

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 047125

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2024.06.05

(21) Номер заявки

202191073

(22) Дата подачи заявки

2016.09.16

(51) Int. Cl. A61K 31/53 (2006.01)

A61K 31/664 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61K 31/683 (2006.01)

A61K 31/685 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ CORONAVIRIDAE

(31) 62/219,302; 62/239,696

(32) 2015.09.16; 2015.10.09

(33) US

(43) 2021.08.31

(62) 201890494; 2016.09.16

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ДЖИЛИД САЙЭНС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Кларк Майкл О'Нил Ханрахан, Фэн

Джой Ян, Джордан Роберт, Макман

Ричард Л., Рэй Эдриан С., Сигель

Дастин (US)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(56) AESOP CHO et al.: "Synthesis and antiviral activity of a series of 1'-substituted 4-aza-7,9-dideazaadenosine C-nucleosides", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, 2012, vol. 22, no. 8, pages 2705-2707, doi:10.1016/j.bmcl.2012.02.105, табл. 1, соединения 3a-3d, 8a-8d, 9a-9d

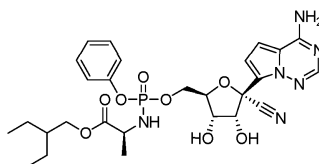
WO-A2-2010002877

US-A1-2012071434

WO-A2-2014078778

WO-A1-2014116755

(57) В изобретении предложен способ лечения инфекции Coronaviridae путем введения соединения формулы



или его фармацевтически приемлемой соли. Предложенный способ, в частности, пригоден для применения при лечении инфекций Coronaviridae, вызванных вирусом Coronaviridae, выбранным из SARS, MERS, 229E, NL63, OC43 и HKU1.

B1

047125

047125

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая патентная заявка испрашивает приоритет в соответствии с §119(e) раздела 35 Свода Законов США (U.S.C.) на основании предварительной заявки на патент США № 62/219302, поданной 16 сентября 2015 г., и предварительной заявки на патент США № 62/239696, поданной 9 октября 2015 г. Содержание указанных заявок полностью включено в настоящее описание посредством ссылок.

Область техники

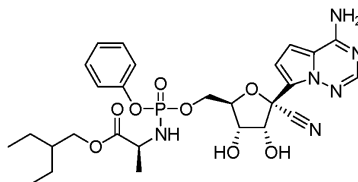
Настоящее изобретение в целом относится к способу лечения вирусных инфекций Coronaviridae, в частности способу лечения вируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) и вируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS).

Уровень техники

Коронавирусы человека, впервые выявленные в середине 1960-х гг., являются распространенными вирусами, которые заражают большинство людей в определенный момент их жизни, обычно вызывая заболевания верхних дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта от легкой до умеренной степени тяжести. Новый коронавирус, называемый "коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома" (MERS-CoV или MERS), впервые был описан в Саудовской Аравии в 2012 г. и распространился на несколько других стран. SARS-CoV, коронавирус, ответственный за тяжелый острый респираторный синдром (SARS), впервые был обнаружен в Китае в 2002 г. и привел к вспышке заболевания по всему миру в 2002 и 2003 гг.

Краткое описание изобретения

Предложен способ лечения инфекции Coronaviridae у человека, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения



или его фармацевтически приемлемой соли.

В варианте реализации способ включает лечение инфекции Coronaviridae, вызванной вирусом Coronaviridae. В другом варианте реализации способ включает лечение инфекции Coronaviridae, вызванной вирусом Coronaviridae, выбранным из SARS, MERS, 229E, NL63, OC43 и HKU1.

В другом варианте реализации способ лечения инфекции Coronaviridae у человека, нуждающегося в этом, включает введение терапевтически эффективного количества указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом.

В другом варианте реализации способ лечения инфекции Coronaviridae у человека, нуждающегося в этом, включает введение терапевтически эффективного количества указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с терапевтически эффективным количеством по меньшей мере одного другого терапевтического агента или его композиции, выбранного из группы, состоящей из кортикостероида, противовоспалительного модулятора передачи сигнала, бронходилататора - агониста β 2-адренорецептора, антихолинергетика, муколитического агента, гипертонического солевого раствора и других лекарственных средств для лечения инфекции, вызванной вирусом Coronaviridae, или их смесей.

Описание чертежей

Фиг. 1 - изменения массы тела после инфицирования у получавших носитель и соединение 32 мышей;

фиг. 2А и 2В - вирусная нагрузка в ткани легкого на 2 и 5 дни после инфицирования у получавших носитель и соединение 32 мышей;

фиг. 3А-Ф - плетизмография всего тела мышей, инфицированных SARS-CoV;

фиг. 4А - изменения массы тела после инфицирования у получавшей носитель и соединение 32 обезьяны;

фиг. 4В - изменения температуры тела после инфицирования у получавшей носитель и соединение 32 обезьяны;

фиг. 4С - изменения частоты дыхания после инфицирования у получавшей носитель и соединение 32 обезьяны;

фиг. 5 - концентрации вирусной РНК в тканях в соответствии с группой лечения. Вирусную нагрузку измеряли с помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (qRT-PCR).

Подробное описание изобретения

I. Определения

Если не указано иное, предполагается, что следующие термины и фразы в контексте настоящего описания имеют следующие значения:

Когда в настоящем описании используются товарные знаки, заявителями подразумевается, что такие указания независимо включают продукт, соответствующий товарному знаку, и активный фармацевтический ингредиент (ингредиенты) продукта, соответствующего товарному знаку.

В контексте настоящего описания "соединение согласно настоящему изобретению" означает указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль. Аналогичным образом, в отношении выделяемых промежуточных соединений, фраза "соединение формулы (номер)" означает соединение указанной формулы и его фармацевтически приемлемые соли.

Термин "хиральный" относится к молекулам, которые не совпадают с зеркальным отражением при наложении, в то время как термин "ахиральный" относится к молекулам, которые можно наложить на их зеркальное отражение.

Термин "стереоизомеры" относится к соединениям, которые имеют одинаковое химическое строение, но отличаются друг от друга по расположению атомов или групп в пространстве.

"Диастереомер" относится к стереоизомеру с двумя или более центрами хиральности, и при этом молекулы-диастереомеры не являются зеркальными отражениями друг друга. Диастереомеры обладают различными физическими свойствами, например температурами плавления, температурами кипения, спектральными свойствами, реакционной способностью и биологическими свойствами. Все такие диастереомеры и способы их применения, описанные в настоящей заявке, охватываются настоящим изобретением. Смеси диастереомеров можно разделить с помощью аналитических методик высокого разрешения, таких как электрофорез, кристаллизация и/или хроматография. Диастереомеры могут обладать различными физическими характеристиками, такими как, но не ограничиваясь ими, растворимость, химическая стабильность и кристалличность, а также могут обладать различными биологическими свойствами, такими как, но не ограничиваясь ими, устойчивость к воздействию ферментов, всасываемость и метаболическая стабильность.

Термин "энантиомеры" относится к двум стереоизомерам соединения, которые представляют собой зеркальные отражения друг друга, не совпадающие при наложении.

Модификатор "примерно", применяемый по отношению к количеству, включает указанную величину и имеет значение согласно контексту (например, включает долю ошибки, связанную с измерением конкретного количества).

Если не указано иное, термин "лечение" в контексте настоящего описания означает вызывание регресса, облегчение, подавление прогресса или предотвращение нарушения или патологического состояния, к которому применяется указанный термин, или одного или более симптомов такого нарушения или патологического состояния. Термин "проведение лечения" в контексте настоящего описания относится к процессу "лечения", который определен непосредственно перед указанным определением.

Термин "терапевтически эффективное количество" в контексте настоящего описания представляет собой количество соединения согласно настоящему изобретению, присутствующего в композиции, описанной в настоящей заявке, которое требуется для обеспечения содержания лекарственного средства в выделениях и тканях дыхательных путей и легких или в качестве альтернативы в кровотоке субъекта, подлежащего лечению, необходимого для получения ожидаемой физиологической реакции или желаемого биологического эффекта в случае, когда такую композицию вводят выбранным способом. Точное количество будет зависеть от множества факторов, например соединения, конкретной активности композиции, применяемого устройства для доставки, физических характеристик композиции, ее предполагаемого применения, а также соображений, связанных с пациентом, таких как состояние тяжести заболевания, контакт с пациентом и т.д., и может быть легко определено специалистом в данной области техники на основе информации, предоставленной в настоящей заявке.

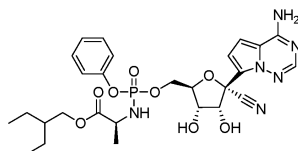
Термин "гипертонический солевой раствор" означает водный раствор, содержащий более 0,9% (мас./об.) NaCl. Например, 3% гипертонический солевой раствор будет содержать 3% (мас./об.) NaCl.

"Получение реакционной смеси" относится к процессу приведения в контакт по меньшей мере двух различных соединений таким образом, что они смешиваются и могут вступать в реакцию. Однако следует понимать, что получаемый продукт реакции можно получить непосредственно в результате реакции между добавленными реагентами или из промежуточного соединения, которое может быть получено в реакционной смеси из одного или более добавленных реагентов.

II. Способ согласно настоящему изобретению

Теперь будет сделана подробная ссылка на некоторые варианты реализации настоящего изобретения, примеры которых проиллюстрированы в сопроводительном описании, структурах и формулах. Хотя настоящее изобретение будет описано в сочетании с перечисленными вариантами реализации, следует понимать, что они не предназначены для ограничения настоящего изобретения этими вариантами реализации. Напротив, подразумевается, что настоящее изобретение охватывает все варианты, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в объем настоящего изобретения.

Предложен способ лечения инфекции *Coronaviridae* у человека, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения

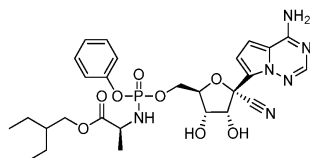


или его фармацевтически приемлемой соли.

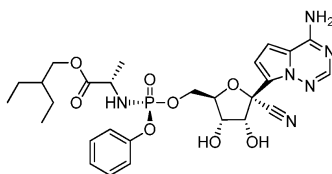
В другом варианте реализации способа лечения инфекции Coronaviridae, включающего введение указанного соединения, инфекция Coronaviridae вызвана вирусом Coronaviridae. В другом аспекте этого варианта реализации вирус Coronaviridae представляет собой вирус MERS или вирус SARS. В другом аспекте этого варианта реализации вирус Coronaviridae представляет собой вирус MERS. В другом аспекте этого варианта реализации вирус Coronaviridae представляет собой вирус SARS. В другом аспекте этого варианта реализации вирус Coronaviridae вызван вирусом MERS, вызванным штаммом, выбранным из известных штаммов.

Способ лечения в настоящем описании включает способ лечения коронавирусных инфекций у человека, включая инфекции, вызванные альфа-коронавирусами 229E (HCoV-229E) и NL63 (HCoV-NL63, коронавирус New Haven), бета-коронавирусами OC43 (HCoV-OC43), HKU1, SARS-CoV (коронавирус, ответственный за тяжелый острый респираторный синдром, или SARS) и MERS-CoV (коронавирус, ответственный за ближневосточный респираторный синдром), ранее известный как новый коронавирус 2012 и HCoV-EMC.

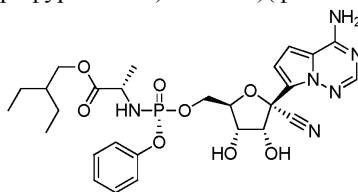
Названия соединений согласно настоящему описанию определены с использованием программного обеспечения для генерирования названий химических соединений ACD/Name (Advanced Chemistry Development, Inc., Торонто, Канада). Другие соединения или радикалы могут быть названы с использованием тривиальных названий или систематических или несистематических наименований. Соединение согласно настоящему изобретению



называется (2S)-2-этилбутила 2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[1,2-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксил)фосфорил(амино)пропаноат. Другое соединение согласно настоящему описанию включает



которое называется (S)-2-этилбутила 2-(((S)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксил)фосфорил(амино)пропаноат и



которое называется (S)-2-этилбутила 2-(((R)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксил)фосфорил(амино)пропаноат.

Любая ссылка на соединение согласно настоящему изобретению, описанное в настоящем описании, также включает ссылку на его физиологически приемлемую соль. Примеры физиологически приемлемых солей соединения согласно настоящему изобретению включают соли - производные подходящего основания, такого как щелочной металл или щелочно-земельный металл (например, Na^+ , Li^+ , K^+ , Ca^{+2} и Mg^{+2}), аммоний и NR_4^+ (где R определен в настоящем описании). Физиологически приемлемые соли атома азота или аминогруппы включают (а) кислотные-аддитивные соли, образованные неорганическими кислотами, например, соляной кислотой, бромистоводородной кислотой, серной кислотой, сульфаминовыми кислотами, фосфорной кислотой, азотной кислотой и тому подобным; (б) соли, образованные органическими кислотами, такими как, например, уксусная кислота, щавелевая кислота, винная кислота, янтарная кислота, малеиновая кислота, фумаровая кислота, глюконовая кислота, лимонная кислота, яблочная кислота, аскорбиновая кислота, бензойная кислота, изэтионовая кислота, лактобионовая кислота, дубильная кислота, пальмитиновая кислота, альгиновая кислота, полиглутаминовая кислота, нафталенсульфоновая кислота, метансульфоновая кислота, п-толуолсульфоновая кислота, бензолсульфоновая ки-

слота, нафталиндисульфоновая кислота, полигалактуроновая кислота, малоновая кислота, сульфосалициловая кислота, гликолевая кислота, 2-гидрокси-3-нафтоат, памоат, салициловая кислота, стеариновая кислота, фталевая кислота, миндальная кислота, молочная кислота, этансульфоновая кислота, лизин, аргинин, глутаминовая кислота, глицин, серин, треонин, аланин, изолейцин, лейцин и тому подобное; и (с) соли, образованные элементарными анионами, например, хлором, бромом и иодом. Физиологически приемлемые соли соединения, образованные по гидроксильной группе, содержат анион указанного соединения в комбинации с подходящим катионом, таким как Na^+ и NR_4^+ .

Соединение согласно настоящему изобретению и его фармацевтически приемлемые соли могут существовать в виде различных полиморфов или псевдополиморфов. В контексте настоящего описания кристаллический полиморфизм означает способность кристаллического соединения существовать в различных кристаллических структурах. Кристаллический полиморфизм может быть результатом различий в упаковке в кристаллах (упаковочный полиморфизм) или различий в упаковке между различными конформерами одной молекулы (конформационный полиморфизм). В контексте настоящего описания кристаллический псевдополиморфизм означает способность гидрата или сольвата соединения существовать в различных кристаллических структурах. Псевдополиморфы согласно настоящему изобретению могут существовать вследствие различий в упаковке в кристаллах (упаковочный псевдополиморфизм) или вследствие различий в упаковке между различными конформерами одной молекулы (конформационный псевдополиморфизм). Настоящее изобретение включает все полиморфы и псевдополиморфы соединения согласно настоящему изобретению и его фармацевтически приемлемых солей.

Соединение согласно настоящему изобретению и его фармацевтически приемлемые соли также могут существовать в виде аморфного твердого вещества. В контексте настоящего описания аморфное твердое вещество представляет собой твердое вещество, в котором не существует дальнего порядка положения атомов в твердом веществе. Это определение также применимо, когда размер кристалла составляет два нанометра или менее. Для получения аморфных форм согласно настоящему изобретению могут быть применены добавки, включая растворители. Настоящее изобретение включает все аморфные формы соединения согласно настоящему изобретению и его фармацевтически приемлемых солей.

Для терапевтического применения соли активных ингредиентов соединения согласно настоящему изобретению будут физиологически приемлемыми, то есть они будут представлять собой соли, полученные из физиологически приемлемых кислоты или основания. Однако соли кислот или оснований, которые не являются физиологически приемлемыми, также могут найти применение, например, в получении или очистке физиологически приемлемого соединения. Все соли, независимо от того, получены ли они из физиологически приемлемых кислоты или основания, входят в объем настоящего изобретения.

Наконец, следует понимать, что композиции в настоящем описании включают соединение согласно настоящему изобретению как в его неионизированной, так и цвиттерионной форме, и комбинации со стехиометрическими количествами воды, как в гидратах.

Следует отметить, что все энантиомеры, диастереомеры и рацемические смеси, таутомеры, полиморфы, псевдополиморфы соединения согласно настоящему изобретению и его фармацевтически приемлемых солей охватываются настоящим изобретением. Все смеси таких энантиомеров и диастереомеров входят в объем настоящего изобретения.

Соединение согласно настоящему изобретению может иметь хиральные центры, например, хиральные атомы углерода или фосфора. Таким образом, соединение согласно настоящему изобретению включает рацемические смеси всех стереоизомеров, включая энантиомеры, диастереомеры и атропоизомеры. Помимо этого соединение согласно настоящему изобретению включает обогащенные или разделенные оптические изомеры при любом или при всех асимметрических хиральных атомах. Другими словами, хиральные центры, видимые на изображениях, представлены в виде хиральных изомеров или рацемических смесей. Все рацемические и диастереомерные смеси, а также отдельные оптические изомеры, выделенные или синтезированные, по существу свободные от их энантиомерных или диастереомерных партнеров, входят в объем настоящего изобретения. Рацемические смеси разделяют на их отдельные, по существу оптически чистые изомеры с помощью хорошо известных методик, таких как, например, разделение диастереомерных солей, образованных с оптически активными вспомогательными веществами, например, кислотами или основаниями, с последующим превращением обратно в оптически активные вещества. В большинстве случаев желаемый оптический изомер синтезируют с помощью стереоспецифических реакций, начиная с соответствующего стереоизомера желаемого исходного вещества.

Стереохимические определения и условные обозначения, используемые в настоящем описании, в целом следуют из источников S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; и Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Многие органические соединения существуют в оптически активных формах, то есть они обладают способностью вращать плоскость плоскополяризованного света. При описании оптически активного соединения префиксы D и L или R и S используют для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно ее хирального центра (центров). Префиксы d и l, D и L или (+) и (-) используют для обозначения знака поворота плоскополяризованного света соединением, причем S, (-) или l означает, что соединение является левовращающим, тогда как соединение с префиксом R, (+)

или d является правовращающим. Для данной химической структуры эти стереоизомеры идентичны за исключением того, что они являются зеркальными отображениями друг друга. Конкретный стереоизомер также может быть назван энантиомером, а смесь таких изомеров часто называют энантиомерной смесью. Смесь энантиомеров 50:50 называется рацемической смесью или рацематом, который может образовываться при отсутствии стереоселекции или стереоспецифичности в химической реакции или процессе. Термины "рацемическая смесь" и "рацемат" относятся к эквимолярной смеси двух энантиомерных частиц, лишенной оптической активности.

В некоторых случаях соединение согласно настоящему изобретению также может существовать в виде таутомерных изомеров. Хотя может быть изображена только одна делокализованная резонансная структура, все такие формы рассматриваются в пределах объема настоящего изобретения. Например, таутомеры енаминов могут существовать для систем пурина, пиримидина, имидазола, гуанидина, амидина и тетразола, и все их возможные таутомерные формы входят в объем настоящего изобретения.

Любая формула или структура, приведенная в настоящем описании, включая соединения согласно настоящему изобретению, так же предназначена для обозначения немеченных форм, как и изотопно меченных форм указанных соединений. Изотопно меченные соединения имеют структуры, изображенные формулами, приведенными в настоящем описании, за исключением того, что один или более атомов заменены атомом, имеющим выбранную атомную массу или массовое число. Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединение согласно настоящему описанию, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора и хлора, такие как, но не ограничиваясь ими, ^2H (дейтерий, D), ^3H (тритий), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl и ^{125}I . Включены различные изотопно меченные соединения согласно настоящему описанию, например, те, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как ^3H , ^{13}C и ^{14}C . Такие изотопно меченные соединения могут быть пригодны для применения в метаболических исследованиях, исследованиях кинетики реакций, методиках обнаружения или визуализации, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), включая анализ распределения лекарственного средства или субстрата в тканях, или в радиоактивном лечении пациентов.

В настоящее описание также включено соединение согласно настоящему изобретению, в котором от 1 до n атомов водорода, присоединенных к атому углерода, заменены на дейтерий, где n равно числу атомов водорода в молекуле. Такие соединения проявляют повышенную устойчивость к метаболизму и таким образом являются пригодными для применения для увеличения периода полувыведения соединения согласно настоящему изобретению при введении млекопитающему, в частности человеку. См., например, Foster, "Deuterium Isotope Effects in Studies of Drug Metabolism", Trends Pharmacol. Sci. 5(12):524-527 (1984). Такие соединения синтезируют способами, хорошо известными в данной области техники, например, с использованием исходных веществ, в которых один или более атомов водорода заменены на дейтерий.

Меченные или замещенные дейтерием терапевтические соединения согласно настоящему описанию могут иметь улучшенные свойства ДМРК (метаболизма и фармакокинетики лекарственных средств), относящиеся к распределению, метаболизму и выведению (ADME). Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, может давать определенные терапевтические преимущества вследствие большей метаболической стабильности, например, увеличенного периода полувыведения *in vivo*, снижения необходимой дозы и/или улучшения терапевтического индекса. Соединение, меченное ^{18}F , может быть пригодно для применения для исследований ПЭТ или ОФЭКТ. Изотопно меченные соединения согласно настоящему описанию и их пролекарства обычно могут быть получены путем выполнения методик, раскрытых в схемах или примерах и способах получения, описанных ниже, с заменой изотопно меченного реагента на легкодоступный изотопно меченный реагент. Понятно, что дейтерий в этом контексте рассматривают в качестве заместителя в соединении согласно настоящему изобретению.

Концентрация такого более тяжелого изотопа, в частности дейтерия, может быть определена с помощью фактора изотопного обогащения. В соединении согласно настоящему описанию любой атом, специально не обозначенный как конкретный изотоп, предназначен для обозначения любого стабильного изотопа этого атома. Если не указано иное, когда положение специально обозначено как "H" или "водород", считается, что указанное положение содержит водород в его природном изотопном составе. Соответственно, в соединении согласно настоящему описанию любой атом, специально обозначенный как дейтерий (D), предназначен для обозначения дейтерия.

Соединение согласно настоящему изобретению может быть получено способами, известными специалисту в данной области техники. Например, соединение согласно настоящему изобретению может быть получено в соответствии со способами, описанными в патенте США № 8008264 и публикации заявки США № US 2012/0027752.

A. Метаболиты соединения согласно настоящему изобретению

Также в объем настоящего изобретения входят продукты метаболизма *in vivo* соединения, описанного в настоящем описании, в той степени, в которой такие продукты являются новыми и неочевидными по сравнению с предшествующим уровнем техники. Такие продукты могут образовываться, например, путем окисления, восстановления, гидролиза, амидирования, этерификации и тому подобного вводимого

соединения, в основном вследствие ферментативных процессов. Соответственно, настоящее изобретение включает новые и неочевидные соединения, полученные способом, включающим приведение соединения согласно настоящему изобретению в контакт с млекопитающим в течение периода времени, достаточного для образования продукта его метаболизма. Такие продукты как правило идентифицируют путем получения радиоактивно меченного (например, ^{14}C или ^3H) соединения согласно настоящему изобретению, его парентерального введения в обнаруживаемой дозе (например, более чем примерно 0,5 мг/кг) животному, такому как крыса, мышь, морская свинка, обезьяна, или человеку, оставляя на достаточное для осуществления метаболизма время (как правило, от примерно 30 с до 30 ч), и выделения продуктов его трансформации из мочи, крови или других биологических образцов. Эти продукты легко поддаются выделению, поскольку они являются мечеными (другие продукты изолируют с применением антител, способных связывать эпитопы, сохраняющиеся в метаболите). Структуры метаболитов определяют обычным способом, например, с помощью анализа МС или ЯМР. В целом, анализ метаболитов проводят так же, как обычные исследования метаболизма лекарственного средства, хорошо известные специалистам в данной области техники. Продукты трансформации, при условии, что они не обнаруживаются *in vivo* в других случаях, пригодны для применения в диагностических исследованиях для терапевтического введения соединения согласно настоящему изобретению.

Известны средства и способы определения стабильности соединений в суррогатных секретах желудочно-кишечного тракта. Соединения определены в настоящем описании как стабильные в желудочно-кишечном тракте, если менее чем примерно 50 мол.% защищенных групп теряют защиту в суррогатном кишечном или желудочном соке при инкубировании в течение 1 ч при 37°C. Тот факт, что соединения стабильны в желудочно-кишечном тракте, не означает, что они не могут быть гидролизованы *in vivo*. Пролекарства согласно настоящему изобретению как правило будут стабильны в пищеварительной системе, но могут быть по существу гидролизованы до исходного лекарственного средства в просвете пищеварительного тракта, печени или другом органе метаболизма или внутри клеток в целом.

III. Фармацевтические составы

Соединение согласно настоящему изобретению получают с обычными носителями и вспомогательными веществами, которые будут выбраны в соответствии с обычной практикой. Таблетки будут содержать вспомогательные вещества, глиданты, наполнители, связующие вещества и тому подобное. Водные составы получают в стерильной форме, и когда они предназначены для доставки путем, отличным от перорального, обычно они будут изотоническими. Все составы будут необязательно содержать вспомогательные вещества, такие как те, которые приведены в "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (1986). Вспомогательные вещества включают аскорбиновую кислоту и другие антиоксиданты, хелатирующие агенты, такие как ЭДТА, углеводы, такие как декстран, гидроксилалкилцеллюлоза, гидроксилалкилметилцеллюлоза, стеариновая кислота и тому подобное. pH составов составляет от примерно 3 до примерно 11, но как правило составляет от примерно 7 до 10. В некоторых вариантах реализации pH составов составляет от примерно 2 до примерно 5, но как правило составляет от примерно 3 до 4.

Хотя активные ингредиенты можно вводить отдельно, может быть предпочтительным представлять их в виде фармацевтических составов. Составы согласно настоящему изобретению для применения как в ветеринарии, так и для человека, содержат по меньшей мере один активный ингредиент, как определено выше, совместно с одним или более его приемлемыми носителями и необязательно другими терапевтическими ингредиентами, в частности с теми дополнительными терапевтическими ингредиентами, которые обсуждаются в настоящем описании. Носитель (носители) должен быть "приемлемым" в отношении совместимости с другими ингредиентами состава и физиологически безопасным для его реципиента.

Указанные составы включают составы, подходящие для вышеуказанных путей введения. В целях удобства составы могут быть представлены в единичной лекарственной форме и могут быть получены любым из способов, хорошо известных в области фармации. Методики и составы в целом описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания). Такие способы включают стадию объединения активного ингредиента с носителем, который представляет собой один или более вспомогательных ингредиентов. В целом составы получают путем равномерного и тщательного смешивания активного ингредиента с жидкими носителями, или тонко измельченными твердыми носителями, или с тем и другим, и затем, при необходимости, формирования продукта.

Составы согласно настоящему изобретению, подходящие для перорального введения, могут быть представлены в виде отдельных единиц, таких как капсулы, кахеты или таблетки, каждая из которых содержит заданное количество активного ингредиента; в виде порошка или гранул; в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии типа масло в воде, или жидкой эмульсии типа вода в масле. Активный ингредиент может быть введен в виде болюса, электуария или пасты.

Таблетку получают путем прессования или формования необязательно с одним или более вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть получены путем прессования в подходящей машине активного ингредиента в свободнотекущей форме, такой как порошок или гранулы, необязательно смешанной со связывающим веществом, смазывающим веществом, инертным разбавителем, консервантом, поверхностно-активным или диспергирующим агентом. Формованные таблетки могут

быть получены путем формования в подходящей машине смеси порошкообразного активного ингредиента, смоченного инертным жидким разбавителем. Таблетки могут необязательно содержать покрытие или иметь риск и необязательно быть приготовлены таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение из них активного ингредиента.

Для инфекций глаза или других наружных тканей, например, рта и кожи, составы предпочтительно наносят в виде мази или крема для местного применения, содержащих активный ингредиент (ингредиенты) в количестве, например, от 0,075 до 20 мас. % (включая активный ингредиент (ингредиенты) в диапазоне между 0,1 и 20% с шагом 0,1 мас. %, как то 0,6 мас. %, 0,7 мас. % и т.д.), предпочтительно от 0,2 до 15 мас. % и наиболее предпочтительно от 0,5 до 10 мас. % При введении в состав мази активные ингредиенты могут быть использованы либо с парафиновой, либо с водорастворимой мазевой основой. В качестве альтернативы активные ингредиенты могут быть введены в состав крема с основой для крема типа масло в воде.

Если желательно, водная фаза основы для крема может содержать, например, по меньшей мере 30 мас. % многоатомного спирта, т.е. спирта, имеющего две или более гидроксильных групп, такого как пропиленгликоль, бутан-1,3-диол, маннитол, сорбитол, глицерин и полиэтиленгликоль (включая ПЭГ-400) и их смеси. Составы для местного применения могут желательно содержать соединение, которое усиливает всасывание или проникновение активного ингредиента через кожу или другие пораженные участки. Примеры таких агентов, усиливающих проникновение через кожу, включают диметилсульфоксид и родственные аналоги.

Масляная фаза эмульсий согласно настоящему изобретению может быть составлена из известных ингредиентов известным образом. Хотя указанная фаза может содержать только эмульгирующий агент (иначе известный как эмульгатор), желательно, чтобы она содержала смесь по меньшей мере одного эмульгирующего агента с жиром или маслом или и жиром, и маслом. Предпочтительно включать гидрофильный эмульгирующий агент совместно с липофильным эмульгирующим агентом, который действует как стабилизатор. Также предпочтительно включать как масло, так и жир. Эмульгирующий агент (агенты) совместно со стабилизатором (стабилизаторами) или без него образуют так называемый эмульгирующий воск, а воск совместно с маслом и жиром образуют так называемую эмульгирующую мазевую основу, которая образует масляную дисперсную фазу составов кремов.

Эмульгаторы и стабилизаторы эмульсий, подходящие для применения в составе согласно настоящему изобретению, включают Tween® 60, Span® 80, цетостеариловый спирт, бензиловый спирт, миристиловый спирт, глицерилмоностеарат и лаурилсульфат натрия. Дополнительные эмульгаторы и стабилизаторы эмульсий, подходящие для применения в составе согласно настоящему изобретению, включают Tween® 80.

Выбор подходящих масел или жиров для состава основан на достижении желаемых косметических свойств. Крем предпочтительно должен быть нежирным, не окрашивающим и смываемым продуктом с подходящей консистенцией, чтобы избежать вытекания из туб или других емкостей. Могут быть применены моно- или дизамещенные алкиловые сложные эфиры с неразветвленной или разветвленной цепью, такие как диизоадипат, изоцетилстеарат, диэфир пропиленгликоля и жирных кислот кокосового масла, изопропилмирилат, децилолеат, изопропилпальмитат, стиролстеарат, 2-этилгексилпальмитат или смесь сложных эфиров с разветвленной цепью, известная как Crodamol CAP, последние три являются предпочтительными сложными эфирами. Они могут быть применены отдельно или в комбинации в зависимости от требуемых свойств. В качестве альтернативы применяют липиды с высокой температурой плавления, такие как белый мягкий парафин и/или жидкий парафин или другие минеральные масла.

Фармацевтические составы в соответствии с настоящим изобретением включают комбинацию в соответствии с настоящим изобретением совместно с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными веществами и необязательно другими терапевтическими агентами. Фармацевтические составы, содержащие активный ингредиент, могут быть представлены в любой форме, подходящей для предполагаемого способа введения. При использовании для перорального введения могут быть получены, например, таблетки, пастилки, таблетки для рассасывания, водные или масляные суспензии, диспергируемые порошки или гранулы, эмульсии, твердые или мягкие капсулы, сиропы или эликсиры. Композиции, предназначенные для перорального введения, могут быть получены в соответствии с любым способом, известным в данной области техники для получения фармацевтических композиций, и такие композиции могут содержать один или более агентов, включая подслащающие агенты, ароматизирующие агенты, окрашивающие агенты и консервирующие агенты, для получения приемлемого препарата. Приемлемые таблетки, содержащие активный ингредиент в смеси с нетоксичным фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, которое подходит для получения таблеток. Эти вспомогательные вещества могут представлять собой, например, инертные разбавители, такие как карбонат кальция или натрия, лактоза, фосфат кальция или натрия; гранулирующие и разрыхляющие агенты, такие как кукурузный крахмал или альгиновая кислота; связующие агенты, такие как крахмал, желатин или гуммиарабик; и смазывающие агенты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк. Таблетки могут быть непокрытыми или могут быть покрыты известными способами, включая микрокап-

сулирование, для замедления распада и всасывания в желудочно-кишечном тракте и таким образом обеспечения пролонгированного действия в течение более длительного периода. Например, может быть использовано замедляющее вещество, такое как глицерилмоностерат или глицерилдистеарат отдельно или совместно с воском.

Составы для перорального введения также могут быть представлены в виде твердых желатиновых капсул, где активный ингредиент смешивают с инертным твердым разбавителем, например, фосфатом кальция или каолином, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешивают с водой или масляной средой, такой как арахисовое масло, жидкий парафин или оливковое масло.

Водные суспензии согласно настоящему изобретению содержат активные вещества в смеси с вспомогательными веществами, подходящими для получения водных суспензий. Такие вспомогательные вещества включают суспендирующий агент, такой как натрий карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагантовая камедь и гуммиарабик, и диспергирующие или смачивающие агенты, такие как фосфатид природного происхождения (например, лецитин), продукт конденсации алкиленоксида с жирной кислотой (например, полиоксиэтиленстеарат), продукт конденсации этиленоксида с длинноцепочечным алифатическим спиртом (например, гептадекаэтиленоксицетанол), продукт конденсации этиленоксида с неполным сложным эфиром, полученным из жирной кислоты и ангидрида гексита (например, полиоксиэтиленсорбитан моноолеат). Водная суспензия также может содержать один или более консервантов, таких как этил- или н-пропил п-гидроксибензоат, один или более окрашивающих агентов, один или более ароматизирующих агентов и один или более подслащивающих агентов, таких как сахароза или сахарин. Дополнительные неограничивающие примеры суспендирующих агентов включают циклодекстрин и Captisol (=сульфобутиловый эфир бета-циклодекстрина; SEB-beta-CD).

Масляные суспензии могут быть получены суспендированием активного ингредиента в растительном масле, таком как арахисовое масло, оливковое масло, кунжутное масло или кокосовое масло, или в минеральном масле, таком как жидкий парафин. Суспензии для перорального введения могут содержать загуститель, такой как пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Подслащивающие агенты, такие как указанные выше, и ароматизирующие агенты могут быть добавлены для получения приемлемого препарата для перорального введения. Эти композиции могут быть сохранены путем добавления антиоксиданта, такого как аскорбиновая кислота.

Диспергируемые порошки и гранулы согласно настоящему изобретению, подходящие для получения водной суспензии путем добавления воды, обеспечивают активный ингредиент в смеси с диспергирующим или смачивающим агентом, суспендирующим агентом и одним или более консервантами. Подходящие диспергирующие или смачивающие агенты и суспендирующие агенты иллюстрированы примерами, раскрытыми выше. Могут также присутствовать дополнительные вспомогательные вещества, например, подслащивающие, ароматизирующие и окрашивающие агенты.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению также могут быть представлены в форме эмульсий типа масло в воде. Масляная фаза может представлять собой растительное масло, такое как оливковое масло или арахисовое масло, минеральное масло, такое как жидкий парафин, или их смесь. Подходящие эмульгирующие агенты включают камеди природного происхождения, такие как гуммиарабик и трагантовая камедь, фосфатиды природного происхождения, такие как соевый лецитин, сложные эфиры или неполные сложные эфиры, полученные из жирных кислот и ангидридов гексита, такие как сорбитан моноолеат, и продукты конденсации этих неполных сложных эфиров с этиленоксидом, такие как полиоксиэтиленсорбитан моноолеат. Эмульсия также может содержать подслащивающие и ароматизирующие агенты. Сиропы и эликсиры могут быть получены с подслащивающими агентами, такими как глицерин, сорбитол или сахароза. Такие составы также могут содержать смягчающий агент, консервант, ароматизирующий или окрашивающий агент.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть представлены в форме стерильного инъекционного препарата, такого как стерильная инъекционная водная или масляная суспензия. Эта суспензия может быть получена в соответствии с известным уровнем техники с применением подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов, которые были упомянуты выше. Стерильный инъекционный препарат может также представлять собой стерильный раствор для инъекций или суспензию в нетоксичном приемлемом для парентерального введения разбавителе или растворителе, такой как раствор в 1,3-бутандиоле, или получен в виде лиофилизированного порошка. В число приемлемых носителей и растворителей, которые могут быть использованы, входят вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Помимо этого в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно могут быть использованы стерильные нелетучие масла. Для этой цели может быть использовано любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Помимо этого, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, также могут быть использованы для получения инъекционных препаратов. В число приемлемых носителей и растворителей, которые могут быть использованы, входят вода, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия и гипертонический раствор хлорида натрия.

Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с веществом-носителем для

получения лекарственной формы для однократного введения, будет различным в зависимости от хозяина, получающего лечение, и конкретного способа введения. Например, состав с замедленным высвобождением, предназначенный для перорального введения людям, может содержать от примерно 1 до 1000 мг активного вещества, соединенного с подходящим и удобным количеством вещества-носителя, которое может составлять от примерно 5 до примерно 95% всей композиции (масса:масса). Фармацевтическая композиция может быть приготовлена для обеспечения легко измеряемых количеств для введения. Например, водный раствор, предназначенный для внутривенной инфузии, может содержать от примерно 3 до 500 мкг активного ингредиента на миллилитр раствора, чтобы можно было проводить инфузию подходящего объема со скоростью примерно 30 мл/ч.

Составы, подходящие для местного введения в глаз, также включают глазные капли, в которых активный ингредиент растворяют или суспендируют в подходящем носителе, в частности водном растворителе для активного ингредиента. Активный ингредиент предпочтительно содержится в таких составах в концентрации от 0,5 до 20%, преимущественно от 0,5 до 10%, и в частности примерно 1,5 мас. %

Составы, подходящие для местного введения в рот, включают таблетки для рассасывания, содержащие активный ингредиент в ароматизированной основе, обычно сахарозе и гуммиарабике или трагакантовой камеди; пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и гуммиарабик; и жидкости для полоскания рта, содержащие активный ингредиент в подходящем жидком носителе.

Составы для ректального введения могут быть представлены в виде суппозитория с подходящей основой, содержащей, например, масло какао или салицилат.

Составы, подходящие для внутрилегочного или назального введения, имеют размер частиц, например, в диапазоне от 0,1 до 500 мкм, как то 0,5, 1, 30, 35 и т.д., которые вводят путем быстрой ингаляции через носовой ход или путем ингаляции через рот таким образом, чтобы достичь альвеолярных мешочков. Подходящие составы включают водные или масляные растворы активного ингредиента. Составы, подходящие для введения аэрозоля или сухого порошка, могут быть получены в соответствии с обычными способами и могут быть доставлены с другими терапевтическими агентами.

Составы, подходящие для вагинального введения, могут быть представлены в виде pessaries, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или аэрозольных составов, содержащих в дополнение к активному ингредиенту такие носители, которые известны в данной области техники как подходящие.

Составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические агенты и растворенные вещества, которые обеспечивают раствору изотоничность крови предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие агенты и загустители.

Составы представлены в однодозовых или многодозовых емкостях, например, запаянных ампулах и флаконах, и могут храниться в сублимационно-высушенном (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением. Экстемпоральные инъекционные растворы и суспензии получают из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанных ранее. Предпочтительными составами с однократной дозой являются составы, содержащие суточную дозу, или часть суточной дозы, как указано выше в настоящем описании, или их подходящую часть, активного ингредиента.

Следует понимать, что в дополнение к ингредиентам, в частности упомянутым выше, составы согласно настоящему изобретению могут содержать другие агенты, обычные в данной области техники, имеющие отношение к типу рассматриваемого состава, например, составы, подходящие для перорального введения, могут содержать ароматизирующие агенты.

В настоящем изобретении дополнительно предложены композиции для ветеринарного применения, содержащие по меньшей мере один активный ингредиент, как определено выше, совместно с его носителем для ветеринарного применения.

Носители для ветеринарного применения представляют собой вещества, пригодные для применения для целей введения композиции, и могут представлять собой твердые, жидкие или газообразные вещества, которые являются либо инертными, либо приемлемыми в области ветеринарии, и совместимы с активным ингредиентом. Эти композиции для ветеринарного применения могут быть введены перорально, парентерально или любым другим желаемым путем.

Соединение согласно настоящему изобретению применяют для получения фармацевтических составов с контролируемым высвобождением, содержащих в качестве активного ингредиента соединение согласно настоящему изобретению ("составы с контролируемым высвобождением"), в которых высвобождение активного ингредиента контролируется и регулируется, чтобы обеспечить меньшую частоту введения или улучшить профиль фармакокинетики или токсичности данного активного ингредиента.

IV. Пути введения

Соединение согласно настоящему изобретению (в настоящем описании называемое активным ингредиентом) вводят любым путем, подходящим для состояния, подлежащего лечению. Подходящие пути включают пероральный, ректальный, назальный, легочный, местный (включая буккальный и подъязыч-

ный), вагинальный и парентеральный (включая подкожный, внутримышечный, внутривенный, внутрикожный, интратекальный и эпидуральный) и тому подобное. Понятно, что предпочтительный путь может изменяться, например, в зависимости от состояния реципиента. Преимущество соединения согласно настоящему изобретению состоит в том, что оно обладает биодоступностью при пероральном введении и может быть введено перорально.

Эффективная доза активного ингредиента зависит по меньшей мере от природы состояния, подлежащего лечению, токсичности, от того, применяют ли соединение профилактически (более низкие дозы) или против активной вирусной инфекции, способа доставки и фармацевтического состава, и будет определяться врачом с использованием обычных исследований с увеличением дозы. Можно ожидать, что она будет составлять от примерно 0,0001 до примерно 100 мг/кг массы тела в день; как правило, от примерно 0,01 до примерно 10 мг/кг массы тела в день; еще более типичной является доза от примерно 0,01 до примерно 5 мг/кг массы тела в день; наиболее типичной является доза от примерно 0,05 до примерно 0,5 мг/кг массы тела в день. Например, потенциально возможная суточная доза для взрослого человека с массой тела примерно 70 кг будет варьировать от 1 до 1000 мг, предпочтительно между 5 и 500 мг, и может иметь форму доз для однократного или многократного приема.

Для введения соединения согласно настоящему изобретению предусмотрен любой подходящий период времени. Например, введение может продолжаться от 1 дня до 100 дней, включая 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 дней. Также введение может продолжаться от 1 до 15 недель, включая 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 недель. Также предусмотрены более длительные периоды введения. Время для введения может зависеть от того, вводят ли соединение профилактически или для лечения человека.

V. Комбинированная терапия

Композиции согласно настоящему изобретению также применяют в комбинации с другими активными ингредиентами. Неограничивающими примерами этих других активных терапевтических агентов являются рибавирин, фавипиравир (также известный как T-705 или Avigan), монофосфат T-705, дифосфат T-705, трифосфат T-705, ST-193 и их смеси. Соединения и композиции согласно настоящему изобретению также предназначены для применения в общем уходе за больными, включающем парентеральные жидкости (включая изотонический раствор декстрозы и Рингер лактат) и питание, антибиотик (включая метронидазол и антибиотики цефалоспоринового ряда, такие как цефтриаксон и цефуроксим) и/или противогрибковые профилактические средства, жаропонижающее и болеутоляющее лекарственное средство, противорвотные (такие как метоклопрамид) и/или противодиарейные агенты, витаминные и минеральные добавки (включая витамин К и сульфат цинка), противовоспалительные агенты (такие как ибупрофен), болеутоляющие средства и лекарственные средства для других распространенных в популяции пациентов заболеваний, такие как агенты против малярии (включая артемизинин и комбинированную терапию артезунат-люмефантрин), тифа (включая антибиотики ряда хинолонов, такие как ципрофлоксацин, макролидные антибиотики, такие как азитромицин, антибиотики цефалоспоринового ряда, такие как цефтриаксон, или аминопенициллины, такие как ампициллин) или шигеллеза.

Также возможно комбинировать соединение согласно настоящему изобретению с одним или более дополнительными активными терапевтическими агентами в единой лекарственной форме для одновременного или последовательного введения пациенту. Комбинированную терапию можно вводить в соответствии с одновременной или последовательной схемой введения. При последовательном введении комбинация может быть введена в виде двух или более введений.

Совместное введение соединения согласно настоящему изобретению с одним или более другими активными терапевтическими агентами в целом относится к одновременному или последовательному введению соединения согласно настоящему изобретению и одного или более других активных терапевтических агентов таким образом, что терапевтически эффективные количества и соединения согласно настоящему изобретению, и одного или более других активных терапевтических агентов присутствуют в организме пациента.

Совместное введение включает введение единичных доз соединения согласно настоящему изобретению до или после введения единичных доз одного или более других активных терапевтических агентов, например, введение соединения согласно настоящему изобретению в течение нескольких секунд, минут или часов после введения одного или более других активных терапевтических агентов. Например, единичная доза соединения согласно настоящему изобретению может быть введена первой с последующим введением в течение нескольких секунд или минут единичной дозы одного или более других активных терапевтических агентов. В качестве альтернативы единичная доза одного или более других активных терапевтических агентов может быть введена первой с последующим введением единичной дозы соединения согласно настоящему изобретению в течение нескольких секунд или минут. В некоторых случаях может быть желательно вводить единичную дозу соединения согласно настоящему изобретению первой с последующим введением через несколько часов (например, 1-12 ч) единичной дозы одного или более других активных терапевтических агентов. В других случаях может быть желательно вводить единичную дозу одного или более других активных терапевтических агентов первой с последующим введением через несколько часов (например, 1-12 ч) единичной дозы соединения согласно настоящему изобретению.

бретению.

Комбинированная терапия может обеспечивать "синергию" и "синергический эффект", то есть эффект, достигаемый при совместном применении активных ингредиентов, превышает сумму эффектов, возникающих в результате применения соединений отдельно. Синергический эффект может быть достигнут, когда активные ингредиенты: (1) приготовлены совместно и вводятся или доставляются одновременно в комбинированном составе; (2) доставляются поочередно или параллельно в виде отдельных составов или (3) в соответствии с другой схемой введения. При доставке при альтернирующей терапии синергический эффект может быть достигнут, когда соединения вводят или доставляют последовательно, например, в отдельных таблетках, пилюлях или капсулах, или посредством различных инъекций в отдельных шприцах. В целом при альтернирующей терапии эффективную дозу каждого активного ингредиента вводят последовательно, то есть серийно, тогда как при комбинированной терапии эффективные дозы двух или более активных ингредиентов вводят совместно. Синергический противовирусный эффект означает противовирусный эффект, превышающий предсказанные исключительно аддитивные эффекты отдельных соединений комбинации.

Примеры

В подробном описании экспериментов используются некоторые сокращения и акронимы. Несмотря на то, что большинство из них будут понятны специалисту в данной области техники, табл. 1 содержит список многих из указанных сокращений и акронимов.

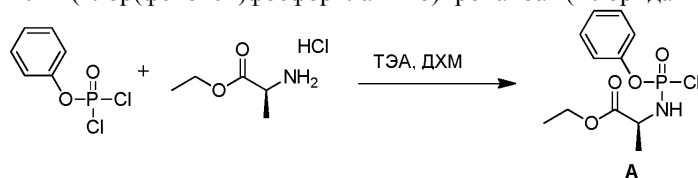
Таблица 1. Список сокращений и акронимов

Сокращение	Значение
Ac ₂ O	уксусный ангидрид
AIBN	2,2'-азобис(2-метилпропионитрил)
Bn	бензил
BnBr	бензилбромид
BSA	бис(триметилсилил)ацетамид
BzCl	бензоилхлорид
CDI	карбонилдимидазол
DABCO	1,4-диазабисцикло[2,2,2]октан
DBN	1,5-диазабисцикло[4,3,0]нон-5-ен
DDQ	2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон
DBU	1,5-диазабисцикло[5,4,0]ундец-5-ен
DCA	дихлорацетамид
DCC	дициклогексилкарбодимид
ДХМ	дихлорметан
DMAP	4-диметиламинопиридин
DME	1,2-диметоксиэтан
DMTCI	диметокситритилхлорид

DMCO	диметилсульфоксид
DMTr	4, 4'-диметокситритил
DMФА	диметилформамид
EtOAc	этилацетат
ИЭР	ионизация электрораспылением
HMDS	гексаметилдисилазан
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
LDA	диизопропиламид лития
МСНР	масс-спектр низкого разрешения
МСРВА	<i>мета</i> -хлорпербензойная кислота
MeCN	ацетонитрил
MeOH	метанол
ММТС	монометокситритилхлорид
m/z или m/e	отношение массы к заряду
MH ⁺	масса плюс 1
MH ⁻	масса минус 1
MsOH	метансульфоная кислота
МС или мс	масс-спектр
NBS	N-бромсукцинимид
Ph	фенил
кт или к. т.	комнатная температура
TBAF	фторид тетрабутиламмония
TMSCl	хлортриметилсилан
TMSBr	бромтриметилсилан
TMSI	йодтриметилсилан
TMSOTf	(триметилсилил)трифторметилсульфонат
ТЭА	триэтиламин
TBA	трибутиламин
TBAP	пирофосфат трибутиламмония
TBSCl	<i>т</i> -бутилдиметилсилилхлорид
TEAB	бикарбонат триэтиламмония
ТФУ	трифторуксусная кислота
ТСХ или tсх	тонкослойная хроматография
Tr	трифенилметил
Tol	4-метилбензоил
Turbo Grignard	смесь изопропилмагнийхлорида и хлорида лития 1:1
δ	химический сдвиг относительно тетраметилсилана, частей на миллион

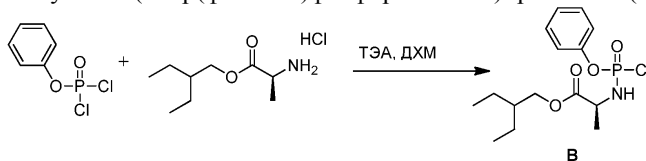
А. Получение соединений

Пример 1. (2S)-этил-2-(хлор(фенокси)фосфиламино)пропаноат (Хлоридат А)



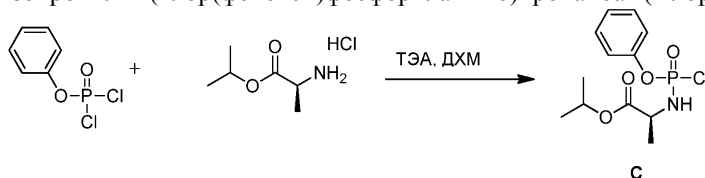
Гидрохлоридную соль этилового эфира аланина (1,69 г, 11 ммоль) растворяли в безводном CH_2Cl_2 (10 мл) и полученную смесь перемешивали при охлаждении до 0°C в атмосфере N_2 (г). Добавляли фенилдихлорфосфат (1,49 мл, 10 ммоль) с последующим добавлением по каплям Et_3N в течение 10 мин. Затем реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 12 ч. Добавляли безводный Et_2O (50 мл) и полученную смесь перемешивали в течение 30 мин. Полученное твердое вещество удаляли путем фильтрования и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток подвергали хроматографии на силикагеле при элюировании 0-50% EtOAc в гексане, получая промежуточное соединение А (1,13 г, 39%). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,39-7,27 (m, 5H), 4,27 (m, 3H), 1,52 (m, 3H), 1,32 (m, 3H). ^{31}P ЯМР (121,4 МГц, CDCl_3) δ 8,2, 7,8.

Пример 2. (2S)-2-этилбутил-2-(хлор(фенокси)фосфориламино)пропаноат (Хлоридат В)



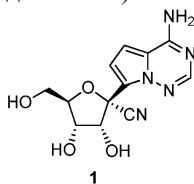
2-Этилбутиловый эфир хлорфосфорамидата аланина В получали с применением той же методики, что и хлоридат А за исключением замены этилового эфира аланина на 2-этилбутиловый эфир аланина. Полученный материал применяли неочищенным в следующей реакции. Обработка метанолом или этанолом приводила к получению замещенного продукта с требуемым сигналом ЖХ/МС.

Пример 3. (2S)-Изопропил-2-(хлор(фенокси)фосфориламино)пропаноат (Хлоридат С)

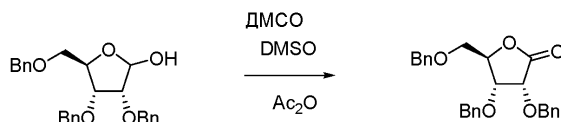


Изопропиловый эфир хлорфосфорамидата аланина С получали с применением той же методики, что и хлоридат А за исключением замены этилового эфира аланина на изопропиловый эфир аланина. Полученный неочищенный материал применяли для следующей реакции. Обработка метанолом или этанолом приводила к получению замещенного продукта с требуемым сигналом ЖХ/МС.

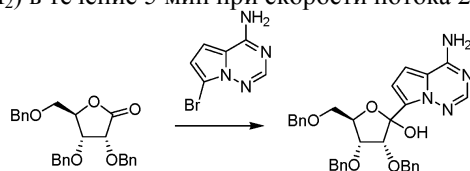
Пример 4. (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[1,2-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрил (Соединение 1)



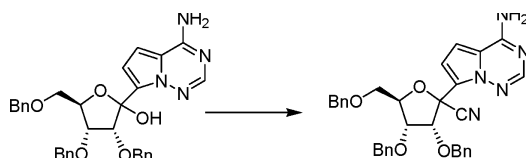
Получение (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[1,2-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила описано ниже.



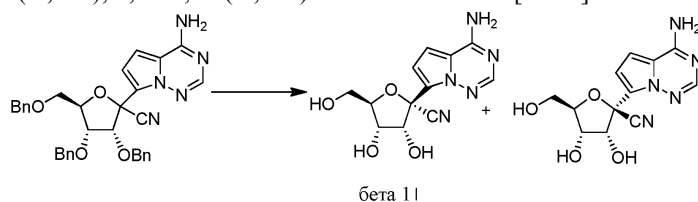
Коммерчески доступный лактол (10 г, 23,8 ммоль) растворяли в безводном ДМСО (30 мл) в атмосфере N₂ (г). Добавляли Ac₂O (20 мл) и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч. Реакционную смесь вливали в ледяную H₂O (500 мл) и полученную смесь перемешивали в течение 20 мин. Смесь подвергали экстракции посредством EtOAc (3 × 200 мл) и затем объединенные органические экстракты промывали H₂O (3 × 200 мл). Органический экстракт сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в CH₂Cl₂ и подвергали хроматографии на силикагеле при элюировании 25% EtOAc в гексане, получая лактон (9,55 г, 96%). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 7,30-7,34 (m, 13H), 7,19-7,21 (m, 2H), 4,55-4,72 (m, 6H), 4,47 (s, 2H), 4,28 (d, J=3,9 Гц, 1H), 3,66 (m, 2H). ЖХ/МС m/z 436,1 [M+H₂O], 435,2 [M+OH] T_r=2,82 мин. ВЭЖХ T_r=4,59 [2-98% ACN в H₂] в течение 5 мин при скорости потока 2 мл/мин.



Бромпирролол (полученный в соответствии с WO 2009/132135) (0,5 г, 2,4 ммоль) суспендировали в безводном ТГФ (10 мл) в атмосфере N₂ (г). Полученную суспензию перемешивали и добавляли TMSCl (0,67 мл, 5,28 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 20 мин при комнатной температуре и затем охлаждали до -78°C, после чего медленно добавляли раствор n-BuLi (6 мл, 1,6 н. в гексане, 9,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин при -78°C и затем через шприц добавляли лактон (1 г, 2,4 ммоль). Когда реакция была завершена по данным ЖХ/МС добавляли AcOH для гашения реакции. Смесь концентрировали при пониженном давлении и остаток растворяли в смеси CH₂Cl₂ и H₂O (100 мл, 1:1). Отделяли органический слой и промывали H₂O (50 мл). Затем органический слой сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток подвергали хроматографии на силикагеле при элюировании 0-50% EtOAc в гексане, получая указанный продукт в виде смеси аномеров в соотношении 1:1 (345 мг, выход 26%). ЖХМС m/z 553 [M+H].

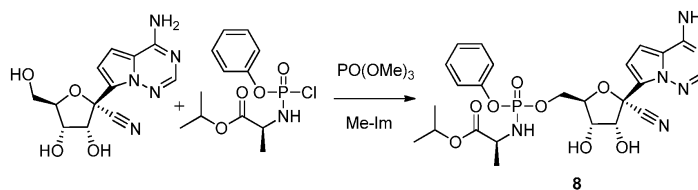


Гидроксинуклеозид (1,1 г, 2,0 ммоль) растворяли в безводном CH_2Cl_2 (40 мл) и полученный раствор охлаждали при перемешивании до 0°C в атмосфере N_2 (г). Добавляли TMSCN (0,931 мл, 7 ммоль) и полученную смесь перемешивали в течение еще 10 мин. К реакционной смеси медленно добавляли TMSOTf (1,63 мл, 9,0 ммоль) и полученную смесь перемешивали в течение 1 ч. Затем реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2 (120 мл) и добавляли водный NaHCO_3 (120 мл) для гашения реакции. Реакционную смесь перемешивали в течение еще 10 мин и отделяли органический слой. Водный слой подвергали экстракции посредством CH_2Cl_2 (150 мл) и объединенные органические экстракты сушили над безводным MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в минимальном количестве CH_2Cl_2 и подвергали хроматографии на силикагеле при элюировании с применением градиента 0-75% EtOAc и гексана, получая трибензилцианонуклеозид в виде смеси аномеров (0,9 г, 80%). ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3CN) δ 7,94 (s, 0,5H), 7,88 (s, 0,5H), 7,29-7,43 (m, 13H), 7,11-7,19 (m, 1H), 6,82-6,88 (m, 1H), 6,70-6,76 (m, 1H), 6,41 (bs, 2H), 5,10 (d, $J=3,9$ Гц, 0,5H), 4,96 (d, $J=5,1$ Гц, 0,5H), 4,31-4,85 (m, 7H), 4,09-4,18 (m, 2H), 3,61-3,90 (m, 2H). ЖХ/МС m/z 562 $[\text{M}+\text{H}]$.



Трибензилцианонуклеозид (70 мг, 0,124 ммоль) растворяли в безводном CH_2Cl_2 (2 мл) и охлаждали до -78°C в атмосфере N_2 (г). Добавляли раствор BCl_3 (1 н. в CH_2Cl_2 , 0,506 мл, 0,506 ммоль) и полученную реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -78°C . Когда реакция была завершена по данным ЖХ/МС, добавляли MeOH для гашения реакции. Реакционной смеси давали возможность нагреться до комнатной температуры и удаляли растворитель при пониженном давлении. Остаток подвергали обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке с $\text{C}18$ при элюировании в течение 5 мин с применением H_2O (0,1 % ТФУ), а затем градиента 0-70% MeCN в H_2O (0,1% ТФУ) в течение 35 мин, элюируя α -аномер (20 мг, 37%) и β -аномер 1 (20 мг, 37%). (α -аномер) ^1H ЯМР (300 МГц, D_2O) δ 7,96 (s, 1H), 7,20 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 6,91 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 4,97 (d, $J=4,4$ Гц, 1H), 4,56-4,62 (m, 1H), 4,08-4,14 (m, 1H), 3,90 (dd, $J=12,9, 2,4$ Гц, 1H), 3,70 (dd, $J=13,2, 4,5$ Гц, 1H). (β -аномер) ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO) δ 7,91 (s, 1H), 7,80-8,00 (ушир. s, 2H), 6,85-6,89 (m, 2H), 6,07 (d, $J=6,0$ Гц, 1H), 5,17 (ушир. s, 1H), 4,90 (ушир. s, 1H), 4,63 (t, $J=3,9$ Гц, 1H), 4,02-4,06 (m, 1H), 3,94 (ушир. s, 1H), 3,48-3,64 (m, 2H). ЖХ/МС m/z 292,2 $[\text{M}+\text{H}]$, 290,0 $[\text{M}-\text{H}]$. $\text{T}_\text{r}=0,35$ мин. ^{13}C ЯМР (400 МГц, DMCO), 156,0, 148,3, 124,3, 117,8, 117,0, 111,2, 101,3, 85,8, 79,0, 74,7, 70,5, 61,4. ВЭЖХ $\text{T}_\text{r}=1,32$ мин.

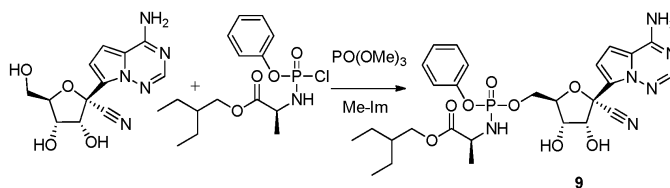
Пример 5. (2S)-Изопропил-2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[1,2-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)-(фосфориламино)пропаноат (Соединение 8)



Нуклеозид 1 (45 мг, 0,15 ммоль) растворяли в безводном триметилфосфате (0,5 мл) и полученный раствор перемешивали в атмосфере N_2 (г) при 0°C . К раствору добавляли метилимидазол (36 мкл, 0,45 ммоль). Хлорфосфорамидат С (69 мг, 0,225 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (0,25 мл) и по каплям добавляли к указанной содержащей нуклеозид смеси. После завершения реакции по данным ЖХ/МС реакционную смесь разбавляли EtOAc и промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 , насыщенным раствором NaCl , сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток подвергали хроматографии на силикагеле при элюировании 0-5% MeOH в CH_2Cl_2 с последующей препаративной ВЭЖХ, получая указанный продукт (20,9 мг, 25%). ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD) δ 7,95 (m, 1H), 7,31-6,97 (m, 7H), 4,94 (m, 1H), 4,78 (m, 1H), 4,43 (m, 3H), 4,20 (m, 1H), 3,80 (d, 1H), 1,30-1,18 (m, 9H). ^{31}P ЯМР (121,4 МГц, CD_3OD) δ 3,8. ЖХ/МС m/z 561,0 $[\text{M}+\text{H}]$, 559,0 $[\text{M}-\text{H}]$.

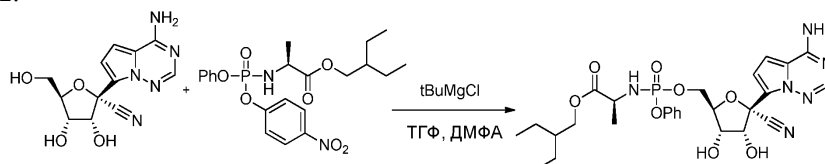
Пример 6. (2S)-2-Этилбутил-2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[1,2-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфориламино)пропаноат (Соединение 9)
Соединение 9 может быть получено несколькими способами, описанными ниже.

Методика 1.



Получение проводили из Соединения 1 и хлорида В в соответствии с тем же способом, который применяли для получения соединения 8. ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD) δ 7,87 (m, 1H), 7,31-7,16 (m, 5H), 6,92-6,89 (m, 2H), 4,78 (m, 1H), 4,50-3,80 (m, 7H), 1,45-1,24 (m, 8H), 0,95-0,84 (m, 6H). ^{31}P ЯМР (121,4 МГц, CD_3OD) δ 3,7. ЖХ/МС m/z 603,1 [M+H], 601,0 [M-H].

Методика 2.



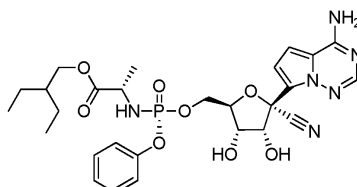
(2S)-2-Этилбутил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат.

(2S)-2-Этилбутил-2-(((4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат (1,08 г, 2,4 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (9 мл) и перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре. К полученной реакционной смеси добавляли одной порцией (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрил (350 мг, 1,2 ммоль). Затем к реакционной смеси по каплям добавляли раствор т-бутилмагния хлорида в ТГФ (1М, 1,8 мл, 1,8 ммоль) в течение 10 мин. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч, после чего реакционную смесь разбавляли этилацетатом (50 мл) и промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (3 × 15 мл), а затем насыщенным водным раствором хлорида натрия (15 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Полученное масло очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (0-10% MeOH в ДХМ), получая (2S)-2-этилбутил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат (311 мг, 43%, смесь диастереомеров по фосфору 1:0,4) в виде твердого вещества белого цвета. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 7,85 (m, 1H), 7,34-7,23 (m, 2H), 7,21-7,09 (m, 3H), 6,94-6,84 (m, 2H), 4,78 (d, $J=5,4$ Гц, 1H), 4,46-4,33 (m, 2H), 4,33-4,24 (m, 1H), 4,18 (m, 1H), 4,05-3,80 (m, 3H), 1,52-1,39 (m, 1H), 1,38-1,20 (m, 7H), 0,85 (m, 6H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, CD_3OD) δ 3,71, 3,65. ЖХ/МС m/z 603,1 [M+H], 600,9 [M-H]. ВЭЖХ (градиент 2-98% MeCN- H_2O с модификатором 0,1% ТФУ в течение 8,5 мин, 1,5 мл/мин, колонка Phenomenex Kinetex C18, 2,6 мкм, 100 Å, 4,6 × 100 мм), $t_R = 5,544$ мин, 5,601 мин.

Разделение (S) и (R)-диастереомеров

(2S)-2-Этилбутил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат растворяли в ацетонитриле. Полученный раствор наносили на хиральную колонку Lux Cellulose-2, уравнивали с ацетонитрилом и элюировали в изократическом режиме смесью ацетонитрил/метанол (95:5 об./об.). Первый элюируемый диастереомер характеризовался временем удерживания 17,4 мин, а второй элюируемый диастереомер характеризовался временем удерживания 25,0 мин.

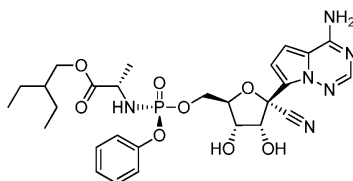
Первый элюируемый диастереомер представляет собой (S)-2-этилбутил-2-(((R)-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат:



^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 8,05 (s, 1H), 7,36 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 7,29 (ушир. t, $J=7,8$ Гц, 2H), 7,19 - 7,13 (m, 3H), 7,11 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 4,73 (d, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,48-4,38 (m, 2H), 4,37-4,28 (m, 1H), 4,17 (t, $J=5,6$ Гц, 1H), 4,08-3,94 (m, 2H), 3,94-3,80 (m, 1H), 1,48 (sep, $J=12,0$, 6,1 Гц, 1H), 1,34 (p, $J=7,3$ Гц, 4H), 1,29 (d, $J=7,2$ Гц, 3H), 0,87 (t, $J=7,4$ Гц, 6H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, CD_3OD) δ 3,71 (s). ВЭЖХ (градиент 2-98% MeCN- H_2O с модификатором 0,1% ТФУ в течение 8,5 мин, 1,5 мл/мин, колонка Phenomenex Kinetex C18, 2,6 мкм, 100 Å, 4,6 × 100 мм), $t_R = 5,585$ мин.

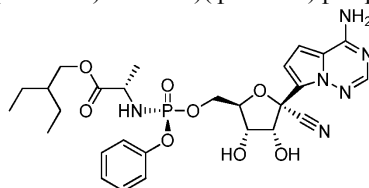
Второй элюируемый диастереомер представляет собой (S)-2-этилбутил-2-(((S)-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-

аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксифосфорил)амино)пропаноат:



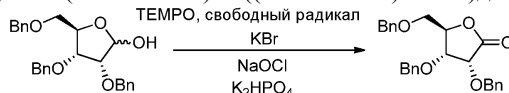
^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 8,08 (s, 1H), 7,36-7,28 (m, 3H), 7,23-7,14 (m, 3H), 7,08 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 4,71 (d, $J=5,3$ Гц, 1H), 4,45-4,34 (m, 2H), 4,32-4,24 (m, 1H), 4,14 (t, $J=5,8$ Гц, 1H), 4,08-3,94 (m, 2H), 3,93-3,85 (m, 1H), 1,47 (sep, $J=6,2$ Гц, 1H), 1,38-1,26 (m, 7H), 0,87 (t, $J=7,5$ Гц, 6H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, CD_3OD) δ 3,73 (s). ВЭЖХ (градиент 2-98% $\text{MeCN-H}_2\text{O}$ с модификатором 0,1% ТФУ в течение 8,5 мин, 1,5 мл/мин, колонка Phenomenex Kinetex C18, 2,6 мкм, 100 Å, 4,6 × 100 мм) $t_R = 5,629$ мин.

Пример 7. (S)-2-Этилбутил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксифосфорил)амино)пропаноат (32)



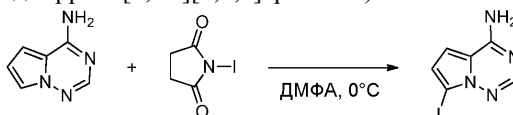
Получение (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксифосфорил)амино)пропаноата описано ниже.

Получение (3R,4R,5R)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)дигидрофуран-2(3H)-она



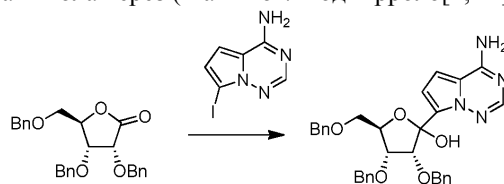
(3R,4R,5R)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-ол (15,0 г) объединяли с МТБЭ (60,0 мл), KBr (424,5 мг), водным раствором K_2HPO_4 (2,5М, 14,3 мл) и TEMPO (56 мг). Данную смесь охлаждали до примерно 1°C . Порциями медленно вносили водный раствор гипохлорита натрия (7,9 мас.%) до полного израсходования исходного материала по данным крахмал/йодидного теста. Слои разделяли и водный слой подвергали экстракции МТБЭ. Объединенную органическую фазу сушили над MgSO_4 и концентрировали при пониженном давлении, получая указанный продукт в виде твердого вещества.

Получение (4-амино-7-йодпирроло[2,1-f][1,2,4]триазина):



К холодному раствору 4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазина (10,03 г; 74,8 ммоль) в N,N -диметилформамиде (70,27 г) порциями добавляли N -йодсукцинимид (17,01 г; 75,6 ммоль) при поддержании температуры смеси примерно 0°C . После завершения реакции (примерно через 3 ч при примерно 0°C) реакционную смесь переносили в 1 М водный раствор гидроксида натрия (11 г NaOH и 276 мл воды), поддерживая температуру смеси примерно $20-30^\circ\text{C}$. Полученную суспензию взбалтывали при примерно 22°C в течение 1,5 ч и затем фильтровали. Твердые вещества ополаскивали водой (50 мл) и сушили при примерно 50°C под вакуумом, получая 4-амино-7-йодпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин в виде твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,90 (s, 1H), 7,78 (ушир. s, 2H), 6,98 (d, $J=4,4$ Гц, 1H), 6,82 (d, $J=4,4$ Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, DMSO-d_6) δ 155,7, 149,1, 118,8, 118,1, 104,4, 71,9. MS $m/z = 260,97$ [M+H].

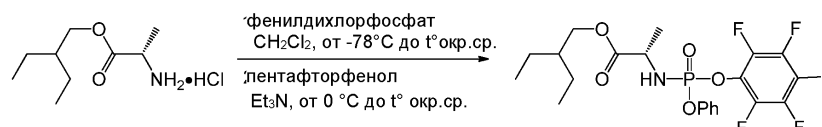
Получение (3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-ола через (4-амино-7-йодпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин)



В реактор в атмосфере азота вносили йодозамещенное основание 2 (81 г) и ТГФ (1,6 л). Полученный раствор охлаждали до примерно 5°C и вносили TMSCl (68 г). Затем медленно вносили PhMgCl (345 мл, 1,8 М в ТГФ), поддерживая внутреннюю температуру примерно $\leq 5^\circ\text{C}$. Реакционную смесь перемер-

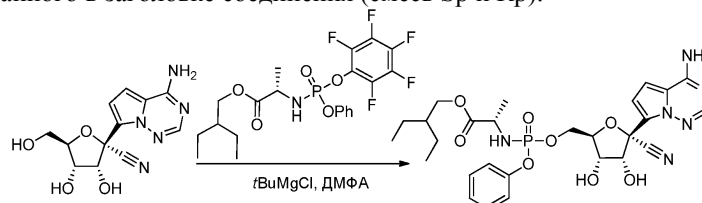
шивали при примерно 0°C в течение 30 мин и затем охлаждали до примерно -15°C. Медленно вносили $i\text{PrMgCl-LiCl}$ (311 мл, 1,1 М в ТГФ), поддерживая внутреннюю температуру ниже примерно -12°C. Через примерно 10 мин перемешивания при примерно -15°C реакционную смесь охлаждали до примерно -20°C и вносили раствор лактона **1** (130 г) в ТГФ (400 мл). Затем реакционную смесь встряхивали при примерно -20°C в течение примерно 1 ч и гасили AcOH (57 мл). Реакционную смесь нагревали до примерно 0°C и доводили pH до значения 7-8 с помощью водного NaHCO_3 (5 мас.%, 1300 мл). Затем реакционную смесь разбавляли EtOAc (1300 мл) и разделяли органический и водный слои. Органический слой промывали 1 н. HCl (1300 мл), водным NaHCO_3 (5 мас.%, 1300 мл) и соевым раствором (1300 мл), затем сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали до сухого состояния. Очистка с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с применением градиента смеси MeOH и EtOAc позволила получить указанный продукт.

Получение ((2S)-2-этилбутил-2-(((перфторфенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата) (смесь Sp и Rp):



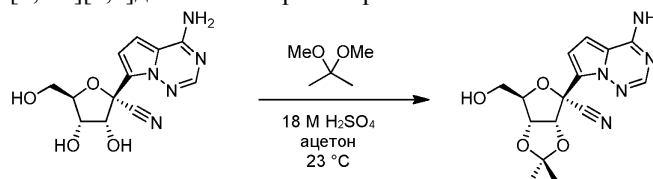
Гидрохлорид 2-этилбутилового эфира L-аланина (5,0 г, 23,84 ммоль) объединяли с метилхлоридом (40 мл), охлаждали до примерно -78°C и добавляли фенилдихлорфосфат (3,65 мл, 23,84 ммоль). Добавляли триэтиламин (6,6 мл, 47,68 ммоль) в течение примерно 60 мин при примерно -78°C и полученную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до примерно 0°C и добавляли пentaфторфенол (4,4 г, 23,84 ммоль). Добавляли триэтиламин (3,3 мл, 23,84 ммоль) в течение примерно 60 мин. Смесь перемешивали в течение примерно 3 ч при температуре окружающей среды и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в EtOAc , несколько раз промывали водным раствором карбоната натрия и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с применением градиента EtOAc и гексана (от 0 до 30%). Содержащие продукт фракции концентрировали при пониженном давлении, получая (2S)-2-этилбутил-2-(((перфторфенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат в виде твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,41-7,32 (m, 4H), 7,30-7,17 (m, 6H), 4,24-4,16 (m, 1H), 4,13-4,03 (m, 4H), 4,01-3,89 (m, 1H), 1,59-1,42 (m, 8H), 1,40-1,31 (m, 8H), 0,88 (t, $J=7,5$ Гц, 12H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, хлороформ-d) δ -1,52. ^{19}F ЯМР (377 МГц, хлороформ-d) δ -153,63, -153,93 (m), -160,05 (td, $J=21,9, 3,6$ Гц), -162,65 (qd, $J=22,4, 20,5, 4,5$ Гц). MS $m/z = 496$ [M+H].

Получение указанного в заголовке соединения (смесь Sp и Rp):



Объединяли указанный нуклеозид (29 мг, 0,1 ммоль), фосфоамид (60 мг, 0,12 ммоль) и N,N-диметилформамид (2 мл) при температуре окружающей среды. Медленно добавляли трет-бутилмагнийхлорид (1М в ТГФ, 0,15 мл). Через примерно 1 ч, реакционную смесь разбавляли этилацетатом, промывали водным раствором лимонной кислоты (5 мас.%), насыщенным водным раствором NaHCO_3 и насыщенным соевым раствором. Органическую фазу сушили над Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с применением градиента метанола и CH_2Cl_2 (от 0 до 5%). Содержащие продукт фракции концентрировали при пониженном давлении, получая указанный продукт.

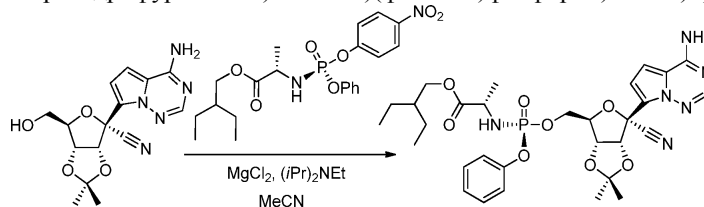
Получение (3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-6-(гидрокси-метил)-2,2-диметилтетрагидрофурано[3,4-d][1,3]диоксол-4-карбонитрила:



К смеси (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидрокси-метил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила (5,8 г, 0,02 моль), 2,2-диметоксипропана (11,59 мл, 0,09 моль) и ацетона (145 мл) при температуре окружающей среды добавляли серную кислоту (18М, 1,44 мл). Полученную смесь нагревали до примерно 45°C. Примерно через 30 мин смесь охлаждали до температуры окружающей среды и добавляли бикарбонат натрия (5,8 г) и воду (5,8 мл). Через 15 мин смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток вносили в этилацетат (150 мл) и воду (50 мл). Водный

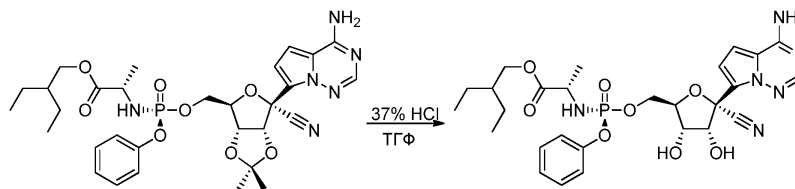
слой подвергали экстракции этилацетатом (2 × 50 мл). Объединенную органическую фазу сушили над сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении, получая неочищенный (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрил. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 7,84 (s, 1H), 6,93 (d, J=4,6 Гц, 1H), 6,89 (d, J=4,6 Гц, 1H), 5,40 (d, J=6,7 Гц, 1H), 5,00 (dd, J=6,7, 3,3 Гц, 1H), 4,48-4,40 (m, 1H), 3,81-3,72 (m, 2H), 1,71 (s, 3H), 1,40 (s, 3H). MS m/z = 332,23 [M+1].

Получение (2S)-2-этилбутил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидроокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата:



Объединяли ацетонитрил (100 мл) с (2S)-2-этилбутил-2-((((4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноатом (9,6 г, 21,31 ммоль), спиртом в качестве субстрата (6,6 г, 0,02 моль), хлоридом магния (1,9 г, 19,91 ммоль) при температуре окружающей среды. Смесь встряхивали в течение примерно 15 мин и добавляли N,N-диизопропилэтиламин (8,67 мл, 49,78 ммоль). Примерно через 4 ч реакцию смесь разбавляли этилацетатом (100 мл), охлаждали до примерно 0°C и объединяли с водным раствором лимонной кислоты (5 мас.%, 100 мл). Органическую фазу промывали водным раствором лимонной кислоты (5 мас.%, 100 мл) и насыщенным водным раствором хлорида аммония (40 мл), водным раствором карбоната калия (10 мас.%, 2 × 100 мл) и насыщенным водным солевым раствором (100 мл). Органическую фазу сушили с помощью сульфата натрия и концентрировали при пониженном давлении, получая неочищенный продукт. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 7,86 (s, 1H), 7,31-7,22 (m, 2H), 7,17-7,09 (m, 3H), 6,93-6,84 (m, 2H), 5,34 (d, J=6,7 Гц, 1H), 4,98 (dd, J=6,6, 3,5 Гц, 1H), 4,59-4,50 (m, 1H), 4,36-4,22 (m, 2H), 4,02 (dd, J=10,9, 5,7 Гц, 1H), 3,91 (dd, J=10,9, 5,7 Гц, 1H), 3,83 (dq, J=9,7, 7,1 Гц, 1H), 1,70 (s, 3H), 1,50-1,41 (m, 1H), 1,39 (s, 3H), 1,36-1,21 (m, 7H), 0,86 (t, J=7,4 Гц, 6H). MS m/z = 643,21 [M+1].

Получение (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидроокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата (Соединение 32)



Неочищенный ацетонид (12,85 г) объединяли с тетрагидрофураном (50 мл) и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток вносили в тетрагидрофуран (100 мл), охлаждали до примерно 0°C и медленно добавляли концентрированную HCl (20 мл). Смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры. После того, как исходный ацетонид был израсходован по данным анализа, проведенного посредством ВЭЖХ, добавляли воду (100 мл), а затем водный насыщенный раствор бикарбоната натрия (200 мл). Полученную смесь подвергали экстракции этилацетатом (100 мл), органическую фазу промывали водным насыщенным солевым раствором (50 мл), сушили над сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с применением градиента метанола и этилацетата (от 0 до 20%). Содержащие продукт фракции концентрировали при пониженном давлении, получая указанный продукт.

В. Противовирусная активность

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам подавления вирусных инфекций, включающим стадию воздействия на образец или субъекта, при предположительной необходимости такого подавления, с применением композиции согласно настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения образцы, предположительно содержащие вирус, включают природные или искусственные материалы, такие как живые организмы; культуры тканей или клеток; биологические образцы, такие как образцы биологического материала (кровь, сыворотка, моча, спинномозговая жидкость, слезы, мокрота, слюна, образцы тканей и тому подобное); лабораторные образцы; образцы продуктов питания, воды или воздуха; образцы биопродуктов, такие как экстракты клеток, в частности рекомбинантные клетки, синтезирующие желаемый гликопротеин; и тому подобное. Как правило, предполагается, что образец будет содержать организм, который вызывает вирусную инфекцию, часто патогенный организм, такой как опухолевый вирус. Образцы могут содержаться в любой среде, включая воду и смеси органический растворитель/вода. Образцы включают живые организмы, такие как люди, и искусственные материалы, такие как культуры клеток.

Если желательно, противовирусная активность соединения согласно настоящему изобретению после применения композиции может быть обнаружена любым способом, включая прямые и косвенные способы обнаружения такой активности. Предусмотрены количественные, качественные и полуколичественные способы обнаружения такой активности. Как правило, применяют один из способов скрининга, описанных ниже, однако применимы также любые другие способы, такие как наблюдение физиологических свойств живого организма.

Пример 8. Исследования противовирусной активности в отношении MERS-CoV и SARS-CoV и цитотоксичности

Противовирусную активность соединения 9 и соединения 32 измеряли в отношении вируса MERS (MERS-CoV) и вируса SARS (SARS-CoV).

Противовирусные исследования проводили в USAMRIID и Университете Северной Каролины в Чапел-Хилл.

Пример 9. Противовирусные исследования в отношении MERS-CoV (USAMRIID)

Клетки Vero E6 высевали в 384-луночные планшеты и добавляли серийные разведения соединения 32 или соединения 9 в аналитические планшеты прямым титрованием с использованием цифрового дозатора HP D300 (Hewlett-Packard, Пало-Альто, Калифорния). Планшеты переносили в помещение с BSL-4 и инфицировали MERS-CoV (штамм Jordan N3) при множественности заражения 0,5 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на клетку. Инфицированные культуры инкубировали в течение 48 ч. Уровень репликации вируса в обработанных соединением и контрольных, обработанных носителем, культурах определяли путем количественного определения уровня вирусспецифического антигена после иммунного окрашивания антителом против белка шипов (S) MERS-CoV. Первичное антитело (40069-RP02 gb - HCoV-EMC/2012 spike(S) protein) разводили в 1000 раз в блокирующем буфере (1× фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с 3% БСА) и добавляли в каждую лунку аналитического планшета. Аналитические планшеты инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Первичное антитело удаляли и клетки промывали 3 раза 1× ФСБ. Вторичное детектирующее антитело представляло собой IgG против иммуноглобулинов кролика, конъюгированный с Dylight488 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, № по каталогу 405310). Вторичное антитело разводили в 1000 раз в блокирующем буфере и добавляли в каждую лунку аналитического планшета. Аналитические планшеты инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Ядра окрашивали с применением Draq5 (Biostatus, Shepshed Leicestershire, UK, № по каталогу DR05500), разведенного в 1× ФСБ. Клетки контрастно окрашивали с применением CellMask Deep Red (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, № по каталогу C10046) для усиления обнаружения цитоплазматического компартмента. Изображения клеток были получены с использованием конфокального микроскопа Perkin Elmer Opera (Perkin Elmer, Waltham, MA) с использованием сухого объектива с 10-кратным увеличением для накопления 5 изображений на лунку. Вирусспецифический антиген количественно определяли путем измерения испускания флуоресценции при длине волны 488 нм, а ядра количественно определяли путем измерения испускания флуоресценции при длине волны 640 нм. Анализ многопараметрической визуализации проводили для количественного определения процента инфицированных клеток и жизнеспособности клеток. Анализ зависимости ответа от дозы для определения значений EC50 проводили с использованием программного обеспечения GeneData Screener, использующего алгоритм Левенберга-Марквардта (Levenberg-Marquardt) для стратегии подбора аппроксимирующей кривой.

Пример 10. Противовирусные исследования в отношении MERS-CoV и SARS-CoV

Культуры клеток НАЕ, выделенные из ткани легких, культивировали в течение 6 недель на границе раздела водной и воздушной сред, что способствует дифференцировке. Апикальные поверхности культур НАЕ промывали за 24 ч и за 1 ч до инфицирования 1× ФСБ в течение >1 ч при 37°C. Рекombинантный MERS-CoV, экспрессирующий красный флуоресцентный белок (MERS-CoV RFP), и SARS-CoV, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок (SARS-CoV GFP), использовали для апикального инфицирования дифференцированных культур НАЕ при множественности заражения 0,1 БОЕ на клетку. Для инфицирования культур НАЕ удаляли апикальные промывки, добавляли вирусный инокулят, и инокулированные культуры инкубировали при 37°C в течение 2,5 ч. Инокулят удаляли, а апикальные поверхности культур НАЕ промывали 3 раза 500 мкл 1× ФСБ для удаления остаточного вируса. Пять трехкратных серийных разведений соединения 9, начиная с 10 мкМ, готовили в трех повторностях и добавляли к среде НАЕ ALI на базолатеральную сторону культуры примерно за 30 мин до инфицирования. Репликацию вируса оценивали с помощью флуоресцентной визуализации культур клеток после 48-часового инкубирования. Помимо этого, репликацию вируса количественно определяли путем измерения продукции инфекционного вируса в апикальных промывках НАЕ с помощью анализа бляшкообразования на монослоях клеток Vero и путем количественного определения продукции вирусной РНК относительно общей РНК клетки методом ПЦР в реальном времени.

Таблица 2. Противовирусные исследования в отношении MERS
Таблица 2. Противовирусная активность соединения 32 в отношении коронавируса in vitro

	EC ₅₀ (мкМ)
Исследование	
Вирус	MERS-CoV
Линия клеток	Vero
Соединение 9	0,46
Соединение 32	0,58

MERS = ближневосточный респираторный синдром

Пример 11. Исследование MERS-CoV и SARS-CoV методом ПЦР в реальном времени

Через 48 ч после инфицирования первичные культуры HAE из противовирусных исследований, описанных выше, собирали в 500 мкл тризола. РНК очищали с использованием набора Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research Corporation, Ирвайн, Калифорния, США). Первую цепь кДНК получали для каждого образца с использованием Superscript III (Life Technologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк, США) с инкубацией при 55°C. После получения первой цепи кДНК количественно определяли ORF1 (геномная РНК) и ORF8 или ORF9 (субгеномная РНК MERS-CoV и SARS-CoV, соответственно) методом ПЦР в реальном времени с использованием следующих праймеров: MERS-CoV: Leader прямой (5'- GAA TAG CTTGGCTATCTCAC-3'), обратный ORF1 (5'-CACAAATCCCACCAGACAA-3'), обратный ORF8 (5'-TTG TTATCGGCAAAGGAAAC-3'); и SARS-CoV: Leader прямой (5'-AGCCAACCAACCTCGATC TCT TGT-3'), обратный ORF1 (5'- TGA CAC CAA GAA CAA GGC TCT CCA -3'), обратный ORF9 (5'- ATT GGT GTTGATTGGAACGCCCTG-3'). Считывания нормализовали по ГАФДГ с использованием следующих праймеров: прямой ГАФДГ (5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3') и обратный ГАФДГ (5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG -3'). Результаты выражают в виде log₁₀ кратности изменений количества копий вирусной РНК, кодирующей ORF1 и ORF8 (MERS-CoV)/и РНК, кодирующей ORF9 (SARS-CoV), в обработанных или необработанных клетках с использованием метода ΔΔCt {10431}.

Пример 12. Эффективность in vitro на клетках Calu-3 2B4

За 48 ч до инфицирования клетки Calu-3 2B4 высевали в 96-луночный планшет с черными стенками и прозрачным дном в количестве 5×10⁴ клеток/луночку. За 24 ч до инфицирования культуральную среду заменяли. 20 mM стоковый раствор соединения 32 последовательно разводили в 100% ДМСО с 3-кратным шагом для получения серии разведений из 10 точек. MERS-nLUC разводили в DMEM 10% ФБС и 1% антибиотиков/антимидина для достижения множественности заражения (МЗ), составляющей 0,08. Клетки инфицировали в трех параллельных экспериментах на каждое разведение лекарственного средства в течение 1 ч, после чего вирус отсасывали, культуры промывали один раз и добавляли свежую среду, содержащую лекарственное средство или носитель. Через 48 ч после инфицирования репликацию вируса количественно определяли на планшетном спектрофотометре Spectramax (Molecular Devices) с помощью набора для люциферазного анализа Nano-luciferase assay (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Для контроля со 100% подавления разбавленный MERS-nLUC подвергали действию коротковолнового ультрафиолетового излучения (LLC, Аплэнд, Калифорния) в течение 6 мин для подавления способности вируса к репликации. Для контроля с 0% подавления клетки инфицировали в присутствии носителя. Концентрация ДМСО поддерживали постоянной во всех условиях, равной 0,05% по объему (об./об.). Значения из трех параллельных лунок на каждое условие усредняли и сравнивали с контрольными значениями для получения значения процента подавления для каждого разведения лекарственного средства. Значение EC₅₀ определяли как концентрацию, при которой наблюдали снижение репликации вируса на 50%. Данные анализировали с использованием GraphPad Prism 6.0 (Ла Хойя, Калифорния). Значения EC₅₀ и CC₅₀ рассчитывали с помощью нелинейного регрессионного анализа с использованием уравнения зависимости ответа от дозы (изменяемый наклон) (четырепараметрическое логистическое уравнение): $Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{-(LogEC_{50} - X) * коэффициент Хилла})$. Значения "Bottom" и "Top" определены минимальным и максимальным значениями Y. Коэффициент Хилла является параметром, используемым для определения крутизны кривой зависимости ответа от дозы. Значения EC₅₀ и CC₅₀ рассчитывали как среднее из двух-четырех независимых экспериментов.

Таблица 3. Противовирусная активность соединения 1 и соединения 32 в отношении MERS-CoV и SARS-CoV и цитотоксичности

	EC ₅₀ (мкМ) ¹		CC ₅₀ (мкМ)
	MERS	SARS	
Соединение 1	0,46 (HAE) -- (Calu-3)	0,22 (HAE) -- (Calu-3)	>100 (HAE) >100 (Calu-3)
Соединение 32	0,074 (HAE) 0,03 (Calu-3)	0,069 (HAE) 0,01 (Calu-3)	>10 (HAE) >10 (Calu-3)

¹Все значения представляют собой средние из > 3 независимых экспериментов. HAE = эпителиальные клетки дыхательных путей человека. Calu-3 = линия эпителиальных клеток легких человека Calu-3 (Calu3-2B4). Проводили исследования HAE от трех доноров.

Пример 13. Оценка действия соединения 32 против коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) при подкожном введении мышам с дефицитом эстеразы (Ces1c-/-)

У самцов и самок мышей (25-28 недель) генетически удаляли карбоксилэстеразу 1С (Ces1c-/-) (Jackson Laboratories stock 014096). Мышей (Ces1c-/-) использовали, поскольку грызуны демонстрируют высокие уровни активности карбоксилэстеразы в плазме относительно других видов животных, уменьшая период полувыведения соединения 32 из плазмы. Генетическая делеция карбоксилэстеразы 1С улучшает стабильность соединения 32 в плазме с получением фармакокинетических профилей, аналогичных тем, которые наблюдают у людей и других видов животных.

Схема исследования отражена в таблице 4. Исследования эффективности проводили в лаборатории с уровнем биологической безопасности животных 3 (ABSL3). Все работы проводились в соответствии с протоколами, одобренными Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию при Университете Северной Каролины в Чапел-Хилл в соответствии с принципами, установленными Ассоциацией по аттестации и аккредитации содержания лабораторных животных (AAALAC) и Министерством сельского хозяйства США (USDA).

Таблица 4. Схема эксперимента (подкожная инъекция)

Группа	Кол-во самцов/ самок	Лечение	Доза соединения 32 (мг/кг)	Интервалы и длительность	Заражение
1	6/6	Носитель	0	два раза в день, дни 1-5	SARS-CoV
2	4/4	Соединение 32 в носителе	25	два раза в день, дни 1-5	
3	6/6	Соединение 32 в носителе	50	один раз в день, дни 1-5	
4	1/2	Носитель	0	два раза в день, дни 1-5	Без вируса
5	2/1	Соединение 32 в носителе	25	два раза в день, дни 1-5	

Группу 1 (носитель), группу 2 (соединение 32, 25 мг/кг два раза в день) и группу 3 (соединение 32, 50 мг/кг один раз в день) анестезировали кетамин/ксилазином и подвергали воздействию 10^4 БОЕ SARS-CoV/50 мкл интраназальным путем. Группу 4 (носитель) и группу 5 (соединение 32, 25 мг/кг два раза в день) оставляли неинфицированными и использовали в качестве контролей для оценки плетизмографии всего тела. Носитель содержал 12% сульфобутилового эфира бета-циклодекстрина в воде (с HCl/NaOH) при pH 5,0). В 0 день животных подвергали воздействию вируса. На 2 и 5 дни после инфицирования группы животных подвергали эвтаназии передозировкой изофлурана, и большую левую долю легкого помещали в 2 мл пробирку с завинчивающейся крышкой с 1 мл DPBS со стеклянными шариками и замораживали при -80°C до анализа бляшкообразования. Нижнюю правую долю помещали в 10% забуференный формалин и хранили при 4°C до гистологического анализа.

Изменения функции легких определяли с помощью плетизмографии всего тела (WBP, Buxco lung function testing system, Data Sciences International). После 30 минут адаптации к камере плетизмографа 11 респираторных реакций и несколько контрольных показателей качества непрерывно измеряли каждые 2 с в течение 5 мин, всего 150 экспериментальных точек. Средние значения для каждого параметра определяли с помощью программного обеспечения DSI Finpoint.

Гистологический анализ проводили на фиксированных в формалине образцах и залитых парафином образцах тканей толщиной 5 мкм. Для оценки патологии легких участки окрашивали гематоксилином и эозином. Вирусный антиген в легком окрашивали с применением поликлонального антитела к нуклеокапсиду (Imgenex). Срезы маскировали для оценивающего эксперта и оценивали в отношении связанной с вирусом патологии легких, а также пространственного расположения и распространенности вирусного антигена. Изображения были получены с помощью микроскопа Olympus BX41, оснащенного камерой Olympus DP71.

Анализ вирусной бляшки использовали для количественного определения инфекционного вируса в замороженной ткани легкого. Клетки Vero E6 высевали в 6-луночные планшеты в количестве 5×10^5 клеток/лунку. Ткань легкого размораживали, гомогенизировали с помощью Roche Magnalyzer, и суспензию ткани последовательно разводили, а разведения использовали для инфицирования клеток Vero E6. Через 72 ч после инфицирования планшеты фиксировали и окрашивали, а количество бляшек определяли путем визуального осмотра.

Первичной конечной точкой для этого исследования являлась вирусная нагрузка в ткани легкого на 5 день после инфицирования. Дополнительные конечные точки включали изменения массы тела животных и функции легких. Массу тела животных при жизни регистрировали ежедневно. На -1, 1, 2, 3 и 5 дни после инокуляции проводили плетизмографию всего тела для оценки функции легких. На 5 день проводили запланированное вскрытие всех оставшихся животных; макропатология легких была оценена аттестованным ветеринарным патологом. Ткань легкого собирали для гистопатологического и вирусологического

ского анализа.

Масса тела и вирусная нагрузка: изменения массы тела и вирусной нагрузки ткани для каждой исследуемой группы на 5 день показаны на фиг. 1, 2А и 2В. Как показано на фиг. 1, животные, получавшие соединение 32, не продемонстрировали признаков потери массы, связанной с инфекцией SARS-CoV, по сравнению с животными, получавшими носитель. Содержание инфекционного вируса измеряли в легочной ткани, собранной при вскрытии, с помощью анализа бляшкообразования. Как показано на фиг. 2А и 2В, содержание инфекционного вируса было значительно снижено у животных, получавших соединение 32, на 2 и 5 дни после инфицирования по сравнению с животными, получавшими носитель. Эти данные показывают, что соединение 32 снижает репликацию SARS-CoV в легких.

Измерение функции легких: влияние лечения с применением соединения 32 на функцию легких у мышей, инфицированных SARS-CoV, оценивали с помощью плетизмографии всего тела (WBP) (фиг. 3А-3F). WBP показала повышение значений Penh (произведение длительности паузы и отношения максимальных давлений на выдохе и вдохе) у мышей, получавших носитель, что свидетельствует о том, что репликация вируса в легких усиливает сопротивление дыхательных путей. У животных, получавших либо 25 мг/кг соединения 32 два раза в день, либо 50 мг/кг соединения 32 один раз в день, значения Penh были ниже по сравнению с животными, получавшими носитель, и были более похожи на значения у ложноинфицированных животных.

У получавших носитель мышей, инфицированных SARS-CoV, длительность дыхания (длительность выдоха) или время между вдохами (конечная экспираторная пауза), измеренные с помощью WBP, увеличивались, указывая на затрудненное дыхание. Как показано на фиг. 3А-3F, эти параметры дыхания были снижены у животных, получавших соединение 32, приближаясь к значениям, полученным от ложноинфицированных животных.

Пример 14. Слепая рандомизированная контролируемая оценка действия соединения 32 против коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) при внутривенном введении макакам-резусам

Изолят MERS-CoV HCoV-EMC/2012 использовали для заражения вирусом в испытательной лаборатории. Изолят MERS-CoV HCoV-EMC/2012 был предоставлен Отделом вирусологии Медицинского центра Эразмуса, Роттердам, Нидерланды, и размножен в клетках VeroE6 в DMEM (Sigma) с добавлением 2% (об./об.) FCS (Logan), 1 mM L-глутамин (Lonza), 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Gibco). Самцы макаков-резусов, ранее не используемые в эксперименте, были случайным образом разделены на группы лечения и уравнены по массе тела.

Схема исследования отражена в табл. 5.

Таблица 5. Схема эксперимента (внутривенно)

Группа	Кол-во самцов/ самок	Лечение	Доза соединения 32 (мг/кг)	Интервалы и длительность *	Заражение
1	6/0	Носитель	0	Один раз в день, дни 1-6	MERS-CoV
2	6/0	Соединение 32 в носителе	10	Один раз в день, дни 1-6	

Всех животных подвергали действию целевой дозы 7×10^6 бляшкообразующих единиц вируса MERS-CoV, разведенного в 0,9% хлориде натрия, для инокуляции. Животных инокулировали несколькими путями, которые включали интраназальное, глазное и интратрахеальное введение. День, на который животных заражали, обозначали как день 0.

Методы контроля систематической ошибки включали экспериментальное ослепление. В частности, исследовательский персонал, который вводил соединение 32 или носитель или регулярно оценивал здоровье животных, был экспериментально ослеплен в отношении распределения по группам всех животных на протяжении фазы жизни. Неослепленный персонал, который не отвечал за оценку здоровья животных, готовил отдельные дозы из нерасфасованных готовых к использованию составов, предоставленных спонсором. Составы с носителем и соединением 32 были идентичны по внешнему виду.

В группах 1 и 2 лечение носителем один раз в день вводили в течение 7 дней, начиная с -1 дня (за один день до заражения вирусом). Каждую дозу соединения 32 или носителя вводили в виде отдельной болюсной медленной в/в инъекции в подкожную вену в объеме 2,0 мл/кг массы тела в течение 1-2 мин. Дозы вводили животным, анестезированным с применением в/м инъекции раствора, содержащего кетамин (100 мг/мл) и ацепромазин (10 мг/мл), в объеме 0,1 мл/кг массы тела. Массу каждого животного определяли на 7 день, и эти массы использовали при определении объема дозы для всех вводимых доз соединения 32 или носителя.

Первичной конечной точкой для этого исследования являлась вирусная нагрузка в ткани легких на 6 день после инфицирования. Здоровье животных контролировали по меньшей мере два раза в день на протяжении фазы жизни и фиксировали клинические признаки болезни. На -7, 0, 1, 3, 5 и 6 дни после инокуляции проводили клиническую оценку всех животных для определения массы тела, температуры тела, частоты дыхательных движений/минуту (под анестезией) и для сбора рентгенограмм, мазков из носа и горла. Цельную кровь и сыворотку собирали для анализа гематологии, биохимии и цитокинов. На

6 день проводили запланированное вскрытие всех животных; макропатология легких была оценена (в % от легочной доли, затронутой макроскопическими поражениями) аттестованным ветеринарным патологом, и массу легких фиксировали для определения отношения масса легких/масса тела. Девятнадцать тканей собирали для гистопатологического и вирусологического анализа.

Признаки заболевания у животных, получавших носитель, были связаны с инфекцией MERS-COV. Суммарные клинические показатели были заметно выше у животных, получавших носитель, по сравнению с животными, получавшими соединение 32. Эти симптомы заболевания были менее выражены у животных, получавших соединение 32.

Масса тела и вирусная нагрузка: изменения массы тела, температуры и дыхания показаны на фиг. 4А-4С. Масса тела и температура тела заметно не изменялись в течение инфекции в присутствии или отсутствие лечения соединением 32. Частота дыхания увеличивалась в течение инфекции и, как правило, была выше на 6 день у животных, получавших носитель, по сравнению с животными, получавшими соединение 32.

Вирусная нагрузка в тканях: вирусную РНК измеряли в ткани легких и других органов, собранных при вскрытии. Изменения в концентрации вирусной РНК в тканях для каждой исследуемой группы на 6 день показаны на фиг. 5. Вирус был обнаружен во всех тканях дыхательных путей у животных, получавших носитель. Вирусная РНК в дыхательных путях была значительно снижена у животных, получавших соединение 32. Вирусная РНК была ниже предела обнаружения у получавших и не получавших лечение животных в ткани печени, селезенки, почек и мочевого пузыря. Вирусная РНК была обнаружена у всех животных в медиастинальном лимфатическом узле, но только у одного получавшего носитель животного в подчелюстном лимфатическом узле.

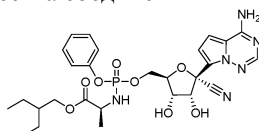
Вирус был обнаружен в мазках из носа и мазках из горла на 1, 3, 5 и 6 дни после инфицирования. Не наблюдали различий в вирусной нагрузке между получавшими носитель и получавшими соединение 32 животными. Вирусная РНК была обнаружена у одного получавшего носитель животного в моче, собранной на 6 день. Изменения в количестве лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов показаны на фиг. 5.

Все публикации, патенты и патентные документы, цитируемые выше в настоящем описании, включены в настоящее описание посредством ссылки, как если бы они были по отдельности включены посредством ссылки.

Настоящее изобретение было описано со ссылкой на различные конкретные и предпочтительные варианты реализации и способы. Однако специалисту в данной области техники будет понятно, что могут быть выполнены многие вариации и модификации без отступления от сущности и объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения инфекции Coronaviridae у человека, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения



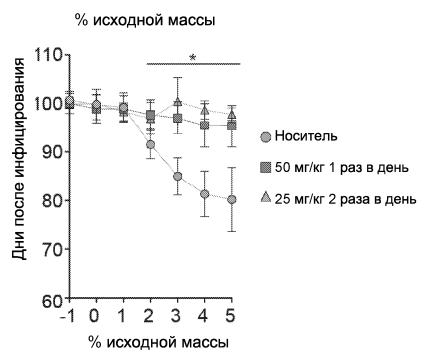
или его фармацевтически приемлемой соли.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий введение фармацевтически приемлемого носителя или вспомогательного вещества.

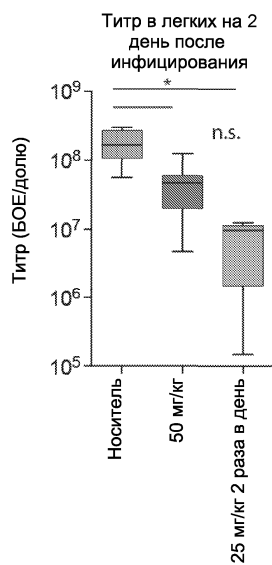
3. Способ по п.1, дополнительно включающий введение терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного другого терапевтического агента или его композиции, выбранного из группы, состоящей из кортикостероида, противовоспалительного модулятора передачи сигнала, бронходилататора - агониста β_2 -адренорецептора, антихолинергетика, муколитического агента, гипертонического солевого раствора и других лекарственных средств для лечения инфекции, вызванной вирусом Coronaviridae, или их смесей.

4. Способ по п.1, где инфекция Coronaviridae вызвана вирусом Coronaviridae.

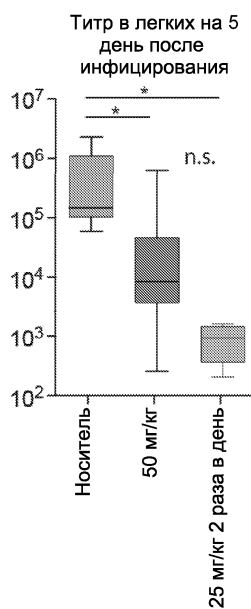
5. Способ по п.1, где инфекция Coronaviridae вызвана вирусом Coronaviridae, выбранным из SARS, MERS, 229E, NL63, OC43 и HKU1.



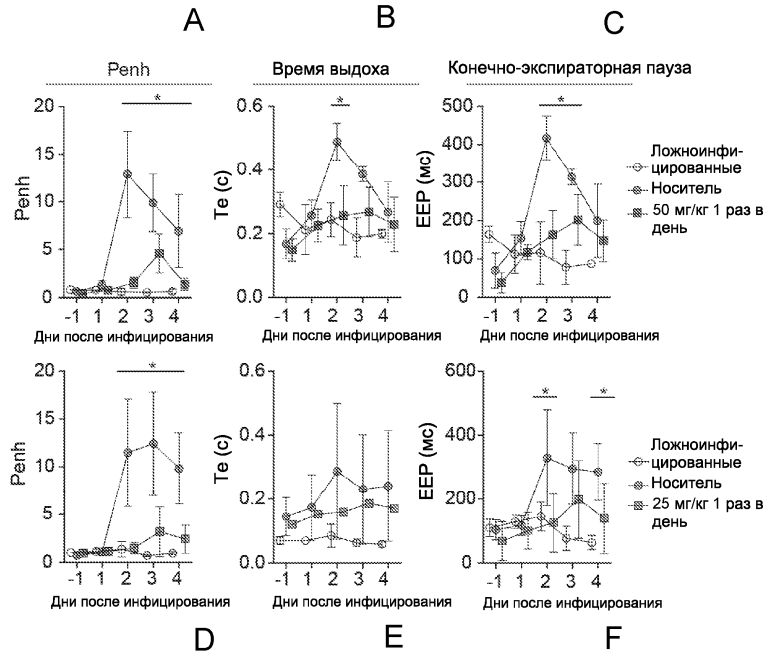
Фиг. 1



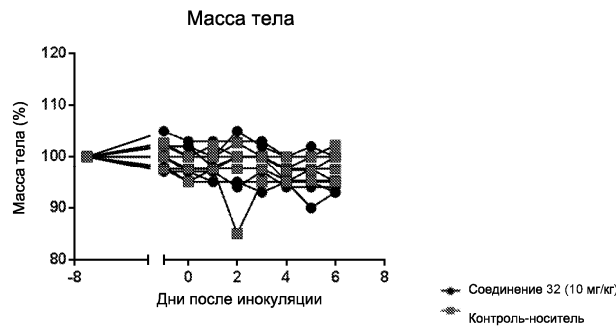
Фиг. 2А



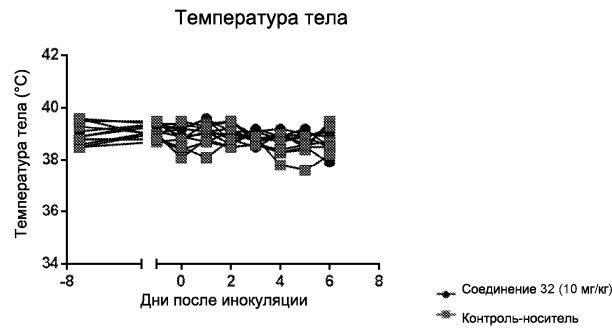
Фиг. 2В



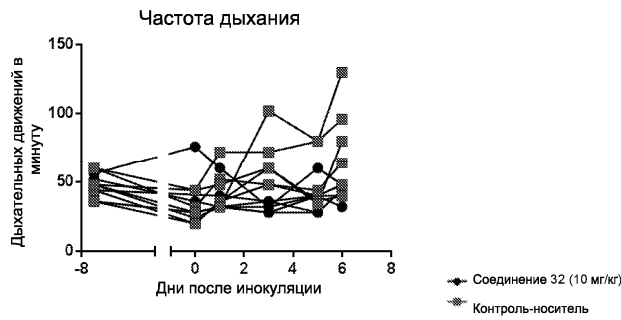
Фиг. 3А-Ф



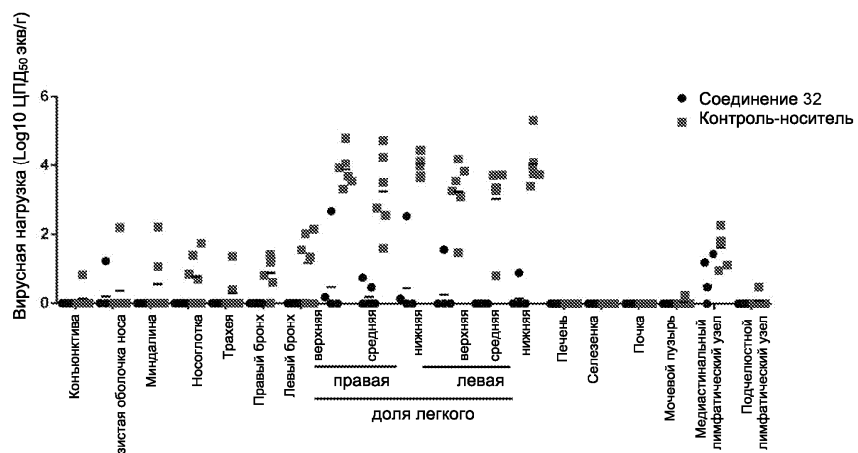
Фиг. 4А



Фиг. 4В



Фиг. 4С



Фиг. 5

