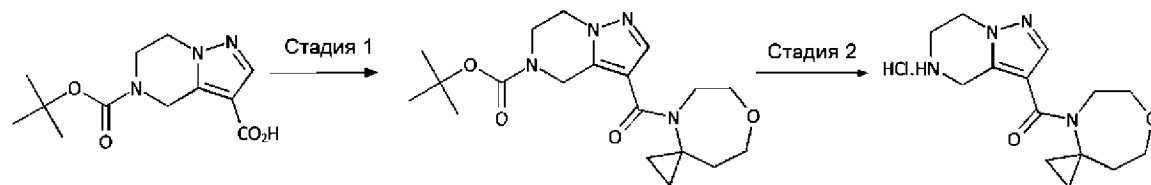
Стадия 1: К раствору 5-[(трет-бутоксикарбонил)-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-3-карбоновой кислоты (489,9 мг, 1,83 ммоль) и гидрохлорида 8-окса-4-азаспиро[2.6]нонана (300,0 мг, 1,83 ммоль) в DMF (5 мл) добавляли HATU (906,01 мг, 2,38 ммоль) и триэтиламин (649,15 мг, 6,42 ммоль, 890,0 мкл). Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, а затем выливали в воду и экстрагировали МТВЕ (2 x 15 мл). Объединенные органические фракции трижды промывали водой (20 мл), сушили над Na_2SO_4 и концентрировали, получая трет-бутил-3-8-окса-4-азаспиро[2.6]нонан-4-карбонил-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-5-карбоксилат (500,0 мг, чистота 91,0%, 1,21 ммоль, выход 65,9%).

Стадия 2: К раствору трет-бутил-3-8-окса-4-азаспиро[2.6]нонан-4-карбонил-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-5-карбоксилата (500,0 мг, 1,33 ммоль) в MeOH (10 мл) добавляли 4M HCl в диоксане (2 мл, 8 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 12 часов, а затем концентрировали при пониженном давлении. Продукт обрабатывали МТВЕ (50 мл) и собирали фильтрованием, а затем сушили в вакууме при 40°C, получая гидрохлорид 4-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-3-карбонил-8-окса-4-азаспиро[2.6]нонана (220,0 мг, чистота 90,0%, 633,0 мкмоль, выход 54%).

^1H ЯМР (500 МГц, d_6 -DMSO) δ 0,90 (м, 4H), 1,95 (м, 2H), 3,50 (м, 3H), 3,64 (м, 5H), 4,37 (м, 2H), 4,47 (м, 2H), 7,77 (с, 1H), 10,09 (м, 2H).

LCMS: m/z 277,2.

Синтез 4-{4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-3-карбонил}-7-окса-4-азаспиро[2.6]нонана



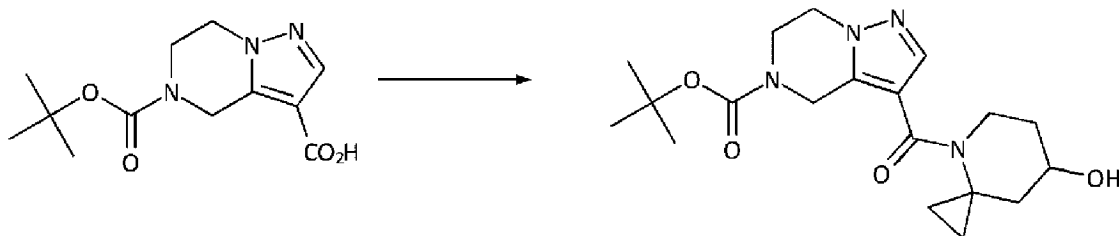
Стадия 1: К перемешиваемому раствору 5-[(трет-бутоксикарбонил)-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-3-карбоновой кислоты (489,9 мг, 1,83 ммоль) и гидрохлорида 7-окса-4-азаспиро[2.6]нонана (300,0 мг, 1,83 ммоль) в DMF (5 мл) добавляли HATU (906,01 мг, 2,38 ммоль) и триэтиламин (649,15 мг, 6,42 ммоль, 890,0 мкл). Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, затем выливали в воду и экстрагировали МТВЕ (2 x 15 мл). Объединенные органические фракции трижды промывали водой, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали, получая трет-бутил-3-7-окса-4-азаспиро[2.6]нонан-4-карбонил-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-5-карбоксилат (350,0 мг, чистота 95,0%, 883,25 мкмоль, выход 48,2%).

Стадия 2: К раствору трет-бутил-3-7-окса-4-азаспиро[2.6]нонан-4-карбонил-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиазин-5-карбоксилата (350,0 мг, 929,74 мкмоль) в метаноле (10 мл) добавляли 4 н. раствор HCl в диоксане (2 мл), и полученный раствор перемешивали в течение 12 часов при 25°C. После завершения реакции (контроль по ¹H ЯМР) реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Продукт обрабатывали МТВЕ и собирали фильтрованием, затем сушили в вакууме при 40°C, получая гидрохлорид 4-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиазин-3-карбонил-7-окса-4-азаспиро[2.6]нонана (110,0 мг, чистота 91,0%, 320,02 мкмоль, выход 34,4%).

¹H ЯМР (400 МГц, D₂O) δ 0,87 (м, 4Н), 1,73 (м, 1Н), 3,71 (м, 5Н), 3,93 (м, 2Н), 4,39 (м, 2Н), 4,55 (м, 3Н), 7,82 (м, 1Н).

LCMS: m/z 277,2.

Синтез **трет-бутил-3-{7-гидрокси-4-азаспиро[2.5]октан-4-карбонил}-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиазин-5-карбоксилата**



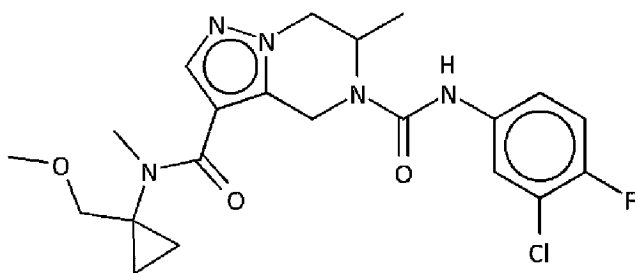
К раствору 5-[(трет-бутоксикарбонил)-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиазин-3-карбоновой кислоты (1,13 г, 4,22 ммоль) и триэтиламина (1,07 г, 10,55 ммоль, 1,47 мл) в MeCN (20 мл) добавляли HATU (1,77 г, 4,64 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 10 минут, затем добавляли гидрохлорид 4-азаспиро[2.5]октан-7-ола (760,0 мг, 4,64 ммоль) и перемешивание продолжали в течение ночи. Реакционную смесь распределяли между EtOAc (50 мл) и водой (100 мл). Органическую фазу промывали водой (2 x 20 мл), насыщенным солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Продукт очищали с помощью HPLC, получая трет-бутил-3-7-гидрокси-4-азаспиро[2.5]октан-4-карбонил-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиазин-5-карбоксилат (275,0 мг, 730,51 мкмоль, выход 17,3%).

¹H ЯМР (400 МГц, d₆-DMSO) δ 0,56 (м, 2Н), 0,82 (м, 1Н), 0,92 (м, 1Н), 1,20 (м, 1Н), 1,43 (с, 9Н), 1,81 (м, 2Н), 3,75 (м, 1Н), 3,83 (м, 3Н), 4,11 (м, 4Н), 4,62 (м, 1Н), 4,71 (м, 1Н), 4,76 (м, 1Н), 7,70 (с, 1Н).

LCMS: m/z 377,2.

Пример 1

N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-[1-(метоксиметил)циклопропил]-N3,6-диметил-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиазин-3,5-дикарбоксимид

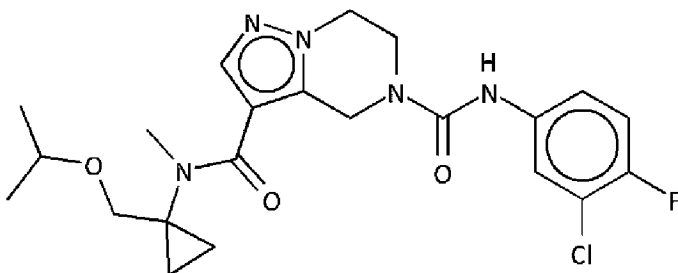


Rt (Метод А) 3,16 мин, m/z 450/452 [M+H]⁺

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,01 (с, 1H), 8,05-7,80 (м, 1H), 7,74 (дд, J=6,9, 2,6 Гц, 1H), 7,45-7,39 (м, 1H), 7,31 (т, J=9,1 Гц, 1H), 5,39-5,10 (м, 1H), 4,98-4,78 (м, 1H), 4,55-4,35 (м, 1H), 4,27-4,19 (м, 1H), 4,13 (д, J=12,9 Гц, 1H), 3,65-3,45 (м, 2H), 3,29 (с, 3H), 3,23-2,87 (м, 3H), 1,25-0,67 (м, 7H).

Пример 2

N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-метил-N3-{1-[(пропан-2-илокси)метил]циклопропил}-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-a]пиразин-3,5-дикарбоксамид

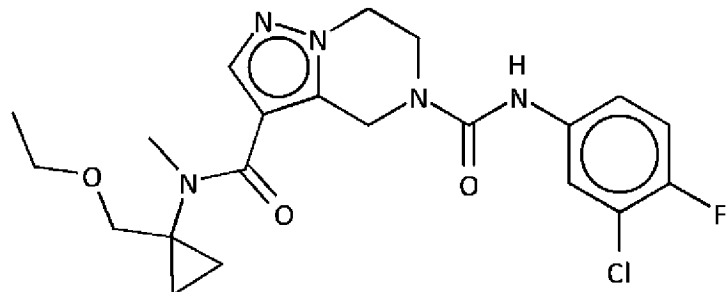


Rt (Метод J) 1,51 мин, m/z 464/466 [M+H]⁺

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,07 (с, 1H), 7,99 (с, 1H), 7,72 (дд, J=6,8, 2,6 Гц, 1H), 7,41 (ддд, J=9,0, 4,3, 2,6 Гц, 1H), 7,31 (т, J=9,1 Гц, 1H), 4,85 (м, 2H), 4,17 (м, 2H), 4,13-3,68 (м, 2H), 3,56 (м, 3H), 3,04 (м, 3H), 1,07 (м, 7H), 0,81 (м, 3H).

Пример 3

N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-[1-(этоксиметил)циклопропил]-N3-метил-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-a]пиразин-3,5-дикарбоксамид

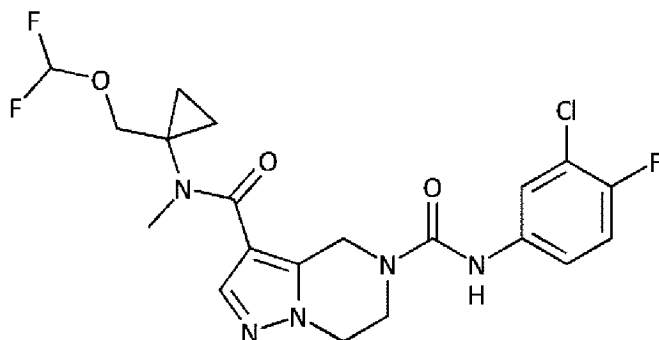


Rt (Метод J) 1,42 мин, m/z 450/452 [M+H]⁺

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,07 (с, 1H), 7,95 (с, 1H), 7,73 (дд, J=6,8, 2,6 Гц, 1H), 7,41 (ддд, J=9,1, 4,3, 2,6 Гц, 1H), 7,31 (т, J=9,1 Гц, 1H), 4,85 (м, 2H), 4,18 (т, J=5,5 Гц, 2H), 3,98 (м, 2H), 3,58 (м, 2H), 3,46 (кв, J=7,0 Гц, 2H), 3,05 (м, 3H), 1,10 (м, 4H), 0,83 (с, 3H).

Пример 4

N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-{1-[(дифторметокси)метил]циклопропил}-N3-метил-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиразин-3,5-дикарбоксамид

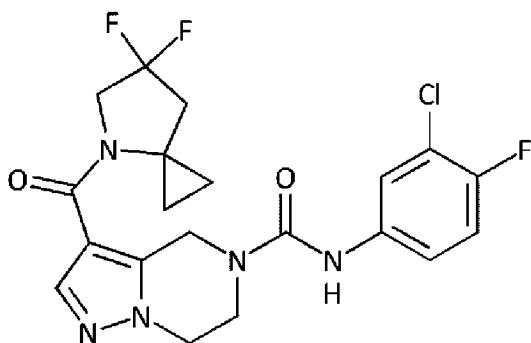


Rt (Метод В) 3,24 мин, m/z 472/474 [M+H]⁺

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,08 (с, 1H), 7,82 (с, 1H), 7,73 (дд, J=6,9, 2,6 Гц, 1H), 7,41 (ддд, J=9,0, 4,4, 2,6 Гц, 1H), 7,31 (т, J=9,1 Гц, 1H), 6,71 (т, J=75,8 Гц, 1H), 4,90-4,81 (м, 2H), 4,21-4,14 (м, 2H), 4,11-3,82 (м, 4H), 3,20-2,98 (м, 3H), 1,20-0,79 (м, 4H).

Пример 5

N-(3-хлор-4-фторфенил)-3-{6,6-дифтор-4-азаспиро[2.4]гептан-4-карбонил}-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиразин-5-карбоксамид

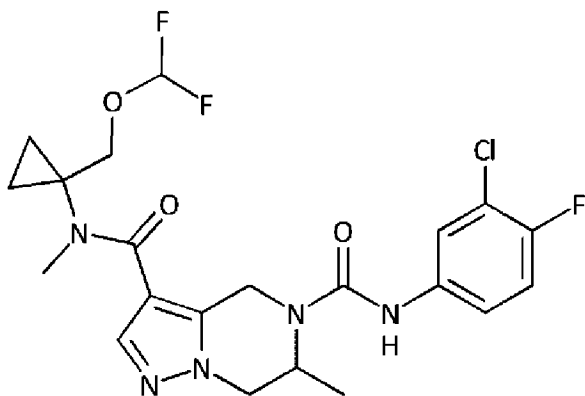


Rt (Метод J) 1,47 мин, m/z 454/456 [M+H]⁺

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,08 (с, 1H), 7,86 (с, 1H), 7,75-7,69 (м, 1H), 7,44-7,38 (м, 1H), 7,31 (т, J=9,1 Гц, 1H), 4,83 (м, 2H), 4,27 (т, J=13,1 Гц, 2H), 4,2 2-4,12 (м, 2H), 3,98-3,87 (м, 2H), 2,50-2,43 (м, 2H), 1,92-1,84 (м, 2H), 0,69-0,62 (м, 2H).

Пример 6

N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-{1-[(дифторметокси)метил]циклопропил}-N3,6-диметил-4Н,5Н,6Н,7Н-пиразоло[1,5-а]пиразин-3,5-дикарбоксамид

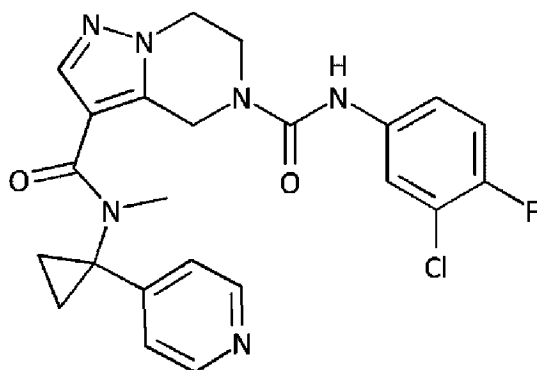


Rt (Метод В) 3,37 мин, m/z 486/488 [M+H]⁺

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,02 (с, 1H), 7,85 (с, 1H), 7,74 (дд, J=6,9, 2,5 Гц, 1H), 7,45-7,38 (м, 1H), 7,31 (т, J=9,1 Гц, 1H), 6,71 (т, J=75,8 Гц, 1H), 5,35-5,18 (м, 1H), 4,94-4,82 (м, 1H), 4,44 (д, 1H), 4,24 (дд, J=12,8, 4,3 Гц, 1H), 4,17-3,95 (м, 3H), 3,22-2,90 (м, 3H), 1,12 (д, J=6,7 Гц, 3H), 0,95 (с, 4H).

Пример 7

N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-метил-N3-[1-(пиридин-4-ил)циклопропил]-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-3,5-дикарбоксамид

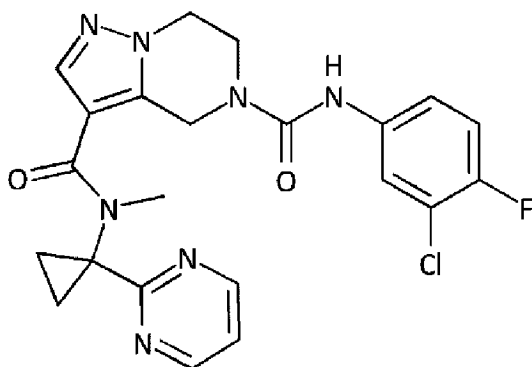


Rt (Метод А) 2,95 мин, m/z 469/471 [M+H]⁺

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,08 (с, 1H), 8,63-8,37 (м, 2H), 8,00-7,68 (м, 1H), 7,64-7,36 (м, 1H), 7,31 (т, J=9,1 Гц, 1H), 7,20-6,80 (м, 3H), 5,07-4,74 (м, 2H), 4,31-3,67 (м, 4H), 3,23-2,94 (м, 3H), 1,84-1,30 (м, 4H).

Пример 8

N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-метил-N3-[1-(пиримидин-2-ил)циклопропил]-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-3,5-дикарбоксамид

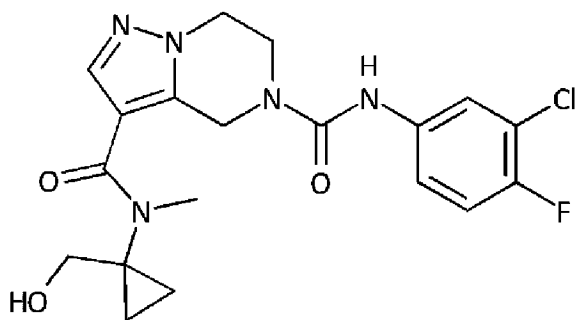


Rt (Метод А) 3 мин, m/z 470/472 $[M+H]^+$

1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 9,07 (с, 1H), 8,84-8,63 (м, 2H), 7,79-7,67 (м, 1H), 7,46-7,24 (м, 3H), 6,78 (с, 1H), 5,00-4,76 (м, 2H), 4,26-3,90 (м, 3H), 3,84-3,68 (м, 1H), 3,10 (с, 3H), 1,9 6-1,80 (м, 1H), 1,66-1,33 (м, 3H).

Пример 9

N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-[1-(гидроксиметил)циклопропил]-N3-метил-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-3,5-дикарбоксамид

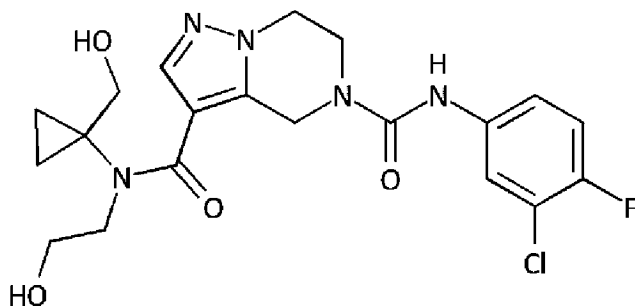


Rt (Метод А) 2,77 мин, m/z 422/424 $[M+H]^+$

1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 9,07 (с, 1H), 8,17-7,76 (м, 1H), 7,73 (дд, $J=6,8$, 2,6 Гц, 1H), 7,41 (ддд, $J=9,1$, 4,4, 2,6 Гц, 1H), 7,31 (т, $J=9,1$ Гц, 1H), 5,32-4,92 (м, 1H), 4,92-4,72 (м, 2H), 4,24-4,12 (м, 2H), 4,12-3,73 (м, 2H), 3,72-3,53 (м, 2H), 3,22-2,88 (м, 3H), 1,21-0,60 (м, 4H).

Пример 10

N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-(2-гидроксиэтил)-N3-[1-(гидроксиметил)циклопропил]-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-3,5-дикарбоксамид

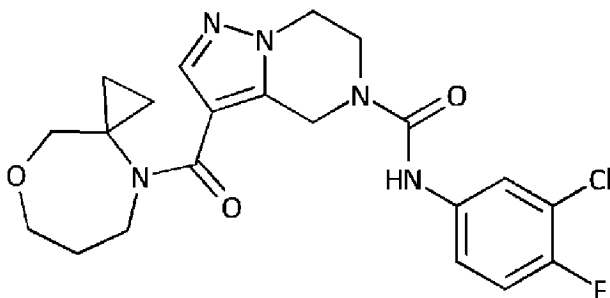


Rt (Метод В) 2,72 мин, m/z 452/454 $[M+H]^+$

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,08 (с, 1H), 7,92 (с, 1H), 7,73 (дд, J=6,8, 2,6 Гц, 1H), 7,41 (ддд, J=9,1, 4,4, 2,6 Гц, 1H), 7,31 (т, J=9,1 Гц, 1H), 5,18-5,01 (м, 1H), 4,94-4,73 (м, 3H), 4,22-3,39 (м, 10H), 1,39-0,61 (м, 4H).

Пример 11

N-(3-хлор-4-фторфенил)-3-{8-окса-4-азаспиро[2.6]нонан-4-карбонил}-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-a]пиразин-5-карбоксамид

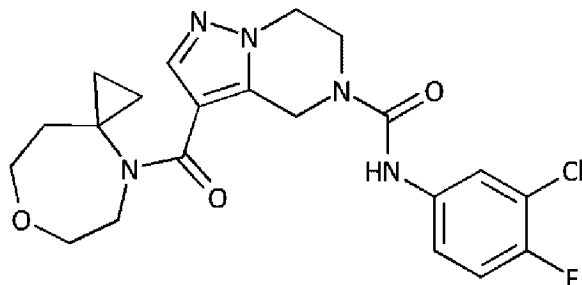


Rt (Метод В) 2,95 мин, m/z 448/450 [M+H]⁺

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,08 (с, 1H), 7,76-7,68 (м, 2H), 7,42 (ддд, J=9,1, 4,4, 2,7 Гц, 1H), 7,31 (т, J=9,1 Гц, 1H), 4,93-4,79 (м, 2H), 4,23-4,14 (м, 2H), 4,11-3,37 (м, 8H), 2,01-1,91 (м, 2H), 1,19-0,78 (м, 4H).

Пример 12

N-(3-хлор-4-фторфенил)-3-{7-окса-4-азаспиро[2.6]нонан-4-карбонил}-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-a]пиразин-5-карбоксамид

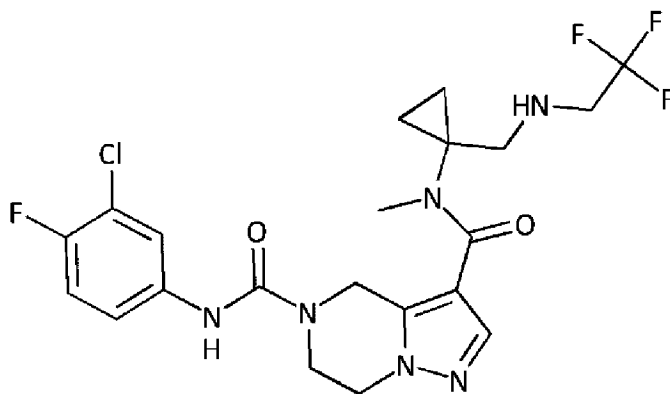


Rt (Метод В) 2,95 мин, m/z 448/450 [M+H]⁺

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,09 (с, 1H), 7,99-7,60 (м, 2H), 7,42 (ддд, J=9,1, 4,4, 2,7 Гц, 1H), 7,31 (т, J=9,1 Гц, 1H), 4,97-4,76 (м, 2H), 4,39-3,46 (м, 10H), 2,06-1,21 (м, 2H), 1,13-0,71 (м, 4H).

Пример 13

N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-метил-N3-(1-{{(2,2,2-трифторэтил)амино}метил}циклопропил)-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-a]пиразин-3,5-дикарбоксамид

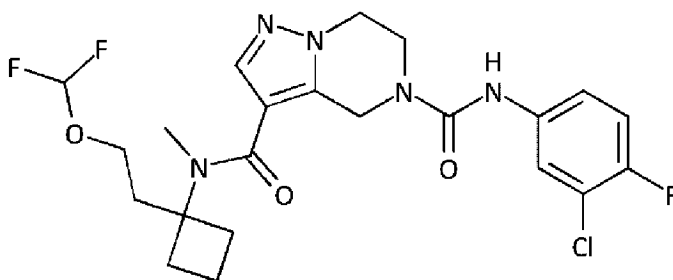


Rt (Метод А) 3,22 мин, m/z 503/505 [M+H]⁺

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,09 (с, 1H), 8,04-7,65 (м, 2H), 7,49-7,38 (м, 1H), 7,31 (т, J=9,1 Гц, 1H), 4,99-4,72 (м, 2H), 4,28-3,66 (м, 4H), 3,30-2,55 (м, 8H), 1,33-0,61 (м, 4H).

Пример 14

N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-{1-[2-(дифторметокси)этил]циклобутил}-N3-метил-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-3,5-дикарбоксамид

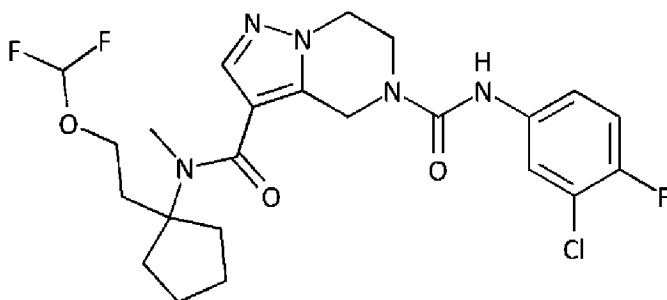


Rt (Метод А2) 3,86 мин, m/z 500/502 [M+H]⁺

Пример

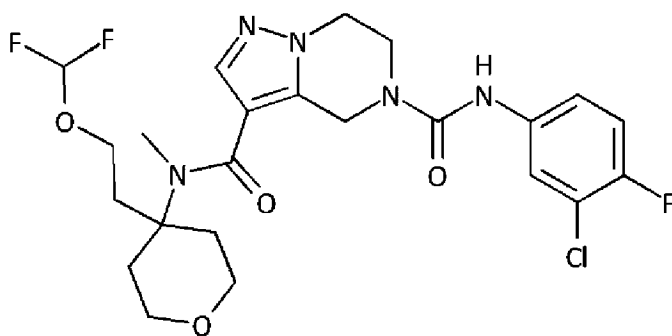
15

N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-{1-[2-(дифторметокси)этил]циклопентил}-N3-метил-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-3,5-дикарбоксамид



Rt (Метод А2) 4,01 мин, m/z 514/516 [M+H]⁺

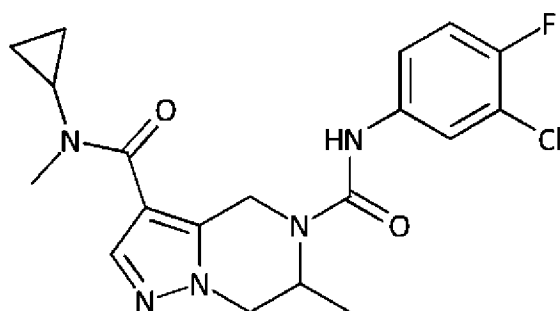
Пример 16 N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-{4-[2-(дифторметокси)этил]оксан-4-ил}-N3-метил-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-3,5-дикарбоксамид



Rt (Метод А2) 3,58 мин, m/z 530/532 [M+H]⁺

Пример 17

N5-(3-хлор-4-фторфенил)-N3-циклопропил-N3,6-диметил-4H,5H,6H,7H-пиразоло[1,5-а]пиразин-3,5-дикарбоксамид



Rt (Метод А) 3,11 мин, m/z 406/408 [M+H]⁺

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8,99 (с, 1H), 8,00 (с, 1H), 7,74 (дд, J=6,9, 2,6 Гц, 1H), 7,46-7,39 (м, 1H), 7,31 (т, J=9,1 Гц, 1H), 5,25 (д, J=18,3 Гц, 1H), 4,93-4,84 (м, 1H), 4,46 (д, J=18,3 Гц, 1H), 4,25 (дд, J=12,9, 4,4 Гц, 1H), 4,14 (д, J=12,8 Гц, 1H), 3,13-3,04 (м, 1H), 2,96 (с, 3H), 1,12 (д, J=6,8 Гц, 3H), 0,84-0,75 (м, 2H), 0,69-0,51 (м, 2H).

Биохимический анализ сборки капсида

Скрининг на эффекторную активность сборки проводили на основе анализа тушения флуоресценции, опубликованного Zlotnick et al. (2007). С-концевой усеченный коровый белок, содержащий 149 аминокислот N-концевого домена сборки, слитый с уникальным остатком цистеина в положении 150, экспрессировали в *E.coli* с использованием системы экспрессии pET (Merck Chemicals, Дармштадт). Очистку димерного корового белка проводили с использованием последовательности стадий эксклюзионной хроматографии. Вкратце, осадок клеток из 1 л культуры BL21 (DE3) Rosetta2, экспрессирующей кодирующую последовательность корового белка, клонированного NdeI/XhoI в экспрессионную плазмиду pET21b, обрабатывали в течение 1 часа на льду нативным буфером для лизиса (Qproteome Bacterial Protein Prep Kit; Qiagen, Хильден). После стадии центрифугирования супернатант осаждали в течение 2 часов при перемешивании на льду с 0,23 г/мл твердого сульфата аммония. После стадии центрифугирования полученный осадок растворяли в буфере А (100 мМ Трис, pH 7,5; 100 мМ NaCl; 2 мМ DTT), а затем загружали на колонку CartoCore 700, уравновешенную

буфером А (GE HealthCare, Франкфурт). Поток через колонку, содержащий собранный капсид HBV, подвергали диализу против буфера N (50 mM NaHCO₃, pH 9,6; 5 mM DTT) перед добавлением мочевины до конечной концентрации 3M для диссоциации капсида на коровые димеры в течение 1,5 часа на льду. Затем раствор белка загружали в колонку с 1 л Sephacryl S300. После элюирования буфером N, фракции, содержащие коровые димеры, идентифицировали с помощью SDS-PAGE, а затем объединяли и диализовали против 50 mM HEPES pH 7,5; 5 mM DTT. Для улучшения способности к сборке очищенных коровых димеров, был проведен второй раунд сборки и разборки, начиная с добавления 5M NaCl и включая стадии эксклюзионной хроматографии, описанные выше. После последней стадии хроматографии, фракции, содержащие коровые димеры, объединяли и хранили в виде аликвот при -80°C в концентрациях от 1,5 до 2,0 мг/мл.

Непосредственно перед мечением коровый белок восстанавливали путем добавления свежеприготовленного DTT в конечной концентрации 20 mM. После 40 минут инкубации на ледяном буфере DTT удаляли с использованием колонки Sephadex G-25 (GE HealthCare, Франкфурт) и 50 mM HEPES, pH 7,5. Для мечения 1,6 мг/мл корового белка инкубировали при 4°C в темноте в течение ночи с малеимидом BODIPY-FL (Invitrogen, Карлсруэ) в конечной концентрации 1 mM. После мечения свободный краситель удаляли дополнительной стадией обессоливания с использованием колонки Sephadex G-25. Меченые коровые димеры хранили в аликвотах при 4°C. В димерном состоянии сигнал флуоресценции меченого корового белка является достаточно высоким, и он гасится во время сборки коровых димеров в высокомолекулярные структуры капсида. Скрининговый анализ проводили в черных 384-луночных микротитрационных планшетах в общем объеме для анализа 10 мкл, с использованием 50 mM HEPES pH 7,5 и 1,0-2,0 мкМ меченого корового белка. Каждое соединение для скрининга добавляли в 8 различных концентрациях, используя серийное разведение с шагом 0,5 log, начиная с конечной концентрации 100 мкМ, 31,6 мкМ или 10 мкМ. В любом случае концентрация DMSO во всем планшете для микротитрования составляла 0,5%. Реакцию сборки запускали инъекцией NaCl до конечной концентрации 300 мкМ, которая индуцирует процесс сборки приблизительно до 25% от максимального погашенного сигнала. Через 6 минут после начала реакции сигнал флуоресценции измеряли с использованием планшетного ридера Clariostar (BMG Labtech, Ортенберг) при длине волны возбуждения 477 нм и эмиссии 525 нм. В качестве 100% и 0% контроля сборки использовали буфер HEPES, содержащий 2,5M и 0M NaCl. Эксперименты проводили трижды в трех повторностях. Значения EC₅₀ рассчитывали методом нелинейного регрессионного анализа с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, Ла-Джолла, США).

Определение ДНК HBV в супернатантах клеток HepAD38

Активность в отношении HBV анализировали в стабильной трансфицированной клеточной линии HepAD38, которая, как описано, секретирует высокие уровни частиц вириона HBV (Ladner et al., 1997). Вкратце, клетки HepAD38 культивировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в 200 мкл поддерживающей среды, которая представляла собой

модифицированную по Дульбекко среду Игла/питательную смесь F-12 (Gibco, Карлсруэ), с 10% фетальной телячьей сывороткой (PAN Biotech Айденбах), с добавлением 50 мкг/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco, Карлсруэ), 2 mM L-глутамин (PAN Biotech, Айденбах), 400 мкг/мл G418 (AppliChem, Дармштадт) и 0,3 мкг/мл тетрациклина. Клетки пересеивали один раз в неделю при соотношении 1:5, и обычно пассировали не более десяти раз. Для анализа 60000 клеток высевали в поддерживающую среду без тетрациклина в каждую лунку 96-луночного планшета и обрабатывали серийными полулогарифмическими разведениями тестируемого соединения. Чтобы свести к минимуму краевые эффекты, внешние 36 лунок планшета не использовали, а заполняли аналитической средой. На каждом планшете для анализа были выделены шесть лунок для вирусного контроля (необработанные клетки HepAD38) и шесть лунок для клеточного контроля (клетки HepAD38, обработанные 0,3 мкг/мл тетрациклина), соответственно. Кроме того, в каждом эксперименте готовили один набор планшетов с контрольными ингибиторами, такими как ВАУ 41-4109, энтекавир и ламивудин, вместо соединений для скрининга. В целом эксперименты проводили трижды в трех повторностях. На 6 день ДНК HBV из 100 мкл отфильтрованного супернатанта клеточной культуры (фильтровальная пластина AcroPrep Advance 96, 0,45 мкМ мембрана Supor, PALL GmbH, Драйайх) автоматически очищали на приборе MagNa Pure LC, с использованием набора MagNa Pure 96 DNA и набора Viral NA Small Volume Kit. (Roche Diagnostics, Маннхейм) в соответствии с инструкциями производителя. Значения EC_{50} рассчитывали на основе относительного числа копий ДНК HBV. Вкратце, 5 мкл из 100 мкл элюата, содержащего ДНК HBV, подвергали ПЦР с использованием набора PCR LC480 Probes Master Kit (Roche), вместе с 1 мкМ антисмыслового праймера *tgcagaggtgaagcgaagtgcaca*, 0,5 мкМ смыслового праймера *gacgtcctttgtgtcgtccc*, 0,3 мкМ гибридизационных зондов HybProbe *acggggcgcacctctctttacgcgg-FL* и *LC640-ctccccgtctgtgccttctcatctgc-PH* (TIBMolBiol, Берлин) до конечного объема 12,5 мкл. ПЦР выполняли в системе реального времени на установке Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Маннхейм), используя следующий протокол: предварительная инкубация в течение 1 мин при 95°C, амплификация: 40 циклов x (10 сек при 95°C, 50 сек при 60°C, 1 сек при 70°C), охлаждение в течение 10 сек при 40°C. Вирусную нагрузку оценивали по известным стандартам с использованием плазмидной ДНК HBV рСН-9/3091 (Nassal et al., 1990, Cell 63: 1357-1363) и программного обеспечения LightCycler 480 SW 1.5 (Roche Diagnostics, Маннхейм). Значения EC_{50} рассчитывали методом нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., Ла-Джолла, США).

Таблица 1: Биохимическая и противовирусная активность

В Таблице 1 обозначение «+++» соответствует величине $EC_{50} < 1$ мкМ; обозначение «++» соответствует величине EC_{50} в интервале от 1 мкМ до 10 мкМ; обозначение «+» соответствует величине $EC_{50} < 100$ мкМ (по анализу клеточной активности)

В Таблице 1 обозначение «А» соответствует величине $IC_{50} < 5$ мкМ; обозначение «В» соответствует величине IC_{50} в интервале от 5 мкМ до 10 мкМ; обозначение «С» соответствует величине $IC_{50} < 100$ мкМ (по анализу активности сборки).

Пример	CC_{50} (мкМ)	Клеточная активность	Активность сборки
Пример 1	> 10	+++	А
Пример 2	> 10	+++	А
Пример 3	> 10	+++	А
Пример 4	> 10	+++	А
Пример 5	> 10	+++	А
Пример 6	> 10	+++	А
Пример 7	> 10	+++	А
Пример 8	> 10	+++	А
Пример 9	> 10	+++	А
Пример 10	> 10	+++	А
Пример 11	> 10	+++	А
Пример 12	> 10	+++	А
Пример 13	> 10	+++	А
Пример 14	> 10	+++	А
Пример 15	> 10	+++	А
Пример 16	> 10	+++	А
Пример 17	> 10	+++	А

Анализ жизнеспособности клеток

Используя метод анализа жизнеспособности AlamarBlue, цитотоксичность оценивали в клетках HepAD38 в присутствии 0,3 мкг/мл тетрациклина, который блокирует экспрессию генома HBV. Условия анализа и содержание планшетов были аналогичны анализу в отношении активности против HBV, однако использовались другие контроли. На каждом планшете для анализа шесть лунок, содержащих необработанные клетки HepAD38, использовали в качестве контроля 100% жизнеспособности, а шесть лунок, заполненных только аналитической средой, использовали в качестве контроля 0% жизнеспособности. Кроме того, серию геометрических концентраций циклогексимида, начиная с конечной аналитической концентрации 60 мкМ, использовали в качестве

положительного контроля в каждом эксперименте. После шести дней инкубации в каждую лунку планшета для анализа добавляли реагент для определения жизнеспособности клеток Alamar Blue Presto (ThermoFisher, Драйайх) в разведении 1/11. После инкубации в течение 30-45 минут при 37°C сигнал флуоресценции, который пропорционален количеству живых клеток, считывали с помощью планшет-ридера Tecan Spectrafluor Plus с фильтром возбуждения 550 нм и фильтром эмиссии 595 нм, соответственно. Данные были нормализованы в процентах от необработанного контроля (жизнеспособность 100%) и среды для анализа (жизнеспособность 0%), и значения CC_{50} рассчитывали методом нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Ла-Джолла, США). Средние значения EC_{50} и CC_{50} использовали для расчета индекса селективности ($SI=CC_{50}/EC_{50}$) для каждого тестируемого соединения.

Модели эффективности in vivo

Исследования HBV и доклинические испытания противовирусных агентов ограничены узким видовым и тканевым тропизмом вируса, малочисленностью доступных моделей инфекции и ограничениями, налагаемыми использованием животных, в частности, шимпанзе, единственных животных, полностью восприимчивых к инфекции HBV. Альтернативные модели животных основаны на использовании гепаднавирусов, схожих с HBV, и различные противовирусные соединения были протестированы на сурках, инфицированных вирусом гепатита сурков (WHV), или на утках, инфицированных вирусом гепатита В уток (DHBV), или на тупайях, инфицированных HBV шерстистой обезьяны (WM-HBV) (см. обзор в Dandri et al., 2017, Best Pract Res Clin Gastroenterol 31, 273-279). Однако использование суррогатных вирусов имеет ряд ограничений. Например, гомология последовательностей между наиболее отдаленными родственными вирусами DHBV и HBV составляет всего приблизительно 40%, и именно поэтому модификаторы сборки корового белка семейства НАР оказались неактивными в отношении DHBV и WHV, но они эффективно подавляли HBV (Campagna et al., 2013, J Virol. 87, 6931-6942). Мыши не являются перmissive в отношении HBV, поэтому основные усилия были сосредоточены на разработке мышинных моделей репликации HBV и инфекции, таких как создание мышей, трансгенных к HBV человека (мыши HBV tg), метода гидродинамической инъекции (HDI) геномов HBV мышам или на создание мышей с гуманизированной печенью и/или гуманизированной иммунной системой, и метода внутривенной инъекции вирусных векторов на основе аденовирусов, содержащих геномы HBV (Ad-HBV) или аденоассоциированный вирус (AAV-HBV), иммунокомпетентным мышам (см. обзор в Dandri et al. al., 2017, Best Practices Clin Gastroenterol 31, 273-279). Используя мышей, трансгенных по полному геному HBV, можно продемонстрировать способность гепатоцитов мышей продуцировать инфекционные вирионы HBV (Guidotti et al., 1995, J. Virol., 69: 6158-6169). Поскольку трансгенные мыши обладают иммунологической толерантностью к вирусным белкам, и у мышей, продуцирующих HBV, повреждений печени не наблюдалось, эти исследования продемонстрировали, что

HBV как таковой не является цитопатическим вирусом. Трансгенных мышей HBV использовали для тестирования эффективности нескольких агентов против HBV, таких как ингибиторы полимеразы и модификаторы сборки основного белка (Weber et al., 2002, *Antiviral Research* 54, 69-78; Julander et al., 2003, *Antivir. Res.*, 59: 155-161), и тем самым было доказано, что трансгенные мыши HBV хорошо подходят для многих типов доклинических антивирусных испытаний *in vivo*.

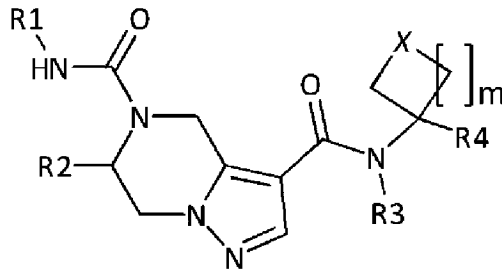
Как описано в Paulsen et al., 2015, *PLoSone*, 10: e0144383, HBV-трансгенные мыши (Tg [HBV1.3 fsX^{3'5'}]), несущие мутацию сдвига рамки считывания (GC) в положении 2916/2917, могут быть использованы для демонстрации противовирусной активности модификаторов сборки корового белка *in vivo*. Вкратце, перед экспериментами всех мышей, трансгенных по HBV, проверяли на наличие HBV-специфической ДНК в сыворотке с помощью количественной ПЦР (см. раздел «Определение ДНК HBV из супернатантов клеток HepAD38»). Каждая группа обработки состояла из пяти самцов и пяти самок возрастом приблизительно 10 недель с титром 10^7 - 10^8 вирионов на мл сыворотки. Соединения готовили в виде суспензии в подходящем носителе, таком как 2% DMSO/98% тилоза (0,5% метилцеллюлоза/99,5% PBS) или 50% PEG400, и вводили животным перорально от одного до трех раз/день в течение 10-дневного периода. Носитель служил отрицательным контролем, а 1 мкг/кг энтекавира в подходящем носителе использовали в качестве положительного контроля. Кровь получали ретробульбарным забором крови с использованием Isoflurane Vaporizer. Для сбора конечной пункции сердца через шесть часов после последней обработки крови или органов, мышей анестезировали изофлураном и затем умерщвляли воздействием CO₂. Образцы крови ретробульбарной (100-150 мкл) и пункционной (400-500 мкл) крови собирали в Microvette 300 LH или Microvette 500 LH, соответственно, с последующим разделением плазмы центрифугированием (10 мин, 2000 g, 4°C). Ткань печени быстро замораживали в жидком N₂. Все образцы хранили при -80°C до их использования. Вирусную ДНК экстрагировали из 50 мкл плазмы или 25 мг ткани печени и элюировали 50 мкл буфера AE (плазма) с использованием набора DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen, Хильден) или 320 мкл буфера AE (ткань печени) с использованием набора DNeasy Tissue Kit. (Qiagen, Хильден) в соответствии с инструкциями производителя. Для определения количества копий HBV элюированную вирусную ДНК подвергали количественной ПЦР с использованием набора LightCycler 480 Probes Master PCR (Roche, Маннгейм) в соответствии с инструкциями производителя. Используемые HBV-специфические праймеры включали прямой праймер 5'-CTG TAC CAA ACC TTC GGA CGG-3', обратный праймер 5'-AGG AGA AAC GGG CTG AGG C-3' и меченный FAM зонд FAM-CCA TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAA TT-BBQ. Один образец для реакции ПЦР общим объемом 20 мкл содержал 5 мкл элюата ДНК и 15 мкл мастер-смеси (включающей 0,3 мкМ прямого праймера, 0,3 мкМ обратного праймера, 0,15 мкМ меченного FAM зонда). Количественную ПЦР проводили на установке Roche LightCycler 1480 по следующему протоколу: предварительная инкубация в течение 1 мин при 95°C,

амплификация: (10 сек при 95°C, 50 сек при 60°C, 1 сек при 70°C) x 45 циклов, охлаждение 10 сек при 40°C. Калибровочные кривые были построены, как описано выше. Все образцы тестировали в двух повторах. Предел обнаружения анализа составляет ~50 копий ДНК HBV (с использованием стандартов в диапазоне от 250 до $2,5 \times 10^7$ копий). Результаты выражали в виде количества копий ДНК HBV/10 мкл плазмы или копий ДНК HBV/100 нг общей ДНК печени (с нормализацией по отрицательному контролю).

В многочисленных исследованиях было показано, что не только трансгенные мыши являются подходящей моделью для доказательства противовирусной активности новых химических соединений *in vivo*. Использование гидродинамической инъекции геномов HBV мышам, а также использование иммунодефицитных мышей, химерных в отношении печени человека, инфицированных химерными мышам с HBV-положительной сывороткой пациентов, также часто используют для профилирования лекарств, направленных на HBV (Li et al., 2016, *Hepat. Mon.* 16: e34420; Qiu et al., 2016, *J. Med. Chem.* 59: 7651-7666; Lutgehetmann et al., 2011, *Gastroenterology*, 140: 2074-2083). Кроме того, хроническая инфекция HBV также была успешно установлена у иммунокомпетентных мышей путем инокуляции низких доз аденовируса (Huang et al., 2012, *Gastroenterology* 142: 1447-1450) или векторов аденоассоциированного вируса (AAV), содержащих геном HBV (Dion et al., 2013, *J. Virol.* 87: 5554-5563). Эти модели также можно использовать для демонстрации противовирусной активности *in vivo* новых агентов против HBV.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы II



II

в котором

- R1 представляет собой фенил или пиридил, необязательно замещенные одной, двумя или тремя группами галогена, C1-C4-алкила, C3-C6-циклоалкила, C1-C4-галогеналкила или C≡N,

- R2 представляет собой H или метил,

- R3 представляет собой C1-C4-алкил, где указанный C1-C4-алкил является незамещенным, или он замещен одной, двумя или тремя группами дейтерия, OH или галогена,

- R4 выбран из группы, включающей C1-C2-алкил-O-C1-C4-алкил, C1-C2-гидроксиалкил, C1-C2-алкил-O-C1-C4-галогеналкил, C1-C2-алкил-NH-C1-C4-галогеналкил, C1-C2-алкил-O-C3-C6-циклоалкил, C1-C2-алкил-S-C1-C4-алкил, C1-C2-алкил-SO₂-C1-C4-алкил, C1-C2-алкил-C≡N, C1-C2-алкил-C3-C7-гетероциклоалкил, C1-C2-алкил-OC(=O)(C3-C7-циклоалкил)NH₂, C1-C2-алкил-OC(=O)(C1-C6-алкил)NH₂, арил и гетероарил, где арил или гетероарил необязательно замещены одной, двумя или тремя группами галогена или C1-C6-алкила,

- R3 и R4 необязательно соединены с образованием пяти-, шести- или семичленного гетероциклического кольца, где указанное гетероциклическое кольцо является незамещенным, или оно замещено одной, двумя или тремя группами галогена, OH, карбокси, OCF₃, OCHF₂ или C≡N,

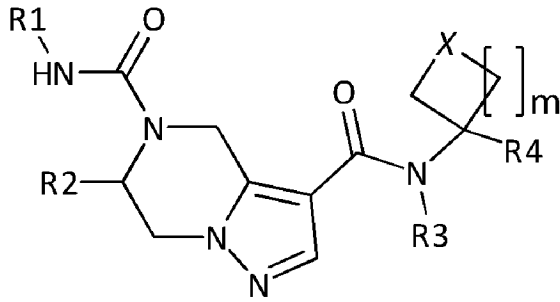
- X представляет собой O, CH₂ или NR₅,

- m равно 0, 1, 2 или 3,

- R5 представляет собой H или C1-C4-алкил,

или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват или гидрат соединения формулы II или его фармацевтически приемлемой соли, или пролекарство соединения формулы II или его фармацевтически приемлемая соль, или его сольват или гидрат.

2. Соединение формулы II по п. 1,



II

в котором

- R1 представляет собой фенил или пиридил, необязательно замещенные одной, двумя или тремя группами галогена, C1-C4-алкила, C3-C6-циклоалкила, C1-C4-галогеналкила или C≡N,

- R2 представляет собой H или метил,

- R3 представляет собой C1-C4-алкил, где указанный C1-C4-алкил является незамещенным, или он замещен одной, двумя или тремя группами дейтерия или галогена,

- R4 выбран из группы, включающей C1-C2-алкил-O-C1-C4-алкил, C1-C2-гидроксиалкил, C1-C2-алкил-O-C1-C4-галогеналкил, C1-C2-алкил-O-C3-C6-циклоалкил, C1-C2-алкил-S-C1-C4-алкил, C1-C2-алкил-SO₂-C1-C4-алкил, C1-C2-алкил-C≡N, C1-C2-алкил, -C3-C7-гетероциклоалкил, C1-C2-алкил-OC(=O)(C3-C7-циклоалкил)NH₂, C1-C2-алкил-OC(=O)(C1-C6-алкил)NH₂, арил и гетероарил, где арил или гетероарил необязательно замещены одной, двумя или тремя группами галогена или C1-C6-алкила,

- R3 и R4 необязательно соединены с образованием пяти-, шести- или семичленного гетероциклического кольца, где указанное гетероциклическое кольцо является незамещенным, или оно замещено одной, двумя или тремя группами галогена, OH, карбокси, OCF₃, OCHF₂ или C≡N,

- X представляет собой O, CH₂ или NR₅,

- m равно 0, 1 или 2,

- R5 представляет собой H или C1-C4-алкил,

или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват или гидрат соединения формулы II или его фармацевтически приемлемой соли, или пролекарство соединения формулы II или его фармацевтически приемлемая соль, или его сольват или гидрат.

3. Соединение формулы II, по любому из пп. 1 или 2, в котором арил представляет собой C6-арил, и/или гетероарил представляет собой C1-C9-гетероарил, и где каждый гетероарил и гетероциклоалкил включает от 1 до 4 гетероатомов, каждый из которых независимо выбран из N, O и S,

или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват или гидрат соединения формулы II или его фармацевтически приемлемой соли, или пролекарство соединения формулы II или его фармацевтически приемлемая соль, или его сольват или гидрат.

4. Соединение Формулы II по любому из пп. 1-3,

или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват или гидрат соединения формулы II или его фармацевтически приемлемой соли, или пролекарство соединения формулы II или его фармацевтически приемлемая соль, или его сольват или гидрат,

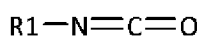
где пролекарство выбрано из группы, включающей сложные эфиры, карбонаты, ацетилоксипроизводные, аминокислотные производные и фосфорамидатные производные.

5. Соединение по любому из пп. 1-4 или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват или гидрат указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, или пролекарство указанного соединения или его фармацевтически приемлемая соль, или его сольват или гидрат, для применения при профилактике или лечении инфекции HBV у субъекта.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-4 или его фармацевтически приемлемую соль, или сольват или гидрат указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, или пролекарство указанного соединения или его фармацевтически приемлемая соль, или его сольват или гидрат, вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

7. Способ лечения инфекции HBV у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-4 или его фармацевтически приемлемой соли, или сольвата или гидрата указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, или пролекарства указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, или его сольвата или гидрата.

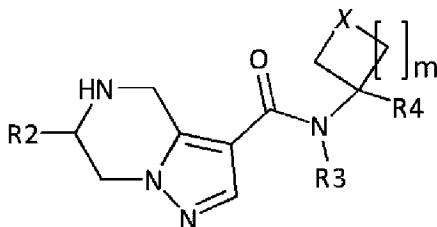
8. Способ получения соединения формулы I по любому из пп. 1-3 путем взаимодействия соединения формулы III



III

в котором R1 имеет значения, определенные в п. 1,

с соединением формулы IV



IV

в котором R2, R3, R4, X и m имеют значения, определенные в любом из пп. 1-4.

По доверенности