

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 046990

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2024.05.20

(51) Int. Cl. A61K 31/685 (2006.01)  
A61P 31/14 (2006.01)

(21) Номер заявки  
202092169

(22) Дата подачи заявки  
2020.10.13

---

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ЗАМЕЩЕННЫХ АМИНОПРОПИОНАТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛЕЧЕНИИ ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2

---

(31) 202010071087.7

(32) 2020.01.21

(33) CN

(43) 2021.07.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ЭКЭДЕМИ ОФ МИЛИТАРИ  
МЕДИКАЛ САЙЕНСИЗ (CN)

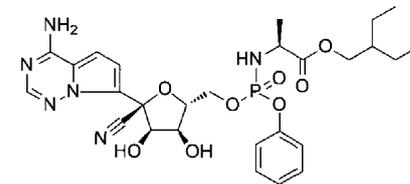
(56) TIMOTHY P. SHEAHAN,  
et al. Broad-spectrum antiviral GS-5734  
inhibits both epidemic and zoonotic  
coronaviruses. SCIENCE TRANSLATIONAL  
MEDICINE, 2017-06-28; No9(396):eaal3653. <doi:  
10.1126/scitranslmed.aal3653> Весь документ,  
особенно реферат, разделы "Results", "Prophylactic  
treatment with GS-5734 reduces SARS-CoV disease",  
"Discussion"

(72) Изобретатель:  
Чжун У, Цао Жуйюань, Сяо Гэнфу,  
Ху Чжихун, Ван Маньли, Чжан Лэйкэ,  
Ли Вэй, Ли Юэсян, Чжао Лэй, Фань  
Шиюн, Ли Сун (CN)

EA-B1-032239  
EA-B1-029712  
EA-B1-025252

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к применению замещенного аминопропионатного соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата и фармацевтической композиции, содержащей соединение, для лечения заболевания или инфекции, вызванной SARS-CoV-2.



I.

B1

046990

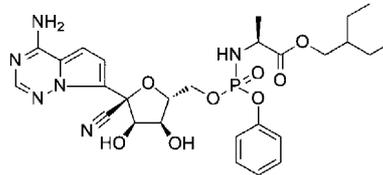
046990

B1

Настоящая заявка основана, и по ней испрашивается приоритет, на китайской патентной заявке № 202010071087.7, поданной 21 января 2020 года, описание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к применению замещенного аминопропионатного соединения, представленного следующей формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата и фармацевтической композиции, содержащей указанные выше соединения, в лечении инфекции SARS-CoV-2.



I

### Уровень техники

Замещенное аминопропионатное соединение (соединение, представленное формулой I) с химическим названием 2-этилбутил(2S)-2-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидроксиоксолан-2-ил]метокси-феноксифосфорил]амино]пропаноат, также известное как ремдесивир (GS-5734), является ингибитором вирусной РНК-полимеразы, и его активной формой *in vivo* является нуклеозидтрифосфат (NTP) родительского лекарственного средства. К настоящему времени завершено клиническое испытание фазы III лекарственного соединения для клинического лечения инфекции вируса Эбола, и в нем показан хороший терапевтический эффект в отношении этой инфекции. Показано, что ремдесивир имеет противовирусную активность против различных вариантов EBOV и других филовирсов в анализах на основе клеток. В модели инфицированных вирусом Эбола макак-резусов, даже если лечение начинали через три дня после воздействия вируса (системную вирусную РНК определяли у двух из шести подвергнутых воздействию животных), внутривенное введение 10 мг/кг GS-5734 в сутки в течение последовательных 12 дней могло значительно ингибировать репликацию EBOV, защищать 100% инфицированных EBOV животных от гибели, и улучшать клинические признаки и патофизиологические маркеры. Помимо вируса Эбола, GS-5734 также обладает противовирусной активностью широкого спектра в отношении таких вирусов, как вирус Нипах, коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), вирус Марбург и т.д.

Новый коронавирус 2019 года (2019-nCoV) является новым штаммом коронавируса, который ранее не обнаруживали у людей. 11 февраля 2020 года Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) объявил, что официальным названием нового коронавируса 2019 года (2019-nCoV) является коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома-2 (SARS-CoV-2). В тот же день Всемирная организация здравоохранения (WHO) объявила, что официальным названием заболевания, вызванного этим вирусом, является COVID-19. Симптомами инфекции вируса SARS-CoV-2, в основном, является пневмония, и их можно разделять на простую инфекцию, легкую пневмонию, тяжелую пневмонию, острый респираторный дистресс-синдром, сепсис, септический шок и т.д. в зависимости от тяжести заболевания. Пациенты с простой инфекцией могут иметь неспецифические симптомы, такие как лихорадка, кашель, боль в горле, заложенность носа, утомляемость, головная боль, боль или дискомфорт в мышцах, и пожилые люди и люди в состоянии иммуносупрессии могут иметь атипичные симптомы. Пациенты с легкой пневмонией, в основном, имеют кашель, диспноэ и полипноэ. Тяжелую пневмонию можно наблюдать у подростков, взрослых или детей, и ее основные симптомы включают повышение частоты дыхательных движений, тяжелую дыхательную недостаточность или диспноэ, центральный цианоз, сонливость, потерю сознания или конвульсии, удушье и т.д. Изображения легких при остром респираторном дистресс-синдроме соответствуют билатеральным теням по типу матового стекла, которые нельзя в полной мере объяснить выпотом, долевым экссудацией или ателектазом, или тени легочной массы, и основным его симптомом является отек легких. Пациенты с сепсисом зачастую имеют фатальную дисфункцию органа, и пациентами в наиболее критическом состоянии являются пациенты с септическим шоком, и они имеют высокую вероятность гибели.

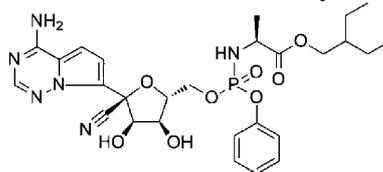
В настоящее время инфекцию вируса SARS-CoV-2, в основном, лечат с использованием поддерживающей терапии в клинике, и противовирусные лекарственные средства недоступны.

### Подробное описание изобретения

Целью настоящего изобретения является обнаружение лекарственного средства с противовирусной активностью против SARS-CoV-2, которое можно использовать для лечения соответствующего заболевания, вызванного его инфекцией. С помощью творческого исследования в рамках настоящего изобретения обнаружено, что соединение, представленное формулой I, обладает функцией ингибирования репликации SARS-CoV-2 и хорошим потенциальным терапевтическим эффектом при лечении заболевания, вызванного SARS-CoV-2.

Настоящее изобретение относится к соединению, представленному формулой I, его геометрическо-

му изомеру, фармацевтически приемлемой соли и/или сольвату и гидрату:



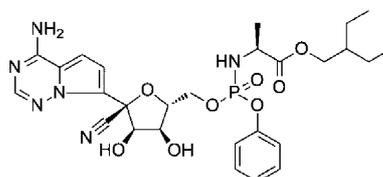
I

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли соединения, представленного формулой I, включают соли неорганических или органических кислот и соли неорганических или органических оснований. Настоящее изобретение относится ко всем формам указанных выше солей, включая, в качестве неограничивающих примеров: натриевую соль, калиевую соль, кальциевую соль, литиевую соль, соль меглума, гидрохлоридную соль, гидробромидную соль, йодогидратную соль, нитратную соль, сульфат, гидросульфат, фосфат, гидрофосфат, ацетат, пропионат, бутират, оксалат, пивалат, адипат, альгинат, лактат, цитрат, тартрат, сукцинат, малеат, фумарат, пикрат, аспарат, глюконат, бензоат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, р-толуолсульфонат, эмбонат и т.д.

Соединение, представленное формулой I, может ингибировать репликацию вируса SARS-CoV-2 в клетках и снижать нагрузку нуклеиновыми кислотами вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток.

После творческого поиска авторы настоящего изобретения открыли новые признаки соединения, представленного формулой I, в клетках: соединение, представленное формулой I, может снижать нагрузку вирусными нуклеиновыми кислотами в клетках, инфицированных SARS-CoV-2, на микромолярном уровне концентрации.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или инфекции (например, заболевания дыхательных путей (например, простой инфекции (такой как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонии, острой респираторной инфекции, тяжелой острой респираторной инфекции (SARI), гипоксической дыхательной недостаточности и острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса и септического шока и т.д.)), вызванных SARS-CoV-2,



I

Настоящее изобретение также относится к применению соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в производстве лекарственного средства в качестве ингибитора SARS-CoV-2.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в производстве лекарственного средства для ингибирования репликации или репродукции SARS-CoV-2 в клетке (например, клетке млекопитающего).

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В частности, фармацевтическая композиция представляет собой твердый препарат, инъекционный препарат, препарат для наружного использования, спрей, жидкий препарат или экстенпоральный препарат.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит эффективное количество соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата.

Настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, или соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в производстве лекарственного средства для лечения заболевания дыхательных путей, включая, в качестве неограничивающих примеров, простую инфекцию (такую как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонию, острую респираторную инфекцию, тяжелую острую респираторную инфекцию (SARI), гипоксическую дыхательную недостаточность, острый респираторный дистресс-синдром, сепсис и септический шок и т.д.).

Настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции, содержа-

шей соединение, представленное формулой I, геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (например, заболевания дыхательных путей (например, простой инфекции (такой как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонии, острой респираторной инфекции, тяжелой острой респираторной инфекции (SARI), гипоксической дыхательной недостаточности, острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса и септического шока и т.д.).

Настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, в производстве лекарственного средства в качестве ингибитора SARS-CoV-2.

Настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, в производстве лекарственного средства для ингибирования репликации или репродукции SARS-CoV-2 в клетке (такой как клетка млекопитающего).

Настоящее изобретение также относится к способу лечения и/или профилактики заболевания у нуждающегося в этом млекопитающего или способу ингибирования репликации или репродукции SARS-CoV-2 у нуждающегося в этом млекопитающего, включающему введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически и/или профилактически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, или соединения, представленного формулой I, геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата, где заболевание включает заболевание, вызванное SARS-CoV-2, таким как вирусное инфекционное заболевание, вызванное SARS-CoV-2 (например, заболевания дыхательных путей, включая простую инфекцию (такую как лихорадка, кашель, боль в горле и т.д.), пневмонию, острую респираторную инфекцию, тяжелую острую респираторную инфекцию (SARI), гипоксическую дыхательную недостаточность и острый респираторный дистресс-синдром, сепсис и септический шок и т.д.).

Настоящее изобретение также относится к соединению, представленному формулой I, его геометрическому изомеру, фармацевтически приемлемой соли, сольвату и/или гидрату для применения в лечении заболевания или инфекции (например, заболевания дыхательных путей (например, простой инфекции (такой как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонии, острой респираторной инфекции, тяжелой острой респираторной инфекции (SARI), гипоксической дыхательной недостаточности, острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса, септического шока и т.д.)), вызванной SARS-CoV-2.

Настоящее изобретение также относится к соединению, представленному формулой I, его геометрическому изомеру, фармацевтически приемлемой соли, сольвату и/или гидрату для применения в качестве ингибитора SARS-CoV-2.

Настоящее изобретение также относится к соединению, представленному формулой I, его геометрическому изомеру, фармацевтически приемлемой соли, сольвату и/или гидрату для применения в ингибировании репликации или репродукции SARS-CoV-2 в клетке (например, клетке млекопитающего).

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат для применения в лечении заболевания или инфекции (например, заболевания дыхательных путей (например, простой инфекции (такой как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонии, острой респираторной инфекции, тяжелой острой респираторной инфекции (SARI), гипоксической дыхательной недостаточности и острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса и септического шока и т.д.)), вызванной SARS-CoV-2.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, для применения в качестве ингибитора SARS-CoV-2.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, для применения в ингибировании репликации или репродукции SARS-CoV-2 в клетке (например, клетке млекопитающего).

Настоящее изобретение также относится к соединению, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в лечении заболевания или инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (например, заболевания дыхательных путей (например, простой инфекции (такой как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонии, острой респираторной инфекции, тяжелой острой респираторной инфекции (SARI), гипоксической дыхательной недостаточности и острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса и септического шока и т.д.)).

Настоящее изобретение также относится к соединению, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в качестве ингибитора SARS-CoV-2.

Настоящее изобретение также относится к соединению, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в ингибировании

нии репликации или репродукции SARS-CoV-2 в клетке (например, клетке млекопитающего).

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству для лечения заболевания или инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (например, заболевания дыхательных путей (например, простой инфекции (такой как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмонии, острой респираторной инфекции, тяжелой острой респираторной инфекции (SARI), гипоксической дыхательной недостаточности и острого респираторного дистресс-синдрома, сепсиса и септического шока и т.д.)), содержащему соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат в качестве активного ингредиента.

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству в качестве ингибитора SARS-CoV-2, содержащему соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат в качестве активного ингредиента.

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству для ингибирования репликации или репродукции SARS-CoV-2 в клетке (например, клетке млекопитающего), содержащему соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат в качестве активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления заболевания, вызванное SARS-CoV-2, описанное в настоящем изобретении, включает, в качестве неограничивающих примеров, заболевание дыхательных путей, такое как простая инфекция (такая как лихорадка, кашель и боль в горле), пневмония, острая респираторная инфекция, тяжелая острая респираторная инфекция (SARI), гипоксическая дыхательная недостаточность и острый респираторный дистресс-синдром, сепсис и септический шок.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении заболевание, вызванное SARS-CoV-2, представленное в настоящем изобретении, является COVID-19.

В настоящем изобретении официальным названием в случае термина "новый коронавирус 2019 года (2019-nCoV)" является коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома-2 (SARS-CoV-2).

В настоящем изобретении официальным названием в случае термина "заболевание, вызванное новым коронавирусом 2019 года (2019-nCoV)" является COVID-19.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении млекопитающее относится к крупному рогатому скоту, лошадиным, козым, свиньям, псовым, кошачьим, грызунам, приматам, где предпочтительным млекопитающим является человек, кошка, собака или свинья.

Фармацевтическую композицию, описанную в настоящем изобретении, можно получать в различных формах в соответствии с разными способами введения.

В настоящем изобретении фармацевтическую композицию можно вводить любым из следующих путей: посредством перорального введения, ингаляции спрея, ректального введения, назального введения, буккального введения, вагинального введения, топического введения, парентерального введения, такого как подкожная, внутривенная, внутримышечная, интраперитонеальная, интратекальная, внутрижелудочковая, интрастеральная и внутричерепная инъекция или инфузия, или введения с помощью эксплантируемого резервуара, где предпочтительным способом введения является пероральное, интраперитонеальное или внутривенное введение.

При пероральном введении соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат можно получать в любой форме перорально приемлемого препарата, включая, в качестве неограничивающих примеров таблетку, капсулу, водный раствор или водную суспензию. Носитель для использования в таблетке, как правило, включает лактозу и кукурузный крахмал, а также можно добавлять смазочное средство, такое как стеарат магния. Дилуент для использования в капсуле, как правило, включает лактозу и сухой кукурузный крахмал. Водную суспензию, как правило, получают посредством смешивания активного ингредиента с подходящим эмульгатором и подходящим суспендирующим средством. При необходимости, в указанные выше формы перорального препарата также можно добавлять подсластитель, ароматизатор или краситель.

При ректальном введении соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, как правило, можно получать в форме суппозитория, получаемого посредством смешивания лекарственного средства с подходящим нераздражающим эксципиентом. Эксципиент находится в твердом состоянии при комнатной температуре, но плавится при температуре прямой кишки, высвобождая лекарственное средство. Такой эксципиент включает масло какао, пчелиный воск и полиэтиленгликоль.

При топическом введении, в частности, для лечения легко доступной пораженной поверхности или органа, такого как глаз, кожа или нижние отделы желудочно-кишечного тракта, посредством топического введения, соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат можно получать в различных формах топических препаратов в соответствии с различными пораженными поверхностями или органами, конкретные инструкции являются следующими:

При топическом введении в глаз соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат можно составлять в такой форме препарата, как микронизированная суспензия или раствор, используемым носителем является изотонический

стерильный физиологический раствор с некоторым рН, и можно добавлять или не добавлять консервант, такой как бензилхлорид алкоксид. Кроме того, в случае введения в глаз соединение также можно получать в форме мази, такой как вазелиновая мазь.

При топическом нанесении на кожу соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемые соли, сольват и/или гидрат можно получать в подходящей форме, такой как мазь, лосьон или крем, в которой активный ингредиент суспендируют или растворяют в одном или более носителях. Носитель для использования в мази включает, в качестве неограничивающих примеров, минеральное масло, вазелиновое масло, белый вазелин, пропиленгликоль, полиэтиленоксид, полипропиленоксид, эмульгирующий воск и воду. Носитель для использования в лосьоне или креме включает, в качестве неограничивающих примеров, минеральное масло, сорбитан моностеарат, Tween-60, воск цетиловых эфиров, гексадециловый ариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

При топическом введении в нижние отделы желудочно-кишечного тракта соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат можно получать в такой форме, как ректальный суппозиторий, как описано выше, или подходящий препарат для введения с помощью клизмы, кроме того, также можно использовать топический трансдермальный пластырь.

Соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер, фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат также можно вводить в форме стерильного препарата для инъекций, включая стерильный инъецируемый водный раствор или масляную суспензию, или стерильных инъецируемых растворов, где используемый носитель и растворитель включает воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспензионной среды также можно использовать стерилизуемое нелетучее масло, такое как моноглицерид или диглицерид.

Лекарственные средства в различных указанных выше формах препаратов можно получать способами, общепринятыми в области фармацевтики.

В настоящем изобретении термин "терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" относится к количеству, являющемуся достаточным для лечения или профилактики заболевания у пациента, но и являющемуся достаточно низким для избегания серьезных побочных эффектов (при разумном соотношении пользы/риска) в пределах разумного медицинского заключения. Терапевтически эффективное количество соединения будет изменяться в зависимости от факторов, таких как конкретное выбранное соединение (например, с учетом эффективности и времени полужизни соединения), выбранный способ введения, заболевание, подвергаемое лечению, тяжесть заболевания, подвергаемого лечению, возраст, размер, масса и физическое состояние пациента, медицинский анамнез, длительность лечения, природа сопутствующей терапии, желаемый терапевтический эффект и т.д., но специалисты в этой области все равно могут определять его общепринятыми способами.

Кроме того, следует отметить, что конкретная доза и способ применения соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в случае разных пациентов зависят от множества факторов, включая возраст, массу, пол, состояние здоровья, питания пациента, активности лекарственного средства, время введения, уровня метаболизма, тяжести заболевания и субъективного мнения лечащего врача. В настоящем изобретении предпочтительно использовать дозу 0,001-1000 мг/кг массы тела/сутки.

#### **Краткое описание чертежей**

На чертеже показано, что ремдесивир может эффективно снижать нагрузку вирусными нуклеиновыми кислотами в клетках VeroE6, инфицированных вирусом SARS-CoV-2. На чертеже (а) показано, что ремдесивир может снижать нагрузку вирусной РНК в клетках через 48 ч после инфицирования клеток вирусом SARS-CoV-2, и концентрация лекарственного средства 33 мкМ может приводить к снижению нагрузки вирусными нуклеиновыми кислотами на порядок величины. По ординате отложено количество копий вирусной РНК в образце, и по абсциссе отложена концентрация лекарственного средства; на чертеже (b) показано, что тестируемые клетки обрабатывали ремдесивиром в тестируемой концентрации в течение 48 ч и не наблюдали цитотоксичности. По ординате отложен процент жизнеспособности клеток относительно контрольной группы, которую обрабатывали носителем (только клетки без добавления лекарственного средства), и по абсциссе отложена концентрация лекарственного средства.

#### **Конкретные модели осуществления настоящего изобретения**

Следующие примеры являются иллюстративными предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения, и они никоим образом не ограничивают настоящее изобретение.

Пример 1. Эксперимент по снижению нагрузки вирусной нуклеиновой кислотой в клетках, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, с помощью ремдесивира.

(1) Обработка инфицированных вирусом клеток лекарственным средством.

Клетки Vero E6 (приобретенные в ATCC, кат. № 1586) помещали в 24-луночный планшет и инкубировали в течение 24 ч, затем осуществляли инфицирование вирусом, в частности, вирус SARS-CoV-2 (2019-nCoV) (штаммом nCoV-2019BetaCoV/Wuhan/WIV04/2019, предоставленным Уханьским институтом вирусологии, Китайская академия наук) разводили 2%-ой поддерживающей клеточной средой (состав: FBS (приобретенная в Gibco, кат. № 16000044) добавляли к MEM (приобретенной в Gibco, кат. №

10370021) в количестве 2% об., таким образом, получая 2%-ую поддерживающую клеточную среду) до соответствующей концентрации, а затем добавляли в 24-луночный планшет таким образом, что каждая лунка имела вирусную нагрузку 100 TCID<sub>50</sub>. Затем ремдесивир (приобретенный в MedChemExpress, кат. № HY-104077) разводили 2%-ой поддерживающей клеточной средой до соответствующих концентраций и добавляли в соответствующие лунки таким образом, что конечные концентрации лекарственного средства составляли 100 мкМ, 33 мкМ, 11 мкМ, 3,7 мкМ, 1,23 мкМ, 0,41 мкМ, 0,14 мкМ, соответственно, затем планшет помещали в инкубатор при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и непрерывно культивировали в течение 48 ч, а в контрольной группе, которую обрабатывали носителем, добавляли только 2%-ую поддерживающую клеточную среду без какого-либо тестируемого лекарственного средства.

#### (2) Выделение РНК.

Набор для выделения РНК приобретали в Qiagen, кат. № 74106. Все из расходных материалов (центрифужных колонок, несодержащих РНКазу пробирок для элюции объемом 2 мл и т.д.) и реагентов (RLT, RW1, RPE, несодержащей РНКазу воды и т.д.), используемых в следующих стадиях выделения РНК, являлись частями набора. Все из следующих стадий выделения рекомендованы в инструкциях к набору.

1) 100 мкл супернатанта отбирали из тестового планшета, добавляли в несодержащую нуклеазу пробирку EP, затем добавляли 350 мкл буфера RLT, смешивали с использованием устройства для переноса жидкостей, чтобы полностью лизировать, и центрифугировали для получения супернатанта;

2) супернатант, полученный на стадии 1), добавляли к равному объему 70% этанола и тщательно смешивали;

3) смешанный раствор, полученный на стадии 2) выше, переносили в несодержащую РНКазу центрифужную колонку, центрифугировали при 12000 об/мин. в течение 15 с и выбрасывали жидкость;

4) 700 мкл буфера RW1 добавляли в центрифужную колонку, затем осуществляли центрифугирование при 12000 об/мин. в течение 15 с для очищения центрифужной колонки и выбрасывали жидкость;

5) 500 мкл буфера RPE добавляли в центрифужную колонку, затем осуществляли центрифугирование при 12000 об/мин. в течение 15 с для очищения центрифужной колонки и выбрасывали жидкость;

6) 500 мкл буфера RPE добавляли в центрифужную колонку, затем осуществляли центрифугирование при 12000 об/мин. в течение 2 мин для очищения центрифужной колонки и выбрасывали жидкость;

7) центрифужную колонку помещали в новую несодержащую РНКазу пробирку для элюции 2 мл, и осуществляли центрифугирование при 12000 об/мин. в течение 1 мин для высушивания центрифужной колонки, а затем всю центрифужную колонку переносили в пробирку для элюции 1,5 мл на стадии 8);

8) центрифужную колонку, высушенную на стадии 7), помещали в новую пробирку для элюции 1,5 мл, добавляли 30 мкл несодержащей РНКазу воды и центрифугировали при 12000 об/мин. в течение 2 мин, полученный элюат содержал соответствующую РНК, в него добавляли ингибитор РНКаз (приобретенный в NEB, кат. № M0314L), и для определения концентрации каждой РНК использовали Nano Drop (приобретенный в Thermo Scientific, Nano Drop One).

#### (3) Обратная транскрипция РНК.

В эксперименте для обратной транскрипции РНК использовали набор для обратной транскрипции (набор реагентов для RT PrimeScript™ с gDNA Eraser, кат. № RR047Q), произведенный TaKaRa Company. Стадии являлись следующими.

1) Удаление геномной ДНК: собирали образцы РНК из каждой экспериментальной группы, отбирали 1 мкг каждого и подвергали обратной транскрипции. Сначала 2 мкл 5-кратного буфера gDNA Eraser Buffer добавляли к образцу РНК из каждой экспериментальной группы, реакционную систему дополняли несодержащей РНКазу водой до 10 мкл, тщательно смешивали и переносили на водяную баню с температурой 42°C на 2 мин для удаления геномной ДНК, которая может находиться в образце;

2) обратная транскрипция: в образец, полученный на стадии 1), добавляли подходящие количества фермента, смеси праймеров и реакционного буфера, дополняли несодержащей РНКазу водой до объема 20 мкл, проводили реакции на водяной бане при 37°C в течение 15 мин, затем помещали на водяную баню с температурой 85°C на 5 с, таким образом, получая кДНК посредством транскрипции.

#### (4) ПНР в реальном времени.

Для определения количества копий на мл исходного раствора вируса использовали флуоресцентную количественную ПЦР.

Реакционную систему смешивали с TB Green Premix (Takara, кат. № RR820A) и осуществляли реакцию амплификации и считывание с использованием устройства для ПЦР в реальном времени StepOne Plus (производитель: ABI). Вычисляли количество копий на мл исходного раствора вируса. Стадии являлись следующими:

1) Получение стандартного продукта: плазмиду pMT-RBD (плазмида предоставлена Уханьским институтом вирусологии, Китайская академия наук) разводили до  $5 \times 10^8$  копий/мкл,  $5 \times 10^7$  копий/мкл,  $5 \times 10^6$  копий/мкл,  $5 \times 10^5$  копий/мкл,  $5 \times 10^4$  копий/мкл,  $5 \times 10^3$  копий/мкл,  $5 \times 10^2$  копий/мкл. Для реакции qPCR использовали 2 мкл стандарта или матрицы кДНК.

2) последовательности праймеров, используемых в эксперименте, являлись следующими (все ука-

заны в 5'-3'-направлении):

RBD-qF: CAATGGTTTAAACAGGCACAGG

RBD-qR: CTC AAGTGTCTGTGGATCACG

3) Реакцию проводили следующим образом: предварительная денатурация: 95°C в течение 5 мин; параметры цикла: 95°C в течение 15 с, 54°C в течение 15 с, 72°C в течение 30 с, всего 40 циклов.

(5) Тест цитотоксичности лекарственного средства.

Определение цитотоксичности лекарственного средства осуществляли с помощью набора ССК-8 (Beoytime). Стадии являлись следующими:

1)  $1 \times 10^4$  клеток Vero E6 (ATCC) помещали в 96-луночный планшет и инкубировали при 37°C в течение 8 ч;

2) лекарственное средство разводили DMSO до подходящей концентрации маточного раствора, а затем разводили средой MEM (приобретенной в Gibco, кат. № 10370021), содержащей 2% FBS (приобретенной в Gibco, кат. № 16000044), до той же концентрации, что и в случае обработки лекарственным средством. Исходную среду в 96-луночном планшете выбрасывали, к клеткам добавляли 100 мкл содержащей лекарственное средство среды MEM и подготавливали три параллельные лунки для каждой концентрации. Использовали контрольный носитель (DMSO и среду добавляли в лунки с клетками без добавления лекарственного средства) и пустую контрольную пробу (DMSO и среду добавляли в лунки без клеток). После добавления лекарственного средства клетки культивировали при 37°C в течение 48 ч;

3) в лунку, подлежащую тестированию, добавляли 20 мкл раствора ССК-8 (Beoytime), осторожно смешивали, не допуская образования пузырьков, и непрерывно инкубировали при 37°C в течение 2 ч.  $OD_{450}$  считывали с помощью спектрофотометра для чтения микропланшетов (приобретенного в Molecular Devices, модель: SpectraMax M5) и вычисляли жизнеспособность клеток:

Активность клеток (%)  $(A_{\text{группа обработки лекарственным средством}} - A_{\text{пустая контрольная проба}}) / (A_{\text{контрольный носитель}} - A_{\text{пустая контрольная проба}}) \times 100\%$ ,

где A представляет собой результаты считывания с помощью спектрофотометр для чтения микропланшетов.

(6) Результаты экспериментов.

Результаты эксперимента по ингибированию пролиферации вируса показали, что тестируемое соединение в концентрациях 100 мкМ, 33 мкМ, 11,1 мкМ и 3,7 мкМ могло эффективно ингибировать репликацию генома вируса SARS-CoV-2 в инфицированном супернатанте (табл. 1 и чертеж).

Таблица 1

Тестирование противовирусной активности тестируемого соединения (ремдесивира) in vitro

Концентрация (мкМ)	100	33,33	11,11	3,70	1,23	0,41	0,14	Носитель
Количество копий генома вируса	901044 4,5±22 82239,0 2	124297 32±181 2581,22	163085 16,5±1 475181, 58	202875 12,5±1 308425 1,56	879273 650,5± 189609 425,32	175186 3138,5 ±11150 69812,4 6	612082 0311,5 ±28867 28551,1 3	510815 026±18 051841 4,22

Результаты теста цитотоксичности показали, что обработка тестируемым соединением (ремдесивиром) не изменяла жизнеспособность клеток при всех тестируемых концентрациях, т.е. тестируемое соединение не имело токсического эффекта в отношении клеток при всех концентрациях (табл. 2 и чертеж).

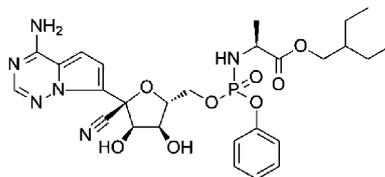
Таблица 2

Результаты теста цитотоксичности тестируемого соединения (ремдесивира)

Концентрация (мкМ)	100	33,33	11,11	3,70	1,23	0,41	0,14	Носитель
Жизнеспособность клеток (% от контрольного носителя)	97,70± 0,76	99,06± 0,41	97,05± 1,12	97,40± 0,41	97,88± 1,12	100,76 ±1,17	100,97 ±2,61	100,19 ±2,62

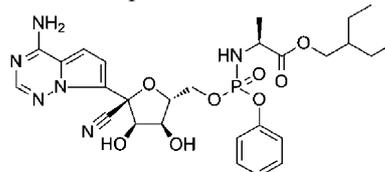
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в лечении заболевания или инфекции, вызванной SARS-CoV-2,



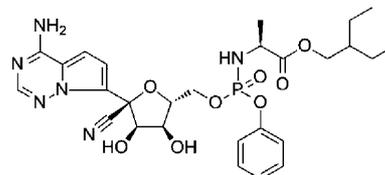
I.

2. Применение соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в качестве ингибитора SARS-CoV-2,



I.

3. Применение соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата в ингибировании репликации или репродукции SARS-CoV-2 в клетке млекопитающего,



I.

4. Применение по п.1, где заболевание, вызванное SARS-CoV-2, является COVID-19.

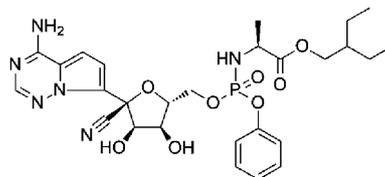
5. Применение по п.3, где млекопитающее относится к крупному рогатому скоту, лошадиным, козым, свиньям, псовым, кошачьим, грызунам или приматам, например, является человеком, кошкой, собакой или свиньей.

6. Применение по п.1, где заболевание, вызванное SARS-CoV-2, является заболеванием дыхательных путей.

7. Применение по п.1, где заболевание, вызванное SARS-CoV-2, является простой инфекцией, пневмонией, острой инфекцией дыхательных путей, тяжелой острой респираторной инфекцией (SARI), гипоксической дыхательной недостаточностью, острым респираторным дистресс-синдромом, сепсисом или септическим шоком.

8. Применение по п.7, где простая инфекция представляет собой лихорадку, кашель и/или боль в горле.

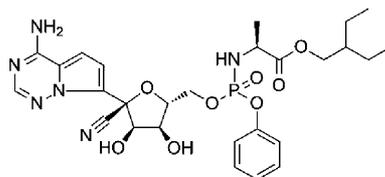
9. Способ лечения и/или профилактики заболевания у нуждающегося в этом млекопитающего, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически и/или профилактически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер или фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, или соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата,



I.

где заболевание включает заболевание, вызванное SARS-CoV-2.

10. Способ ингибирования репликации или репродукции SARS-CoV-2 у нуждающегося в этом млекопитающего, включающий введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически и/или профилактически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение, представленное формулой I, его геометрический изомер или фармацевтически приемлемую соль, сольват и/или гидрат, или соединения, представленного формулой I, его геометрического изомера, фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или гидрата,



I.

11. Способ по п.9, где заболевание, вызванное SARS-CoV-2, является вирусным инфекционным заболеванием, вызванным SARS-CoV-2.

12. Способ по п.9, где заболевание, вызванное SARS-CoV-2, является заболеванием дыхательных путей.

13. Способ по п.9, где заболевание, вызванное SARS-CoV-2, является простой инфекцией, пневмонией, острой респираторной инфекцией, тяжелой острой респираторной инфекцией (SARI), гипоксической дыхательной недостаточности, острым респираторным дистресс-синдромом, сепсисом или септическим шоком.

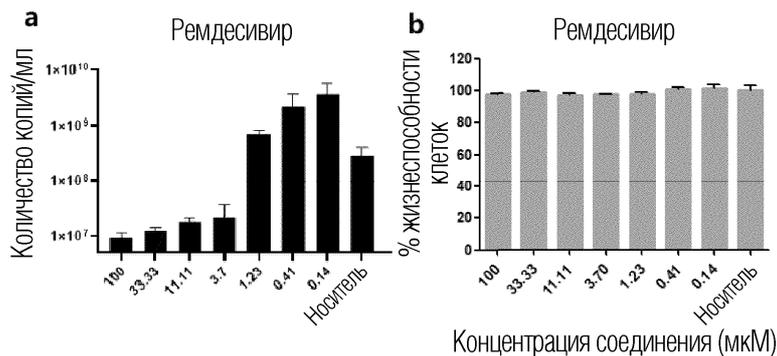
14. Способ по п.13, где простая инфекция представляет собой лихорадку, кашель и/или боль в горле.

15. Способ по любому из пп.9-14, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

16. Способ по п.15, где фармацевтическая композиция представляет собой твердый препарат, инъекционный препарат, препарат для наружного использования, спрей, жидкий препарат или экстенпальный препарат.

17. Способ по п.9, где заболевание, вызванное SARS-CoV-2, является COVID-19.

18. Способ по п.9 или 10, где млекопитающее включает крупный рогатый скот, лошадиных, козых, свиней, псовых, кошачьих, грызуна, примата, например, является человеком, кошкой, собакой или свиньей.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2