

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393047 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.06.10(22) Дата подачи заявки
2022.06.17(51) Int. Cl. *A61K 31/395* (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(54) ЭФФЕКТИВНАЯ КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ПРОТИВ HCV

(31) 63/212,047

(32) 2021.06.17

(33) US

(86) PCT/US2022/034083

(87) WO 2022/266497 2022.12.22

(71) Заявитель:
АТЕА ФАРМАСЬЮТИКАЛС, ИНК.
(US)

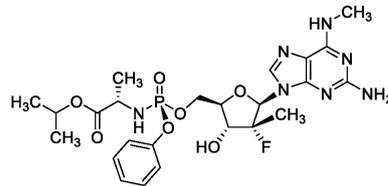
(72) Изобретатель:

Соммадосси Жан-Пьер, Мусса Адель,
Пьетропаоло Кит М., Чжоу Сяо-Цзянь
(US)

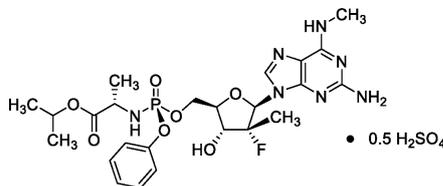
(74) Представитель:

Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В.,
Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А. (RU)

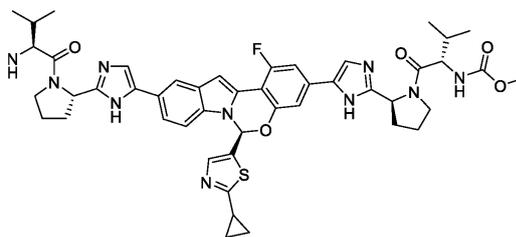
(57) Синергическая фармацевтическая комбинация соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли (например, соединения 1-А) и соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли, а также ее применение для лечения гепатита С или состояния, связанного с гепатитом С, а также способы изготовления фармацевтической комбинации. Соединения 1, 1-А и 2



Соединение 1



Соединение 1-А



Соединение 2

A1

202393047

202393047

A1

ЭФФЕКТИВНАЯ КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ПРОТИВ HCV

ОПИСАНИЕ

Ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с предварительной заявкой США № 63/212047, поданной 17 июня 2021 г. Эта заявка включена в настоящий документ в полном объеме и для всех целей путем ссылки на нее.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение предоставляет фармацевтическую комбинацию специфического ингибитора полимеразы NS5B и специфического ингибитора NS5A для эффективной и синергической терапии инфекции, вызванной HCV.

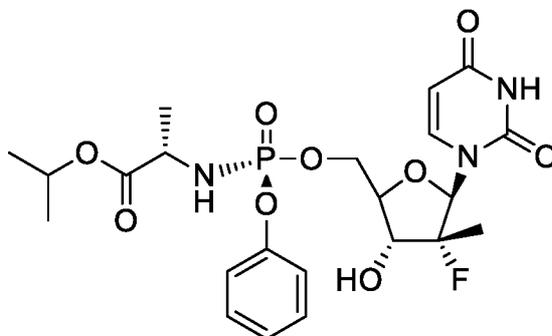
Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Вирус гепатита С (HVC) представляет собой одноцепочечный РНК-вирус, и он принадлежит к роду *Hepacivirus*. Подсчитано, что большинство всех случаев заболеваний печени вызвано HVC. Инфекция HVC может привести к циррозу и раку печени, а если допустить ее прогрессирование, то и к печеночной недостаточности, которая может потребовать трансплантацию печени.

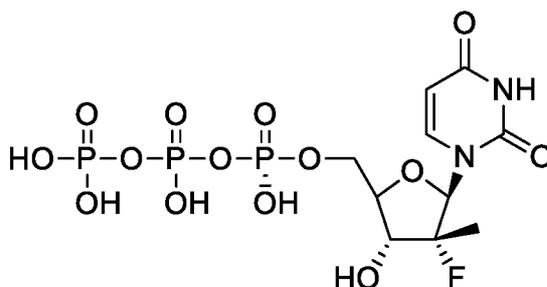
РНК-полимераза является ключевой мишенью для разработки лекарственных средств против одноцепочечных РНК-вирусов. Неструктурный белок NS5B HCV в РНК-зависимой полимеразе является ключевым ферментом, ответственным за инициацию и катализ синтеза вирусной РНК. Существует два основных подкласса ингибиторов NS5B: нуклеозидные аналоги и нуклеозидные ингибиторы (НИИ). Нуклеозидные аналоги анаболизируются до активных трифосфатов, которые действуют как альтернативные субстраты для полимеразы. Нуклеозидные ингибиторы (НИИ) связываются с аллостерическими участками белка. Нуклеозидные или нуклеотидные ингибиторы имитируют природные субстраты полимеразы и действуют как терминаторы цепи. Они ингибируют инициацию транскрипции РНК и/или удлинение образующейся цепи РНК.

Помимо нацеливания на РНК-полимеразу, для лечения также можно использовать в качестве мишени для нацеливания и другие белки РНК-вирусов. Примерами белков HVC, которые являются дополнительными мишенями для терапевтических подходов, являются NS3/4A (сериновая протеаза) и NS5A (неструктурный белок, который является важным компонентом репликазы HVC, оказывающий ряд различных воздействий на клеточные пути).

В декабре 2013 года был одобрен софосбувир, первый нуклеозидный ингибитор полимеразы NS5B (Sovaldi[®], Gilead Sciences). Совальди (Sovaldi[®]) является пролекарством, и представляет собой фосфорамидат уридина, который поглощается гепатоцитами и подвергается внутриклеточной активации с образованием активного метаболита, 2'-дезоксидезокси-2'-α-фтор-β-С-метилуридин-5'-трифосфата.



Совальди (Sovaldi[®])



2'-дезоксидезокси-2'-α-фтор-β-С-метилуридин-5'-трифосфат

Совальди (Sovaldi[®]) - первый препарат, обладающий достаточной безопасностью и эффективностью при лечении некоторых типов инфекции HVC, без необходимости одновременного применения интерферона. Совальди - третий препарат, получивший статус «революционной терапии» из числа препаратов, одобренных FDA (Управление по контролю за продуктами и лекарствами (США)).

Для лечения инфекции, вызванной HVC, одобрен ряд комбинаций препаратов с фиксированными дозировками. В 2014 году FDA одобрило препарат Harvoni[®] (ледиспасвир, ингибитор NS5A, и софосбувир) для лечения хронического гепатита С, вызванного вирусом гепатита С, генотипа 1. Harvoni[®] - первая комбинированная таблетка, одобренная для лечения хронической инфекции HVC генотипа 1. Это также первая одобренная схема лечения, не требующая введения интерферона или рибавирина. Кроме того, FDA одобрило симепревивр (Olysio[™]) в сочетании с софосбувиром (Sovaldi[®]) в качестве перорального препарата, принимаемого один раз в день, не содержащего интерферон и рибавирин, для лечения взрослых с инфекцией HVC генотипа 1.

FDA также одобрило лекарственное средство VIEKIRA Pak™ от компании AbbVie, представляющее собой упаковку из нескольких таблеток, содержащую дасабувир (ненуклеозидный ингибитор полимеразы NS5B), омбитасвир (ингибитор NS5A), паритапревир (ингибитор NS3/4A) и ритонавир. VIEKIRA Pak™ можно использовать с рибавирином или без него для лечения пациентов, инфицированных вирусом гепатита С генотипа 1, включая пациентов с компенсированным циррозом печени. При лечении лекарственным средством VIEKIRA Pak™ сопутствующей терапии интерфероном не требуется.

В июле 2015 года FDA одобрило лекарственные препараты Technivie™ и Daklinza™ для лечения инфекции, вызванной HVC, соответственно 4-го и 3-го генотипа. Лекарственный препарат Technivie™ (омбитасвир/паритапревир/ритонавир) был одобрен для использования в сочетании с рибавирином для лечения инфекции, вызванной HVC, 4-го генотипа у пациентов без рубцов и цирроза печени, и он является первым вариантом для пациентов, инфицированных HVC-4, которым не требуется одновременный прием интерферона. Лекарственный препарат Daklinza™ был одобрен для использования в сочетании с Совальди для лечения инфекций HVC генотипа 3. Daklinza™ является первым препаратом, обладающим достаточной безопасностью и эффективностью при лечении HVC 3-го генотипа, при использовании которого не требуется одновременного использования интерферона или рибавирина. В октябре 2015 года FDA предупредило, что лечение гепатита С с использованием лекарственного средства Viekira Pak и препарата Technivie может вызвать серьезное повреждение печени, и прежде всего, у пациентов с запущенным заболеванием печени, и в этой связи потребовало, чтобы на этикетке была добавлена дополнительная информация о безопасности.

В августе 2017 года FDA одобрило препарат Mavyret® (глекапревир/пибрентасвир) для лечения пациентов с инфекцией HVC всех основных генотипов (генотипы 1-6). Этот препарат также был одобрен для лечения пациентов без цирроза печени или с легким циррозом печени, пациентов, находящихся на диализе, и пациентов с инфекцией генотипа 1, которые ранее лечились с использованием средств, держащих ингибитор NS5A или NS3/4A. Пациенты без цирроза печени, которые ранее не лечились, принимают Mavyret® 8-недельным курсом. В 2019 году FDA одобрило 8-недельный курс лечения для пациентов с компенсированным циррозом печени и ранее не проходивших лечение.

Наряду с Mavyret®, препарат Epclusa® является еще одним препаратом для лечения гепатита С. Этот препарат был разработана компанией Gilead, и он представляет собой комбинированное средство с фиксированными дозировками, содержащее софосбувир (ингибитор NS5B) и велпатасвир (ингибитор NS5A). Препарат Epclusa® был одобрен в

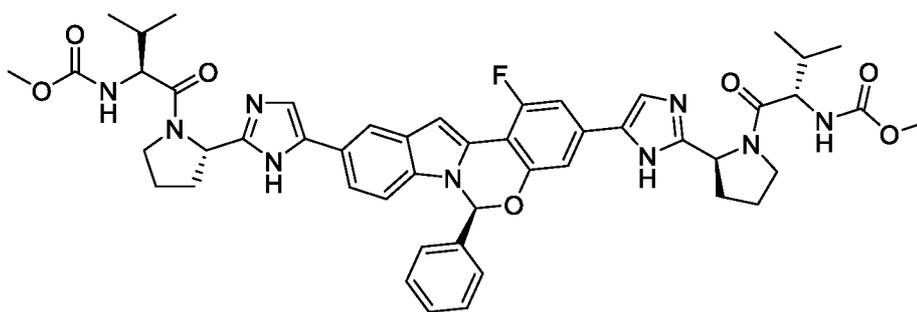
2016 году для лечения взрослых с хронической инфекцией HVC всех основных генотипов (генотипы 1-6), и он назначается 12-недельным курсом для пациентов без цирроза печени или с компенсированным циррозом печени. У пациентов с декомпенсированным циррозом печени препарат Epclusa® разрешен к применению в сочетании с рибавирином.

Другие одобренные методы лечения гепатита С предусматривают использование при лечении интерферона альфа-2b или пегилированного интерферона альфа-2b (Pegintron®), которые можно назначать вместе с рибавирином (Rebetol®) теллапревиром NS3/4A (Incivek®, Vertex и Johnson & Johnson), боцепревиром (Victrelis™, Merck), симепревир (Olysio™, Johnson & Johnson), паритапревиром (AbbVie), омбитасвиром (AbbVie) и нуклеозидным ингибитором дасабувиром (ABT-333).

Патенты США и заявки ВО, в которых описаны ингибиторы нуклеозидной полимеразы для лечения Flaviviridae, включая HCV, включают патенты, выданные на имя Idenix Pharmaceuticals (патенты США №№ 6812219; 6914054; 7105493; 7138376; 7148206; 7157441; 7163929; 7169766; 7192936; 7365057; 7384924; 7456155; 7547704; 7582618; 7608597; 7608600; 7625875; 7635689; 7662798; 7824851; 7902202; 7932240; 7951789; 8193372; 8299038; 8343937; 8362068; 8507460; 8637475; 8674085; 8680071; 8691788 8742101 8951985; 9109001; 9243025; US2016/0002281; US2013/0064794; WO/2015/095305; WO/2015/081133; WO/2015/061683; WO/2013/177219; WO/2013/039920; WO/2014/137930; WO/2014/052638; WO/2012/154321); Merck (патенты США №№ 6777395; 7105499; 7125855; 7202224; 7323449; 7339054; 7534767; 7632821; 7879815; 8071568; 8148349; 8470834; 8481712; 8541434; 8697694; 8715638 9061041; 9156872 и WO/2013/009737); Emory University (патенты США №№ 6348587; 6911424; 7307065; 7495006; 7662938; 7772208; 8114994; 8168583; 8609627; US 2014/0212382 и WO2014/1244430); Gilead Sciences / Pharmasset Inc. (патенты США №№ 7842672; 7973013; 8008264; 8012941; 8012942; 8318682; 8324179; 8415308; 8455451; 8563530; 8841275; 8853171; 8871785; 8877733; 8889159; 8906880; 8912321; 8957045; 8957046; 9045520; 9085573; 9090642 и 9139604) и (патенты США №№ 6908924; 6949522; 7094770; 7211570; 7429572; 7601820; 7638502; 7718790; 7772208; 7842015; 7919247; 7964580; 8093380; 8114997; 8173621; 8334270; 8415322; 8481713; 8492539; 8551973; 8580765; 8618076; 8629263; 8633309; 8642756; 8716262; 8716263; 8735345; 8735372; 8735569; 8759510 и 8765710); Hoffman La Roche (патент США № 6660721); Roche (патенты США №№ 6784166; 7608599 7608601 и 8071567); Alios BioPharma Inc. (патенты США №№ 8895723; 8877731; 8871737 8846896 8772474; 8980865; 9012427; US 2015/0105341; US 2015/0011497; US 2010/0249068; US2012/0070411; WO 2015/054465; WO 2014/209979; WO 2014/100505; WO 2014/100498; WO 2013/142159; WO 2013/142157; WO 2013/096680; WO 2013/088155; WO 2010/108135);

Enanta Pharmaceuticals (патенты США №№ 8575119; 8846638; 9085599; WO 2013/044030; WO 2012/125900); Biota (патенты США №№ 7268119; 7285658; 7713941; 8119607; 8415309; 8501699 и 8802840); Biocryst Pharmaceuticals (патенты США №№ 7388002; 7429571; 7514410; 7560434; 7994139; 8133870; 8163703; 8242085 и 8440813); Alla Chem LLC (патент США № 8889701 и WO 2015/053662); Inhibitex (8759318 и WO/2012/092484); Janssen Products (патенты США №№ 8399429; 8431588 8481510 8552021 8933052; 900629 и 9012428); The University of Georgia Foundation (патенты США №№ 6348587; 7307065; 7662938; 8168583; 8673926 8816074; 8921384 и 8946244); RFS Pharma LLC (8895531; 8859595; 8815829; 8609627; 7560550; US 2014/0066395; US 2014/0235566; US 2010/0279969; WO/2010/091386 и WO 2012/158811); University College Cardiff Consultants Limited (WO/2014/076490 WO 2010/081082; WO/2008/062206); Achillion Pharmaceuticals Inc. (WO/2014/169278 и WO 2014/169280); Cocrystal Pharma Inc. (US 9173893); Katholieke Universiteit Leuven (WO 2015/158913); Catabasis (WO 2013/090420); и The Regents of the University of Minnesota (WO 2006/004637).

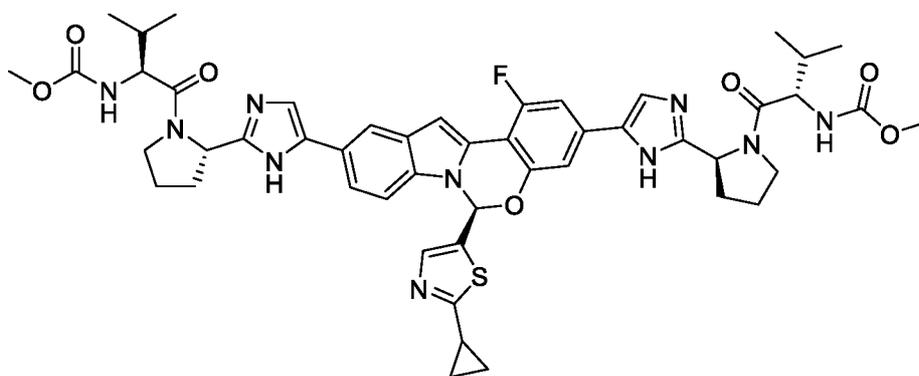
Эльбасвир, являющийся ингибитором NS5A вируса гепатита С, одобрен FDA в 2016 году в качестве компонента комбинации с grazoprevиром, ингибитором протеазы NS3/4A, применяемой с фиксированной дозировкой. Эта комбинация (как препарат Zepatier[®]) одобрена для лечения пациентов, ранее не получавших лечение, и для пациентов, ранее проходивших лечение. Обычная продолжительность курса лечения составляет 12 недель. Однако, для достижения эффекта у пациентов с HVC генотипа 1a с мутациями в положениях 28, 30, 31 и/или 93, Zepatier[®] необходимо принимать в течение 16 недель вместе с рибавирином. В отношении рибавирина FDA опубликовала несколько предупреждений, в том числе о риске гемолитической анемии и тератогенности.



Эльбасвир (МК-8742)

Рузасвир (МК-8408) представляет собой пероральный пангенотипный ингибитор NS5A, который прошел клинические испытания по лечению хронической инфекции HVC. Рузасвир обладает от суб- до низко-пиколярным сродством к NS5A HVC в отношении широкого спектра генотипов HVC и распространенных клинических мутантов, включая

HVC генотипа 1 с мутациями Y93H, Q30R, L31V и Y93C (Tong et al. “Discovery of Ruzasvir (MK-8408): A Potent, Pan-Genotype HCV NS5A Inhibitor with Optimized Activity against Common Resistance-Associated Polymorphisms” J. Med. Chem. 2017, 60, 290-306). WO 2014/110705 и патент США № 9555038, переданный компании Merck and Company, раскрывают рузасвир, фармацевтические композиции, содержащие рузасвир, и способы их применения.



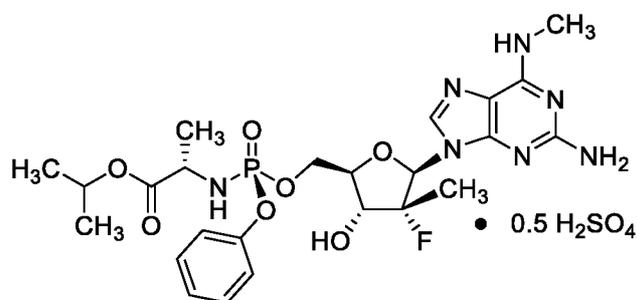
Рузасвир (МК-8408)

В 2015 году компании Merck, Sharp & Dohme спонсировали клинические испытания по оценке эффективности grazoprevira и uprifosbuvira в сочетании с эльбасвиром или рузасвиром для лечения пациентов с HVC различных генотипов. Схема из трех указанных препаратов позволила добиться устойчивого вирусологического ответа через 12 недель у 85-100% пациентов, инфицированных HVC различных генотипов (см, например, NCT02332707, NCT02332720, Lawitz, E. «Safety and efficacy of a fixed-dose combination regimen of grazoprevir, ruzasvir and uprifosbuvir with or without ribavirin in participants with and without cirrhosis with chronic hepatitis C virus genotype 1, 2, or 3 infection (C-CREST-1 and C-CREST-2, part B): two randomized, phase 2, open-label trials» 2017, Lancet Gastroenterol Hepatol, doi:10.1016/S2468-1253(17)30163-2). Гразопревир, один из компонентов схемы из трех препаратов, является ингибитором протеазы NS3/4A. Этот класс терапевтических средств может вызывать лекарственное взаимодействие и повышение уровня печеночных трансаминаз.

В 2016 году компания Merck начала открытые клинические исследования фазы II рузасвира и ингибитора NS5B уприфосбувира в схеме из двух препаратов без ингибитора NS3/4A. При изученной дозе 60 мг рузасвира в день и 450 мг уприфосбувира в день, эта комбинация хорошо переносилась, но наблюдалась субоптимальная эффективность, и клиническое исследование было прекращено (C-BREEZE 1; NCT02759315). Та же комбинация, но в более высоких дозах (180 мг рузасвира в день, 450 мг уприозбувира в день), позволила достичь устойчивого вирусологического ответа более чем у 90%

участников, инфицированных HVC генотипов GT1, GT2, GT4, GT5 и GT6. Однако ответ у участников, инфицированных GT3, составил лишь 73,8%. Кроме того, более 30% участников исследования столкнулись с нежелательными явлениями, связанными с приемом препарата (C-BREEZE 2; NCT02956629; Lawitz, E. «Efficacy and Safety of Two-Drug Direct-Acting Antiviral Agent Regimen Ruzasvir 180 mg and Uprifosbuvir 450 mg for 12 Weeks in Adults with Chronic Hepatitis C Virus Genotype 1, 2, 3, 4, 5, or 6» 2019, J. Viral Hepat. 26, 9, 1127-1138). Второе клиническое исследование с более высокой дозой было также прекращено.

Компания Atea Pharmaceuticals, Inc. для лечения инфекции, вызванной HVC, разработала полезные нуклеотидные фосфорамидаты структуры β -D-2'-дезоксид-2'- α -фтор-2'- β -C-замещенный-2-модифицированный-N⁶-(моно- и ди-метил)пуриновые нуклеозиды. (Патенты США №№ 9828410; 10000523; 10005811; 10239911; 10519186; 10815266; 10870672; 10870673; 10875885; 10894804 и 10906928; и заявки на выдачу патента США: US 2021-0015841; US 2020-0179415). В частности, изопропил-((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-амино-6-(метиламино)-9H-пурин-9-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)-L-аланинат гемисульфат (AT-527, бемнифосбувир) обладает удивительными преимуществами, такими как высокая биодоступность, высокая селективность по отношению органа-мишени и высокая эффективность против HVC всех генотипов, включая GT3 (WO2018/144640).



Бемнифосбувир (AT-527)

В рамках исследования фазы I, в группе многодозового введения бемнифосбувира, он снижал вирусную нагрузку на 4,5 log₁₀ ME/мл у участников без цирроза печени и на 4,6 log₁₀ ME/мл у участников с циррозом печени. В группе пациентов с циррозом он был одинаково эффективен против HVC ряда генотипов, включая трудно поддающийся лечению генотип GT3 (GT1b: 4,0, 4,0, 4,5; GT2: 5,0; GT3: 4,8, 5,2) (NCT03219957; Berliba, E. et al. «Safety, Pharmacokinetics, and Antiviral Activity of AT-527, a Novel Purine Nucleotide Prodrug, in Hepatitis C Virus-Infected Subjects with or without Cirrhosis» 2019, Antimicrob Agents Chemother, 63 (12): e01201-19).

В комбинированном исследовании бемнифосбувира и ингибитора NS5A HCV первого поколения даклатасвира у всех десяти участников исследования уровень РНК HCV был ниже нижнего предела количественного определения. У 90% субъектов наблюдалась устойчивая неопределяемая вирусная нагрузка через 12 недель после лечения (SVR12). У одного субъекта, у которого не наблюдалась SVR12, была выявлена группа вариантов HCV, связанных с резистентностью (NS5A: R30Q, NS5B: L159F/A218S/C316N) (NCT04019717; Mungur, O. et al. «A combination of AT-527, a potent pan-genotypic guanosine nucleotide prodrug and daclatasvir was well-tolerated and effective in HCV-infected subjects», 2020, постер THU438 на заседании Международного конгресса по печени). Однако это исследование было прекращено.

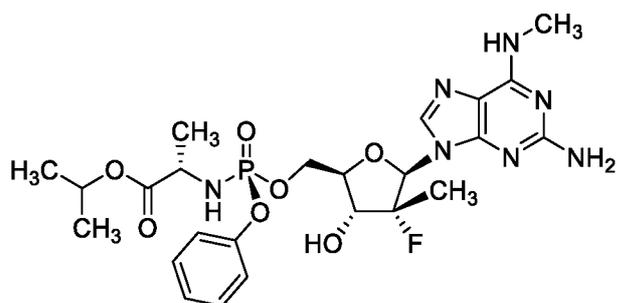
Таким образом, сохраняется острая медицинская потребность в разработке способов лечения гепатита С, которые были бы безопасными, эффективными и хорошо переносимыми. Эта потребность обостряется еще и потенциальной лекарственной устойчивостью HCV. РНК-полимераза HCV имеет высокую скорость репликации, что способствует образованию потенциально устойчивых одиночных и двойных точечных мутаций по всему геному и поддержанию квазивидов вируса. Мутации, влияющие на резистентность, были выявлены *in vitro* и *in vivo* при лечении почти всеми видами монотерапии.

Поэтому целью настоящего изобретения является предоставление соединений, фармацевтических композиций, способов и лекарственных форм для лечения и/или предотвращения инфекций HCV.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение предоставляет высокосинергическую комбинацию соединения **1**, которое является мощным пангенотипным ингибитором полимеразы NS5B, или его фармацевтически приемлемой соли (например, АТ-527, бемнифосбувир), и соединения **2**, которое является ингибитором NS5A, или его фармацевтически приемлемой соли (рузасвир, МК-8408) для лечения инфекции гепатита С у хозяина, обычно человека.

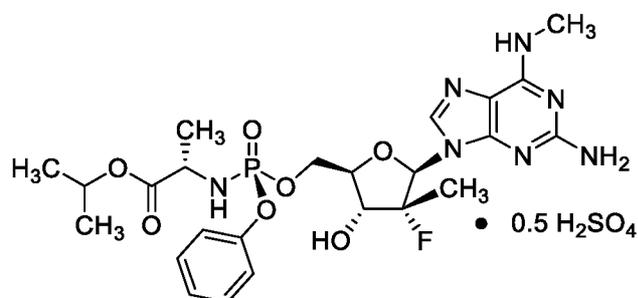
Соединение **1** представляет собой изопропил((*S*)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-амино-6-(метиламино)-9H-пурин-9-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)-*L*-аланинат:



Соединение 1

Соединение 1 раскрыто в патентах США №№ 9828410; 1000523; 10005811; 10239911; 10815266; 1080672; 10870673; 10875885; и в заявках PCT WO 2016/21276 и WO 2019/200005, переданные Atea Pharmaceuticals.

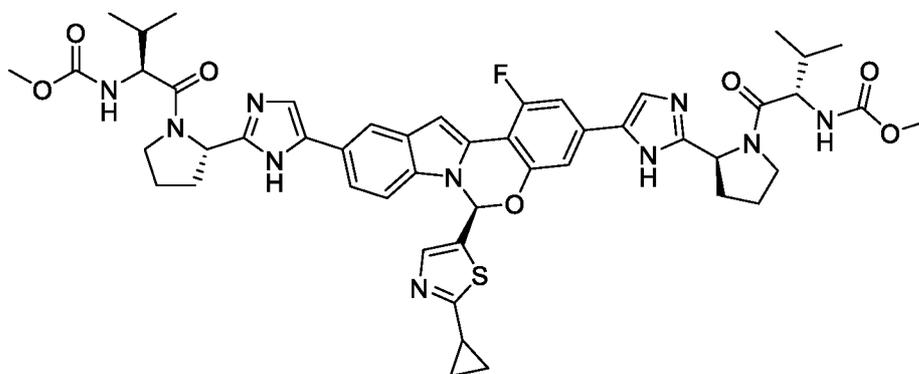
Гемисульфатная соль соединения 1 показана ниже как соединение 1-A:



Соединение 1-A

Соединение 1-A раскрыто в патентах США №№ 10519186; 10906928; 10894804; и в заявках PCT WO 2018/144640 и WO 2019/200005, переданные Atea Pharmaceuticals.

Соединение 2 представляет собой рузасвир (диметил-N,N'-(((6S)-6-(2-циклопропил-1,3-тиазол-5-ил)-1-фтор-6H-индоло[1,2-c][1,3]бензоксазин-3,10-диил)бис{1H-имидазол-5,2-диил-(2S)-пирролидин-2,1-диил[(2S)-3-метил-1-оксобутан-1,2-диил]})дикарбамат):



Соединение 2

В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 2 представляет собой аморфное твердое вещество. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 2 представляет собой кристаллическое твердое вещество. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 2 вводят в виде его фармацевтически приемлемой соли. Соединение 2 раскрыто в WO 2014/110705 и в патенте США № 9555038.

Предыдущие клинические исследования рузасвира в сочетании с ингибитором NS5B уприфосбувиром были прекращены из-за отсутствия эффективности. На этом фоне установлено, что при тестировании в многократных дозах комбинация соединения 1 (например, АТ-527) и рузасвира является высоко синергичной (см. Пример 30 и Фиг. 34). При каждой комбинированной дозе ожидаемую аддитивную противовирусную защиту вычитали из экспериментально наблюдаемой противовирусной активности, в результате чего получали положительное значение показателя синергизма, нулевое значение аддитивного действия или отрицательное значение антагонистического эффекта. Показатели синергизма в интервалах от -50 до 50 $\mu\text{M}^2\%$ считаются аддитивными, от 50 до 100 $\mu\text{M}^2\%$ указывают на незначительную синергию, а величины более 100 $\mu\text{M}^2\%$ считаются показателями сильного синергизма. Комбинацию соединения 1 и соединения 2 оценивали в широком диапазоне доз, и эта комбинация показала высокий синергизм. График показателей синергизма в зависимости от дозы каждого соединения представлен на Фиг. 34. При 40 нМ соединения 1 и 0,008 нМ соединения 2 показатель синергизма составляет 255 $\mu\text{M}^2\%$, что более чем в пять раз превышает пороговый уровень для синергических эффектов, и этот результат относится к категории высокосинергических.

Эту синергическую комбинацию двух средств против НВС, действующих вместе по различным механизмам, можно применять системно, например, перорально, в виде двух или более отдельных лекарственных форм или в виде комбинированной лекарственной формы. При раздельном введении лекарства следует предоставлять таким образом, чтобы хозяин получал пользу от обоих активных агентов, действующих биологически согласованным образом, например, таким образом, чтобы достигать перекрывающегося фармакокинетического воздействия, действия в плазме и/или АUC. Помимо эффективного лечения против вируса НВС, комбинированная лекарственная терапия особенно полезна для ограничения возникновения лекарственной устойчивости.

В одном неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 представлено в виде гемисульфата.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения эта комбинация с фиксированными дозировками предназначена для достижения устойчивого

вирусологического ответа через приблизительно 12 недель или менее, например, через приблизительно 10 недель или менее, через 8 недель или менее, или через 6 недель или менее. Помимо эффективного противовирусного лечения, комбинированная лекарственная терапия помогает ограничить возникновение лекарственной устойчивости.

Масса активного соединения в описанной здесь лекарственной форме указана по отношению либо к свободной форме, либо к солевой форме соединения, если не указано иное. Например, 600 мг соединения **1-A** эквивалентны 550 мг соединения **1**.

В типичном варианте осуществления настоящего изобретения соединение **1** вводят в дозе, составляющей приблизительно 300-1000 мг (из расчета на свободную форму или из расчета на солевую форму), более типично от 400 или 500 до 600 или 800 мг, или от 500 до 750 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение **1** вводят в дозе, составляющей от приблизительно 500 до приблизительно 1500 мг. В одном примере 550 мг соединения **1** вводят в дозе приблизительно 600 мг соединения **1-A**. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения 1100 мг соединения **1** вводят как дозу соединения **1-A**, составляющую приблизительно 1200 мг.

В типичном варианте осуществления настоящего изобретения соединение **2** или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе, составляющей приблизительно 20-500 мг, чаще 40-250 мг, например, включая, но без ограничения, по меньшей мере 60, 70, 75, 100, 125, 150, 180, 200, 225, 250, 270, 300, 350 или 400 мг соединения в лекарственной форме. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение **2** вводят в виде лекарственной формы, которая включает по меньшей мере приблизительно 90, 180, 270 или 360 мг соединения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинация включает 550 мг соединения **1-A** и приблизительно по меньшей мере 90, 180, 270 или 360 мг соединения **2** или его фармацевтически приемлемой соли (например, 180 мг). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эту комбинацию вводят один, два или три раза в день.

Комбинированное терапевтическое средство можно вводить один, два, три или более раз в день в соответствии с рекомендациями врача. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинированное терапевтическое средство вводят один раз в день. В других вариантах осуществления настоящего изобретения комбинированное терапевтическое средство вводят два раза в день. В еще одном варианте комбинированное лекарственное средство вводят три раза в день.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение **1-A** предоставлено в виде твердой дозированной формы, из расчета введения дозы

соединения, составляющей 600 мг/день, а соединение 2 предоставлено в комбинированной или отдельной дозированной лекарственной формы, из расчета введения дозы, составляющей 180 мг/день, которые вместе можно принимать 1, 2 или 3 раза в день.

В различных аспектах настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемая соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемая соль составляют вместе в виде одной лекарственной формы или они могут быть представлены в нескольких отдельных лекарственных формах (например, в виде двух или более дозированных форм, каждая из которых содержит оба активных вещества или где одна дозированная форма содержит один активный агент, а другая дозированная форма содержит другой активный агент). В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемая соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемая соль представлены в отдельных лекарственных формах, но таким образом, чтобы они могли действовать на хозяина согласованно, например синергически. Например, отдельные лекарственные формы можно вводить таким образом, чтобы достигалось перекрытие AUC, или достигался другой фармакокинетический параметр, который указывает на то, что активные вещества действуют вместе против вируса.

В одном аспекте настоящего изобретения соединение 1 и соединение 2 представляются в виде отдельных таблеток, и их вводят приблизительно в одно и то же время в течение дня или одновременно.

Комбинация соединения 1 (или его фармацевтически приемлемой соли, например, соединения 1-А) и соединения 2 (или его фармацевтически приемлемой соли) также может быть использована для лечения родственных состояний, таких как наличие положительных антител против HVC и антиген-положительные состояния, хроническое вирусное воспаление печени, рак печени, вызванный прогрессирующим гепатитом С (гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК)), цирроз печени, хронический или острый гепатит С, молниеносный гепатит С, хронический персистирующий гепатит С и усталость, вызванная терапией против HVC.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль, например соединение 1-А, и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в течение периода времени, составляющего до 24 недель, до 12 недель, до 10 недель, до 8 недель, до 6 недель или до 4 недель. В альтернативных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль, например соединение 1-А, и соединение 2 или его

фармацевтически приемлемую соль вводят в течение по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 6 недель, по меньшей мере 8 недель, по меньшей мере 10 недель, по меньшей мере 12 недель или по меньшей мере 24 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение **1** или его фармацевтически приемлемую соль и соединение **2** или его фармацевтически приемлемую соль вводят по меньшей мере один раз в день или через день. В альтернативных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение **1** или его фармацевтически приемлемую соль и соединение **2** или его фармацевтически приемлемую соль вводят два раза в день. В альтернативных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение **1** или его фармацевтически приемлемую соль и соединение **2** или его фармацевтически приемлемую соль вводят три раза в день или чаще.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у пациента отсутствует цирроз печени. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пациент страдает циррозом печени. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения у хозяина с циррозом печени этот цирроз печени компенсирован. В альтернативном варианте у хозяина с циррозом печени имеется декомпенсированный цирроз печени. В одном варианте осуществления настоящего изобретения хозяин страдает циррозом печени класса А по классификации Чайлда-Пью. В альтернативном варианте у хозяина имеется цирроз печени класса В или класса С по классификации Чайлда-Пью.

Вышеуказанные комбинации также можно использовать для лечения против HVC ряда генотипов. Во всем мире идентифицировано по меньшей мере шесть различных генотипов HVC, каждый из которых имеет несколько подтипов. Генотипы 1-3 распространены во всем мире, а генотипы 4, 5 и 6 более ограничены географически. Генотип 4 распространен на Ближнем Востоке и в Африке. Генотип 5 в основном встречается в Южной Африке. Генотип 6 преимущественно распространен в Юго-Восточной Азии. Хотя наиболее распространенным генотипом в США является генотип 1, определение генотипа и подтипа может помочь в выборе типа и продолжительности лечения. Например, разные генотипы по-разному реагируют на разные лекарственные средства. Оптимальное время лечения варьируется в зависимости от генотипа инфекции. Подтипы внутри генотипов, такие как генотип 1a и генотип 1b, также могут по-разному реагировать на лечение. Заражение одним генотипом вируса не исключает последующего заражения другим генотипом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения комбинация соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли, например соединения 1-A, и соединения **2**

или его фармацевтически приемлемой соли используют для лечения против HVC генотипа 1, генотипа 2, генотипа 3, генотипа 4, генотипа 5 или генотипа 6. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль используют для лечения против HVC генотипа 1a. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль используют для лечения против HVC генотипа 1b. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль используют для лечения против HVC генотипа 2a. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль используют для лечения против HVC генотипа 2b. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль используют для лечения против HVC генотипа 3a. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль используют для лечения против HVC генотипа 3b. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль используют для лечения против HVC генотипа 4a. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль используют для лечения против HVC генотипа 4d. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль используют для лечения против HVC генотипа 5a. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль используют для лечения против HVC генотипа 6a. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль используют для лечения инфекции, вызванной HVC, генотипов 6b, 6c, 6d, 6e, 6f, 6g, 6h, 6i, 6j, 6k, 6l, 6m, 6n, 6o, 6p, 6q, 6r, 6s, 6t или 6u.

Изобретение также включает конкретные комбинации и дозированные лекарственные формы, в которых соединение **1-A** может находиться в виде аморфной или

кристаллической соли и, независимо, соединение 2 может быть кристаллическим или аморфным.

Таким образом, настоящее изобретение предоставляет по меньшей мере следующие варианты осуществления:

(a) эффективная комбинация против HCV, содержащая соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соли;

(b) эффективная твердая дозированная лекарственная форма комбинации, содержащей соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль;

(c) вариант осуществления (a) или (b), где соединение 1 представляет собой соединение 1-A;

(d) варианты осуществления (a)-(c), где в комбинации представлен третий агент, эффективный против HCV;

(e) вариант осуществления (d), где третий агент, эффективный против HCV, действует по иному механизму, чем соединение 1, соединение 1-A или соединение 2;

(f) фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию по любому из вариантов осуществления (a)-(e) в фармацевтически приемлемом эксципиенте.

(g) вариант осуществления (f), где комбинация представлена в форме комбинированной фармацевтической композиции;

(h) вариант осуществления (f), где комбинация представлена в форме отдельных фармацевтических дозированных лекарственных форм для каждого активного агента, для их согласованного применения;

(i) фармацевтические лекарственные формы (f)-(h), подходящие для пероральной доставки;

(j) лекарственная форма (i) представленная в форме пилюли, таблетки или геля;

(k) фармацевтические дозированные лекарственные формы (f)-(h), подходящие для парентерального введения;

(l) фармацевтические дозированные лекарственные формы (f)-(h), подходящие для внутривенного введения;

(m) применение эффективной комбинации по любому из вариантов осуществления (a)-(l) при изготовлении лекарственного средства для лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита С, у пациента, нуждающегося в этом;

(n) способ изготовления лекарственного средства, предназначенного для терапевтического применения для лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита С, у

пациента, нуждающегося в этом, где при изготовлении используют эффективную комбинацию по любому из вариантов осуществления (a)-(l);

(o) способ лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита С, предусматривающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективной комбинации по любому из вариантов осуществления (a)-(l);

(p) способ лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита С, предусматривающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективной комбинации по любому из вариантов осуществления (a)-(l);

(q) способ профилактического лечения пациента с риском заражения вирусом гепатита С, предусматривающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективной комбинации по любому из вариантов осуществления (a)-(l);

(r) способ лечения состояний, связанных с вирусной инфекцией гепатита С, выбранных из хронического вирусного воспаления печени, рака печени, возникшего в результате прогрессирующего гепатита С (гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК)), цирроза печени, хронического или острого гепатита С, молниеносного гепатита С, хронического персистирующего гепатита С и усталости, вызванной терапией против HCV, предусматривающий введение пациенту или пациенту, нуждающемуся в этом, эффективной комбинации по любому из вариантов осуществления (a)-(l);

(s) любой из вариантов осуществления (m)-(r), где у пациента имеется цирроз печени;

(t) любой из вариантов осуществления (m)-(r), где у пациента отсутствует цирроз печени;

(u) любой из вариантов осуществления (m)-(t), где инфекция HCV относится к генотипу (GT) 1;

(v) любой из вариантов осуществления (m)-(t), где инфекция HCV относится к генотипу (GT) 2;

(w) любой из вариантов осуществления (m)-(t), где инфекция HCV относится к генотипу (GT) 3;

(x) любой из вариантов осуществления (m)-(t), где инфекция HCV относится к генотипу (GT) 4;

(y) любой из вариантов осуществления (m)-(t), где инфекция HCV относится к генотипу (GT) 5;

(z) любой из вариантов осуществления (m)-(t), где инфекция HCV относится к генотипу (GT) 6;

(aa) комбинация (a)-(l) для применения для лечения против HVC или состояний, связанных с HVC.

В настоящем изобретении в синергической комбинированной терапии соединение 1-А может быть использовано в виде кристаллической формы или, альтернативно, кристаллическая форма может быть использована в способе изготовления с распылительной сушкой. На Фиг. 1-15 представлены характеристики физической формы соединения 1-А, полученные с помощью метода XRPD (метод рентгеновской порошковой дифрактометрии), DSC (метод дифференциальной сканирующей калориметрии) и TGA (термогравиметрический анализ). Соединение 1-А можно выделить в кристаллической форме, что может облегчить его синтез и последующую обработку.

Фармакокинетика соединения 1-А важна для успеха комбинированной терапии. На Фиг. 16 показаны полезные свойства соединения 1-А по биораспределению. Соединение концентрируется в печени, органе-мишени для инфекции HVC, а не в сердце. Поскольку концентрация в печени высока, то это выгодно для комбинированной терапии печени.

Аналогично, на Фиг. 17, 18 и 21-23 показаны фармакокинетические свойства соединения 1-А и основных метаболитов. Хотя соединение 1-А метаболизируется в течение 8 часов, активные метаболиты присутствуют до 24 часов. В течение 24 часов присутствия метаболитов наблюдается подавление вирусной РНК HVC. При дозах 300 мг концентрации метаболитов соединения 1-А в плазме выше, чем EC₉₅ против HCV GT1b. Эти показатели фармакокинетики (PK) и фармакодинамики (PD) способствуют успешной комбинированной терапии.

На Фиг. 19 и 20 показана пангенотипная активность соединения 1-А. Пангенотипная активность в этой комбинированной терапии может предотвратить развитие устойчивых мутантов HVC.

На Фиг. 25-31 показаны уровни метаболита соединения 1 и вирусной РНК HCV у хозяев с циррозом печени, которым вводили соединение 1. На Фиг. 27 показано, что соединение 1 одинаково эффективно как у пациентов с циррозом, так и у пациентов без цирроза печени. Комбинация соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли и соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли может быть использована для лечения против HCV как у пациентов с циррозом, так и у пациентов без цирроза печени. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль, может быть приготовлена в виде пероральной дозированной лекарственной формы. На Фиг. 32 изображен пример процесса изготовления таблеток, предназначенных для перорального введения. Соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или

его фармацевтически приемлемую соль объединяют вместе, просеивают, смешивают и таблетуют, получая в итоге комбинации в виде пероральной лекарственной дозированной формы.

Краткое описание фигур

На Фиг. 1А представлено наложение дифрактограмм XRPD образцов 1-1 (аморфное соединение 1), 1-2 (кристаллическое соединение 1) и 1-3 (аморфное соединение 1-А) до исследований стабильности, с целью определения характеристик, как описано в Примере 2 и в Примере 5. На оси X представлено значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 1В представлены результаты ВЭЖХ-хроматографии аморфного соединения 1 (образец 1-1) для определения чистоты, как описано в Примере 2. Чистота образца составила 98,7%. На оси X представлено время, измеренное в минутах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 2А представлены результаты ВЭЖХ-хроматографии кристаллического соединения 1 (образец 1-2) для определения чистоты, как описано в Примере 2. Чистота образца составила 99,11%. На оси X представлено время, измеренное в минутах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 2В представлены графики результатов анализа кристаллического соединения 1 (образец 1-2) методами DSC и TGA до проведения каких-либо исследований стабильности для целей определения характеристик, как описано в Примере 2. На оси X представлена температура, измеренная в °С, на левой оси Y представлен тепловой поток в (Вт/г), а на правой оси Y - масса, измеренная в процентах.

На Фиг. 3 представлено рентгеноструктурное изображение соединения 1, показывающее абсолютную стереохимию, как описано в Примере 2.

На Фиг. 4А представлено наложение дифрактограмм XRPD образцов 1-1 (аморфное соединение 1), 1-2 (кристаллическое соединение 1) и 1-3 (аморфное соединение 1-А) после хранения при 25°C и относительной влажности 60% в течение 14 дней, как описано в Примере 2 и Примере 5. На оси X представлено значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y представлена интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 4В представлено наложение дифрактограмм XRPD образцов 1-4, 1-5, 1-6, 1-7 и 1-9 после хранения при 25°C и относительной влажности 60% в течение 7 дней, как

описано в Примере 4. На оси X представлено значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 5А представлено наложение дифрактограмм XRPD образцов 1-4, 1-6, 1-7 и 1-9 после хранения при 25°C и относительной влажности 60% в течение 14 дней, как описано в Примере 4. На оси X представлено значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y представлена интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 5В представлена дифрактограмма XRPD аморфного соединения 1-А (образец 1-3), как описано в Примере 5. На оси X представлено значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y представлена интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 6А представлены результаты ВЭЖХ-хроматографии аморфного соединения 1-А (образец 1-3) для определения чистоты, как описано в Примере 5. Чистота образца составила 99,6%. На оси X представлено время, измеренное в минутах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 6В представлены графики результатов анализа методами DSC и TGA для аморфного соединения 1-А (образец 1-3) до проведения каких-либо исследований стабильности для целей определения характеристик, как описано в Примере 5. На оси X представлена температура, измеренная в °C, на левой оси Y представлен тепловой поток в (Вт/г), а на правой оси Y - масса, измеренная в процентах.

На Фиг. 7А представлено наложение дифрактограмм XRPD кристаллических образцов (образцы 2-2, 2-6 и 2-7) и слабокристаллических образцов (образцы 2-3, 2-4, 2-5 и 2-8), идентифицированных в результате кристаллизации соединения 1-А (Пример 6). На оси X представлено значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 7В представлено наложение дифрактограмм XRPD аморфных образцов (образцы 2-9, 2-10 и 2-11), идентифицированных в результате кристаллизации соединения 1-А (Пример 6). На оси X представлено значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 8А представлено наложение дифрактограмм XRPD образцов (образцы 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7 и 2-8) после 6 дней хранения при 25°C и 60% относительной влажности (Пример 6). На оси X представлено значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 8В представлены графики результатов анализа методами DSC и TGA для образца 2-2 (Пример 6). На оси X представлена температура, измеренная в °C, на левой

оси Y представлен тепловой поток в (Вт/г), а на правой оси Y - масса, измеренная в процентах. Экспериментальные процедуры анализа DSC и TGA описаны в Примере 2.

На Фиг. 9А представлены графики результатов анализа методами DSC и TGA для образца 2-3 (Пример 6). На оси X представлена температура, измеренная в °С, на левой оси Y представлен тепловой поток в (Вт/г), а на правой оси Y - масса, измеренная в процентах. Экспериментальные процедуры анализа DSC и TGA описаны в Примере 2.

На Фиг. 9В представлены графики результатов анализа методами DSC и TGA для образца 2-4 (Пример 6). На оси X представлена температура, измеренная в °С, на левой оси Y представлен тепловой поток в (Вт/г), а на правой оси Y - масса, измеренная в процентах. Экспериментальные процедуры анализа DSC и TGA описаны в Примере 2.

На Фиг. 10А представлены графики результатов анализа методами DSC и TGA для образца 2-5 (Пример 6). На оси X представлена температура, измеренная в °С, на левой оси Y представлен тепловой поток в (Вт/г), а на правой оси Y - масса, измеренная в процентах. Экспериментальные процедуры анализа DSC и TGA описаны в Примере 2.

На Фиг. 10В представлены графики результатов анализа методами DSC и TGA для образца 2-6 (Пример 6). На оси X представлена температура, измеренная в °С, на левой оси Y представлен тепловой поток в (Вт/г), а на правой оси Y - масса, измеренная в процентах. Экспериментальные процедуры анализа DSC и TGA описаны в Примере 2.

На Фиг. 11А представлены графики результатов анализа методами DSC и TGA для образца 2-7 (Пример 6). На оси X представлена температура, измеренная в °С, на левой оси Y представлен тепловой поток в (Вт/г), а на правой оси Y - масса, измеренная в процентах. Экспериментальные процедуры анализа DSC и TGA описаны в Примере 2.

На Фиг. 11В представлены графики результатов анализа методами DSC и TGA для образца 2-8 (Пример 6). На оси X представлена температура, измеренная в °С, на левой оси Y представлен тепловой поток в (Вт/г), а на правой оси Y - масса, измеренная в процентах. Экспериментальные процедуры анализа DSC и TGA описаны в Примере 2.

На Фиг. 12А представлена дифрактограмма XRPD аморфного соединения 1-В (образец 3-12), как обсуждалось в Примере 7. На оси X представлено значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах. Кристаллизация малонатной соли не наблюдалась независимо от используемого растворителя.

На Фиг. 12В представлено наложение дифрактограмм XRPD аморфных образцов (образцы 3-6, 3-10, 3-11 и 3-12), идентифицированных в результате попытки кристаллизации соединения 1 с малонатной солью (Пример 7). На оси X представлено

значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 13А представлена ВЭЖХ-хроматограмма образца 3-12, полученного при попытке кристаллизации соединения 1 с малонатной солью, как описано в Примере 7. Образец имел чистоту 99,2%. На оси X представлено время, измеренное в минутах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в мА.

На Фиг. 13В представлено наложение дифрактограмм XRPD твердых образцов, полученных в результате кристаллизации с использованием LAG (образцы 4-13, 4-12, 4-9, 4-3 и 4-1) по сравнению с соединением 1 (образец 1-2), как описано в Примере 8. Все дифрактограммы XRPD соответствуют дифрактограммам для кристаллов с кислотным противоионом без дополнительных пиков. На оси X представлено значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 14А представлено наложение дифрактограмм XRPD образцов, полученных при использовании этилацетата в качестве растворителя для кристаллизации (образцы 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 6-8, 6-7, 6-6, 6-5), 6-4 и 6-2), по сравнению с кристаллическим соединением 1 (образец 1-2), как описано в Примере 10. Установлено, что дифрактограммы XRPD в целом соответствуют дифрактограмме соединения 1, за исключением образцов 6-2, 6-4 и 6-5, которые имеют небольшие различия. На оси X представлено значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 14В представлено наложение дифрактограммы XRPD образца 5-1 после второго растворения в метилэтилкетоне (МЭК) и добавления антирастворителя циклогексана и памовой кислоты, как описано в Примере 9. Образец 5-1, кристаллизованный в памовой кислоте, представлял собой твердое вещество после созревания, но дифрактограмма XRPD соответствовала дифрактограмме памовой кислоты.

На Фиг. 15А представлено наложение дифрактограмм XRPD образцов, полученных при использовании этилацетата в качестве растворителя для кристаллизации (образцы 6-5, 6-4 и 6-2), по сравнению с кристаллическим соединением 1 (образец 1-2), как описано в Примере 10. Установлено, что диаграммы XRPD в целом соответствуют диаграмме соединения 1, за исключением образцов 6-2, 6-4 и 6-5, где выявлены небольшие различия. На оси X представлено значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах, и указана кислота, использованная при кристаллизации.

На Фиг. 15В представлена дифрактограмма XRPD для соединения 1-А, как описано в Примере 14. На оси X представлено значение угла 2-тета, измеренное в градусах, а на оси Y - интенсивность, измеренная в относительных единицах.

На Фиг. 16А представлен график, отражающий уровни концентраций активного трифосфата (ТР) (метаболита 1-6) в печени и сердце крыс, собак и обезьян (Пример 18). На оси X представлена дозировка, измеренная в мг/кг для каждого вида, а на оси Y - активная концентрация ТР, измеренная в нг/г.

На Фиг. 16В представлен график, отражающий уровни концентраций активного ТР (метаболита 1-6) в печени и сердце собак (n=2), измеренных через 4 часа после однократного перорального введения соединения 1 или соединения 1-А (Пример 19). На оси X представлена дозировка, измеренная в мг/кг для каждого вида, а на оси Y - активная концентрация ТР, измеренная в нг/г.

На Фиг. 17 представлен профиль соединения 1 и метаболита 1-7 в плазме у крыс, получивших однократную пероральную дозу 500 мг/кг соединения 1-А (Пример 20), измеренный через 72 часа после введения дозы. На оси X представлено время, измеренное в часах, а на оси Y - концентрация в плазме, измеренная в нг/мл.

На Фиг. 18 представлен профиль соединения 1 и метаболита 1-7 в плазме у обезьян, которым вводили однократные пероральные дозы 30 мг, 100 мг или 300 мг соединения 1-А (Пример 20), измеренный через 72 часа после введения дозы. На оси X представлено время, измеренное в часах, а на оси Y - концентрация в плазме, измеренная в нг/мл.

На Фиг. 19 представлен график значений EC_{95} , измеренных в нМ, для софосбувира и соединения 1 в отношении клинических изолятов HCV. Значения EC_{95} для соединения 1 в 7-33 раза ниже, чем у софосбувира (Пример 22). На оси X указан генотип, а на оси Y - значения EC_{95} , измеренных в нМ.

На Фиг. 20 представлен график значений EC_{50} , измеренных в нМ, для софосбувира и соединения 1, в отношении лабораторных штаммов HCV генотипов 1a, 1b, 2a, 3a, 4a и 5a. Соединение 1 приблизительно в 6-11 раз более эффективно, чем софосбувир в генотипах 1-5 (Пример 22). На оси X указан генотип, а на оси Y - значения EC_{50} , измеренных в нМ.

На Фиг. 21 представлен график зависимости средней концентрации соединения 1 в плазме от времени, после введения однократной пероральной дозы соединения 1-А для всех групп в Части В исследования, как описано в Примере 24. Соединение 1 быстро всасывалось и быстро абсорбировалось, и метаболизировалось в течение приблизительно

8 часов во всех группах в Части В исследования. На оси X указано время, измеренное в часах, а на оси Y - средняя геометрическая концентрация в плазме, измеренная в нг/мл.

На Фиг. 22 представлен график зависимости средней концентрации метаболита 1-7 от времени, после введения однократной пероральной дозы соединения 1-А для всех групп в части В исследования, как описано в Примере 24. Метаболит 1-7 показал устойчивую концентрацию в плазме для всех групп в Части В исследования. На оси X указано время, измеренное в часах, а на оси Y - средняя геометрическая концентрация в плазме, измеренная в нг/мл.

На Фиг. 23А представлены результаты фармакокинетического/фармакодинамического (PK/PD) анализа у отдельного субъекта, включенного в группу 1b, как описано в Примере 24. График показывает содержание метаболита 1-7 в плазме и снижение уровней РНК HCV. Пунктирная линия представляет минимальную концентрацию метаболита 1-7, необходимую для поддержания вирусологического ответа, превышающего значение EC_{95} против GT1b. На оси X указано время, измеренное в часах. Левая ось ординат показывает концентрацию метаболита 1-7 в плазме, измеренную в нг/мл, а правая ось ординат показывает снижение уровней РНК HVC, измеренных в \log_{10} МЕ/ мл.

На Фиг. 23В представлены результаты фармакокинетического/фармакодинамического (PK/PD) анализа у отдельного субъекта, включенного в группу 1b, как описано в Примере 24. График показывает содержание метаболита 1-7 в плазме и снижение уровней РНК HCV. Пунктирная линия представляет минимальную концентрацию метаболита 1-7, необходимую для поддержания вирусологического ответа, превышающего значение EC_{95} против GT1b. На оси X указано время, измеренное в часах. Левая ось ординат показывает концентрацию метаболита 1-7 в плазме, измеренную в нг/мл, а правая ось ординат показывает снижение уровней РНК HVC, измеренных в \log_{10} МЕ/ мл.

На Фиг. 23С представлены результаты фармакокинетического/фармакодинамического анализа у отдельного субъекта, включенного в группу 1b, как описано в Примере 24. График показывает содержание метаболита 1-7 в плазме и снижение уровней РНК HCV. Пунктирная линия представляет минимальную концентрацию метаболита 1-7, необходимую для поддержания вирусологического ответа, превышающего значение EC_{95} против GT1b. На оси X указано время, измеренное в часах. Левая ось ординат показывает концентрацию метаболита 1-7 в плазме, измеренную в нг/мл, а правая ось ординат показывает снижение уровней РНК HVC, измеренных в \log_{10} МЕ/ мл.

На Фиг. 23D представлены результаты фармакокинетического/фармакодинамического анализа у субъекта, включенного в группу 3b, как описано в Примере 24. Каждый график показывает содержание метаболита 1-7 в плазме и снижение уровней РНК HCV. Пунктирная линия представляет минимальную концентрацию метаболита 1-7, необходимую для поддержания вирусологического ответа, превышающего значение EC_{95} против GT1b. На оси X указано время, измеренное в часах. Левая ось ординат показывает концентрацию метаболита 1-7 в плазме, измеренную в нг/мл, а правая ось ординат показывает снижение уровней РНК HCV, измеренных в \log_{10} МЕ/мл.

На Фиг. 23E представлены результаты фармакокинетического/фармакодинамического анализа у субъекта, включенного в группу 3b, как описано в Примере 24. Каждый график показывает содержание метаболита 1-7 в плазме и снижение уровней РНК HCV. Пунктирная линия представляет минимальную концентрацию метаболита 1-7, необходимую для поддержания вирусологического ответа, превышающего значение EC_{95} против GT1b. На оси X указано время, измеренное в часах. Левая ось ординат показывает концентрацию метаболита 1-7 в плазме, измеренную в нг/мл, а правая ось ординат показывает снижение уровней РНК HCV, измеренных в \log_{10} МЕ/мл.

На Фиг. 23F представлены результаты фармакокинетического/фармакодинамического анализа у субъекта, включенного в группу 3b, как описано в Примере 24. Каждый график показывает содержание метаболита 1-7 в плазме и снижение уровней РНК HCV. Пунктирная линия представляет минимальную концентрацию метаболита 1-7, необходимую для поддержания вирусологического ответа, превышающего значение EC_{95} против GT1b. На оси X указано время, измеренное в часах. Левая ось ординат показывает концентрацию метаболита 1-7 в плазме, измеренную в нг/мл, а правая ось ординат показывает снижение уровней РНК HCV, измеренных в \log_{10} МЕ/мл.

На Фиг. 24 представлен график значений EC_{95} соединения 1 и софосбувира в отношении с клинических изолятов GT1, GT2, GT3 и GT4 от пациентов, инфицированных HCV. Пунктирная горизонтальная линия (- - - -) показывает минимальную равновесную концентрацию ($C_{24,ss}$) нуклеозида софосбувира после введения софосбувира один раз в день в дозе 400 мг. Сплошная горизонтальная линия (—) показывает минимальную равновесную концентрацию ($C_{24,ss}$) метаболита 1-7 после введения 600 мг соединения 1-A (эквивалентно 550 мг соединения 1). Горизонтальная линия из точек (·····) показывает минимальную равновесную концентрацию ($C_{24,ss}$) метаболита 1-7 после введения 450 мг

соединения 1-А (что эквивалентно 400 мг соединения 1). Как обсуждалось в Примере 25, прогнозируемый минимальный равновесный уровень в плазме ($C_{24,ss}$) метаболита 1-7 после введения 600 мг и 450 мг соединения 1-А превышает EC_{95} соединения 1 *in vitro* по сравнению со всеми протестированными клиническими изолятами. Минимальный уровень стабильного состояния софосбувира в плазме ($C_{24,ss}$) превышает EC_{95} только у клинических изолятов GT2. На оси X отмечены клинические изоляты, и под осью X указаны значения EC_{95} для соединения 1 и софосбувира. По оси ординат представлена величина EC_{95} по отношению к клиническим изолятам, измеренная в нг/мл. Величина EC_{95} выражена как нуклеозидный эквивалент. Софосбувир и соединение 1-А вводили ежедневно (QD).

На Фиг. 25 представлен график, показывающий среднее изменение РНК HVC по сравнению с исходным уровнем у субъектов с нецирротической (NC) инфекцией HVC GT1b после введения однократной дозы соединения 1-А, эквивалентной 92 мг, 275 мг, 368 мг или 550 мг соединения 1, как описано в Примерах 26 и 27. На оси X представлены часы после введения дозы, а на оси Y показано среднее изменение РНК HCV по сравнению с исходным уровнем, измеренное в \log_{10} МЕ/мл.

На Фиг. 26 представлен график, показывающий среднее изменение РНК HVC по сравнению с исходным уровнем у субъектов с нецирротической (NC) инфекцией HVC GT1b через 7 дней ежедневного введения соединения 1-А, как описано в Примерах 26 и 27. На оси абсцисс представлены дни после первого введения дозы, а на оси ординат показано среднее изменение РНК HVC по сравнению с исходным уровнем, измеренное в \log_{10} МЕ/мл.

На Фиг. 27 представлен график, сравнивающий среднее изменение РНК HCV по сравнению с исходным уровнем у субъектов с нецирротической инфекцией HCV GT1, у субъектов с нецирротической инфекцией HCV GT3 и у субъектов с цирротической инфекцией HCV GT1 или GT3 после введения доз 600 мг/день один раз в день (QD) соединения 1-А (эквивалентно 550 мг соединения 1), как описано в Примерах 26 и 27. Как показано на графике, у субъектов с циррозом печени наблюдались средние изменения РНК HCV, которые были аналогичны изменениям, имевшим место у субъектов без цирроза печени. На оси X представлены дни после введения первой дозы, а на оси Y показано среднее изменение РНК HCV по сравнению с исходным уровнем, измеренное в \log_{10} МЕ/мл.

На Фиг. 28А представлен график изменения РНК HVC по сравнению с исходным уровнем у отдельных субъектов с нецирротической (NC) инфекцией HVC GT1b после введения дозы 600 мг/день QD соединения 1-А (эквивалентно 550 мг соединения 1), как

описано в Примерах 26 и 27. Пунктирная горизонтальная линия (- - -) показывает предел количественного определения ($LOQ = 15$ МЕ/мл). У 50% субъектов уровень РНК HVC был $<LOQ$. На оси X представлены дни после введения первой дозы, а на оси Y показано среднее изменение РНК HCV по сравнению с исходным уровнем, измеренное в \log_{10} МЕ/мл.

На Фиг. 28В представлен график изменения РНК HCV по сравнению с исходным уровнем у отдельных субъектов с нецирротической (NC) инфекцией HCV GT3 после введения дозы 600 мг/день QD соединения 1-А (эквивалентно 550 мг соединения 1), как описано в Примерах 26 и 27. Пунктирная горизонтальная линия (- - -) показывает предел количественного определения ($LOQ = 15$ МЕ/мл). На оси X представлены дни после введения первой дозы, а на оси Y показано среднее изменение РНК HCV по сравнению с исходным уровнем, измеренное в \log_{10} МЕ/мл.

На Фиг. 28С представлен график изменения РНК HVC по сравнению с исходным уровнем у отдельных субъектов с цирротической инфекцией HVC GT1 или GT3 после введения дозы 600 мг/день QD соединения 1-А (эквивалентно 550 мг соединения 1), как описано в Примерах 26 и 27. Пунктирная горизонтальная линия (- - -) показывает предел количественного определения ($LOQ = 15$ МЕ/мл). На оси X представлены дни после введения первой дозы, а на оси Y показано среднее изменение РНК HCV по сравнению с исходным уровнем, измеренное в \log_{10} МЕ/мл.

На Фиг. 29 представлен профиль зависимости средней концентрации метаболита 1-7 в плазме от времени у пациентов инфицированных HCV GT1/GT3 с циррозом и без цирроза печени. Субъектам, инфицированным GT1, без цирроза печени, вводили соединение 1-А, в эквивалентной дозе соединения 1 составляющей 138 мг/день, 275 мг/день или 550 мг/день, субъектам, инфицированным GT3, без цирроза печени, вводили 600 мг/день QD соединения 1-А (эквивалентно 550 мг/день соединения 1), и субъектам, инфицированным GT1/GT3, с циррозом печени, вводили 600 мг соединения 1-А QD (эквивалентно 550 мг/день соединения 1), как описано в Примерах 26 и 27. На оси X представлены часы после введения дозы, а на оси Y показана средняя концентрация в плазме, измеренная в нг/мл.

На Фиг. 30А представлен график, показывающий среднюю концентрацию метаболита 1-7 в плазме (левая ось Y) и среднее снижение РНК HVC после введения 600 мг/день QD соединения 1-А (эквивалентно 550 мг соединения 1) (правая ось Y) в течение времени, для субъектов с нецирротической (NC) инфекцией HCV GT1b, как описано в Примерах 26 и 27. Величина EC_{95} соединения 1 для GT1b показана горизонтальной линией из точек ($\cdot \cdot \cdot \cdot$). Точки на графике представляют минимальные уровни

равновесного состояния метаболита 1-7 в плазме (C_t) и, как показано на графике, (C_t) постоянно превышает EC_{95} во все изученные моменты времени. На левой оси ординат показана средняя концентрация метаболита 1-7 в плазме, измеренная в нг/мл, на правой оси ординат показано снижение уровня РНК HVC после введения 550 мг соединения 1 QD, измеренное в \log_{10} МЕ/мл, а на оси X показано время, измеренное в часах.

На Фиг. 30B представлен график, показывающий среднюю концентрацию метаболита 1-7 в плазме (левая ось Y) и среднее снижение РНК HVC после введения 600 мг/день QD соединения 1-A (эквивалентно 550 мг соединения 1) (правая ось Y) в течение времени, для субъектов с нецирротической (NC) инфекцией HCV GT3, как описано в Примерах 26 и 27. Величина EC_{95} соединения 1 для GT3 показана горизонтальной линией из точек ($\cdot \cdot \cdot \cdot \cdot$). Точки на графике представляют минимальные уровни равновесного состояния метаболита 1-7 в плазме (C_t) и, как показано на графике, (C_t) постоянно превышает EC_{95} во все изученные моменты времени. На левой оси ординат показана средняя концентрация метаболита 1-7 в плазме, измеренная в нг/мл, на правой оси ординат показано снижение уровня РНК HVC после введения 550 мг соединения 1 QD, измеренное в \log_{10} МЕ/мл, а на оси X показано время, измеренное в часах.

На Фиг. 30C представлен график, показывающий среднюю концентрацию метаболита 1-7 в плазме (левая ось Y) и среднее снижение РНК HVC после введения 600 мг/день QD соединения 1-A (эквивалентно 550 мг соединения 1) (правая ось Y) в течение времени, для субъектов с цирротической (NC) инфекцией HCV GT1b, как описано в Примерах 26 и 27. Величина EC_{95} соединения 1 для GT1b показана горизонтальной линией из точек ($\cdot \cdot \cdot \cdot \cdot$). Точки на графике представляют минимальные уровни равновесного состояния метаболита 1-7 в плазме (C_t) и, как показано на графике, (C_t) постоянно превышает EC_{95} во все изученные моменты времени. На левой оси ординат показана средняя концентрация метаболита 1-7 в плазме, измеренная в нг/мл, на правой оси ординат показано снижение уровня РНК HVC после введения 550 мг соединения 1 QD, измеренное в \log_{10} МЕ/мл, а на оси X показано время, измеренное в часах.

На Фиг. 30D представлен график, показывающий среднюю концентрацию метаболита 1-7 в плазме (левая ось Y) и среднее снижение РНК HVC после введения 600 мг/день соединения 1-A QD (эквивалентно 550 мг соединения 1) QD (правая ось Y) в течение времени, для субъектов с цирротической инфекцией HCV GT3 как описано в Примерах 26 и 27. Величина EC_{95} соединения 1 для GT3 показана горизонтальной линией из точек ($\cdot \cdot \cdot \cdot \cdot$). Точки на графике представляют минимальные уровни равновесного состояния метаболита 1-7 в плазме (C_t) и, как показано на графике, (C_t) постоянно превышает EC_{95} во все изученные моменты времени. На левой оси ординат показана

средняя концентрация метаболита 1-7 в плазме, измеренная в нг/мл, на правой оси ординат показано снижение уровня РНК HVC после введения 550 мг соединения 1 QD, измеренное в \log_{10} МЕ/мл, а на оси X показано время, измеренное в часах.

На Фиг. 31 представлена модель Emax, в которой снижение РНК HVC, измеренное на 7-й день для субъектов с нецирротической (NC) инфекцией HVC GT1b, с нецирротической инфекцией HVC GT3, с цирротической инфекцией HVC GT1b и с цирротической инфекцией HVC GT3, отображается в зависимости от AUC метаболита 1-7 после введения дозы соединения 1-А один раз в день. Как описано в Примерах 26 и 27, субъектам с нецирротической инфекцией HVC GT1b вводили несколько возрастающих доз соединения 1-А, эквивалентных дозе 138 мг/день, 275 мг/день или 550 мг/день соединения 1, один раз в день в течение 7 дней. Субъектам с цирротической инфекцией HVC GT3 и субъектам с цирротической инфекцией HVC GT1/GT3 вводили 600 мг соединения 1-А (эквивалентно 550 мг/день соединения 1) QD в течение 7 дней. Показаны диапазоны интервалов 95% CI для субъектов с нецирротической инфекцией HVC GT1b при введении доз 138 мг/день, 275 мг/день или 550 мг/день. Модель предсказывает, что воздействие метаболита 1-7, превышающее или равное 2000 нг/мл x час, приведет к максимальному снижению вирусной нагрузки как минимум на 4 log после 7 дней введения доз. Все субъекты смогли достичь воздействия метаболита 1-7, превышающего 2000 нг/мл x час, после введения доз 550 мг соединения 1, независимо от того, был ли у субъекта цирроз печени или не было цирроза. По оси абсцисс показана величина AUC метаболита 1-7, измеренная в нг/мл x час, а на оси ординат показано снижение уровня РНК HVC на 7-й день, измеренное в \log_{10} .

На Фиг. 32 представлена блок-схема, показывающая процесс изготовления таблеток с 50 мг и 100 мг соединения 1-А, как описано в Примере 28. На стадии 1 микрокристаллическую целлюлозу, соединение 1-А, моногидрат лактозы и кроскармеллозу натрия пропускают через сито с размером отверстий 600 мкм. На стадии 2 продукт, полученный на стадии 1, загружают в V-образный блендер и перемешивали в течение 5 минут при 25 об/мин. На стадии 3 стеарат магния пропускают через сито с размером отверстий 600 мкм. На стадии 4 стеарат магния загружают в V-блендер, содержащий продукт, полученный на стадии 2 (микрокристаллическую целлюлозу, соединение 1-А, моногидрат лактозы и кроскармеллозу натрия), и перемешивали в течение 2 минут при 25 об/мин. Затем общую смесь разделяют для изготовления таблеток, содержащих 50 мг и таблеток, содержащих 100 мг соединения 1-А. Для изготовления таблеток 50 мг смесь, полученную на стадии 4, прессуют с помощью стандартного вогнутого пуансона диаметром 6 мм. Для изготовления таблеток 100 мг смесь,

полученную на стадии 4, прессуют с помощью стандартного вогнутого пуансона диаметром 8 мм. Затем таблетки упаковывают во флаконы из полиэтилена высокой плотности, и герметично закрывают полипропиленовыми крышками с влагопоглотителем.

На Фиг. 33 представлен ингибитор полимеразы NS5B: соединение 1-А; и ингибитор NS5А: соединение 2.

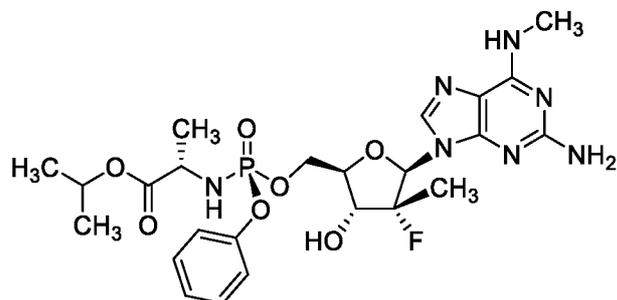
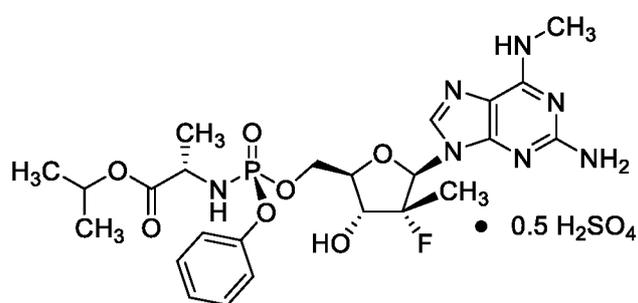
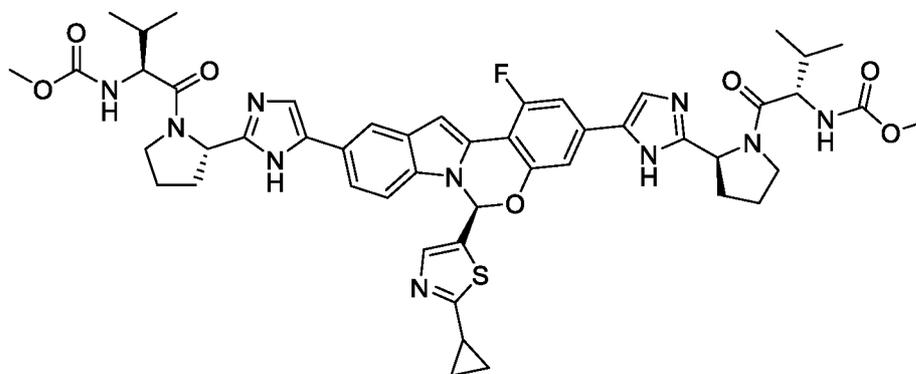
На Фиг. 34 представлен трехмерный график поверхности для комбинаций, показывающий, при каких концентрациях комбинация соединения 1 и соединения 2 проявляют синергичный, аддитивный или антагонистический эффект. Как описано в Примере 30, эффекты действия комбинации лекарственных средств рассчитывают на основе активности двух соединений при тестировании их по отдельности. Ожидаемую аддитивную противовирусную защиту вычитают из экспериментально определенной противовирусной активности при каждой концентрации в комбинации, получая в результате положительное значение (синергия или усиление), отрицательное значение (антагонизм) или ноль (аддитивность). Результаты комбинационных анализов представлены в трехмерном виде для каждой концентрации в комбинации, где показана поверхность активности, простирающуюся выше (синергия) или ниже (антагонизм) плоскости аддитивности. Комбинация соединения 1 и соединения 2 является синергичной в широком диапазоне концентраций как соединения 1, так и соединения 2. Для соединения 1 наблюдается синергизм в диапазонах концентраций от приблизительно 0,156 нМ до приблизительно 1 нМ и от 2,5 нМ до 40 нМ или более. Для соединения 2 наблюдается наибольшая синергия в диапазоне концентраций от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 0,008 нМ.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение предоставляет высокоактивную синергическую комбинацию из специфического ингибитора полимеразы NS5B и специфического ингибитора NS5A для эффективного лечения инфекции гепатита С (HVC) у хозяина, обычно человека.

Соединениями против HVC, используемыми в этой комбинированной терапии, являются: 1) ингибитор NS5B изопропил(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-амино-6-(метиламино)-9H-пурин-9-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)-L-аланинат (соединение 1) или его фармацевтически приемлемая соль; и 2) ингибитор NS5A рузасвир (диметил N,N'-(((6S)-6-(2-циклопропил-1,3-тиазол-5-ил)-1-фтор-6H-индоло[1,2-с][1,3]бензоксазин-3,10-диил]бис{1H-имидазол-5,2-диил-(2S)-пирролидин-2,1-диил[(2S)-3-метил-1-оксобутан-1,2-диил]})дикарбамат)

(соединение **2**) или его фармацевтически приемлемая соль. В типичном варианте осуществления настоящего изобретения соединение **1** вводят в виде производного, такого как гемисульфатная соль (соединение **1-A**).

Соединение **1**Соединение **1-A**Соединение **2**

В одном варианте осуществления настоящего изобретения комбинацию лекарственных средств вводят в виде лекарственной формы с фиксированной дозой, такой как пилюля или таблетка. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения два соединения вводят таким образом, чтобы нуждающийся в этом хозяин получал согласованную пользу от обоих соединений, что измеряется по стандартным фармакокинетическим показателям.

Соединение 1 и соединение 1-А

Соединение **1** (изопропил((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-амино-6-(метиламино)-9H-пурин-9-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)-L-аланинат) ранее было описано в патентах США №№ 9828410; 10000523; 10005811 и 10239911, и в заявках PCT WO 2016/21276 и WO 2019/200005, переданные Atea Pharmaceuticals. Синтез соединения **1** описан в Примере 1, представленном ниже.

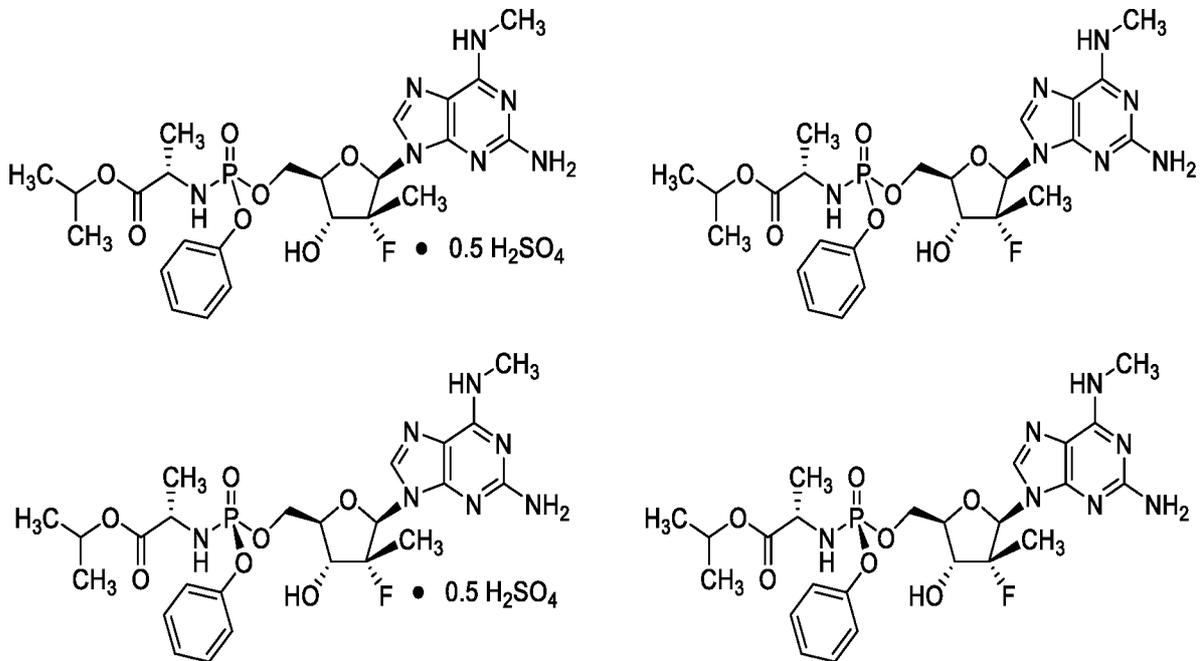
Соединение **1-А** ранее было описано в патенте США 2018-0215776 и заявках PCT WO 2018/144640 и WO 2019/200005, переданных Atea Pharmaceuticals. Синтез соединения **1-А** (гемисульфатная соль изопропил((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-амино-6-(метиламино)-9H-пурин-9-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)-L-аланинат) описан в Примере 4, представленном ниже. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение **1-А** представлено в фармацевтически приемлемой композиции или твердой лекарственной форме. В другом варианте осуществления настоящего изобретения соединение **1-А** представляет собой аморфное твердое вещество. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение **1-А** представляет собой кристаллическое твердое вещество. На Фиг. 1-15 отражены характеристики физической формы соединения **1-А**, полученные с помощью методов XRPD, DSC и TGA.

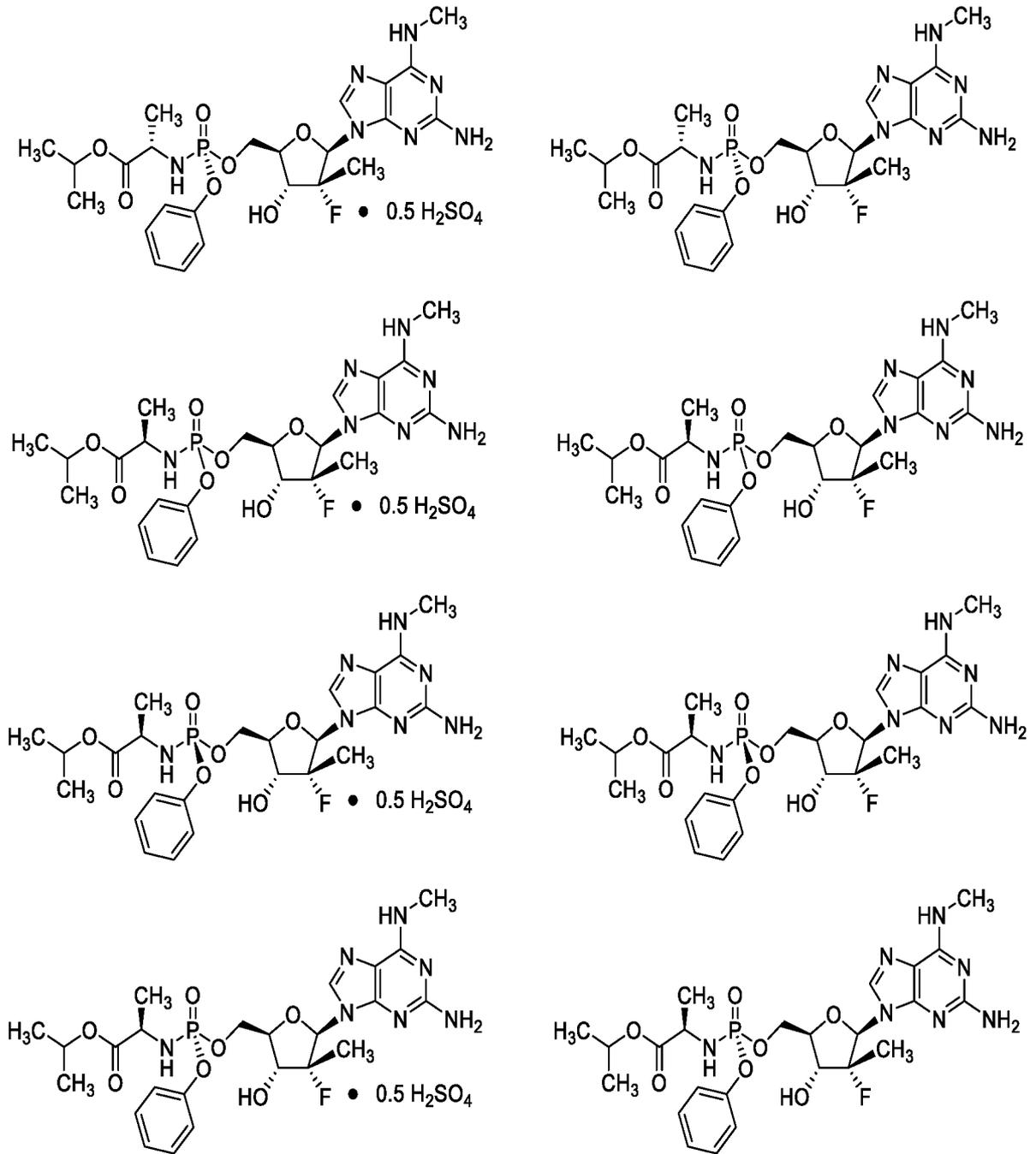
Как описано выше, в отношении соединения **1-А** завершены клинические испытания фазы 1b/2a на пациентах, инфицированных HCV. В многоэтапном исследовании оценивали эффект действия однократных и многократных доз соединения **1-А** у здоровых субъектов, у пациентов, инфицированных HCV без цирроза печени (нецирротические пациенты), и у пациентов, инфицированных HCV с циррозом печени (цирротические пациенты). Соединение **1-А** вызывало значительное снижение вирусной нагрузки при введении всем протестированным группам пациентов, инфицированным HCV. Соединение **1-А** вводили один раз в день (QD) в течение семи дней, и при этом наблюдали мощную противовирусную активность. У нецирротических пациентов, инфицированных HCV, которым вводили 600 мг соединения **1-А** один раз в день (эквивалентно 550 мг соединения **1**), среднее максимальное снижение РНК HCV составило 4,4 log₁₀ МЕ/мл у пациентов, инфицированных HCV GT1, и 4,6 log₁₀ МЕ/мл у пациентов, инфицированных HCV GT3. Эффект действия соединения **1-А** в отношении снижения вирусной нагрузки также распространялся на пациентов с циррозом печени, которые трудно поддаются лечению. В группе пациентов с циррозом CPA (цирроз с легким нарушением функции печени), инфицированных HCV GT1 или HCV GT3, среднее

максимальное снижение РНК HCV составило $4,4 \log_{10}$ МЕ/мл при введении QD в течение семи дней (Zhou, X. et al. «AT-527, a pan-genotypic purine nucleotide prodrug, exhibits potent antiviral activity in subjects with chronic hepatitis C», представлено на Международном конгрессе по печени 2018 года; 13 апреля 2018 г.; Париж, Франция). На Фигурах 25-31 показаны уровни метаболита соединения 1 и вирусной РНК HCV у пациентов с циррозом печени, которым вводили соединение 1. На Фигуре 27 показано, что соединение 1 одинаково эффективно как у пациентов с циррозом, так и у пациентов без цирроза.

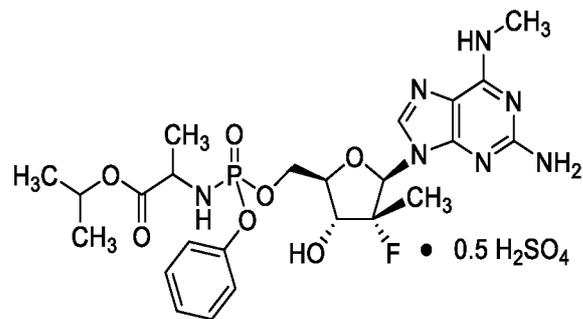
Если не указано иное, соединение 1 или его фармацевтически приемлемая соль, например, соединение 1-A, представлено в β -D-конфигурации. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемая соль, например соединение 1-A, могут быть представлены в β -L-конфигурации. Фосфорамидат соединения 1 или его фармацевтически приемлемая соль, например соединение 1-A, могут быть представлены в виде R- или S-хирального фосфорного производного, или их смеси, включая рацемическую или диастереомерную смесь. Все комбинации этих стереоконфигураций представляют собой альтернативные варианты осуществления настоящего изобретения.

Эти альтернативные конфигурации включают, но без ограничения, следующие структуры:





Дополнительная альтернативная конфигурация включает следующую структуру:

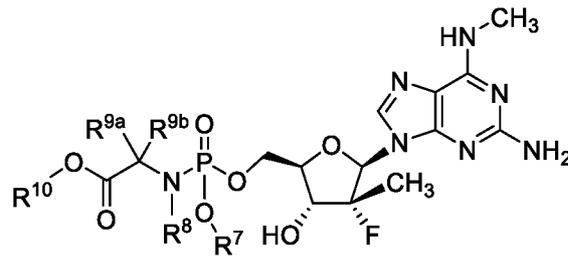


В одном варианте осуществления настоящего изобретения любой из вышеуказанных стереоизомеров или фармацевтически приемлемая соль стереоизомера

используется в качестве соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли в любом из аспектов настоящего изобретения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения любой из вышеуказанных стереоизомеров или фармацевтически приемлемая соль стереоизомера используется в качестве соединения **1-A** в любом из аспектов настоящего изобретения.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения соединение **1-A** представлено в виде гемисульфатной соли фосфорамидата, отличного от конкретного фосфорамидата, описанного в качестве иллюстративного соединения.

В другом альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения соединение **1** или его фармацевтически приемлемая соль представлены в виде фосфорамидата, отличного от конкретного фосфорамидата, описанного в качестве иллюстративного соединения. Специалистам в данной области известен широкий спектр фосфорамидатов, которые можно выбирать по желанию для получения активного соединения, как описано здесь. Например, фосфорамидат соединения **1** или его фармацевтически приемлемая соль включает соединение или его фармацевтически приемлемую соль формулы А:



в которой:

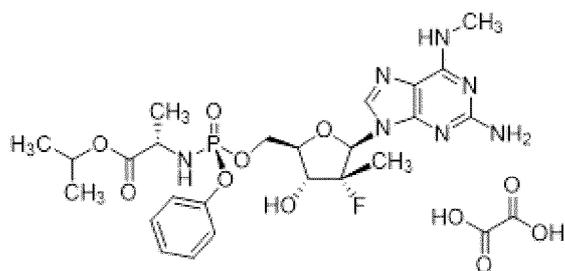
R^7 представляет собой водород, C_{1-6} алкил (включая метил, этил, пропил и изопропил), C_{3-7} циклоалкил или арил (включая фенил и нафтил);

R^8 представляет собой водород или C_{1-6} алкил (включая метил, этил, пропил и изопропил);

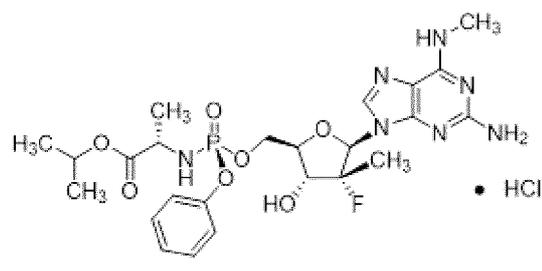
R^{9a} и R^{9b} независимо выбраны из водорода, C_{1-6} алкила (включая метил, этил, пропил и изопропил) или C_{3-7} циклоалкила; и

R^{10} представляет собой водород, C_{1-6} алкил (включая метил, этил, пропил и изопропил), C_{1-6} галогеналкил или C_{3-7} циклоалкил.

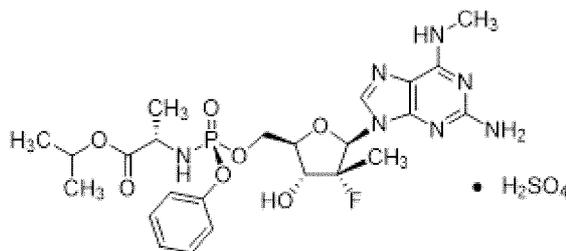
В альтернативных неограничивающих вариантах осуществления настоящее изобретение включает соединение **1** в виде оксалата (соединение **1-B**), соли HCl (соединение **1-C**) или сульфатной соли (соединение **1-D**).



Соединение 1-B



Соединение 1-C



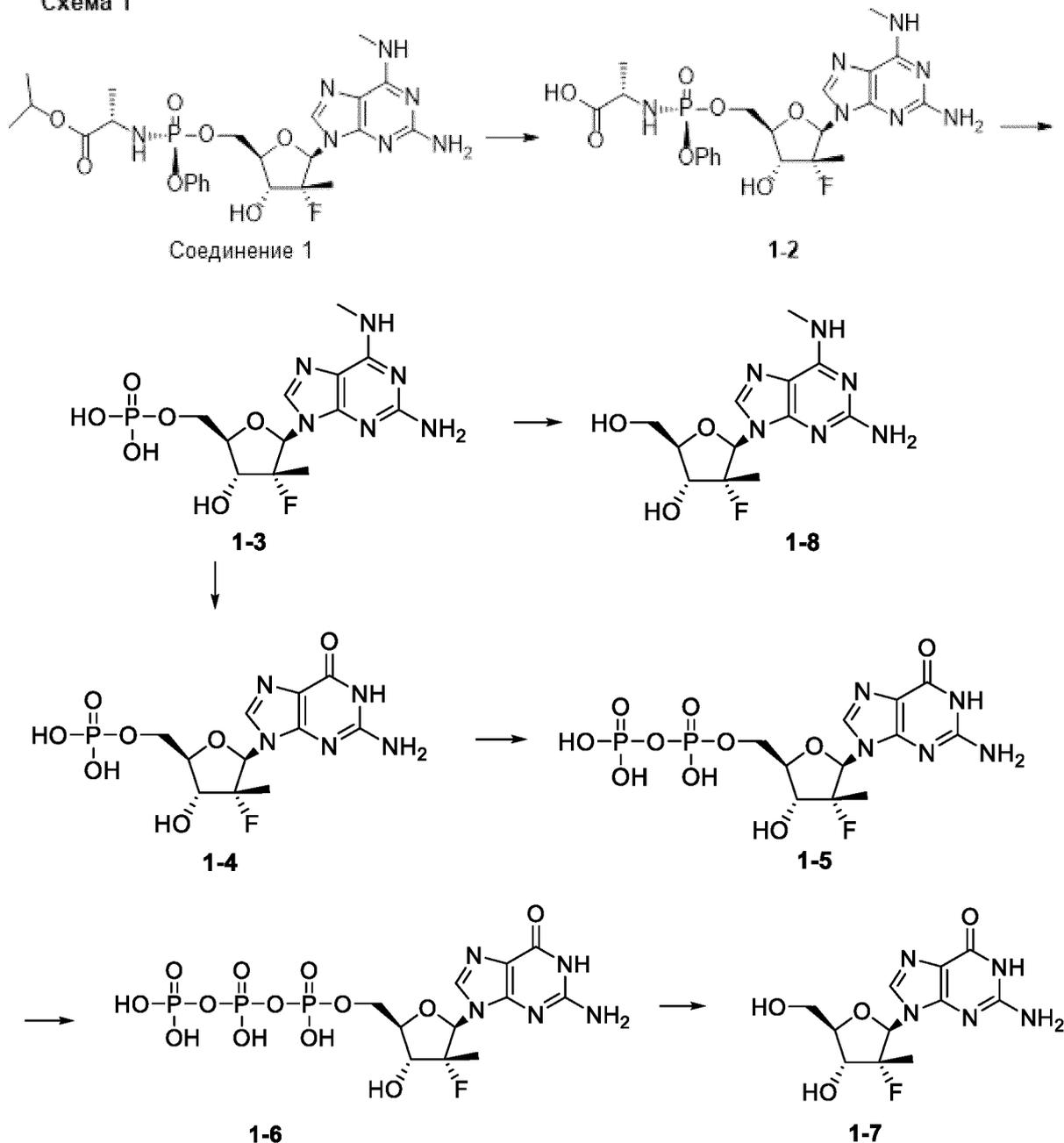
Соединение 1-D

Метаболизм соединения **1** и соединения **1-A** включает продукцию 5'-монофосфата и последующий анаболизм N⁶-метил-2,6-диаминопуринового основания (**1-3**) с образованием ((2R,3R,4R,5R)-5-(2-амино-6-оксо-1,6-дигидро-9H-пурин-9-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метилдигидрофосфата (**1-4**) в виде 5'-монофосфата. Затем монофосфат далее анаболизируется до активных видов трифосфата: 5'-трифосфата (**1-6**). 5'-трифосфат может далее метаболизироваться с образованием 2-амино-9-((2R,3R,4R,5R)-3-фтор-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)-3-метилтетрагидрофуран-2-ил)-1,9-дигидро-6H-пурин-6-она (**1-7**). На Фиг. 17-24 приведены фармакокинетические (PK) характеристики и свойства соединения **1-A** и основных метаболитов. Хотя соединение **1-A** метаболизируется в течение 8 часов, активные метаболиты присутствуют до 24 часов. В течение 24 часов присутствия метаболитов наблюдается подавление вирусной РНК HCV. При дозах 300 мг концентрации метаболитов соединения **1-A** в плазме выше, чем EC₉₅ против HCV GT1b. На Фиг. 16 показаны полезные свойства и показатели биораспределения соединения **1-A**. Соединение концентрируется в печени, органе-мишени для инфекции HCV, а не в сердце. Поскольку концентрация в печени высока, то можно использовать более низкую дозу. Эффект не является видоспецифичным, и он наблюдался у трех различных доклинических видов. На Фиг. 24 показано сравнение EC₉₅ для соединения **1** и софосбувира в отношении HCV различных генотипов. Софосбувир имеет варьирующие значения EC₉₅ в зависимости от генотипа, но

EC₉₅ для соединения 1 имеет небольшие вариации значений EC₉₅ для различных генотипов.

Альтернативно, 5'-монофосфат 1-2 может метаболизироваться с образованием пуринового основания **1-8**. Путь метаболизма изопропил((*S*)-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-(2-амино-6-(метиламино)-9*H*-пурин-9-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)-L-аланината показан на схеме 1:

Схема 1



Компания Atea Pharmaceuticals, Inc. раскрыла β -D-2'-дезоксидезокси-2'- α -фтор-2'- β -C-замещенные-2-модифицированные-N⁶-(моно- и ди- метил) пуриновые нуклеотиды для лечение HVC в патентах США №№ 9828410; 10000523; 10005811; 10239911, 10815266; 10870672; 10870673; 10870885; 10519186; 10906928; 10894804; и в заявках РСТ № WO 2016/144918; WO 2018/048937; WO 2018/013937 и WO 2018/144640. Компания Atea также

описала β -D-2'-дезоксидезокси-2'-замещенные-4'-замещенные-2-N⁶-замещенные-6-аминопуриновые нуклеотиды для лечения парамиксовирусных и ортомиксовирусных инфекций в патенте США № 10202412 и заявке PCT № WO 2018/009623.

Соединение 2

Соединение 2 раскрыто в заявке PCT № WO 2014/110705 и в патенте США № 9555038, переданных компании Merck and Company. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 2 вводят в виде его фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления настоящего изобретения используется твердая форма соединения 2. В одном варианте осуществления настоящего изобретения твердая форма соединения 2 представляет собой твердое кристаллическое вещество.

Синтез рузасвира (диметил N,N'-((6S)-6-(2-циклопропил-1,3-тиазол-5-ил)-1-фтор-6H-индоло[1,2-c][1,3]бензоксазин-3,10-диил)бис{1H-имидазол-5,2-диил-(2S)-пирролидин-2,1-диил[(2S)-3-метил-1-оксобутан-1,2-диил]})дикарбамат, соединение 2) известен в данной области. Неограничивающие примеры методов синтеза, которые можно использовать для синтеза соединения 2, включают те, которые показаны в Примере 29 и описаны в заявке PCT № WO 2016/196932, переданной компании Merck.

Определения

Термин «D-конфигурация», используемый в контексте настоящего изобретения, относится к основной конфигурации, которая имитирует природную конфигурацию сахарных фрагментов, в отличие от нуклеозидов неприродного происхождения, или «L»-конфигурации. Термин « β » или « β -аномер» используется по отношению к аналогам нуклеозидов, в которых нуклеозидное основание в нуклеозидном аналоге расположено (находится) над плоскостью фуранозного фрагмента.

Термины «совместное введение» и «совместно вводятся» или «комбинированная терапия» используются для описания введения соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли согласно настоящему изобретению в комбинации с соединением 2 или его фармацевтически приемлемой солью. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемая соль, например соединение 1-A, и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль вводят по меньшей мере с одним другим активным агентом, например, при необходимости, по меньшей мере с одним дополнительным средством (агентом) против НВС. Время при совместном введении лучше всего определяет врач-специалист, лечащий пациента. Иногда предпочтительно, чтобы агенты вводились одновременно или, по

меньшей мере, таким образом, чтобы обеспечить перекрывающееся фармакологическое действие двух лекарств у пациента, подлежащего лечению. Альтернативно, лекарства, выбранные для комбинированной терапии, можно вводить пациенту в разное время. Конечно, когда имеет место присутствие более одной вирусной или другой инфекции, или пациента имеет также другую дополнительную патологию, то соединения по изобретению можно комбинировать с другими средствами (агентами) для лечения этой другой инфекции или патологии по мере необходимости.

Термин «хозяин», используемый здесь, относится к одноклеточному или многоклеточному организму, в котором вирус HCV может реплицироваться, включая клеточные линии и животных, и обычно человека. Термин «хозяин» конкретно относится к инфицированным клеткам, клеткам, трансфицированным всем геномом HVC или его частью, и животным, в частности приматам (включая шимпанзе), и людям, которые несут геном HVC или его часть, которые могут лечиться комбинацией, описанной в настоящем документе. В большинстве вариантов применений настоящего изобретения в отношении животных, хозяином является пациент-человек, и такие варианты осуществления настоящего изобретения включают, но без ограничения, режим дозирования с перекрывающейся фармакокинетикой. Однако при определенных условиях настоящее изобретение явно предполагает применение его в ветеринарии (например, для лечения шимпанзе). Хозяином также может быть, например, крупный рогатый скот, лошадь, птица, собака, кошка и т.п., способные переносить и передавать вирус.

«Фармацевтически приемлемая соль» представляет собой производное раскрытого здесь соединения, в котором исходное соединение модифицировано до его неорганической и органической соли путем присоединения кислоты или основания, которые не являются чрезмерно токсичными. Соли соединений настоящего изобретения могут быть синтезированы из исходного соединения с основной или кислотной группой обычными химическими методами. Обычно такие соли соединений настоящего изобретения можно получить путем взаимодействия свободных кислотных форм соединений со стехиометрическим количеством соответствующего основания (такого как гидроксид, карбонат, бикарбонат Na, Ca, Mg или K и т.п.) или путем взаимодействия этих соединений в форме свободного основания со стехиометрическим количеством соответствующей кислоты. Такие реакции обычно проводят в воде, органическом растворителе или их смеси. Обычно, если это практически осуществимо, типичными являются неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил. Соли соединений настоящего изобретения необязательно могут быть предоставлены в форме сольвата.

Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но без ограничения, соли минеральных или органических кислот с основными остатками, такими как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, такие как карбоновые кислоты; и т.п. Фармацевтически приемлемые соли включают обычные соли и четвертичные аммониевые соли исходного соединения по изобретению, образованные, например, из неорганических или органических кислот, которые не являются чрезмерно токсичными. Например, обычные кислотные соли включают соли, полученные с помощью неорганических кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, серная, сульфаминовая, фосфорная, азотная и т.п. кислоты; и соли, полученные с помощью органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, стеариновая, молочная, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, памовая, малеиновая, гидроксималеиновая, фенилуксусная, глутаминовая, бензойная, салициловая, мезиловая, есиловая, безиловая, сульфаниловая, 2-ацетоксибензойная, фумаровая, толуолсульфоновая, метансульфоновая, этандисульфоновая, щавелевая, изетионовая кислоты, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, где n равно 0-4, и т.п., или с использованием другой кислоты, которая продуцирует противоион. Перечень дополнительных подходящих солей можно найти, например, в справочнике Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., p. 1418 (1985).

Соединение в солях можно представлять при любом молярном соотношении, которое обеспечивает желаемый результат. Например, соединение может содержать менее одного молярного эквивалента противоиона, например, когда оно представлено в виде гемисульфатной соли. Альтернативно, соединение может быть представлено с более чем одним молярным эквивалентом противоиона, например, в форме дисульфатной соли. Неограничивающие примеры молярных соотношений соединения и противоиона включают значения 1:0,25, 1:0,5, 1:1 и 1:2.

Изотопное замещение

Настоящее изобретение включает комбинации соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли, например соединения **1-A**, и соединения **2** или его фармацевтически приемлемой соли, где одно или оба соединения имеют желаемые изотопные замещения атомов в количествах, превышающих естественное содержание изотопа, т.е. обогащенные. Изотопы - это атомы, имеющие одинаковый атомный номер, но разные массовые числа, т.е. одинаковое количество протонов, но разное количество нейтронов. В качестве общего примера, но без ограничения, в любом месте описанных структур могут использоваться изотопы водорода, например, дейтерий (^2H) и тритий (^3H).

Альтернативно или дополнительно можно использовать изотопы углерода, например, ^{13}C и ^{14}C . Для улучшения эффективности действия лекарственного средства предпочтительной изотопной заменой водорода в одном или нескольких местах молекулы является дейтерий. Дейтерий может быть связан в месте разрыва связи во время метаболизма (кинетический изотопный эффект α -дейтерия), или рядом с местом разрыва связи, или рядом с ним (кинетический изотопный эффект β -дейтерия). В заявках РСТ WO/2014/169278 и WO/2014/169280 (Achillion Pharmaceuticals, Inc.) описано дейтерирование нуклеотидов для улучшения их фармакокинетики или фармакодинамики, в том числе в 5-положении молекулы.

Замена изотопами, такими как дейтерий, может обеспечить определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, включая, например, увеличение периода полураспада *in vivo* или снижение требований к дозировке. Замена водорода на дейтерий в месте метаболического распада может снизить скорость или устранить метаболизм по этой связи. В любом положении соединения, где может присутствовать атом водорода, атом водорода может представлять собой любой изотоп водорода, включая протий (^1H), дейтерий (^2H) и тритий (^3H). Таким образом, ссылка на соединение, описанное здесь, охватывает все возможные изотопные формы, если из контекста явно не следует иное.

Термин «меченый изотопами» аналог относится к аналогу, который представляет собой «дейтерированный аналог», « ^{13}C -меченный аналог» или «дейтерированный/ ^{13}C -меченный аналог». Термин «дейтерированный аналог» означает соединение, описанное здесь, в котором Н-изотоп, т.е. водород/протий (^1H), замещен Н-изотопом, т.е. дейтерием (^2H). Замещение дейтерием может быть частичным или полным. Частичное замещение дейтерием означает, что по меньшей мере один водород заменен по меньшей мере одним дейтерием. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изотоп обогащен на 90, 95 или 99% или более по изотопу, расположенному в любом представляющем интерес месте. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения речь идет о дейтерии, обогащенном на 90, 95 или 99%, расположенном в желаемом месте. Если не указано иное, то дейтерирование составляет по меньшей мере 80% в указанном месте. Дейтерирование нуклеозида может происходить по любому замещаемому водороду, если это обеспечивает желаемые результаты.

Способы лечения

Термин «лечение», как используется здесь, относится к введению комбинации по изобретению в эффективном количестве хозяину, например, человеку, который

инфицирован или может быть инфицирован вирусом HCV. В одном варианте осуществления настоящего изобретения способ лечения предусматривает введение эффективного количества соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли и соединения **2** или его фармацевтически приемлемой соли хозяину, например человеку, который инфицирован или может быть инфицирован вирусом HCV. В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ лечения предусматривает введение соединения **1-А** и соединения **2** хозяину, например человеку, который инфицирован или может быть инфицирован вирусом HCV.

Термины «профилактика» или «предотвращение» при использовании здесь относятся к введению комбинации по изобретению для исключения вероятности или снижения вероятности возникновения вирусного заболевания. В альтернативном варианте настоящее изобретение предлагает лечение и профилактическую или превентивную терапию. В одном варианте осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят хозяину, который подвергся воздействию вируса гепатита С и, следовательно, он подвергается риску заражения и возникновения заболевания.

Изобретение предлагает способ лечения инфекции, вызванной вирусом гепатита С, путем введения эффективного количества синергической комбинации соединения **1** (такого как соединение **1-А**) и соединения **2**, где вирус гепатита С включает формы HVC с лекарственной устойчивостью и множественной лекарственной устойчивостью, а также лечения связанных патологий, состояний или осложнений при инфекции HVC, включая цирроз печени и связанную с ним гепатотоксичность, а также другие состояния, вторичные по отношению к инфекции HVC, такие как слабость, потеря аппетита, потеря веса, увеличение молочных желез (особенно у мужчин), сыпь (особенно на ладонях), затруднение свертывания крови, паукообразные сосуды на коже, спутанность сознания, кома (энцефалопатия), скопление жидкости в брюшной полости (асцит), варикозное расширение вен пищевода, портальная гипертензия, почечная недостаточность, увеличение селезенки, уменьшение количества клеток крови, анемия, тромбоцитопения, желтуха, гепатоцеллюлярный рак и другие. Способ предусматривает введение нуждающемуся в этом хозяину, обычно человеку, эффективного количества описанной здесь комбинации, необязательно в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным биоактивным агентом, например, дополнительным агентом против HVC, дополнительно и необязательно в комбинации с фармацевтически приемлемой добавкой, носителем и/или эксципиентом. В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ предусматривает введение пациенту с риском инфицирования HCV эффективного количества комбинации по изобретению. В другом варианте осуществления

настоящего изобретения описанную выше комбинацию используют с фармацевтически приемлемым носителем, добавкой или эксципиентом, необязательно в комбинации с третьим агентом против HVC. В другом варианте осуществления настоящего изобретения комбинацию настоящего изобретения можно вводить пациенту после трансплантации печени, связанной с гепатитом, для защиты нового органа.

Комбинированная терапия и лекарственные формы по изобретению также могут быть использованы для лечения состояний, связанных или возникающих в результате воздействия вируса HCV. Например, активное соединение можно использовать для лечения состояний, положительных по антителам к HVC и положительных по антигену HVC, хронического вирусного воспаления печени, рака печени, возникшего в результате прогрессирующего гепатита С (например, гепатоцеллюлярной карциномы), цирроза печени, острого гепатита С, гепатита С с молниеносным течением, хронического персистирующего гепатита С и усталости, вызванной терапией против HVC. Комбинацию также можно использовать в целях профилактики для предотвращения или ограничения прогрессирования клинических признаков заболевания у лиц, имеющих антитела или антиген-положительные антитела к HVC или подвергшихся воздействию вируса гепатита С.

Фармацевтические композиции и лекарственные формы

Введение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли и соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли можно осуществлять в любой желаемой форме, включая, но без ограничения, пероральное, местное, парентеральное, внутримышечное, внутривенное, подкожное, чрескожное (при котором можно использовать агент, усиливающий проникновение), буккальное введение, а также введение в виде суппозитория, среди других способов введения. В одном варианте осуществления настоящего изобретения активное соединение или комбинация соединений по изобретению представлены в виде твердых дозированных лекарственных форм, которые хорошо известны в данной области техники и дополнительно описаны ниже. При пероральном способе введения для повышения биодоступности соединений также можно использовать таблетки с энтеросолюбильным покрытием. Выбор наиболее эффективных лекарственных форм будет зависеть от биодоступности/фармакокинетики конкретных выбранных агентов, а также от тяжести заболевания у пациента. Пероральные дозированные лекарственные формы особенно предпочтительны из-за простоты их введения и ожидаемого благоприятного соблюдения пациентами режима лечения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции по изобретению содержат эффективное против вируса HCV количество каждого отдельного соединения или комбинированной формы, содержащей соединения **1** или его фармацевтически приемлемую соль и соединение **2** или его фармацевтически приемлемую соль, как описано здесь, необязательно в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, добавкой или эксципиентом, а также дополнительно и необязательно в комбинации или с чередованием введения по меньшей мере одного другого активного соединения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения комбинация включает твердую дозированную лекарственную форму соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли, например, соединения **1-A**, и соединения **2** или его фармацевтически приемлемой соли в фармацевтически приемлемом носителе. Эта фармацевтическая композиция может содержать как соединение **1** или его фармацевтически приемлемую соль, так и соединение **2** или его фармацевтически приемлемую соль, или, альтернативно, эти соединения могут находиться в отдельных дозированных лекарственных формах, которые вводят таким образом, чтобы хозяин получал пользу от обоих соединений в согласованном режиме, измеренном с помощью методов стандартной фармакокинетики.

Специалисту в данной области техники понятно, что терапевтически эффективное количество будет варьироваться в зависимости от инфекции или состояния, подлежащего лечению, его тяжести, используемой схемы лечения, фармакокинетики используемого агента, а также от пациента или субъекта (животное или человек), подлежащего лечению, и такое терапевтически эффективное количество может быть определено лечащим врачом или специалистом.

Соединение **1** или его фармацевтически приемлемая соль, например соединение **1-A** и соединение **2** или его фармацевтически приемлемая соль могут быть приготовлены и представлены в виде одной или нескольких смесей с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В общем, предпочтительно вводить одну или несколько фармацевтических композиций в форме для перорального введения и, в частности, в виде одной или нескольких твердых дозированных лекарственных форм, таких как пилюля или таблетка. Некоторые формы препаратов можно вводить парентерально, внутривенно, внутримышечно, местно, чрескожно, буккально, подкожно, в виде суппозиторий или другим путем, включая использование интраназального спрея. Препараты для внутривенного и внутримышечного введения обычно вводят с использованием стерильного физиологического раствора. Специалист в данной области может модифицировать составы препаратов, чтобы сделать их более растворимыми в воде

или другом носителе, например, этого можно легко достичь путем незначительных модификаций (солевой состав, этерификация и т.п.), которые вполне доступны обычному специалисту в данной области. В компетенции обычных специалистов в данной области также находится модификация путей введения и режима дозирования соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли, например соединения **1-A**, и соединения **2** или его фармацевтически приемлемой соли для управления фармакокинетикой соединений по изобретению для достижения максимального полезного эффекта у пациентов.

В некоторых фармацевтических дозированных формах могут быть использованы пролекарственные формы соединений по изобретению, включая ацилированные (ацетилированные или другие) и эфирные (алкильные и родственные) производные, фосфатные эфиры, тиофосфорамидаты, фосфорамидаты и различные солевые формы соединений по изобретению, чтобы достичь желаемый эффект. Специалисту в данной области техники понятно, как можно модифицировать соединения по изобретению, чтобы получить пролекарства с целью облегчения доставки активных соединений в целевой участок или область в организме хозяина или пациента. Специалист в данной области также может воспользоваться преимуществами, следующими из фармакокинетических параметров пролекарств, где это применимо, при доставке соединений по изобретению в целевой участок или область в организме хозяина или пациента, чтобы максимизировать ожидаемый эффект действия соединения.

Количества, упомянутые здесь, обычно относятся к свободной форме (т.е. несоленой, гидратной или сольватной форме) соединений. Типичные значения, описанные здесь, представляют собой эквиваленты для свободной формы, т.е. количества, которые соответствуют величине, если бы была введена свободная форма соединения. Если вводятся соли, то количества необходимо рассчитывать в зависимости от соотношения молекулярных масс соли и свободной формы.

Количество соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли, например соединения **1-A** и соединения **2** или его фармацевтически приемлемой соли, включенной в терапевтически активный препарат по изобретению, представляет собой эффективное количество для достижения желаемого результата, согласно настоящему изобретению, например, для лечения инфекции HCV, снижения вероятности инфицирования HCV или ингибирования, снижения и/или устранения HVC или вторичных эффектов от HVC, включая патологии, состояния и/или осложнения, возникающие вторично по отношению к HVC. В общем, терапевтически эффективное количество соединений по изобретению в фармацевтической лекарственной форме может находиться в диапазоне, например, от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг из расчета введения в день или

более. Соединение **1** или соединение **1-A** можно вводить пациенту, например, в количествах в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг в день, в зависимости от фармакокинетики агента у пациента.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в лекарственной дозированной форме содержится 600 мг соединения **1-A**, что соответствует 550 мг соединения **1**.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция представлена в виде дозированной лекарственной формы, которая содержит соединение **1** или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от приблизительно 1 мг до приблизительно 2000 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 100 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 500 мг или от приблизительно 400 мг до приблизительно 450 мг соединения **1** или эквивалентное количество соединения **1-A**, и дополнительно она содержит соединение **2** или его фармацевтически приемлемую соль в количестве от приблизительно 1 мг до приблизительно 2000 мг, от приблизительно 10 до приблизительно 1000 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 800 мг соединения **2** или эквивалентного количества фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

В альтернативных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция представлена в виде дозированной лекарственной формы, которая содержит от приблизительно 500 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 550 мг до приблизительно 750 мг, от приблизительно 600 мг до приблизительно 800 мг или от приблизительно 1000 мг до приблизительно 1300 мг соединения **1** или эквивалентное количество соединения **1-A**, и дополнительно она содержит приблизительно 100-800 мг, приблизительно 150-200 мг, приблизительно 250-300 мг или приблизительно 350, до приблизительно 400 мг соединения **2** или эквивалентного количества фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция представлена в виде дозированной лекарственной формы, например в виде твердой дозированной лекарственной формы, которая содержит до приблизительно 10, до приблизительно 50, до приблизительно 100, до приблизительно 125, до приблизительно 150, до приблизительно 175, до приблизительно 200, до приблизительно 225, до приблизительно 250, до приблизительно 275, до приблизительно 300, до приблизительно 325, до приблизительно 350, до приблизительно 375, до приблизительно 400, до приблизительно 425, до приблизительно 450, до приблизительно 475, до приблизительно

500, до приблизительно 525, до приблизительно 550, до приблизительно 575, до приблизительно 600, до приблизительно 625, до приблизительно 650, до приблизительно 675, до приблизительно 700, до приблизительно 725, до приблизительно 750, до приблизительно 775, до приблизительно 800, до приблизительно 825, до приблизительно 850, до приблизительно 875, до приблизительно 900, до приблизительно 925, до приблизительно 950, до приблизительно 975 или приблизительно 1000 мг или более соединения **1** или эквивалентное количество соединения **1-А** в единичной дозированной лекарственной форме.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция представлена в виде дозированной лекарственной формы, например в виде твердой дозированной лекарственной формы, которая содержит до приблизительно 10, до приблизительно 50, до приблизительно 60, до приблизительно 100, до приблизительно 125, до приблизительно 150, до приблизительно 175, до приблизительно 200, до приблизительно 225, до приблизительно 250, до приблизительно 275, до приблизительно 300, до приблизительно 325, до приблизительно 350, до приблизительно 375, до приблизительно 400, до приблизительно 425, до приблизительно 450, до приблизительно 475, до приблизительно 500, до приблизительно 525, до приблизительно 550, до приблизительно 575, до приблизительно 600, до приблизительно 625, до приблизительно 650, до приблизительно 675, до приблизительно 700, до приблизительно 725, до приблизительно 750, до приблизительно 775, до приблизительно 800, до приблизительно 825, до приблизительно 850, до приблизительно 875, до приблизительно 900, до приблизительно 925, до приблизительно 950, до приблизительно 975 или приблизительно 1000 мг или более соединения **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

В альтернативных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция представлена в виде дозированной лекарственной формы, например в виде твердой дозированной лекарственной формы, которая содержит приблизительно 90, приблизительно 180, приблизительно 270 или приблизительно 360 мг соединения **2** или эквивалентного количества фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения твердая дозированная лекарственная форма содержит до приблизительно 800 мг, до приблизительно 700 мг, до приблизительно 600 мг, до приблизительно 550 мг, до приблизительно 500 мг, до приблизительно 400 мг, до приблизительно 300 мг, до приблизительно 200 мг или до приблизительно 100 мг соединения **1** или эквивалентное количество соединения **1-А**, и до

приблизительно 360 мг, до приблизительно 270 мг, до приблизительно 180 мг, до приблизительно 145 мг, до приблизительно 130 мг, до приблизительно 125 мг, до приблизительно 110 мг, до приблизительно 100 мг, до приблизительно 90 мг, до приблизительно 75 мг, до приблизительно 70 мг, до приблизительно 65 мг, до приблизительно 60 мг, до приблизительно 55 мг, до приблизительно 50 мг, до приблизительно 45 мг, до приблизительно 40 мг, до приблизительно 35 мг, до приблизительно 30 мг, до приблизительно 25 мг, до приблизительно 20 мг, до приблизительно 15 мг, до приблизительно 10 мг или до приблизительно 5 мг соединения **2** или эквивалентного количества фармацевтически приемлемой соли соединения **2**, где указанную дозированную форму для лечения инфекции, вызванной HVC, вводят один раз в день хозяину, нуждающемуся в этом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения твердая дозированная лекарственная форма содержит по меньшей мере приблизительно 100 мг, по меньшей мере приблизительно 200 мг, по меньшей мере приблизительно 300 мг, по меньшей мере приблизительно 400 мг, по меньшей мере приблизительно 500 мг, по меньшей мере приблизительно 550 мг, по меньшей мере приблизительно 600 мг, по меньшей мере приблизительно 700 мг, по меньшей мере приблизительно 750 мг или по меньшей мере приблизительно 1100 мг соединения **1** или эквивалентное количество соединения **1-A**, и по меньшей мере приблизительно 5 мг, по меньшей мере приблизительно 10 мг, по меньшей мере приблизительно 15 мг, по меньшей мере приблизительно 20 мг, по меньшей мере приблизительно 25 мг, по меньшей мере приблизительно 30 мг, по меньшей мере приблизительно 35 мг, по меньшей мере приблизительно 40 мг, по меньшей мере приблизительно 45 мг, по меньшей мере приблизительно 50 мг, по меньшей мере приблизительно 55 мг, по меньшей мере приблизительно 60 мг, по меньшей мере приблизительно 65 мг, по меньшей мере приблизительно 70 мг, по меньшей мере приблизительно 75 мг, по меньшей мере приблизительно 90 мг, по меньшей мере приблизительно 100 мг, по меньшей мере приблизительно 110 мг, по меньшей мере приблизительно 125 мг, по меньшей мере приблизительно 130 мг, по меньшей мере приблизительно 145 мг, по меньшей мере приблизительно 180 мг, по меньшей мере приблизительно 270 мг, по меньшей мере приблизительно 360 мг, по меньшей мере приблизительно 400 мг или по меньшей мере приблизительно 500 мг соединения **2** или эквивалентного количества фармацевтически приемлемой соли соединения **2**, где указанную дозированную форму для лечения инфекции, вызванной HVC, вводят один раз в день хозяину, нуждающемуся в этом.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения твердая дозированная лекарственная форма содержит до приблизительно 1100 мг, до приблизительно 750 мг или до приблизительно 550 мг соединения **1** или эквивалентное количество соединения **1-A**, и до приблизительно 360 мг, до приблизительно 270 мг, до приблизительно 180 мг, до приблизительно 90 мг соединения **2** или эквивалентного количества фармацевтически приемлемой соли соединения **2**, где указанную дозированную форму для лечения инфекции, вызванной HVC, вводят один раз в день хозяину, нуждающемуся в этом.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения твердая дозированная лекарственная форма, содержащая по меньшей мере приблизительно 500 мг, по меньшей мере приблизительно 550 мг, по меньшей мере приблизительно 750 мг или по меньшей мере приблизительно 1100 мг соединения **1** или эквивалентное количество соединения **1-A**, и по меньшей мере приблизительно 90 мг, по меньшей мере приблизительно 180 мг, по меньшей мере приблизительно 270 мг, по меньшей мере приблизительно 360 мг соединения **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**, где указанную дозированную форму для лечения инфекции, вызванной HVC, вводят два раза в день хозяину, нуждающемуся в этом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения комбинацию соединений, описанную в настоящем документе, вводят в виде одной таблетки, которая содержит до приблизительно 600 мг соединения **1-A** и до приблизительно 90, 180, 270 или 360 мг соединения **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения комбинацию соединений, описанную в настоящем документе, вводят в виде одной таблетки, которая содержит до приблизительно 600 мг соединения **1-A** и до приблизительно 180 мг соединения **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения комбинацию соединений, описанную в настоящем документе, вводят в виде одной таблетки, которая содержит до приблизительно 600 мг соединения **1-A** и до приблизительно 270 мг соединения **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения комбинацию соединений, описанную в настоящем документе, вводят в виде одной таблетки, которая содержит до приблизительно 600 мг соединения **1-A** и до приблизительно 360 мг

соединения **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения комбинацию соединений, описанную в настоящем документе, вводят в виде одной таблетки, которая содержит до приблизительно 750 мг соединения **1-А** и до приблизительно 180 мг соединения **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения комбинацию соединений, описанную в настоящем документе, вводят в виде одной таблетки, которая содержит до приблизительно 750 мг соединения **1-А** и до приблизительно 270 мг соединения **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения комбинацию соединений, описанную в настоящем документе, вводят в виде одной таблетки, которая содержит до приблизительно 750 мг соединения **1-А** и до приблизительно 360 мг соединения **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения комбинацию соединений, описанную в настоящем документе, вводят в виде одной таблетки, которая содержит до приблизительно 1200 мг соединения **1-А** и до приблизительно 180 мг соединения **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения комбинацию соединений, описанную в настоящем документе, вводят в виде одной таблетки, которая содержит до приблизительно 1200 мг соединения **1-А** и до приблизительно 270 мг соединения **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения комбинацию соединений, описанную в настоящем документе, вводят в виде одной таблетки, которая содержит до приблизительно 1200 мг соединения **1-А** и до приблизительно 360 мг соединения **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**.

Альтернативно, твердую дозированную лекарственную форму, содержащую соединение **1-А** или эквивалентное количество соединения **1**, может вводить в комбинации с отдельной твердой дозированной лекарственной формой, содержащей

соединение **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**. Эту комбинацию можно вводить один, два, три или до четырех раз в день по указанию врача. В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение **1-А** или соединение **1** вводят по схеме, отличающейся от схемы введения соединения **2**. Например, соединение **1** или эквивалентное количество соединения **1-А** вводят два раза в день, тогда как соединение **2** вводят только один раз в день, или наоборот: соединение **2** вводят несколько раз в день, в то время как соединение **1** или эквивалентное количество соединения **1-А** вводят только один раз в день.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения твердая дозированная лекарственная форма содержит до приблизительно 800 мг, до приблизительно 700 мг, до приблизительно 600 мг, до приблизительно 500 мг, до приблизительно 400 мг, до приблизительно 300 мг, до приблизительно 200 мг или до приблизительно 100 мг соединения **1**, или эквивалентное количество соединения **1-А**, где указанную дозированную форму для лечения инфекции, вызванной НВС, вводят один раз в день хозяину, нуждающемуся в этом, и отдельная твердая лекарственная форма содержит до приблизительно 145 мг, до приблизительно 130 мг, до приблизительно 125 мг, до приблизительно 110 мг, до приблизительно 100 мг, до приблизительно 90 мг, до приблизительно 75 мг, до приблизительно 70 мг, до приблизительно 65 мг, до приблизительно 60 мг, до приблизительно 55 мг, до приблизительно 50 мг, до приблизительно 45 мг, до приблизительно 40 мг, до приблизительно 35 мг, до приблизительно 30 мг, до приблизительно 25 мг, до приблизительно 20 мг, до приблизительно 15 мг, до приблизительно 10 мг или до приблизительно 5 мг соединения **2** или эквивалентного количества фармацевтически приемлемой соли соединения **2**, где указанную дозированную форму для лечения инфекции, вызванной НВС, вводят один раз в день хозяину, нуждающемуся в этом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения твердая дозированная лекарственная форма содержит по меньшей мере приблизительно 100 мг, по меньшей мере приблизительно 200 мг, по меньшей мере приблизительно 300 мг, по меньшей мере приблизительно 400 мг, по меньшей мере приблизительно 500 мг, по меньшей мере приблизительно 600 мг, по меньшей мере приблизительно 700 мг или по меньшей мере приблизительно 800 мг соединения **1** или эквивалентное количество соединения **1-А**, где указанную дозированную форму для лечения инфекции, вызванной НВС, вводят один раз в день хозяину, нуждающемуся в этом, и отдельная твердая дозированная лекарственная форма содержит по меньшей мере приблизительно 5 мг, по меньшей мере приблизительно 10 мг, по меньшей мере приблизительно 15 мг, по меньшей мере приблизительно 20 мг,

по меньшей мере приблизительно 25 мг, по меньшей мере приблизительно 30 мг, по меньшей мере приблизительно 35 мг, по меньшей мере приблизительно 40 мг, по меньшей мере приблизительно 45 мг, по меньшей мере приблизительно 50 мг, по меньшей мере приблизительно 55 мг, по меньшей мере приблизительно 60 мг, по меньшей мере приблизительно 65 мг, по меньшей мере приблизительно 70 мг, по меньшей мере приблизительно 75 мг, по меньшей мере приблизительно 80 мг, по меньшей мере приблизительно 90 мг, по меньшей мере приблизительно 100 мг, по меньшей мере приблизительно 110 мг, по меньшей мере приблизительно 125 мг по меньшей мере приблизительно 130 мг или по меньшей мере приблизительно 145 мг соединения **2** или эквивалентное количество фармацевтически приемлемой соли соединения **2**, где указанную дозированную форму для лечения инфекции, вызванной HVC, вводят один раз в день хозяину, нуждающемуся в этом.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию соединений, описанную в настоящем документе, вводят хозяину, нуждающемуся в этом, в виде следующих форм (т.е. либо в виде отдельных доз двух активных агентов, либо в виде комбинированной дозы двух активных соединений):

- (1) единичная дозированная лекарственная форма;
- (2) две дозированные лекарственные формы;
- (3) три или более дозированные лекарственные формы;
- (4) набор, содержащий две дозированные лекарственные формы;
- (5) набор, содержащий три или более дозированных лекарственных форм;

при этом дозированная лекарственная форма в каждом из вариантов осуществления (1)-(5) содержит:

(a) от приблизительно 500 или 550 мг до приблизительно 1100 мг соединения 1-А и эффективного количества соединения 2;

(b) от приблизительно 100 мг до приблизительно 800 мг соединения 1-А и эффективного количества соединения 2;

(c) от приблизительно 550 до приблизительно 650 мг соединения 1-А и эффективное количество соединения 2;

(d) от приблизительно 500 до приблизительно 750 мг соединения 1-А и эффективное количество соединения 2;

(e) от приблизительно 1000 до приблизительно 1300 мг соединения 1-А и эффективное количество соединения 2;

(f) по меньшей мере приблизительно 600 мг соединения 1-А и эффективное количество соединения 2;

(g) по меньшей мере приблизительно 750 мг соединения 1-А и эффективное количество соединения 2;

(h) по меньшей мере приблизительно 1100 мг соединения 1-А и эффективное количество соединения 2;

(i) любой из вариантов осуществления (a)-(h), где содержится от приблизительно 60 мг до приблизительно 500 мг соединения 2;

(j) любой из вариантов осуществления (a)-(h), где содержится от приблизительно 90 мг до приблизительно 360 мг соединения 2;

(k) любой из вариантов осуществления (a)-(h), где содержится от приблизительно 250 мг до приблизительно 300 мг соединения 2;

(l) любой из вариантов осуществления (a)-(h), где содержится от приблизительно 350 мг до приблизительно 400 мг соединения 2;

(m) любой из вариантов осуществления (a)-(h), где содержится по меньшей мере приблизительно 90 мг соединения 2;

(n) любой из вариантов осуществления (a)-(h), где содержится по меньшей мере приблизительно 180 мг соединения 2;

(o) любой из вариантов осуществления (a)-(h), где содержится по меньшей мере приблизительно 270 мг соединения 2;

(p) любой из вариантов осуществления (a)-(h), где содержится по меньшей мере приблизительно 360 мг соединения 2;

(q) любой из вариантов осуществления (1)-(5) и (a)-(h), где лекарственную форму вводят один раз в день;

(r) любой из вариантов осуществления (1)-(5) и (a)-(h), где лекарственную форму вводят два раза в день;

(s) любой из вариантов осуществления (1)-(5) и (a)-(h), где лекарственную форму вводят три или более раз в день;

(t) любой из вариантов осуществления (1)-(5) и (a)-(s), где лекарственную форму вводят перорально;

(u) любой из вариантов осуществления (1)-(5) и (a)-(t), где хозяином является человек.

В альтернативных вариантах осуществления настоящего изобретения хозяину, нуждающемуся в этом, может быть введено такое количество соединения 1, которое приводит к концентрации в плазме от приблизительно 0,15 нМ до приблизительно 1 нМ соединения 1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения хозяину, нуждающемуся в этом, может быть введено необходимое количество соединения 1

которое приводит к концентрации в плазме приблизительно от 0,25 до приблизительно 40 нМ соединения **1**. В одном варианте осуществления настоящего изобретения хозяину, нуждающемуся в этом, при необходимости может быть введено определенное количество соединения **1**, которое приводит к концентрации соединения **1** в плазме от приблизительно 40 до приблизительно 200 нМ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения хозяину, нуждающемуся в этом, может быть введено такое количество соединения **2**, которое приводит к концентрации в плазме от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 0,008 нМ соединения **2**.

Соединения в виде комбинации по изобретению часто вводят перорально, но их можно вводить парентерально, местно или в форме суппозитория, а также интраназально, в виде назального спрея или иным образом, как описано здесь. В более общем смысле, эти соединения можно вводить в виде одной или нескольких таблеток, капсул, в виде инъекционных форм, внутривенных препаратов, суспензий, жидкостей, эмульсий, имплантатов, частиц, микросфер, кремов, мазей, суппозитория, ингаляционных форм, трансдермальных форм, буккальных, подъязычных, местных формах, геля, средств для нанесения на слизистые оболочки и т.п.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере один раз в день на протяжении периода времени до 24 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере один раз в день на протяжении периода времени 12 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере один раз в день на протяжении периода времени 10 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере один раз в день на протяжении периода времени 8 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере один раз в день на протяжении периода времени 6 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере один раз в день на протяжении периода времени 4 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере один раз в день на протяжении периода времени по меньшей мере 4 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере один раз в день на протяжении периода времени по меньшей мере 6 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере один раз в день на протяжении периода времени по меньшей мере 8 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере один раз в

день на протяжении периода времени по меньшей мере 10 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере один раз в день на протяжении периода времени по меньшей мере 12 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере один раз в день на протяжении периода времени по меньшей мере 24 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере через день на протяжении периода времени периода до 24 недель, до 12 недель, до 10 недель, до 8 недель, до 6 недель или до 4 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения комбинацию вводят по меньшей мере через день на протяжении периода времени по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 6 недель, по меньшей мере 8 недель, по меньшей мере 10 недель, по меньшей мере 12 недель или по меньшей мере 24 недель.

Для целей настоящего изобретения количество, предотвращающее развитие инфекции, или профилактическое эффективное количество композиции по изобретению находится в том же диапазоне концентраций, который указан выше для терапевтически эффективного количества, и оно обычно совпадает с терапевтически эффективным количеством.

Для приготовления фармацевтических композиций по изобретению терапевтически эффективное количество соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли, например соединение **1-A**, и соединение **2** или его фармацевтически приемлемые соли могут быть тщательно смешаны с фармацевтически приемлемым носителем в соответствии с обычными фармацевтическими методами приготовления рецептур для получения необходимой дозы. Носитель может быть самым разнообразным в зависимости от формы препарата, желаемой для введения, например, пероральной или парентеральной. При приготовлении фармацевтических композиций в виде пероральной дозированной лекарственной формы можно использовать любую обычную фармацевтическую среду. Таким образом, для жидких пероральных препаратов, таких как суспензии, эликсиры и растворы, можно использовать подходящие носители и добавки, включая воду, гликоли, масла, спирты, ароматизаторы, консерванты, красители и т.п. Для твердых пероральных препаратов, таких как порошки, таблетки, капсулы, и для твердых препаратов, таких как суппозитории, могут быть использованы подходящие носители и добавки, включающие крахмалы, сахарные носители, такие как декстроза, манифоль, лактоза и аналогичные носители, разбавители, гранулирующие вещества, лубриканты, связующие, дезинтегранты и т.п. При желании таблетки или капсулы могут быть покрыты энтеросолюбильной оболочкой, или они могут иметь замедленное высвобождение, обеспечиваемое

стандартными методами. Использование этих лекарственных форм может значительно повысить биодоступность соединений для пациента.

Для парентеральных препаратов носитель обычно включает стерильную воду или водный раствор хлорида натрия, хотя могут быть использованы и другие ингредиенты, включая те, которые способствуют диспергированию. Конечно, если необходимо использовать стерильную воду и поддерживать ее стерильность, то композиции и носители также должны быть стерилизованы. Также можно приготовить суспензии для инъекций, и в этом случае можно использовать соответствующие жидкие носители, суспендирующие агенты и т.п.

Липосомальные суспензии (включая липосомы, нацеленные на вирусные антигены) также можно приготовить обычными способами, используемыми для получения фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть подходящими для доставки свободных нуклеозидов, ацил/алкилнуклеозидов или пролекарственных форм сложных эфиров фосфорной кислоты нуклеозидных соединений настоящего изобретения.

В типичных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическую композицию применяют для лечения, предотвращения или задержки развития инфекции HCV или вторичных патологий, состояний или осложнений, вызываемых HCV.

Твердые дозированные лекарственные формы

Одним из аспектов настоящего изобретения является фиксированная дозированная лекарственная форма активных соединений (по отдельности или в комбинации) или их фармацевтически приемлемых солей, необязательно в комбинированной форме с фиксированной дозировкой.

Одно или оба соединения могут быть предоставлены в кристаллической или некристаллической форме. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения они представлены в отдельной или одной и той же лекарственной дозированной форме для перорального применения, например, в желатиновой капсуле, в виде твердой формы, высушенной распылением дисперсии, таблетке, капсуле или пилюли в другой форме.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения комбинация с фиксированными дозировками включает твердую дисперсию, высушенную распылением, по меньшей мере одного из соединений или обоих соединений или их фармацевтически приемлемых солей, и при этом композиция пригодна для перорального введения. В одном аспекте этого варианта осуществления комбинация с фиксированной дозировкой включает соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или

его фармацевтически приемлемую соль, где по меньшей мере одно соединение находится в виде твердой дисперсии, высушенной распылением.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения комбинация с фиксированными дозировками представляет собой гранулированную слоистую твердую дисперсию по меньшей мере одного из соединений или их фармацевтически приемлемых солей, и при этом композиция пригодна для перорального введения. Типовой процесс приготовления твердых дозированных лекарственных форм для перорального введения представлен на Фиг. 32. В одном аспекте этого варианта осуществления настоящего изобретения комбинация с фиксированными дозировками представляет собой твердую дисперсию с гранулированными слоями, которая включает соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дисперсию, высушенную распылением, или компонент твердой дисперсии с гранулированными слоями получают с использованием кристаллического соединения 1-А. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения соединение 1 или его фармацевтически приемлемая соль, например, соединение 1-А, или соединение 2 или его фармацевтически приемлемая соль, могут быть представлены в виде аморфных соединений.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения твердая дисперсия также содержит по меньшей мере один эксципиент, выбранный из коповидона, полоксамера и НРМС-AS. В одном варианте полоксамер представляет собой полоксамер 407 или смесь полоксамеров, которая может включать полоксамер 407. В одном варианте осуществления настоящего изобретения НРМС-AS представляет собой НРМС-AS-L.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения композиция с фиксированной дозировкой, полученная из соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли, и соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли, также содержит один или несколько из следующих эксципиентов: фосфоглицерид; фосфатидилхолин; дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC); диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE); диолеилоксипропилтриэтиламмоний (DOTMA); диолеоилфосфатидилхолин; холестерин; эфир холестерина; диацилглицерин; диацилглицеролсукцинат; дифосфатидилглицерин (DPPG); гександеканол; жирный спирт, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ); полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир; поверхностно-активная жирная кислота, такая как пальмитиновая кислота или олеиновая кислота; жирная кислота; моноглицерид жирной кислоты; диглицерид жирных кислот; амид жирной кислоты; гликохолат сорбитантриолеата (Span[®]85); сорбитанмонолаурат

(Span[®]20); полисорбат 20 (Tween[®]20); полисорбат 60 (Tween[®]60); полисорбат 65 (Tween[®]65); полисорбат 80 (Tween[®]80); полисорбат 85 (Tween[®]85); полиоксиэтиленмоностеарат; сурфактин; полуксомер; сложный эфир сорбитана и жирной кислоты, такой как триолеат сорбитана; лецитин; лизолецитин; фосфатидилсерин; фосфатидилинозитол; сфингомиелин; фосфатидилэтаноламин (цефалин); кардиолипин; фосфатидная кислота; цереброзид; дицетилфосфат; дипальмитоилфосфатидилглицерин; стеариламин; додециламин; гексадециламин; ацетилпальмитат; глицеролрицинолеат; гексадецилстеарат; изопропилмиристат; тилоксапол; поли(этиленгликоль)5000-фосфатидилэтаноламин; поли(этиленгликоль)400-моностеарат; фосфолипид; синтетическое и/или натуральное поверхностно-активное вещество, обладающее высокими поверхностно-активными свойствами; дезоксихолат; циклодекстрин; хаотропная соль; агент ионного спаривания; глюкоза, фруктоза, галактоза, рибоза, лактоза, сахароза, мальтоза, трегалоза, целбиоза, манноза, ксилоза, арабиноза, глюкороновая кислота, галактороновая кислота, кислота, маннуроновая кислота, глюкозамин, галатозамин и нейрамовая кислота; пуллулан, целлюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, силикатизированная микрокристаллическая целлюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), гидроксидцеллюлоза (HC), метилцеллюлоза (MC), декстран, циклодекстран, гликоген, гидроксидэтилкрахмал, каррагинан, гликон, амилоза, хитозан, N,O-карбоксиметилхитозан, альгин и альгиновая кислота, крахмал, хитин, инулин, конжак, глюкомманн, пустилан, гепарин, гиалуроновая кислота, курдлан и ксантан, маннит, сорбит, ксилит, эритрит, мальтит и лактит, плюроновый полимер, полиэтилен, поликарбонат (например, поли(1,3-диоксан-2он)), полиангидрид (например, поли(себациновый ангидрид)), полипропилфумерат, полиамид (например, поликапролактан), полиацеталь, полиэфир, полиэфир (например, полилактид, полигликолид, полилактид-когликолид, поликапролактон, полигидроксикислота (например, поли((β- гидроксидалканоат))), поли(ортоэфир), полицианоакрилат, поливинилловый спирт, полиуретан, полифосфазен, полиакрилат, полиметакрилат, полимочевина, полистирол и полиамин, полилизин, сополимер полилизина-ПЭГ и поли(этиленимин)), сополимер поли(этиленимин)-ПЭГ, монокаприлокапрат глицерина, пропиленгликоль, витамин E TPGS (также известный как сукцинат d-α-токоферилполиэтиленгликоля 1000), желатин, диоксид титана, поливинилпирролидон (PVP), гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), гидроксипропилцеллюлоза (HPC), метилцеллюлоза (MC), блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида (PEO/PRO), полиэтиленгликоль (ПЭГ), карбоксиметилцеллюлоза натрия (NaCMC) или ацетат-сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCAS).

В других вариантах осуществления настоящего изобретения композиция с фиксированной дозировкой, полученная из соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли и соединения **2** или его фармацевтически приемлемой соли также содержит одно или несколько из следующих поверхностно-активных веществ: полиоксиэтиленгликоль, полиоксипропиленгликоль, децилглюкозид, лаурилглюкозид, октилглюкозид, полиоксиэтиленгликоль, октилфенол, тритон (Triton X-100), алкиловый эфир глицерина, лаурат глицерила, кокамид MEA, кокамид DEA, оксид додецилдиметиламина и полочсамеры. Примеры полочсамеров включают полочсамеры 188, 237, 338 и 407. Эти полочсамеры доступны под торговым названием Pluronic® (доступны от BASF, Mount Olive, Нью-Джерси) и соответствуют маркам Pluronic® F-68, F-87, F-108 и F-127, соответственно. Полочсамер 188 (соответствует Pluronic® F-68) представляет собой блок-сополимер со средней молекулярной массой от приблизительно 7000 до приблизительно 10000 Да, или от приблизительно 8000 до приблизительно 9000 Да, или приблизительно 8400 Да. Полочсамер 237 (соответствует Pluronic® F-87) представляет собой блок-сополимер со средней молекулярной массой от приблизительно 6000 до приблизительно 9000 Да, или от приблизительно 6500 до приблизительно 8000 Да, или приблизительно 7700 Да. Полочсамер 338 (соответствует Pluronic® F-108) представляет собой блок-сополимер со средней молекулярной массой от приблизительно 12000 до приблизительно 18000 Да, или от приблизительно 13000 до приблизительно 15000 Да, или приблизительно 14600 Да. Полочсамер 407 (соответствует Pluronic® F-127) представляет собой триблок-сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилен в соотношении приблизительно от E101 P56 E101 до приблизительно E106 P70 E106, или приблизительно E101 P56E101, или приблизительно E106 P70 E106, со средней молекулярной массой от приблизительно 10000 до приблизительно 15000 Да, или от приблизительно 12000 до приблизительно 14000 Да, или от приблизительно 12000 до приблизительно 13000 Да, или приблизительно 12600 Да.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения композиция с фиксированной дозировкой, полученная из соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли и соединения **2** или его фармацевтически приемлемой соли, также содержит одно или несколько из следующих поверхностно-активных веществ: поливинилацетат, натриевая соль хелевой кислоты, диоктилсульфосукцинат натрия, бромид гексадецилтриметиламмония, сапонин, сложные эфиры сахаров, поверхностно-активные вещества серии Triton X, сорбитантриолеат, сорбитанмоноолеат, полиоксиэтилен (20) сорбитанмонолаурат, полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеат, олеилполиоксиэтилен (2) эфир, стеарилполиоксиэтилен (2) эфир, лаурилполиоксиэтилен

(4) эфир, блок-сополимеры оксиэтилена и оксипропилена, диолеат диэтиленгликоля, олеат тетрагидрофурфурила, этилолеат, изопропилмиристат, глицерилмоноолеат, глицерилмоностеарат, глицерилмонорицинолеат, цетиловый спирт, стеариловый спирт, хлорид цетилпиридиния, хлорид бензалкония, оливковое масло, глицерилмонолаурат, кукурузное масло, хлопковое масло и подсолнечное масло.

В альтернативных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция с фиксированной дозировкой, полученная из соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли и соединения **2** или его фармацевтически приемлемой соли, получают способом, который предусматривает использование сухой грануляции или грануляции с растворителем, необязательно с последующим прессованием или уплотнением, распылительной сушки, обработки наносуспензией, экструзии горячего расплава, экструзии/сферонизации, формования, сферонизации, наслаивания (например, напыление суспензии или раствора) и т.п. Примеры таких технологий включают прямое прессование с использованием соответствующих пуансонов и матриц, например, когда пуансоны и матрицы устанавливают на подходящем таблетировочном прессе; влажное гранулирование с использованием подходящего оборудования для гранулирования, такого как гранулятор с высоким усилием сдвига, для формирования смоченных частиц, подлежащих дальнейшей сушке с получением гранул; гранулирование с последующим прессованием с использованием соответствующих пуансонов и матриц, при этом пуансоны и матрицы устанавливают на подходящем таблетировочном прессе; экструзию влажной массы с образованием цилиндрического экструдата, который можно разрезать на куски желаемой длины или разломить на куски под действием силы тяжести и истирания; экструзию/сферонизацию, при которой экструдат округляют до сферических частиц и уплотняют за счет сферонизации; нанесение распылением суспензии или раствора на инертное ядро с использованием обычной тарелки или колонки Вурстера; литье под давлением или прессование с использованием подходящих форм, установленных в устройстве для прессования; и т.п.

Примеры дезинтегрантов включают альгиновую кислоту, кальций-карбоксиметилцеллюлозу, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, сшитую натрий-карбоксиметилцеллюлозу (кроскармеллоза натрия), порошкообразную целлюлозу, хитозан, кроскармеллозу натрия, кросповидон, гуаровую камедь, низкозамещенную гидроксипропилцеллюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, альгинат натрия, натрий-гликолят крахмала, частично прежелатинизированный крахмал, прежелатинизированный крахмал, крахмал, натрийкарбоксиметилкрахмал и т.п., или их комбинацию.

Примеры лубрикантов включают стеарат кальция, стеарат магния, бегенат глицерина, глицерилпальмитостеарат, гидрогенизированное касторовое масло, легкое минеральное масло, лаурилсульфат натрия, лаурилсульфат магния, стеарилфумарат натрия, стеариновую кислоту, стеарат цинка, диоксид кремния, коллоидный диоксид кремния, обработанный диметилдихлорсиланом, диоксид кремния, тальк или их комбинацию.

Ядра для дозированной лекарственной формы, описанной в настоящем документе, могут быть покрыты оболочкой с получением таблеток с покрытием. Дозированные формы, содержащие ядра, могут быть покрыты функциональным или нефункциональным покрытием или комбинацией функциональных и нефункциональных покрытий. «Функциональное покрытие» включает покрытия для таблеток, которые изменяют свойства и показатели высвобождения всей композиции, например, такое покрытие, как покрытие для пролонгированного или отсроченного высвобождения. «Нефункциональное покрытие» включает покрытие, которое не является функциональным покрытием, например, такое покрытие, как косметическое покрытие. Нефункциональное покрытие может оказывать некоторое влияние на высвобождение активного агента вследствие первоначального растворения, гидратации, перфорации покрытия и т.д., но такое отклонение не будет являться значительным по сравнению с композицией без покрытия. Нефункциональное покрытие также может маскировать вкус композиции без покрытия, включающей активный фармацевтический ингредиент. Покрытие может содержать светонепроницаемый материал, светопоглощающий материал, или светонепроницаемый материал и светопоглощающий материал.

Типичные полиметакрилаты включают сополимеры эфиров акриловой и метакриловой кислот, такие как аминметакрилатный сополимер USP/NF, такой как: а. поли(бутилметакрилат, (2-диметиламиноэтил)метакрилат, метилметакрилат) 1:2:1 (например, EUDRAGIT E 100, EUDRAGIT EPO и EUDRAGIT E 12.5; CAS № 24938-16-7); б. поли(метакриловая кислота, этилакрилат) 1:1 (например, EUDRAGIT L30 D-55, EUDRAGIT L100-55, EASTACRYL 30D, KOLLICOAT MAE 30D и 30DP; CAS № 25212-88-8); в. поли(метакриловая кислота, метилметакрилат) 1:1 (например, EUDRAGIT L 100, EUDRAGIT L 12,5 и 12,5 P; также известный как сополимер метакриловой кислоты, тип A NF; CAS № 25806-15-1); г. поли(метакриловая кислота, метилметакрилат) 1:2 (например, EUDRAGIT S 100, EUDRAGIT S 12,5 и 12,5 P; CAS № 25086-15-1); д. поли(метилакрилат, метилметакрилат, метакриловая кислота) 7:3:1 (например, Eudragit FS 30D; CAS № 26936-24-3); е. поли(этилакрилат, метилметакрилат, триметиламмониетилметакрилатхлорид) 1:2:0,2 или 1:2:0,1 (например, EUDRAGITS RL 100, RL PO, RL 30 D, RL 12,5, RS 100, RS

PO, RS 30 D, или RS 12.5; CAS № 33434-24-1); g. поли(этилакрилат, метилметакрилат) 2:1 (например, EUDRAGIT NE 30 D, Eudragit NE 40D, Eudragit NM 30D; CAS № 9010-88-2); и т.п., или их комбинацию.

Подходящие алкилцеллюлозы включают, например, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу и т.п., или их комбинацию. Примеры покрытий из этилцеллюлозы на водной основе включают AQUACOAT, 30%-ную дисперсию, дополнительно содержащую лаурилсульфат натрия и цетиловый спирт (доступна от FMC, Филадельфия, Пенсильвания); SURELEASE - 25% дисперсия, дополнительно содержащая стабилизатор или другой компонент покрытия (например, олеат аммония, дибутилсебацинат, коллоидный безводный диоксид кремния, триглицериды со средней длиной цепи и т.д.; доступна от Colorcon, Вест-Пойнт, Пенсильвания); этилцеллюлоза (доступна от Aqualon или Dow Chemical Co (Ethocel), Мидленд, Мичиган). Специалистам в данной области понятно, что часть или вся этилцеллюлоза может быть заменена другими целлюлозными полимерами, включая другие алкилцеллюлозные полимеры.

Другие подходящие материалы, которые можно использовать для получения функционального покрытия, включают ацетатсукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCAS); ацетатфталат целлюлозы (CAP); поливинилацетатфталат; нейтральные или синтетические воски, жирные спирты (такие как лауриловый, миристиловый, стеариловый, цетиловый или, в частности, цетостеариловый спирт), жирные кислоты, включая сложные эфиры жирных кислот, глицериды жирных кислот (моно-, ди- и триглицериды), гидрогенизированные жиры, углеводороды, обычные воски, стеариновую кислоту, стеариловый спирт, гидрофобные и гидрофильные материалы, имеющие углеводородные основные цепи, или их комбинации. Подходящие воски включают пчелиный воск, гликовакс, касторовый воск, карнаубский воск, микрокристаллический воск, канделильский воск и воскоподобные вещества, например, материал, который обычно является твердым при комнатной температуре, и имеющий точку плавления от приблизительно 30°C до приблизительно 100°C, или их комбинацию.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения функциональное покрытие может включать легкоусвояемые длинноцепочечные (например, C8-C50, особенно C12-C40), замещенные или незамещенные углеводороды, такие как жирные кислоты, жирные спирты, глицериловые эфиры жирных кислот, минеральные и растительные масла, воски или их комбинации. Могут быть использованы углеводороды, имеющие температуру плавления от приблизительно 25°C до приблизительно 90°C. В частности, можно использовать длинноцепочечные углеводородные материалы, жирные (алифатические) спирты.

Покрытия могут необязательно содержать дополнительные фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как пластификатор, стабилизатор, водорастворимый компонент (например, порообразователь), антиадгезив (например, тальк), поверхностно-активное вещество и т.п., или их комбинацию.

Функциональное покрытие может включать агент, модифицирующий высвобождение, который влияет на свойства и показатели высвобождения активного вещества. Агент, модифицирующий высвобождение, может, например, действовать как порообразователь или разрушитель матрикса. Агент, модифицирующий высвобождение, может быть органическим или неорганическим, и он включает материалы, которые могут растворяться, экстрагироваться или выщелачиваться из покрытия в среде, где находится или используется средство по изобретению. Агент, модифицирующий высвобождение, может содержать один или несколько гидрофильных полимеров, включая эфиры целлюлозы и другие целлюлозы, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, метилцеллюлоза, ацетатфталат целлюлозы или ацетатфталат гидроксипропилметилцеллюлозы; повидон; поливиниловый спирт; акриловый полимер, такой как растворимый в желудке Eudragit FS 30D, pH-чувствительный Eudragit L30D 55, L 100, S 100 или L 100-55; или их комбинацию. Другие типичные агенты, модифицирующие высвобождение, включают повидон; сахарид (например, лактоза и т.п.); стеарат металла; неорганическую соль (например, двухосновный фосфат кальция, хлорид натрия и т.п.); полиэтиленгликоль (например, полиэтиленгликоль (ПЭГ) марки PEG 1450 и т.п.); сахарный спирт (например, сорбит, маннит и т.п.); алкилсульфат щелочного металла (например, лаурилсульфат натрия); полиоксиэтилен-сложный эфир сорбитана и жирной кислоты (например, полисорбат); или их комбинацию. Типичные разрушители матрикса включают нерастворимый в воде органический или неорганический материал. Органические полимеры, включают, но без ограничения, целлюлозу, простые эфиры целлюлозы, такие как этилцеллюлоза, сложные эфиры целлюлозы, такие как ацетат целлюлозы, ацетат-бутират целлюлозы и ацетат-пропионат целлюлозы; крахмал также может действовать как разрушитель матрикса. Примеры неорганических разрушителей включают различные соли кальция, таких как моно-, ди- и трифосфат кальция; диоксид кремния и тальк.

Покрытие может необязательно содержать пластификатор, служащий для улучшения физических свойств покрытия. Например, поскольку этилцеллюлоза имеет относительно высокую температуру стеклования, и она не образует гибких пленок при нормальных условиях покрытия, может быть выгодно добавлять пластификатор к этилцеллюлозе перед ее использованием в качестве материала покрытия. Обычно

количество пластификатора, включенного в раствор для покрытия, зависит от концентрации полимера, например, оно может составлять от приблизительно 1% до приблизительно 200%, в зависимости от полимера, но чаще всего составляет от приблизительно 1% до приблизительно 100 % от массы полимера. Оптимальные концентрации пластификатора можно определить путем обычных экспериментов.

Примеры пластификаторов для этилцеллюлозы и других целлюлоз включают такие пластификаторы, как дибутилсебацат, диэтилфталат, триэтилцитрат, трибутилцитрат, триацетин или их комбинацию, хотя возможно использование и других водонерастворимых пластификаторов (таких как ацетилированные моноглицериды, сложные эфиры фталевой кислоты, касторовое масло и т.п.).

Примеры пластификаторов для акриловых полимеров включают сложные эфиры лимонной кислоты, такие как триэтилцитрат NF, трибутилцитрат, дибутилфталат, 1,2-пропиленгликоль, полиэтиленгликоли, пропиленгликоль, диэтилфталат, касторовое масло, триацетин или их комбинацию, хотя возможно использование и других пластификаторов (таких как ацетилированные моноглицериды, фталатные эфиры, касторовое масло и т.п.).

Для нанесения материала покрытия на поверхность ядер лекарственной формы можно использовать различные подходящие способы. Могут быть использованы такие процессы, как простая или сложная коацервация, межфазная полимеризация, сушка жидкости, термическое и ионное гелеобразование, распылительная сушка, распылительное охлаждение, нанесение покрытия в псевдооживленном слое, нанесение покрытия в лотке или электростатическое осаждение.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения между ядром дозированной лекарственной формы и внешним покрытием находится необязательное промежуточное покрытие. Такое промежуточное покрытие можно использовать для защиты активного агента или другого компонента субъединицы ядра от материала, используемого во внешнем покрытии, или для придания других свойств. Типичные промежуточные покрытия обычно включают водорастворимые пленкообразующие полимеры. Такие промежуточные покрытия могут включать пленкообразующие полимеры, такие как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, желатин, гидроксипропилметилцеллюлоза, полиэтиленгликоль, полиэтиленоксид и т.п., или их комбинацию; и пластификатор. Пластификаторы можно использовать для уменьшения хрупкости и повышения прочности на разрыв и эластичности покрытия. Примеры пластификаторов включают полиэтиленгликоль, пропиленгликоль и глицерин.

Комбинированная и альтернативная терапия

Лекарственная устойчивость иногда возникает в результате мутации гена, кодирующего фермент, используемый при репликации вируса. Эффективность комбинированной терапии против инфекции HCV можно продлить, усилить или восстановить путем добавления дополнительного соединения к комбинированной терапии. Эту дополнительную комбинированную терапию можно назначать вместе или попеременно с другим, и, возможно, даже с двумя или тремя другими противовирусными соединениями, которые вызывают другую мутацию или действуют по другому пути, отличному от пути основной комбинации. Альтернативно, фармакокинетика, биораспределение, период полужизни или другой параметр комбинации могут быть изменены с помощью такой комбинированной терапии (которая может включать альтернативную терапию, если она согласована с основной терапией).

Настоящее изобретение предоставляет выгодную комбинированную терапию для лечения инфекции, вызванной HCV, или расстройства, связанного с инфекцией HCV, путем введения выбранного ингибитора NS5B с ингибитором NS5A. Дополнительные терапевтические эффекты могут быть достигнуты путем добавления третьего, четвертого или даже пятого активного агента, вводимого совместно или отдельно.

Поскольку соединение **1** и соединение **1-A** являются ингибиторами полимеразы NS5B, а соединение **2** является ингибитором NS5A, то может быть полезно введение соединения **1** и соединения **2** хозяину в комбинации, например, со следующими активными агентами, такими как:

- (1) ингибитор протеазы, такой как ингибитор протеазы NS3/4A;
- (2) другой ингибитор NS5A;
- (3) другой ингибитор полимеразы NS5B;
- (4) несубстратный ингибитор NS5B;
- (5) интерферон альфа-2а, который может быть пегилированным или иным образом модифицированным, и/или рибавирин;
- (6) несубстратный ингибитор;
- (7) ингибитор геликазы;
- (8) антисмысловой олигодезоксинуклеотид (S-ODN);
- (9) аптамер;
- (10) нуклеазорезистентный рибозим;
- (11) иРНК, включая микроРНК и киРНК;
- (12) антитело, частичное антитело или доменное антитело к вирусу, или
- (13) вирусный антиген или частичный антиген, индуцирующий реакцию антител хозяина.

Неограничивающие примеры дополнительных средств против HVC, которые можно вводить в дополнительной комбинации или путем чередования с комбинацией настоящего изобретения, включают:

(i) ингибиторы протеазы, такие как телапревир (Incivek®), боцепревир (Vicitrelis™), симепревир (Olysio™), паритапревир (ABT-450), глекапревир (ABT-493), ритонавир (норвир), АСН-2684, AZD-7295, BMS-791325, данопревир, филибувир, GS-9256, GS-9451, МК-5172, сетробувир, совапревир, тегобувир, VX-135, VX-222, ALS-220 и воксилапревир.

(ii) ингибитор NS5A, такой как АСН-2928, АСН-3102, IDX-719, даклатасвир, ледипасвир, велпатасвир (эпклуза), эльбасвир (МК-8742), гразопревир (МК-5172) и омбитасвир (ABT-267);

(iii) ингибиторы NS5B, такие как AZD-7295, клемизол, дасабувир (эксивьера), ITX-5061, PPI-461, PPI-688, софосбувир (Sovaldi®), МК-3682 и мерциитабин;

(iv) ингибиторы NS5B, такие как ABT-333 и MBX-700;

(v) антитело, такое как GS-6624;

(vi) комбинированные препараты, такие как харвони (ледипасвир/софосбувир); виекира пак (омбитасвир/паритапревир/ритонавир/дасабувир); виекиракс (омбитасвир/паритапревир/ритонавир); G/P (паритапревир и глекапревир); Technivie™ (омбитасвир/паритапревир/ритонавир), эпклуза (софосбувир/ велпатасвир), зепатиев (эльбасвир и гразопревир), мавирет (глекапревир и пибрентасвир) и восеви (софосбувир, велпатасвир и воксилапревир).

Если комбинацию вводят для лечения прогрессирующего гепатита С, приводящего к раку или циррозу печени, то в одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение можно вводить в комбинации или чередуя с другим лекарственным средством, которое обычно используется для лечения гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), например, как описано в Andrew Zhu, «New Agents on the Horizon in Hepatocellular Carcinoma» Therapeutic Advances in Medical Oncology, V 5(1), January 2013, 41-50. Примеры подходящих соединений для комбинированной терапии, когда у хозяина имеется ГЦК или имеется риск возникновения ГЦК, включают антиангиогенные агенты, сунитиниб, бриваниб, линифаниб, рамоцирумаб, бевацизумаб, цедираниб, пазопаниб, TSU-68, ленватиниб, антитела против EGFR, ингибиторы mTog, ингибиторы MEK и ингибиторы децетилирования гистонов, капецитабин, цисплатин, карбоплатин, доксорубицин, 5-фторурацил, гемцитабин, иринотекан, оксалиплатин, топотекан и другие топоизомеразы.

Примеры

Общие методы

Спектры ^1H , ^{19}F и ^{31}P записаны на фурье-спектрометре Brüker при 400 МГц. Спектры получены в DMSO-d_6 , если не указано иное. Спиновые кратности обозначены символами «с» («s» - синглет), «д» («d» - дуплет), «т» («t» - триплет), «м» («m» - мультиплет) и «ш» («br» - широкий, уширенный). Постоянные взаимодействия (J) указаны в Гц. Реакции обычно проводили в атмосфере сухого азота с использованием безводных растворителей от Sigma-Aldrich. Все обычные химические реактивы получены из коммерческих источников.

В примерах используются следующие сокращения и обозначения:

ВІD: дважды в день

DCM: дихлорметан

EtOAc: этилацетат

EtOH: этанол

GT: генотип

HPLC: ВЭЖХ; жидкостная хроматография высокого давления.

LD: ударная (насыщающая) доза

NaOH: гидроксид натрия

Na_2SO_4 : сульфат натрия (безводный).

MeOH: метанол

Na_2SO_4 : сульфат натрия.

NH_4Cl : хлорид аммония.

PE: петролейный эфир

Силикагель: сорбент, частицы от 230 до 400 меш

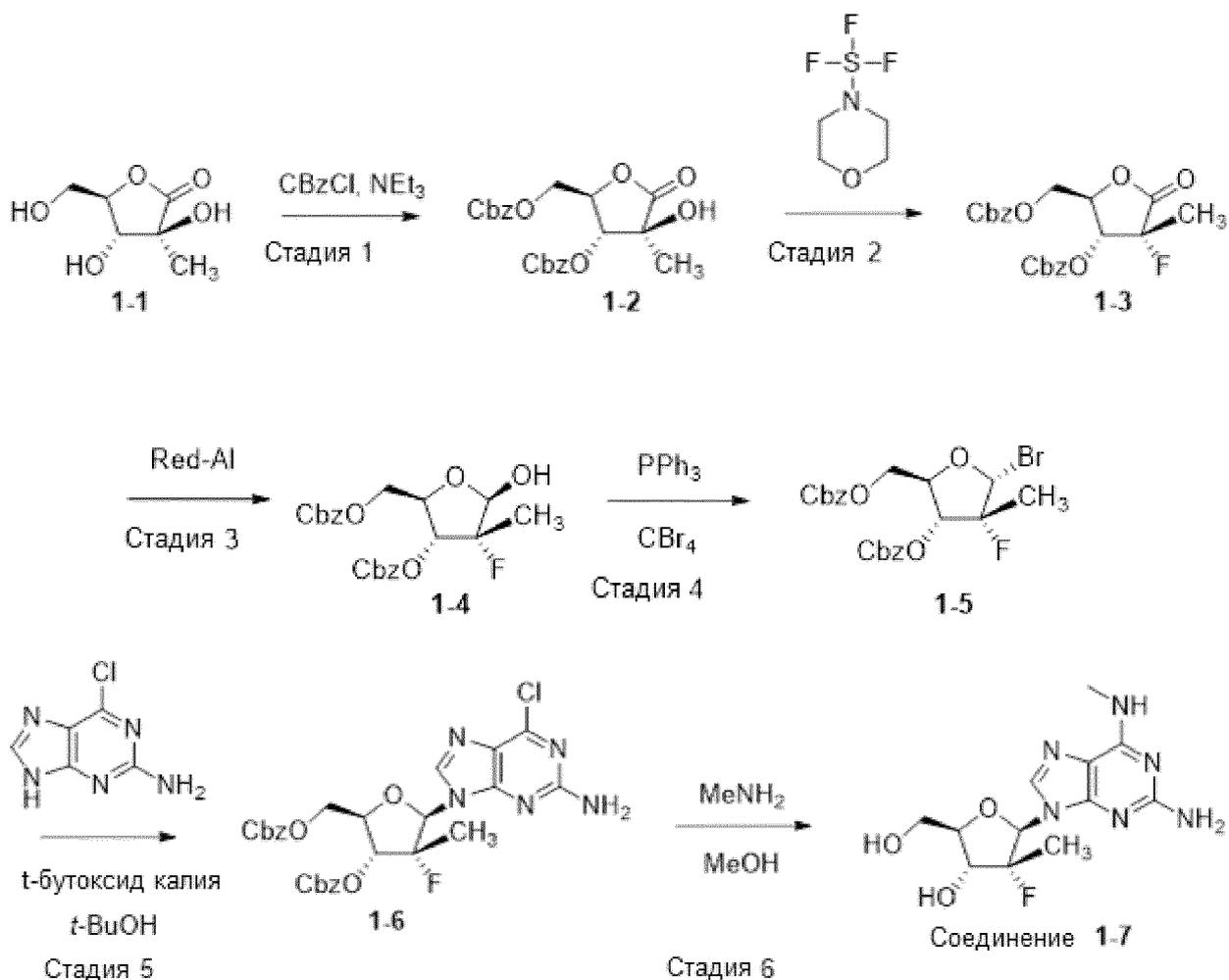
$t\text{-BuMgCl}$: трет-бутилмагнийхлорид

THF: тетрагидрофуран (ТГФ), безводный.

TP: трифосфат

Пример 1. Синтез соединения 1 и соединения 1-А

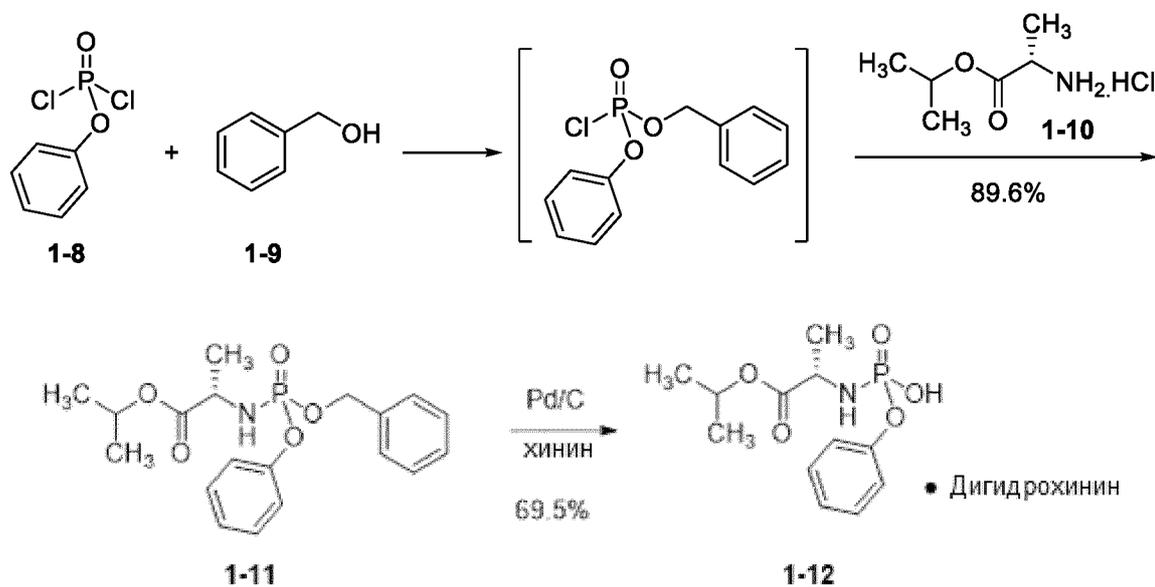
Часть А: Синтез (2R,3R,4R,5R)-5-(2-амино-6-(метиламино)-9H-пурин-9-ил)-4-фтор-2-(гидроксиметил)-4-метилтетрагидрофуран-3-ола (1-7)



На стадии 1 соединение **1-1** растворяли в DC, реакционную смесь охлаждали до 10°C , добавляли бензилхлорформат, а затем NEt_3 . Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 12-14 часов. После обработки и очистки в соответствующих условиях выделяли соединение **1-2**. На стадии 2 соединение **1-2** растворяли в ацетонитриле и охлаждали до температуры от -15°C до 5°C перед добавлением морфо-DAST. Реакционную смесь перемешивали в течение 6 часов. После обработки и очистки в соответствующих условиях выделяли соединение **1-3**. На стадии 3 соединение **1-3** растворяли в толуоле и реакционную смесь охлаждали до $0-10^\circ\text{C}$ перед добавлением Red Al. После обработки и очистки в соответствующих условиях соединение **1-4** выделяли в виде диастереомера с (R)-стереохимией в гидроксильном положении. На стадии 4 соединение **1-4** растворяли в ацетонитриле и охлаждали до температуры от -15°C до 5°C перед добавлением CBr_4 и PPh_3 . После обработки и очистки в соответствующих условиях выделяли соединение **1-5**. На стадии 5 соединение **1-5** растворяли в ацетонитриле и добавляли $t\text{-BuOH}$, $t\text{-BuOK}$ и 6-хлор-9H-пурин-2-амин. Реакционную смесь нагревали до $40-50^\circ\text{C}$. После обработки и очистки в соответствующих условиях выделяли соединение **1-6**. На стадии 6 соединение **1-6** растворяли в MeOH и добавляли

MeNH₂. Реакционную смесь нагревали до 20-30°C. После соответствующей обработки и очистки выделяли соединение **1-7**.

Часть В: Синтез дигидрохиновой соли изопропил(гидрокси(фенокси)фосфорил)-L-аланината (1-12)



Фенилдихлорфосфат (**1-8**, 150 г, 1,0 экв.) добавляли в изопропилацетат (1300 мл). Раствор охлаждали до $-10^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ и затем добавляли раствор бензилового спирта (**1-9**, 80,6 г, 1,05 экв.) и Et₃N (86,3 г, 1,2 экв.). Смесь перемешивали в течение 3 часов при $-10 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Конечную точку реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Гидрохлорид изопропилового эфира L-аланина (**1-10**, 125 г, 1,05 экв.) и Et₃N (152 г, 2,1 экв.) добавляли при $-10^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Реакционную смесь перемешивали при $-10 \pm 5^{\circ}\text{C}$ в течение 2 часов. Конечную точку реакции контролировали с помощью ТСХ.

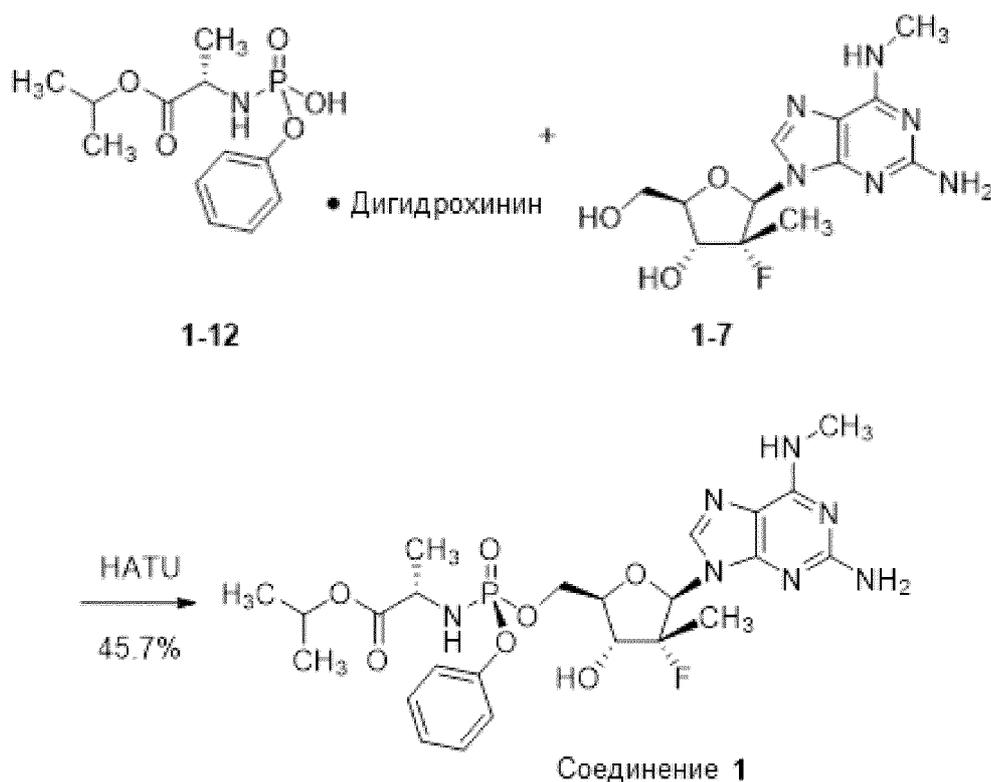
Реакционную смесь фильтровали, и осадок на фильтре промывали 20 мл изопропилацетата. Фильтрат промывали 1 н. HCl, водой и водным раствором бикарбоната натрия. Отделенный органический слой сушили безводным Na₂SO₄, а затем концентрировали досуха в вакууме при 40°C-50°C с получением 240 г неочищенного продукта **1-11** в виде диастереомерной смеси (приблизительно 1:1). (Бледно-желтое масло; выход: 89,6% моль/моль; чистота по ВЭЖХ: 83,4% по площади; анализ ВЭЖХ: 86,2% мас./мас.). Продукт содержал приблизительно 6-7% остаточного бензилового спирта. Неочищенное соединение **1-11** использовали непосредственно на следующей стадии.

Соединение **1-11** (135 г, 1,0 экв, анализ 86,2%) и хинин (100 г, 1,0 экв.) добавляли в 650 мл i-PrOH. После добавления 5% Pd/C (19,2 г, 60% воды по KF) проводили

гидрирование в закрытой системе при 20°C-25°C в течение 8 часов с использованием водородного мешка. После завершения реакции смесь фильтровали через воронку Бюхнера. Фильтрат концентрировали в вакууме для удаления растворителя.

К вышеуказанному остатку добавляли 300 мл ТВМЕ. Смесь концентрировали в вакууме при температуре 40-45°C для удаления растворителя, а затем эту стадию повторяли еще раз с 300 мл МТВЕ. К вышеуказанному остатку добавляли 600 мл МТВЕ и смесь перемешивали при 40-45°C в течение 1 часа, а затем перемешивали при 0-5°C еще 1 час. Смесь фильтровали и осадок на фильтре промывали 100 мл МТВЕ. Осадок сушили при 45°C в течение 16 часов без вакуума, получая 152 г дигидрохинониновой соли изопропил(гидрокси(фенокси)фосфорил)-L-аланината (**1-12**, белое твердое вещество; выход: 69,5% моль/моль; чистота по ВЭЖХ: 97,91%).

Часть С: Синтез соединения 1



Дигидрохинониновая соль изопропил(гидрокси(фенокси)фосфорил)-L-аланината (**1-12**, 5,9 г, 1,5 экв.), соединение **1-7** (2,0 г, 1,0 экв.), DIPEA (0,83 г, 1,0 экв.), и HATU (3,65 г, 1,5 экв.) добавляли в 100 мл дихлорметана. Смесь нагревали до 40°C и перемешивали в течение 18 часов. Реакцию контролировали с помощью ТСХ и ВЭЖХ.

После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, промывали 1 н. хлористоводородной кислотой (100 мл x 2), водой (100 мл x

2) и 5% водным раствором бикарбоната натрия (15 мл x 1). Отделенную органическую фазу сушили с использованием 2 г безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали при 40-45°C в вакууме, с получением желтого масла.

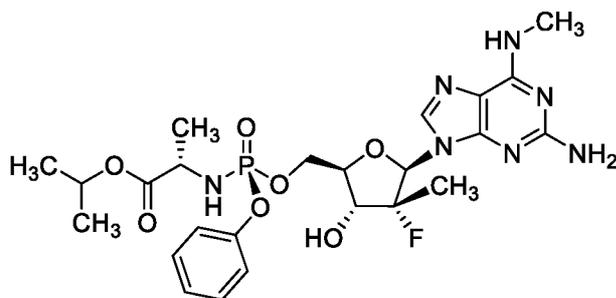
Добавляли изопропилацетат (10 мл). После перемешивания смесь концентрировали под вакуумом. Затем добавляли 25 мл изопропилацетата. Смесь нагревали до 45°C, получая прозрачный раствор. После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 часов твердый осадок фильтровали и сушили без вакуума при 45°C в течение 15 часов, получая 2,0 г неочищенного соединения **1** (выход: 53,8% моль/моль; чистота по ВЭЖХ: 93,1% по площади (содержащее 3,7% соединения с противоположной R_p-конфигурацией).

Смесь неочищенного соединения **1** (2,0 г) и 15 мл изопропилацетата нагревали до 80°C-85°C, получая раствор. Раствор охлаждали до 20°C-25°C и перемешивали в течение 1 часа. Выпавшее в осадок твердое вещество фильтровали, промывали изопропилацетатом (1 мл) и сушили без вакуума при 50°C в течение 16 часов, получая 1,7 г соединения **1** (выход: 45,7% моль/моль; чистота по ВЭЖХ: 98,99%). Спектры ¹H-ЯМР, ¹⁹F-ЯМР и ³¹P-ЯМР подтвердили структуру соединения **1**.

Пример 2. Характеристики аморфного и кристаллического соединения 1.

Аморфное соединение **1** и кристаллическое соединение **1** первоначально анализировали с помощью методов XRPD, ¹H-ЯМР и ВЭЖХ. XRPD-дифрактограммы для обоих соединений показаны на Фиг. 1А, а кривые ВЭЖХ для определения чистоты показаны на Фиг. 1В и 2А, соответственно. В Таблице 1 представлен перечень пиков XRPD кристаллического соединения **1**, а в Таблице 2 представлен перечень относительных времен удерживания (RTT) из кривых ВЭЖХ. Аморфное соединение **1** имело чистоту 98,61%, а кристаллическое соединение **1** имело чистоту 99,11%. Оба соединения представляют собой белое твердое вещество. На Фиг. 2В представлены графики, отражающие результаты анализа методами TGA и DSC кристаллического соединения **1**. Для кристаллического соединения **1** эндотермический пик наблюдали при 88,6°C, а потеря массы составляла 7,8% при температуре 80-110°C.

Образец соединения **1** перекристаллизовывали из смеси EtOAc/гексан и экстрагировали с помощью ORTEP. Абсолютное строение соединения **1** подтверждено перекристаллизацией монокристалла. На Фиг. 3 представлено ORTEP-изображение соединения **1**. Данные измерений в отношении кристаллической структуры соединения **1** представлены в Таблице 3. Абсолютная стереохимия соединения **1**, основанная на рентгеновской кристаллографии, показана ниже:



Анализ DSC проводили на приборе TA Instruments Q2000 с 50-позиционным автоматическим пробоотборником. Калибровку теплоемкости проводили с использованием сапфира, а калибровку энергии и температуры - с использованием сертифицированного индия. Обычно приблизительно 3 мг каждого образца в алюминиевой ванночке с точечными отверстиями нагревали со скоростью 10°C/мин в диапазоне температур от 25°C до 200°C. Над образцом поддерживали поток сухого азота со скоростью 50 мл/мин. Для управления прибора использовали программное обеспечение Advantage for Q Series v2.8.0.394 и Thermal Advantage v5.5.3; результаты анализировали с помощью программного обеспечения Universal Analysis v4.5A.

Анализ TGA проводили на приборе TA Instruments Q500 TGA с 16-позиционным автоматическим пробоотборником. Прибор калибровали по температуре с использованием сертифицированных алюминия и никеля. Обычно 5-10 мг каждого образца загружали в предварительно тарированную алюминиевую ванночку для DSC, и нагревали со скоростью 10°C/мин от температуры окружающей среды до 350°C. Над образцом поддерживали поток азота со скоростью 60 мл/мин. Для управления прибора использовали программное обеспечение Advantage for Q Series v2.5.0.256 и Thermal Advantage v5.5.3; результаты анализировали с помощью программного обеспечения Universal Analysis v4.5.

Аморфное соединение 1 (1-1):

¹H-ЯМР (400 МГц, *DMSO-d*₆) δ м.д. 1,01-1,15 (м, 9 H), 1,21 (д, *J*=7,20 Гц, 3 H), 2,75 3,08 (м, 3 H), 3,71-3,87 (м, 1 H), 4,02 - 4,13 (м, 1 H), 4,22 - 4,53 (м, 3 H), 4,81 (с, 1 H), 5,69 - 5,86 (м, 1 H), 6,04 (уш. д, *J*=19,33 Гц, 4 H), 7,12 - 7,27 (м, 3 H), 7,27 - 7,44 (м, 3 H), 7,81 (с, 1 H)

Кристаллическое соединение 1 (1-2):

¹H-ЯМР (400 МГц, *DMSO-d*₆) δ м.д. 0,97-1,16 (м, 16 H), 1,21 (д, *J*=7,07 Гц, 3 H), 2,87 (уш. с, 3 H), 3,08 (с, 2 H), 3,79 (уш. д, *J*=7,07 Гц, 1 H), 4,08 (уш. д, *J*=7,58 Гц, 1 H),

4,17 - 4,55 (м, 3 Н), 4,81 (кв, $J=6,25$ Гц), 1 Н), 5,78 (уш. с, 1 Н), 5,91 - 6,15 (м, 4 Н), 7,10 - 7,26 (м, 3 Н), 7,26 - 7,44 (м, 3 Н), 7,81 (с, 1 Н))

Таблица 1. Пики кристаллического соединения 1

Угол (2θ)	Расстояние d (Å)	Интенсивность (имп.)	Интенсивность (%)
6,03	14,64	1005	39,0
7,36	12,00	315	12,2
7,94	11,13	1724 г,	66,9
9,34	9,47	2500	97,0
9,51	9,29	860	33,4
9,77	9,05	1591 г,	61,8
11,08	7,98	2576	100,0
12,02	7,36	171	6,6
12,95	6,83	319	12,4
13,98	6,33	241	9,4
14,30	6,19	550	21,4
14,69	6,03	328	12,7
15,20	5,82	2176	84,5
15,94	5,56	1446	56,1
16,75	5,29	1009	39,2
17,29	5,13	700	27,2
17,72	5,00	1213	47,1
18,11	4,89	1565 г,	60,8
18,46	4,80	302	11,7
18,89	4,69	385	14,9
19,63	4,52	636	24,7
20,37	4,36	1214	47,1
20,74	4,28	1198	46,5
21,24	4,18	640	24,8
22,31	3,98	961	37,3
22,88	3,88	806	31,3
23,43	3,79	355	13,8
24,08	3,69	573	22,2

24,49	3,63	159	6,2
25,00	3,56	351	13,6
25,36	3,51	293	11,4
26,09	3,41	235	9,1
26,26	3,39	301	11,7
26,83	3,32	696	27,0
27,35	3,26	436	16,9
27,46	3,25	363	14,1
28,07	3,18	200	7,8
28,30	3,15	195	7,6
28,82	3,10	599	23,3
29,85	2,99	217	8,4
30,26	2,95	186	7,2
30,75	2,91	333	12,9
31,12	2,87	149	5,8
31,85	2,81	238	9,2
33,28	2,69	261	10,1
34,77	2,58	171	6,6
35,18	2,55	175	6,8
36,83	2,44	327	12,7
37,41	2,40	172	6,7

Таблица 2. Относительные времена удерживания по данным ВЭЖХ-хроматографии для аморфного соединения 1 и кристаллического соединения 1

Аморфное соединение 1		Кристаллическое соединение 1	
RRT	Площадь (%)	RRT	Площадь (%)
0,48	0,15	0,48	0,17
0,51	0,04	0,48	0,17
0,48	0,15	0,94	0,12
0,51	0,04	1,00	99,11
0,94	0,13	1,04	0,22
0,98	0,21	1,37	0,07
1,00	98,61		
1,04	0,29		

1,37	0,31
------	------

Таблица 3. Данные измерений в отношении кристаллической структуры соединения 1

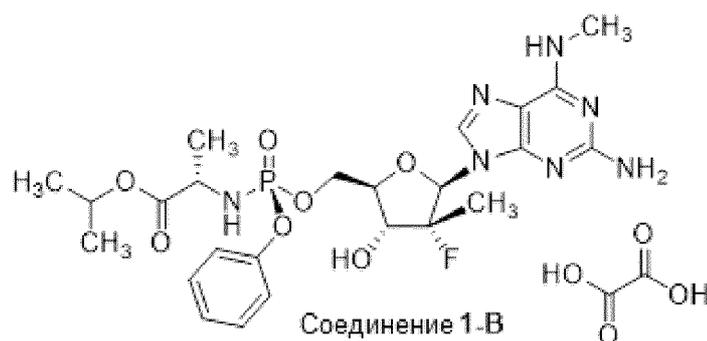
Параметры связи	CC = 0,0297Å, длина волны = 1,54184	
Ячейка	a=10,1884(3) b=28,6482(9) c=12,9497(5) альфа=90 бета=113,184(4) гамма=90	
Температура	150К	
	Рассчитано	Получено
Объем	3474,5(2)	3474,5(2)
Пространственная группа	P21	P 1 2 1 1
Пространственная группа по Холлу	P 2yb	P 2yb
Формула фрагмента	C24 H34 F N7 O7 P	2(C24 H34 F N7 O7 P)
Полная формула	C24 H34 F N7 O7 P	C48 H68 F2 N14 O14 P2
Мол. масса	582,55	1165,10
Dx, г см ⁻³	1,114	1,114
Z	4	2
Му (мм ⁻¹)	1,139	1,139
Φ000	1228,0	1228,0
F000'	1233,21	
h, k, l _{max}	12,34,15	12,34,15
N _{ref}	12742 [6510]	8259
T _{min} , T _{max}	0,790, 0,815	0,808, 1,000
T _{min} '	0,716	
Метод коррекции	# Установленные пределы T: T _{min} = 0,808 T _{max} = 1,00	
AbsCorr	MULTI-SCAN	
Полнота данных	1,27/0,65	
Тета (макс.)	68,244	
R (отражения)	0,2091 (7995)	
wR2 (отражения)	0,5338 (8259)	
S	2,875	

№пар	716
------	-----

После первоначального анализа образцов их хранили при 25°C и 60% относительной влажности (RH) в течение 14 дней, и выполняли анализ с помощью методов ВЭЖХ и XRPD через 7 и 14 дней. На Фиг. 4А представлены результаты XRPD через 14 дней при 25°C и 60% относительной влажности. Аморфное соединение **1** (образец 1-1) оставалось плохо кристаллическим, тогда как кристаллическое соединение **1** (образец 1-2) сохраняло свою кристалличность, но тем не менее, оба соединения были стабильны после 14 дней хранения при 25°C и 60% относительной влажности.

Пример 3. Получение оксалатной соли соединения **1-В**

Первоначально оксалатную соль соединения **1**, соединения **1-В**, получали путем смешивания оксалатной соли с различными растворителя (5 объемов, 100 мкл) и испарения раствора при комнатной температуре. Полученные суспензии выдерживали (при комнатной температуре 50°C) в течение 3 часов и определяли кристалличность.



В Таблице 4 показаны различные растворители, использованные при получении соединения **1-В**. Все растворители, за исключением двух (циклогексана и *n*-гептана), привели к получению кристаллических продуктов. Несмотря на высокую кристалличность и высокую растворимость соединения **1-В**, оксалатные соли неприемлемы для клинического применения из-за потенциальной возможности образования камней в почках, и поэтому были исследованы другие соли соединения **1**.

Таблица 4. Образование оксалата соединения **1-В**

Растворитель	Наблюдение после добавления кислоты при комнатной температуре	Наблюдение после созревания/испарения растворителя
EtOH	Раствор	ОХА - Форма 1

IPA	Раствор	ОХА - Форма 1
Ацетон	Раствор	ОХА - Форма 1
МЕК	Раствор	ОХА - Форма 1
EtOAc	Суспензия	ОХА - Форма 1
<i>i</i> PrOAc	Суспензия	ОХА - Форма 1
THF	Раствор	ОХА - Форма 1
Толуол	Раствор	ОХА - Форма 1
MeCN	Раствор	ОХА - Форма 1
IPA: 10% воды	Раствор	ОХА - Форма 1
TBME	Суспензия	ОХА - Форма 1
Циклогексан	Суспензия	Аморфный
<i>n</i> -гептан	Суспензия	Аморфный

Пример 4. Солевые соединения аморфного соединения 1

Поскольку оксалатную соль соединения **1-В** (Пример 3) нельзя использовать в клинических испытаниях из-за ее способности образовывать камни в почках, получали аморфные соли соединения **1** с противоионами, указанными в Таблице 5. Соединение **1** растворяли в *трет*-бутанол (20 объемов, 6 мл) и раствор обрабатывали кислотными противоионами (по 1 эквиваленту для каждого образца, кроме образца 1-9, который содержал 0,5 эквивалента сульфата). Затем образцы замораживали, и удаляли растворитель путем лиофилизации. Остаточное твердое вещество в образцах 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8 и 1-9 первоначально анализировали с помощью метода XRPD и ВЭЖХ.

Таблица 5. Данные для аморфных солей

Образец №	Кислота в образце	Маточный раствор	Наблюдение	ЯМР
1-4	HCl (1:1)	THF 1M	Белое твердое вещество	на 3 протона меньше ~0,3 экв. <i>t</i> -BuOH
1-5	Серная (1:1)	THF 1M	Белое твердое вещество	на 3 протона меньше ~0,3 экв. <i>t</i> -BuOH
1-6	Фумаровая (1:1)	MeOH:THF (1:1) 0,5M	Стекловидное твердое вещество	1,05 экв. фумаровой кислоты 0,84 экв. <i>t</i> -BuOH
1-7	Бензойная	THF 1M	Белое твердое	1.0 экв бензойной

	(1:1)		вещество	кислоты 0,34 экв. <i>t</i> -BuOH
1-8	Янтарная (1:1)	MeOH 1M	Липкое белое твердое вещество	~ 1,1 экв. янтарной кислоты 0,37 экв. <i>t</i> -BuOH
1-9	Серная (0,5:1 кислота:API)	THF 1M	Белое твердое вещество	на 3 протона меньше ~0,3 экв. <i>t</i> -BuOH

Для всех образцов были сняты ^1H -ЯМР-спектры.

Образец 1-4, соль HCl (1:1):

^1H -ЯМР (400 МГц, *DMSO-d*₆) δ м.д. 0,93-1,39 (м, 16 H), 2,97 (уш. с, 2 H), 3,70-3,88 (м, 1 H), 4,10 (уш. с, 1 H)), 4,18 - 4,49 (м, 3 H), 4,70 - 4,88 (м, 1 H), 5,71 - 5,94 (м, 1 H), 6,07 (уш. д, $J=19,07$ Гц, 2 H), 7,14 - 7,27 (м, 3 H), 7,29 - 7,44 (м, 2 H), 7,83 - 8,19 (м, 1 H)

Образец 1-5, соль серной кислоты (1:1):

^1H -ЯМР (400 МГц, *DMSO-d*₆) δ м.д. 0,97-1,38 (м, 15 H), 2,96 (уш. с, 2 H), 4,06-4,18 (м, 1 H), 4,19-4,49 (м, 3 H), 4,66 - 4,91 (м, 1 H), 5,70 - 5,95 (м, 1 H), 5,96 - 6,16 (м, 2 H), 7,10 - 7,27 (м, 3 H), 7,30 - 7,43 (м, 2 H), 7,88 - 8,19 (м, 1 H)

Образец 1-6, соль фумаровой кислоты (1:1):

^1H -ЯМР (400 МГц, *DMSO-d*₆) δ м.д. 0,95-1,31 (м, 21 H), 2,87 (уш. с, 3 H), 3,79 (уш. д, $J=7,20$ Гц, 1 H), 4,01-4,13 (м, 1 H), 4,16 - 4,23 (м, 1 H), 4,16 - 4,24 (м, 1 H), 4,20 (с, 1 H), 4,18 - 4,23 (м, 1 H), 4,24 - 4,52 (м, 1 H), 4,24 - 4,52 (м, 1 H), 4,24 - 4,49 (м, 1 H), 4,72 - 4,88 (м, 1 H), 5,68 - 5,86 (м, 1 H), 6,04 (уш. д, $J=19,33$ Гц, 4 H), 6,63 (с, 1 H), 6,61 - 6,66 (м, 1 H), 7,12 - 7,27 (м, 3 H), 7,27 - 7,45 (м, 3 H), 7,81 (с, 1 H), 13,16 (уш. с, 2 H)

Образец 1-7, соль бензойной кислоты (1:1):

^1H -ЯМР (400 МГц, *DMSO-d*₆) δ м.д. 0,96-1,30 (м, 15 H), 2,87 (уш. с, 3 H), 3,79 (шир д, $J=7,07$ Гц, 1 H), 4,07 (уш. с, 1 H), 4,20 (с, 1 H), 4,25 - 4,52 (м, 3 H), 4,81 (с, 1 H), 5,71 - 5,85 (м, 1 H), 6,04 (уш. д, $J = 19,33$ Гц, 4 H), 7,08 - 7,27 (м, 3 H), 7,27 - 7,43 (м, 3 H), 7,45 - 7,57 (м, 2 H), 7,63 (с, 1 H), 7,81 (с, 1 H)), 7,95 (дд, $J=8,27, 1,33$ Гц, 2 H), 12,98 (уш. с, 1 H)

Образец 1-8, соль янтарной кислоты (1:1):

^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ м.д. 0,98-1,28 (м, 15 Н), 2,42 (с, 5 Н), 2,87 (уш. с, 3 Н), 3,57-3,62 (м, 1 Н), 3,70 - 3,86 (м, 1 Н), 4,02 - 4,14 (м, 1 Н), 4,20 (с, 1 Н), 4,24 - 4,51 (м, 3 Н), 4,70 - 4,88 (м, 1 Н), 5,69 - 5,86 (м, 1 Н), 6,04 (уш. д, $J=19,33$ Гц, 4 Н), 7,12 - 7,27 (м, 3 Н), 7,27 - 7,44 (м, 3 Н), 7,81 (с, 1 Н), 11,95 - 12,58 (м, 2 Н)

Образец 1-9, соль серной кислоты (0,5:1):

^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ м.д. 1,02-1,31 (м, 15 Н), 2,94 (уш. с, 3 Н), 3,79 (шир д, $J=7,20$ Гц, 2 Н), 4,09 (уш. с, 1 Н), 4,22 - 4,48 (м, 3 Н), 4,72 - 4,90 (м, 1 Н), 5,71 - 5,92 (м, 1 Н), 6,07 (уш. д, $J=19,07$ Гц, 2 Н), 7,12 - 7,28 (м, 3 Н), 7,31 - 7,44 (м, 2 Н), 7,75 - 8,19 (м, 1 Н).

Затем образцы хранили при 25°C и 60% относительной влажности (RH) в течение 14 дней с анализом с помощью ВЭЖХ и XRPD через 7 (Фиг. 4В) и 14 дней (Фиг. 5А). Все приготовленные соли оставались аморфными, и результаты наблюдений показаны в Таблице 6. Моносульфат (образцы 1-5) и соли янтарной кислоты (сукцинат, образцы 1-8) оказались физически нестабильными и расплывались или превращались в смолу в ходе исследования. Установлено, что фумарат (образец 1-6), так и бензоатная соль (образец 1-7) представляют собой стекловидные твердые вещества. Установлено, что соль HCl (образцы 1-4) сохранила свой исходный внешний вид. Неожиданно оказалось, что гемисульфатная соль (образец 1-9) также сохранила свой внешний вид в виде белого твердого вещества в отличие от моносульфатного соединения (образец 1-5), которое представляло в конце эксперимента собой липкую смолу. Результаты показаны в Таблице 6. Установлено, что моногидрохлоридная соль (образец 1-4) и гемисульфатная соль (образец 1-9) физически и химически стабильны после 2 недель хранения при 25°C и 60% относительной влажности. (HR). Хотя обе соли были стабильны при хранении в течение двух недель, гемисульфатная соль была лучше соли HCl, поскольку соль HCl была гигроскопичной, что делало ее менее полезной по сравнению с гемисульфатной солью при длительном хранении или использовании.

Таблица 6. Стабильность образцов через 7 и 14 дней при 25°C и 60% относительной влажности

Образец №	Время воздействия 25 °С и 60% относительной влажности (дни)					
	0		7		14	
	ВЭЖХ	Наблюдение	ВЭЖХ	Наблюдение	ВЭЖХ	Наблюдение

1-1	98,6	Белое твердое вещество	98,7	Белое твердое вещество	98,5	Белое твердое вещество
1-2	99,1	Белое твердое вещество	99,2	Белое твердое вещество	99,0	Белое твердое вещество
1-3	99,7	Белое твердое вещество	99,6	Белое твердое вещество	99,4	Белое твердое вещество
1-4	98,7	Белое твердое вещество	98,8	Белое твердое вещество	98,6	Белое твердое вещество
1-5	98,4	Белое твердое вещество	55,7	Липкое белое твердое вещество	-	Липкая смола
1-6	98,7	Стекловидное твердое вещество	98,6	Прозрачное стекловидное твердое вещество	98,4	Белое стекловидное твердое вещество
1-7	98,8	Белое твердое вещество	98,8	Прозрачное стекловидное твердое вещество	98,7	Прозрачное стекловидное твердое вещество
1-8	98,7	Липкое белое твердое вещество	-	Расплавляющееся /липкое масло	-	Расплавляющееся вещество
1-9	98,7	Белое твердое вещество	98,1	Белое твердое вещество	96,4	Белое твердое вещество

Пример 5. Характеристика аморфного соединения 1-А

Аморфное соединение **1-А** первоначально анализировали методами XRPD, ¹H-ЯМР, DSC, TGA и ВЭЖХ. Дифференциальная дифрактограмма аморфного соединения **1-А**, наложенная на дифрактограмму аморфного соединения **1** и кристаллического соединения **1**, показана на Фиг. 1А, а дифрактограмма XRPD аморфного соединения **1-А** показана на Фиг. 5Б. В Таблице 7 представлены пики диаграммы XRPD, показанной на Фиг. 5Б. Кривая ВЭЖХ, выполненной для определения чистоты, показана на Фиг. 6А. В Таблице 8 представлены относительные времена удерживания (RTT) из кривой ВЭЖХ, показанной на Фиг. 6А. Аморфное соединение **1-А** имело чистоту 99,68%. На Фиг. 6В представлен график, отражающий результаты анализа аморфного соединения **1-А** методами TGA и DSC. Подробности экспериментов по анализу методами TGA и DSC описаны в Примере 2.

Таблица 7. Пики аморфного соединения 1-А

Угол (°2 θ)	Расстояние d (Å)	Интенсивность (имп.)	Интенсивность (%)
4,20	21,03	486	81,8
4,67	18,91	482	81,0
5,16	17,10	595	100,0
9,13	9,68	547	92,0

Таблица 8. Хроматограмма ВЭЖХ аморфного соединения 1-А

Аморфное соединение 1-А	
RRT	Площадь %
0,48	0,02
0,48	0,02
0,67	0,01
0,94	0,13
1.00	99,68
1.04	0,06

Аморфное соединение 1-А:

¹H-ЯМР (400 МГц, *DMSO-d*₆) δ м.д. 0,93-1,29 (м, 13 H), 2,94 (уш. с, 3 H), 3,79 (тд, *J* = 10,04, 7,07 Гц, 2 H), 4,05 - 4,19 (м, 1 H), 4,19 - 4,50 (м, 3 H), 4,81 (кв, *J* = 6,25 Гц, 1 H), 5,71 - 5,94 (м, 1 H), 5,97 - 6,16 (м, 2 H), 7,14 - 7,28 (м, 3 H), 7,31 - 7,44 (м, 2 H), 7,82 - 8,09 (м, 1 H)

Пример 6. Кристаллизация аморфного соединения 1-А

Поскольку после 14-дневного исследования стабильности установлено, что соль гемисульфата остается в твердом состоянии, как показано в Таблице 6, то были проведены предварительные испытания по изучению условий кристаллизации с использованием 11 различных растворителей. Аморфное соединение 1-А суспендировали в 5 объемах растворителя при 25 °С (образцы 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10 и 2-11). К тем образцам, которые не были сыпучими (2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8 и 2-10), дополнительно добавляли 5 объемов растворителя. Затем образцы выдерживали при 25-50°C (1°C/мин между температурами и 4 часа при каждой

температуре) в течение 6 дней, за исключением образца 2-1, который через 1 день превратился в прозрачный раствор, и он был оставлен испаряться в условиях окружающей среды. Результаты показаны в Таблице 9. Кристаллические структуры были получены в результате кристаллизации с изобутанолом (образец 2-1), с ацетоном (образец 2-2), с EtOAc (образец 2-6) и с *i*-PrOAc (образец 2-7). Также были идентифицированы два слабокристаллических образца при кристаллизации с MEK (образец 2-4) и MIBK (образец 2-5). Диаграммы XRPD показаны на Фиг. 7А.

Таблица 9. Условия кристаллизации соединения 1-А

Образец №	Растворитель	Наблюдение после добавления 5 объемов	Наблюдение после добавления 10 объемов	Наблюдение после 1 дня созревания	XRPD
2-1	IPA	Твердое несыпучее вещество	Свободно-текучая суспензия	Раствор, после испарения при комнатной температуре - смола	Смола
2-2	Изобутанол	Твердое несыпучее вещество	Свободно-текучая суспензия	Суспензия	Кристалл; дифрактограмма 2
2-3	Ацетон	Твердое несыпучее вещество	Свободно-текучая суспензия	Суспензия	Кристалл; дифрактограмма 3
2-4	MEK	Твердое несыпучее вещество	Свободно-текучая суспензия	Суспензия	Слабокристалл. вещество; дифрактограмма 4
2-5	MIBK	Твердое несыпучее вещество	Свободно-текучая суспензия	Суспензия	Слабокристалл. вещество; дифрактограмма 4
2-6	EtOAc	Твердое несыпучее вещество	Свободнотекучая суспензия	Суспензия	Кристалл; дифрактограмма 1

2-7	iProAc	Твердое несыпучее вещество	Свободно- текучая суспензия	Суспензия	Кристалл; дифрактограмма 1
2-8	THF	Твердое несыпучее вещество	Свободно- текучая суспензия	Суспензия	Слабокристалл. вещество
2-9	TBME	Свободно- текучая суспензия	-	Суспензия	Аморфное вещество
2-10	Толуол	Твердое несыпучее вещество	Свободно- текучая суспензия	Суспензия	Аморфное вещество
2-11	Гептан	Свободно- текучая суспензия	-	Суспензия	Аморфное вещество

Семь образцов (образцы 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7 и 2-8) анализировали методами DSC, TGA, ¹H-ЯМР и ИК-спектроскопии (Таблица 10, Фиг. 8А, Фиг. 8В, Фиг. 9А, Фиг. 9В, Фиг. 10А, Фиг. 10В, Фиг. 11А и Фиг. 11В), а также методом XRPD после 6 дней хранения при 25°C и 60% относительной влажности (RH). Все образцы оставались кристаллическими/слабокристаллическими после хранения при оценке стабильности. Все образцы содержали приблизительно половину эквивалента сульфата, но содержали относительно большое количество остаточного растворителя. Наложение рентгеновских дифрактограмм аморфных образцов 2-9, 2-10 и 2-11 показано на Фиг. 7В.

Таблица 10. Характеристики кристаллических образцов соединения 1-А

Образец №	Растворитель	DSC	TGA	¹ H-ЯМР	IC (с поправкой из TGA)
2-2	изо-бутанол	Эндо. пик: 113,8°C	8,3% окр. среда - 140°C	1,1 экв. изобутанола	0,45 экв.
2-3	Ацетон	Эндо. пик: 30-95°C Эндо: 100-145°C	7,6% окр. среда - 140°C	0,5 экв ацетона	0,46 экв.

2-4	МЕК	Широкий комплекс эндо. пиков: 30-115°C Эндо: 115-145 °С	8,5 % окр. среда - 140°C	0,8 экв. МЕК	0,45 экв.
2-5	МІВК	Широкий эндо. пик: 30-105 °С Эндо. пик: 114,7 °С	5,2% окр. среда - 110°C	0,2 экв. МІВК	0,46 экв.
2-6	EtOAc	Острый эндо. пик 113,6 °С	2,0% окр. среда - 100°C	0,9 экв. EtOAc	0,46 экв.
2-7	iProAc	Эндо. пик 30-90 °С	1,6% окр. среда - 90°C	0,8 экв. iProAc	0,45 экв.
2-8	THF	Эндо. пик 30-100 °С Острый эндо. пик 115,6 °С	4,2% окр. среда - 130°C	0,7 экв. THF	0,45 экв.

¹H-ЯМР были сняты для всех образцов и результаты представлены ниже.

Образец 2-2:

¹H-ЯМР (400 МГц, *DMSO-d*₆) δ м.д. 0,83 (д, *J* = 6,69 Гц, 7 H), 0,99-1,26 (м, 14 H), 1,61 (дт, *J* = 13,26, 6,63 Гц, 1 H), 3,73 - 3,87 (м, 2 H), 4,03 - 4,18 (м, 1 H), 4,18 - 4,51 (м, 4 H), 4,66 - 4,92 (м, 1 H), 4,70 - 4,90 (м, 1 H), 4,72 - 4,88 (м, 1 H), 5,81 (уш. с, 1 H), 5,93 - 6,11 (м, 2 H), 7,10 - 7,26 (м, 3 H), 7,14 - 7,26 (м, 1 H), 7,30 - 7,41 (м, 2 H), 7,94 (уш. с, 1 H)

Образец 2-3:

¹H-ЯМР (400 МГц, *DMSO-d*₆) δ м.д. 1,00-1,26 (м, 13 H), 2,09 (с, 3 H), 3,74-3,87 (м, 2 H), 4,10 (уш. д, *J*=7,70 Гц, 1 H), 4,22 - 4,50 (м, 3 H), 4,81 (кв, *J*=6,28 Гц, 1 H), 5,71 - 5,90 (м, 1 H), 5,96 - 6,15 (м, 2 H), 7,12 - 7,26 (м, 3 H), 7,31 - 7,41 (м, 2 H), 7,79 - 8,07 (м, 1 H)

Образец 2-4:

¹H-ЯМР (400 МГц, *DMSO-d*₆) δ м.д. 0,91 (т, *J* =7,33 Гц, 3 H), 1,01-1,28 (м, 13 H), 2,08 (с, 2 H), 3,72-3,89 (м, 2 H), 4,10 (уш. д, *J*=8,08 Гц, 1 H), 4,23 - 4,47 (м, 3 H), 4,81 (кв, *J* =6,25 Гц, 1 H), 5,69 - 5,89 (м, 1 H), 5,94 - 6,13 (м, 2 H), 7,14 - 7,25 (м, 3 H), 7,32 - 7,41 (м, 2 H), 7,79 - 8,11 (м, 1 H)

Образец 2-5:

^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) δ м.д. 0,86 (д, $J=6,69$ Гц, 1 H), 0,98-1,33 (м, 13 H), 2,02-2,09 (м, 1 H), 4,03-4,17 (м, 1 H), 4,22 - 4,50 (м, 3 H), 4,81 (кв, $J=6,25$ Гц, 1 H), 5,81 (уш. с, 1 H), 5,93 - 6,15 (м, 2 H), 7,11 - 7,27 (м, 3 H), 7,31 - 7,41 (м, 2 H), 7,77 - 8,21 (м, 1 H)

Образец 2-6:

^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) δ м.д. 0,98-1,28 (м, 15 H), 2,00 (с, 3 H), 3,99-4,14 (м, 3 H), 4,21-4,49 (м, 3 H)), 4,81 (кв, $J=6,22$ Гц, 1 H), 5,82 (уш. с, 1 H), 5,93 - 6,14 (м, 2 H), 7,11 - 7,26 (м, 3 H), 7,29 - 7,42 (м, 2 H), 7,79 - 8,17 (м, 1 H)

Образец 2-7:

^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) δ м.д. 0,92-1,28 (м, 17 H), 1,97 (с, 2 H), 4,04-4,16 (м, 1 H), 4,20-4,51 (м, 3 H)), 4,71 - 4,93 (м, 2 H), 5,82 (уш. с, 1 H), 5,95 - 6,14 (м, 2 H), 7,11 - 7,28 (м, 3 H), 7,31 - 7,43 (м, 2 H), 7,75 - 8,21 (м, 1 H)

Образец 2-8:

^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) δ м.д. 0,81-1,11 (м, 13 H), 1,19 (с, 1 H), 1,53-1,66 (м, 1 H), 3,87-4,01 (м, 1 H)), 4,06 - 4,32 (м, 3 H), 4,64 (кв, $J=6,25$ Гц, 1 H), 5,55 - 5,75 (м, 1 H), 5,77 - 5,97 (м, 2 H), 6,94 - 7,10 (м, 3 H), 7,13 - 7,26 (м, 2 H), 7,66 - 7,96 (м, 1 H)

Пример 7. Попытка кристаллизации аморфной малонатной соли (соединение 1-Е)

Как показано в Примере 3, кристаллическая оксалатная соль была идентифицирована при определении подходящих солей для соединения **1**, но оксалатная соль соединения **1-В** не могла быть использована в клинических испытаниях из-за ее потенциальной способности вызывать образование камней в почках. Поэтому была предпринята попытка кристаллизации химически родственной малонатной соли (соединение **1-Е**) с использованием тех же 11 растворителей, что и для гемисульфатной соли. Соединение **1** (12×50 мг, образцы 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11 и 3-12) растворяли в *трет*-бутаноле (20 об.) и затем растворы обрабатывали 1 эквивалентом исходного раствора малоновой кислоты (1 М в THF). Затем образцы замораживали, и удаляли растворитель путем лиофилизации. К образцам 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10 и 3-11 при комнатной температуре добавляли соответствующий растворитель (5 объемов). Всем полученным растворам давали возможность испаряться в условиях окружающей среды, и смолы или твердые вещества созревали и осаждались в течение 5 дней при 25-50°C (1°C/мин между температурами и 4

часа при каждой температуре). Твердые вещества анализировали с помощью метода XRPD (Фиг. 12В), и установлено, что все образцы либо образовывали смолу, либо были аморфными (Фиг. 12В). Результаты показаны в Таблице 11. Один твердый (аморфный) образец (3-12) анализировали с помощью методов ^1H -ЯМР и ВЭЖХ, и установлено, что он содержал приблизительно 1 эквивалент малоновой кислоты (пики перекрываются), а также 0,6 экв. *t*-BuOH. Соединение имело чистоту 99,2% (Фиг. 13А). На Фиг. 12А представлена дифрактограмма XRDP для образца 3-12, а на Фиг. 13А представлена кривая ВЭЖХ-хроматографии для образца 3-12.

Образец 3-12:

^1H -ЯМР (400 МГц, *DMSO-d*₆) δ м.д. 0,81-1,11 (м, 13 Н), 1,19 (с, 1 Н), 1,53-1,66 (м, 1 Н), 3,87-4,01 (м, 1 Н), 4,06 - 4,32 (м, 3 Н), 4,64 (кв, *J*=6,25 Гц, 1 Н), 5,55 - 5,75 (м, 1 Н), 5,77 - 5,97 (м, 2 Н), 6,94 - 7,10 (м, 3 Н), 7,13 - 7,26 (м, 2 Н), 7,66 - 7,96 (м, 1 Н)

Таблица 11. Условия кристаллизации аморфной малонатной соли соединения 1-Е

Образец №	Растворитель	Наблюдение после добавления 5 объемов	Наблюдение после 5 дней наблюдения	XRPD
3-1	IPA	Прозрачный раствор*	Прозрачная смола	-
3-2	Изобутанол	Прозрачный раствор*	Прозрачная смола	-
3-3	Ацетон	Прозрачный раствор*	Прозрачная смола	-
3-4	МЕК	Прозрачный раствор*	Прозрачная смола	-
3-5	МИБК	Раствор и немного смолы	Прозрачная смола	-
3-6	EtOAc	Прозрачный раствор*	Прозрачная смола и кристаллоподобное вещество	Аморфное вещество
3-7	iPrOAc	Смола	Прозрачная смола	-
3-8	THF	Прозрачный раствор*	Прозрачная смола	-
3-9	ТВМЕ	Густая суспензия	Прозрачная смола	-
3-10	Толуол	Белая смола/твердое вещество	Белая смола	Аморфное вещество

3-11	Гептан	Белое твердое вещество (монокристалл)	Белая смола	Аморфное вещество
3-12	-	(Белое твердое вещество - без растворителя)	(Липкое белое твердое вещество - условия окружающей среды)	Аморфное вещество

* Испарение растворителя при комнатной температуре.

Пример 8. Недостаточное образование солей при использовании жидкостного измельчения (LAG)

Исследование жидкостного измельчения (LAG) для определения подходящих солей, отличных от гемисульфата, было проведено с использованием 14 кислотных противоионов, указанных в Таблице 12.

Таблица 12. Исходные растворы кислот для противоионов, используемых при кристаллизации LAG

Кислота для противоиона	Растворитель (1 М)
Памовая	DMSO
Малоновая	THF
D-глюкуроновая	Вода
DL-миндалевая	THF
D-глюконовая	THF
Гликолевая	THF
L-молочная	THF
Олеиновая	THF
L-аскорбиновая	Вода
Адипиновая	THF (нагрев.)
Капроновая	THF
Стеариновая	THF
Пальмитиновая	THF
Метансульфоная	THF

Соединение 1 (30 мг) помещали во флаконы для ВЭЖХ с двумя шариками диаметром 3 мм. Материалы смачивали растворителем (15 мкл этанола, пробы 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13 и 4-14), и затем добавляли 1 эквивалент кислоты для противоиона. Затем образцы измельчали в течение 2 часов при

650 об/мин с использованием системы Fritsch с адаптером Automaxion. Установлено, что большинство образцов после измельчения представляли собой прозрачные смолы, и их не подвергали дальнейшему анализу (Таблица 13). Образцы, которые представляли или содержали твердое вещество, анализировали с помощью метода XRPD, и во всех случаях установили, что полученные дифрактограммы соответствуют дифрактограммам кристаллов с кислотным противоионом без дополнительных пиков (Фиг. 13В).

Таблица 13. Наблюдения и результаты анализа методом XRPD для соединений 1 после LAG

Образец №	Кислота	Наблюдение после измельчения	Результаты XRPD
4-1	Памововая	Желтая смола/твердое вещество	Памововая кислота и аморфный ореол
4-2	Малоновая	Прозрачная смола	-
4-3	D-глюкуроновая	Белая смола/твердое вещество	D-глюкуроновая кислота и аморфный ореол
4-4	DL-миндалевая	Прозрачная смола	-
4-5	D-глюконовая	Прозрачная смола	-
4-6	Гликолевая	Прозрачная смола	
4-7	L-молочная	Прозрачная смола	-
4-8	Олеиновая	Прозрачная смола	-
4-9	L-аскорбиновая	Белая смола/твердое вещество	L-аскорбиновая кислота и аморфный ореол
4-10	Адипиновая	Прозрачная смола	-
4-11	Капроновая	Прозрачная смола	-
4-12	Стеариновая	Белая смола/твердое вещество	Стеариновая кислота и аморфный гало
4-13	Пальмитиновая	Белая смола/твердое вещество	Пальмитиновая кислота и аморфный ореол

4-4	Метансульфоновая	Прозрачная смола	-
-----	------------------	------------------	---

Пример 9. Невозможность адекватного солеобразования при использовании метилэтилкетона (МЕК)

Для изучения подходящих солей, отличных от гемисульфатной соли, в качестве растворителя использовали метилэтилкетон (МЕК). Используя 14 кислот для противоионов из Таблицы 12, проводили исследование путем растворения соединения 1 (50 мг) в МЕК (20 объемов) при комнатной температуре. Растворы обрабатывали 1 эквивалентом выбранных кислот для противоионов (Таблица 12). Затем образцы охлаждали до 5°C со скоростью 0,1°C/мин и перемешивали при этой температуре в течение ночи. Всем образцам давали возможность испариться в условиях окружающей среды, и любые наблюдаемые твердые вещества анализировали с помощью метода XRPD. В результате испарения в основном образовывались смолы, за исключением образцов со стеариновой кислотой (образец 5-12) и пальмитиновой кислотой (образец 5-13), которые приводят к образованию стекловидных образований в растворах. Эти твердые вещества были аморфными по данным XRPD, но кристаллические формы соли не образовывались. Результаты показаны в Таблице 14.

Таблица 14. Результаты растворения соединения 1 в МЕК (20 объемов)

Образец №	Кислота	Растворитель кислоты до 1M	Наблюдение при добавлении кислоты	Наблюдение при охлаждении	Наблюдение при испарении
5-1	Памовая	DMSO	Желтый раствор	Желтый раствор	Желтая смола
5-2	Малоновая	THF	Раствор	Раствор	Прозрачная смола
5-3	D-глюкуроновая	Вода	Раствор	Раствор	Прозрачная смола
5-4	DL-миндалевая	THF	Раствор	Раствор	Прозрачная смола
5-5	D-глюконовая	THF	Белый осадок	Мутный раствор	Прозрачная смола
5-6	Гликолевая	THF	Раствор	Раствор	Прозрачная смола

5-7	L-молочная	THF	Раствор	Раствор	Прозрачная смола
5-8	Олеиновая	THF	Раствор	Раствор	Прозрачная смола
5-9	L-аскорбиновая	Вода	Раствор	Раствор	Желтая смола
5-10	Адипиновая	THF (нагрев.)	Раствор	Раствор	Прозрачная смола
5-11	Капроновая	THF	Раствор	Раствор	Прозрачная смола
5-12	Стеариновая	THF	Раствор	Мутный раствор	Прозрачное стекловидное твердое вещество*
5-13	Пальмитиновая	THF	Раствор	Раствор	Прозрачное стекловидное твердое вещество*
5-14	Метансульфо- новая	THF	Раствор	Раствор	Прозрачная смола

Исходный раствор приготовлен перед добавлением кислоты

* Образцы были проанализированы с помощью метода XRPD и показали наличие аморфной структуры плюс пики кислотного противоиона.

Поскольку все образцы были аморфными, то все образцы повторно растворяли в МЕК (5 об.) и при комнатной температуре добавляли циклогексан (20 об.) в качестве антирастворителя с последующим перемешиванием в течение 1 часа при 25°C. Затем образцы выдерживали при температуре 50-5°C (1°C/мин между температурами, 4 часа при каждой температуре) в течение 2 дней, а затем цикл меняли на 50-25°C еще на 4 дня. После созревания образцы контролировали визуально. Результаты показаны в Таблице 15. После созревания установлено, что все образцы, кроме 5-1 (с памовой кислотой), представляют собой смолы. Образец 5-1, представляющий собой желтое твердое вещество, анализировали с помощью метода XRPD, и установили, что его структура соответствует известной форме памовой кислоты (Фиг. 14В), поэтому кристаллические формы соли не получены.

Таблица 15. Результаты, полученные после повторного растворения соединения 1 в МЕК (5 объемов) и антирастворителе

Образец №	Наблюдение сразу после добавления	Наблюдение через 10 минут	Наблюдение через 60 минут	Наблюдение после созревания
5-1	Осадок	Смола	Смола	Желтая суспензия**
5-2	Осадок	Смола	Смола	Смола
5-3	Осадок/смола	Смола	Смола	Смола
5-4	Осадок	Смола	Смола	Смола
5-5	Осадок/смола	Смола	Смола	Смола
5-6	Осадок	Смола	Смола	Смола
5-7	Осадок	Смола	Смола	Смола
5-8	Осадок	Светлая суспензия	Смола	Смола
5-9	Осадок	Смола	Смола	Смола
5-10	Осадок	Смола	Смола	Смола
5-11	Осадок	Светлая суспензия	Смола	Смола
5-12	Осадок	Светлая суспензия	Смола	Смола
5-13	Осадок	Светлая суспензия	Смола	Смола
5-14	Осадок	Смола	Смола	Смола

** Образец, проанализированный с помощью метода XRPD, показал совпадение с дифрактограммой известной формы памовой кислоты (без дополнительных пиков).

Пример 10. Невозможность адекватного солеобразования при использовании этилацетата

Для изучения подходящих солей, отличных от гемисульфата, использовали этилацетат. Используя 14 кислот для противоионов из Таблицы 12, проводили исследование путем растворения соединения 1 (50 мг) в этилацетате (20 объемов) при 50°C. Растворы обрабатывали 1 эквивалентом выбранных кислот для противоионов (Таблица 12). Затем образцы охлаждали до 5°C со скоростью 0,1°C/мин и перемешивали при этой температуре в течение 4 дней. Растворам давали возможность испариться в

условиях окружающей среды, и любые твердые вещества анализировали с помощью метода XRPD. Результаты кристаллизации с использованием этилацетата показаны в Таблице 16. В отличие от Примера 8, где растворителем был МЕК, большинство образцов после охлаждения смеси кислоты и соединения представляли собой суспензии (смесям, которые представляли собой растворы, давали возможность испариться в условиях окружающей среды). Однако дифрактограммы XRPD в целом соответствовали кристаллическому соединению **1**. Образцы 6-2, 6-4 и 6-5 имели некоторые небольшие различия (Фиг. 14А и Фиг. 15А). Кристаллических форм соли не получено.

Таблица 16. Результаты растворения соединения 1 в EtOAc (20 объемов)

Образец №	Кислота	Растворитель кислоты до 1М	Наблюдение при добавлении кислоты	Наблюдение при охлаждении	XRPD	Наблюдение после испарения
6-1	Памовая	DMSO	Желтый раствор	Желтый раствор*	-	Смола
6-2	Малоновая	THF	Раствор	Белая суспензия	Небольшие отличия от свободного основания	-
6-3	D-глюкуроновая	Вода	Раствор	Раствор*	-	Смола
6-4	DL-миндалевая	THF	Раствор	Белая суспензия	Небольшие отличия от свободного основания	-
6-5	D-глюконовая	THF	Белый осадок	Возможна белая смола	Небольшие отличия от свободного основания	-
6-6	Гликолевая	THF	Раствор	Белая суспензия	Свободное основание	-
6-7	L-молочная	THF	Раствор	Белая суспензия	Свободное основание	-

6-8	Олеиновая	THF	Раствор	Белая суспензия	Свободное основание	-
6-9	L-аскорбиновая	Вода	Раствор	Раствор*	-	Белое твердое вещество/ аморфная желтая смола
6-10	Адипиновая	THF (нагрев.)	Раствор	Белая суспензия	Свободное основание	-
6-11	Капроновая	THF	Раствор	Белая суспензия	Свободное основание	-
6-12	Стеариновая	THF	Раствор	Белая суспензия	Свободное основание	-
6-13	Пальмитиновая	THF	Раствор	Белая суспензия	Свободное основание	-
6-14	Метансульфоная	THF	Белый осадок	Раствор/ прозрачная смола*	-	Прозрач. смола

Пример 11. Определение химической чистоты методом ВЭЖХ

Анализ чистоты образцов по Примеру 2 и Примеру 4 проводили с использованием системы серии Agilent HP1100, оснащенной детектором на диодной матрице. Для анализа результатов использовали программное обеспечение ChemStation vB.04.03. Используемые методы и параметры показаны в Таблице 17.

Таблица 17. Метод ВЭЖХ для определения химической чистоты

Параметр	Значение, показатель
Метод	Хроматография с обращенной фазой, градиентной элюирование
Пробы	0,5 мг/мл в смеси ацетонитрил:вода 1:1
Колонка	Supelco Ascentis Express C18, 100 x 4,6 мм, 2,7 мкм
Температура колонки (°C)	25
Вводимый объем образца (мкл)	5
Длина волны, полоса пропускания (нм)	255, 90

Скорость потока (мл/мин)	2		
Фаза А	0,1% TFA в воде		
Фаза В	0,085% TFA в ацетонитриле		
Временной режим	Время (мин)	% Фаза А	% Фаза В
	0	95	5
	6	5	95
	6,2	95	5
	8	95	5

Пример 12. Методы порошковой рентгеновской дифракции (XRPD)

Дифрактограммы XRPD в Примерах 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 были получены на дифрактометре PANalytical Empyrean с использованием Cu K α -излучения (45 кВ, 40 мА) в режиме пропускания. На падающем пучке использовались щель 0,5°, маска 4 мм, и щели Соллера 0,4 рад с фокусирующим зеркалом. Детектор PIXcel^{3D} на дифракционном пучке был установлен в режиме получения щели Соллера 0,04 рад. Работоспособность прибора еженедельно проверялась с использованием кремниевого порошка. Для сбора данных использовали программное обеспечение X'Pert Data Collector v. 5.3, а для анализа данных и вывода конечных результатов использовали программное обеспечение Diffrac Plus EVA v. 15.0.0.0 или Highscore Plus v. 4.5. Образцы готовили и анализировали либо в металлическом планшете, либо в 96-луночном планшете Millipore в режиме пропускания. На металлическом луночном планшете над порошком размещали рентгенопрозрачную пленку, и порошки (приблизительно 1-2 мг) использовали в полученном виде. Планшет Millipore использовали для выделения и анализа твердых веществ из суспензий путем добавления небольшого количества суспензии непосредственно на планшет перед фильтрованием под легким вакуумом.

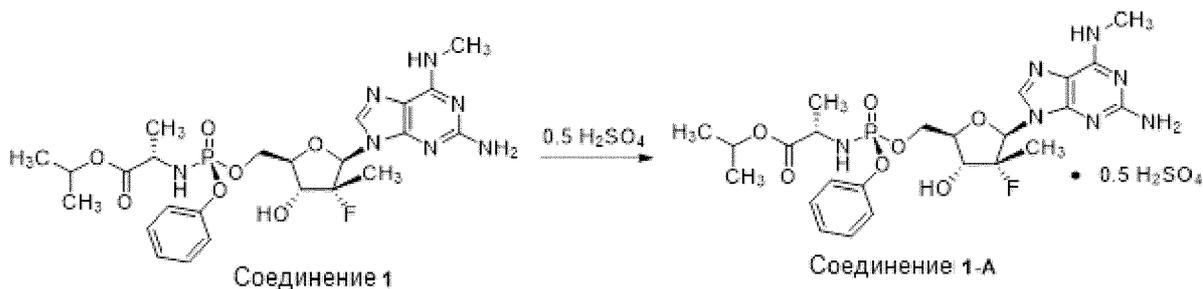
Для сканирования металлических планшетов использовали осевой гониометр, а для планшетов Millipore использовали сканирование под углами 2 θ . Проверку работоспособности проводили с использованием кремниевого порошка на металлических планшетах. При анализе XRPD диапазон углов составлял 2,5 до 32,0° 2 θ , шаг 0,0130° 2 θ , и общее время анализа составляло 2,07 минут.

Образцы также анализировали на дифрактометре Bruker D8 с использованием CuK α -излучения (40 кВ, 40 мА), гониометра θ -2 θ , при расходимости пучка и приемных щелей V4, с использованием Ge-монохроматора и детектора Lynxeye. Работоспособность прибора проверяли с использованием сертифицированного стандарта Corundum (NIST 1976). Для сбора данных использовали программное обеспечение Diffrac Plus. XRD

Commander v2.6.1, а для анализа данных и вывода конечных результатов использовали программное обеспечение Diffrac Plus EVA v. 15.0.0.0

Образцы испытывали в условиях окружающей среды в виде тонких плоских проб с использованием порошка в том виде, в котором он был получен. Образцы аккуратно помещали в полость, вырезанную в полированной кремниевой пластине с нулевым фоном (510). Во время анализа образец вращался в своей плоскости. При анализе XRPD диапазон углов составлял от 2 до 42° 2 θ , шаг 0,05° 2 θ , и время анализа составляла 0,5 с/шаг.

Пример 13. Синтез аморфного соединения 1-А



В колбу емкостью 250 мл загружали MeOH (151 мл) и раствор охлаждали до 0-5°C. В течение 10 минут добавляли по каплям концентрированный раствор H₂SO₄. В отдельную колбу загружали соединение 1 (151 г) и ацетон (910 мл), и по каплям добавляли раствор H₂SO₄/MeOH при 25-30°C в течение 2,5 часов. Выпадало большое количество твердого вещества. После перемешивания раствора в течение 12-15 часов при 25-30°C смесь фильтровали, промывали смесью MeOH/ацетон (25 мл/150 мл) и сушили при 55-60°C в вакууме, с получением соединения 1-А (121 г, 74%).

¹H-ЯМР: (400 МГц, DMSO-*d*₆): δ 8,41 (шир, 1H), 7,97 (с, 1H), 7,36 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H), 7,22 (д, $J = 8,0$ Гц, 2H), 7,17 (т, $J = 8,0$ Гц, 1H), 6,73 (с, 2H), 6,07 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 6,00 (дд, $J = 12,0, 8,0$ Гц, 1H), 5,81 (шир, 1H), 4,84-4,73 (м, 1H), 4,44-4,28 (м, 3H), 4,10 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H), 3,85-3,74 (м, 1H), 2,95 (с, 3H), 1,21 (с, $J = 4,0$ Гц, 3H), 1,15-1,10 (м, 9H).

Аналитический метод для соединения 1-А. Чистоту соединения 1-А определяли с использованием системы ВЭЖХ Agilent 1100 с колонкой Waters XTerra Phenyl 5 мкм, 4,6x250 мм при следующих условиях: скорость потока 1 мл/мин, регистрация при 254 нм, температура колонки 30°C, объем вводимой пробы 10 мкл, время анализа 30 минут. Образец растворяли в смеси ACN:вода (90:10, по объему). Градиентный режим показан ниже. R_t (мин) для соединения 1-А составило приблизительно 12,0 минут.

Время (мин)	0,1% H ₃ PO ₄ в воде (А)%	Ацетонитрил (В)%
0	90	10
20	20	80
20,1	90	10
30	90	10

Пример 14. Характеристики соединения 1-А

Соединение 1-А дополнительно охарактеризовывали визуально, с использованием методов ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, ¹⁹F-ЯМР, масс-спектрометрии (MS), ВЭЖХ и XRPD (Фиг. 15В). Остаточный растворитель измеряли методом газовой хроматографии (ГХ). Содержание воды измеряли титрованием по методу Карла Фишера, и содержание воды составляло всего 0,70%. Полученные результаты и данные обобщены в Таблице 18.

Таблица 18. Дополнительные характеристики соединения 1-А

Тест	Результат
Внешн. вид	Белое твердое вещество
ЯМР	Спектр ¹ H-ЯМР представлен в Примере 4.
MS	MS(ESI+ve) [M+ H] ⁺ = 582,3; соответствует структуре
ВЭЖХ	99,8% по AUC при 254 нм (в среднем по двум препаратам)
Остаточный растворитель (по результатам ГХ)	Метанол - 57 частей на миллион Ацетон - 752 частей на миллион Дихлорметан - 50 частей на миллион Этилацетат - 176 частей на миллион
Содержание воды	0,70%

Пример 15. Растворимость соединения 1 и соединения 1-А

Соединение 1 и соединение 1-А были протестированы на растворимость в биорелевантных тестовых средах, включая искусственную желудочную жидкость (SGF), искусственную желудочную жидкость натошак (FaSSIF) и желудочную жидкость в состоянии сытости (FeSSIF). Результаты для соединения 1 показаны в Таблице 19, а результаты для соединения 1-А показаны в Таблице 20. Образцы перемешивали в средах при комнатной температуре (20-25°C). Соединение 1-А было более чем в 40 раз более растворимым в воде через 2 часа, чем соединение 1, и более чем в 25 раз более

растворимым через 24 часа. В среде SGF растворимость соединения 1-А составила 84,2 мг/мл через 24 часа по сравнению с растворимостью 15,6 мг/мл соединения 1 в тот же момент времени. Соединение 1-А также было более растворимым через 2 часа в среде SGF, чем соединение 1, и достаточно растворимым, чтобы можно было провести тестирование даже через 48 часов, тогда как тестирование через 48 часов с соединением 1 не проводилось.

Таблица 19. Результаты оценки растворимости соединения 1

Среда	Растворимость (в мг/мл)		Внешний вид	Оценка
	Через 2 часа	Через 24 часа		
Вода	1,5	2,5	Прозрачный раствор*	Слабая растворимость
SGF	13,8	15,6	Прозрачный раствор со смолой внизу	Умеренная растворимость
FaSSIF	1,7	1,7	Мутный раствор	Слабая растворимость
FESSIF	2,8	2,9	Мутный раствор	Слабая растворимость

*Образец выглядел прозрачным, однако была достигнута растворимость всего 1,5 мг/мл. При дальнейшем исследовании отмечено, что на мешалке образовалась липкая пленка. Активный фармацевтический ингредиент (соединение 1) образовывал липкий шарик в разбавителе (90% воды/10% ацетонитрила) во время стандартного приготовления, что требовало длительного времени обработки ультразвуком для полного растворения.

Таблица 20. Результаты оценки растворимости соединения 1-А

Среда	Растворимость (в мг/мл солевой основы)			Внешний вид	Оценка
	Через 2 часа	Через 24 часа	Через 48 часов		
Вода	65,3	68,0	N/A	Мутный раствор	Растворимо
SGF	89,0	84,2	81,3	Мутный	Растворимо

				раствор	
FaSSIF	1,9	2,0	N/A	Мутный раствор	Слабая растворимость
FESSIF	3,3	3.4	N/A	Мутный раствор	Слабая растворимость

N/A - не оценивали

Пример 16. Химическая стабильность соединения 1-А

Соединение **1-А** тестировали в отношении его химической стабильности при 25 и 40°C в течение 6 месяцев путем контроля органической чистоты, содержания воды, оценки методами ¹H-ЯМР, DSC и ИК-рамановского рассеяния. Система закрытого контейнера для исследования представляла собой комбинированный медицинский клапанный мешок с фармацевтической ламинированной пленкой поверх пакета и влагопоглощающим силикагелем между двумя слоями. Соединение **1-А** (1 г) помещали в каждый контейнер. Затем пакеты хранили при 25°C и 60% относительной влажности (RH) и 40°C и 75% относительной влажности. Оценки органической чистоты, содержания воды, и оценки методами ¹¹H-ЯМР, DSC и комбинационного рассеяния проводили в момент времени 0, через 1 месяц, через 2 месяца, через 3 месяца и через 6 месяцев.

Чистоту соединения **1-А** определяли с использованием системы Shimadzu LC-20AD с колонкой Waters XTerra Phenyl, 5 мкм, 4,6x250 мм при следующих условиях: скорость потока 1 мл/мин, детектирование при 254 нм, температура колонки 35°C, и объем вводимой пробы 10 мкл. Образец растворяли в смеси ацетонитрил:вода (90:10) (по объему). Градиентный режим показан ниже.

Время (мин)	А% (ACN)	В% (вода)
0	90	10
20	20	80
20.1	90	10
30	90	10

Содержание воды в соединении **1-А** (250 мг) определяли с помощью аппарата для титрования воды с использованием метода титрования Карла Фишера.

Результаты показаны в Таблице 21 и Таблице 22. Когда соединение **1-А** хранили в течение 6 месяцев при 25 и 40°C, скорость разложения была минимальной. Через 3 месяца соединение **1-А** имело чистоту 99,75% в условиях 25°C и чистоту 99,58% в условиях хранения при 40°C. Через 6 месяцев соединение **1-А** все еще имело чистоту 99,74% при

температуре 25°C, и чистоту 99,30% при температуре 40°C. При 25°C процент содержания продуктов разложения увеличился с 0,03% в день 0 до 0,08% через 6 месяцев. При 40°C процент содержания продуктов разложения увеличился с 0,03% до 0,39%. В течение 6 месяцев процент содержания воды увеличился приблизительно на 0,6% при температуре 25°C и увеличился приблизительно на 0,7% при температуре 40°C.

Показатели, полученные с использованием методов ¹H-ЯМР, комбинационного рассеяния света и DSC, для соединения **1-A** через 1, 2, 3 и 6 месяцев были такими же, как показатели соединения **1-A** в день 0 при обоих температурных условиях (Таблица 22), что подчеркивает стабильность соединения **1-A** в течение длительного времени хранения.

Таблица 21. Показатели разложения соединения **1-A** при хранении в течение 6 месяцев при 25°C и 40°C

	Время проверки	Процентное содержание воды	Процент чистоты	Процентное содержание продукта разложения	Максимальный процент содержание примесей
25°C	День 0	1,2	99,82	0,03	0,12
	Месяц 1	1,9	99,77	0,04	0,12
	Месяц 2	1,8	99,75	0,06	0,12
	Месяц 3	1,8	99,75	0,06	0,12
	Месяц 6	1,8	99,74	0,08	0,13
40°C	День 0	1,2	99,82	0,03	0,12
	Месяц 1	2,0	99,71	0,09	0,12
	Месяц 2	1,9	99,63	0,15	0,12
	Месяц 3	1,9	99,58	0,20	0,12
	Месяц 6	1,9	99,30	0,39	0,14

Таблица 22. Характеристика соединения **1-A** при исследовании его разложения

	Время проверки	¹ H-ЯМР	Рамановское рассеяние	DSC
25°C	День 0	Начальный тест	Начальный тест	Начальный тест
	Месяц 1	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0
	Месяц 2	То же, что и в	То же, что и в день	То же, что и в день

		день 0	0	0
	Месяц 3	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0
	Месяц 6	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0
40°C	День 0	Начальный тест	Начальный тест	Начальный тест
	Месяц 1	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0
	Месяц 2	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0
	Месяц 3	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0
	Месяц 6	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0	То же, что и в день 0

Дополнительные исследования химической стабильности соединения **1-А** были проведены для определения уровней примесей и воды. Были протестированы три условия: ускоренное испытание по стабильности ($40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\%$ относительной влажности) в течение 6-месячного периода, стабильность в условиях окружающей среды ($25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%$ относительной влажности) в течение 9-месячного периода, и стабильность в условиях холодильника ($5\pm 3^\circ\text{C}$) в течение 9 месяцев. Результаты исследования стабильности в ускоренном режиме, стабильности в условиях окружающей среды и условиях холодильника, показаны в Таблице 23, Таблице 24 и Таблице 25, соответственно. По результатам этих исследований можно сделать вывод, что соединение **1-А** химически очень стабильно.

В ускоренном исследовании стабильности (Таблица 23) в каждый момент времени (1-й месяц, 3-й месяц и 6-й месяц), когда оценивали соединение **1-А**, соединение **1-А** всегда представляло собой белое твердое вещество, и спектр IR соответствовал эталонному стандарту. Через шесть месяцев общее количество примеси в виде вещества 1 в соединении 1 составило всего 0,08%, а примеси в виде вещества 2 и его изомеров не были обнаружены.

Таблица 23. Ускоренное испытание по стабильности ($40\pm 2^\circ\text{C}$ и $75\pm 5\%$ относительной влажности) соединения 1-А

Показатели	Результат	Время тестирования
------------	-----------	--------------------

		оценки	0 месяцев	1-й месяц	3-й месяц	6-й месяц
Внешний вид		Белое или почти белое твердое вещество	Белое твердое вещество	Белое твердое вещество	Белое твердое вещество	Белое твердое вещество
ИК-анализ		Соответствует эталонному стандарту	Соответствует эталонному стандарту	/	Соответствует эталонному стандарту	Соответствует эталонному стандарту
Вода		≤0,0%	0,45%	0,21%	0,36%	0,41%
Вещество 1	Примесь А	≤0,15%	ND	ND	ND	ND
	Примесь В	≤0,15%	ND	ND	ND	ND
	Примесь F	≤0,15%	ND	ND	ND	0,01%
	Примесь Н	≤0,15%	ND	ND	ND	ND
	Любая другая одиночная примесь	≤0,10%	0,01%	0,02%	0,01%	0,05%
	Всего примесей	≤0,2%	0,01%	0,02%	0,02%	0,08%
Вещество 2	Примесь G	≤0,15%	ND	ND	ND	ND
Изомер	Примесь С	≤0,15%	ND	/	ND	ND
	Примесь D	≤0,15%	ND	/	ND	ND
	Примесь E	≤0,15%	ND	/	ND	ND
Анализ		98,0%~102,0%	98,8%	101,5%	99,6%	99,5%
Микроб- ный тест	ТАМС	≤1000 КОЕ/г	<1 КОЕ/г	/	/	/
	Плесень и дрожжи	≤100 КОЕ/г	<1 КОЕ/г	/	/	/

	Кишечная палочка	Не обнаружено	ND	/	/	/
--	------------------	---------------	----	---	---	---

ND: не обнаружено

При исследовании стабильности в условиях окружающей среды, где в течение девяти месяцев оценивали внешний вид, проводили ИК-анализ, оценку уровней воды и примесей, внешний вид соединения **1-А** всегда представлял собой белое твердое вещество, а ИК-спектр всегда соответствовал эталонному образцу. Результаты (Таблица 24) показывают, что соединение **1-А** химически стабильно. Через 9 месяцев процентное содержание воды в образце составил всего 0,20%, а общее количество примесей вещества 1 составил всего 0,02%. Как и в ускоренном исследовании стабильности, примесь в виде вещества 2 и его изомеров в соединении **1-А** не обнаружены.

Таблица 24. Стабильность при хранении в условиях окружающей среды ($25\pm 2^\circ\text{C}$ и $60\pm 5\%$ относительной влажности) соединения **1-А**

Показатели	Результат оценки	Время тестирования				
		0 месяцев	1-й месяц	3-й месяц	6-й месяц	9-й месяц
Внешний вид	Белое или почти белое твердое вещество	Белое твердое вещество	Белое твердое вещество	Белое твердое вещество	Белое твердое вещество	Кремово-белое твердое вещество
ИК-анализ	Соответствует эталонному стандарту	Соответствует эталонному стандарту	/	Соответствует эталонному стандарту	Соответствует эталонному стандарту	Соответствует эталонному стандарту
Вода	$\leq 2,0\%$	0,45%	0,19%	0,29%	0,46%	0,20%
Вещество 1	Примесь А	$\leq 0,15\%$	ND	ND	ND	ND
	Примесь В	$\leq 0,15\%$	ND	ND	0,03%	ND
	Примесь F	$\leq 0,15\%$	ND	ND	0,02%	0,01%

	Примесь Н	≤0,15%	ND	ND	ND	ND	ND
	Любая другая одиночная примесь	≤0,10%	0,01%	0,01%	0,03%	0,02%	0,02%
	Всего примесей	≤0,2%	0,01%	0,02%	0,11%	0,05%	0,02%
Вещество 2	Примесь G	≤0,15%	ND	ND	ND	ND	ND
Изомер	Примесь C	≤0,15%	ND	/	ND	ND	ND
	Примесь D	≤0,15%	ND	/	ND	ND	ND
	Примесь E	≤0,15%	ND	/	ND	ND	ND
Анализ		98,0%~102,0%	98,8%	101,1%	99,6%	99,7%	100,9%
Микробный тест	ТАМС	≤1000 КОЕ/г	<1 КОЕ/г	/	/	/	/
	Плесень и дрожжи	≤100 КОЕ/г	<1 КОЕ/г	/	/	/	/
	Кишечная палочка	Не обнаружено	ND	/	/	/	/

ND: не обнаружено

Результаты исследования стабильности при хранении в условиях холодильника представлены в Таблице 25. Единственными примесями, обнаруженными даже через 9 месяцев, были примеси вещества 1 и воды. Содержание воды через 9 месяцев составило 0,32%, а общее количество примесей вещества 1 составило всего 0,01% от массы образца. При хранении в условиях холодильника соединение **1-А** химически очень стабильно.

Таблица 25. Стабильность при хранении в условиях холодильника ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$) соединения 1-А

Показатели		Результат оценки	Время тестирования				
			0 месяцев	1-й месяц	3-й месяц	6-й месяц	9-й месяц
Внешний вид		Белое или почти белое твердое вещество	Белое твердое вещество	Белое твердое вещество	Белое твердое вещество	Белое твердое вещество	Кремово-белое твердое вещество
ИК		Соответствует эталонному стандарту	Соответствует эталонному стандарту	/	Соответствует эталонному стандарту	Соответствует эталонному стандарту	Соответствует эталонному стандарту
Вода		$\leq 2,0\%$	0,45%	0,19%	0,32%	0,42%	0,32%
Вещество 1	Примесь А	$\leq 0,15\%$	ND	ND	ND	ND	ND
	Примесь В	$\leq 0,15\%$	ND	ND	0,01%	ND	ND
	Примесь F	$\leq 0,15\%$	ND	ND	ND	ND	ND
	Примесь Н	$\leq 0,15\%$	ND	ND	ND	ND	ND
	Любая другая одиночная примесь	$\leq 0,10\%$	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%
	Всего примесей	$\leq 0,2\%$	0,01%	0,01%	0,03%	0,03%	0,01%
Вещество 2	Примесь G	$\leq 0,15\%$	ND	ND	ND	ND	ND
Изомер	Примесь С	$\leq 0,15\%$	ND	/	ND	ND	ND
	Примесь D	$\leq 0,15\%$	ND	/	ND	ND	ND
	Примесь E	$\leq 0,15\%$	ND	/	ND	ND	ND
Анализ		98,0% ~ 102,0%	98,8%	101,1%	100,2%	98,6%	101,4%
Микробный тест	ТАМС	≤ 1000 КОЕ/г	<1 КОЕ/г	/	/	/	/
	Плесень и дрожжи	≤ 100 КОЕ/г	<1 КОЕ/г	/	/	/	/

	Кишечная палочка	Не обнаружен	ND	/	/	/	/
--	------------------	--------------	----	---	---	---	---

ND: не обнаружено

Пример 17. Уровни метаболитов в плазме после однократного перорального введения соединения 1-А

Крысам, собакам и обезьянам вводили однократную пероральную дозу соединения 1-А, и измеряли уровни некоторых метаболитов в плазме, которые показаны на Схеме 1.

Превращение соединения 1-А в соединение 1 и метаболит 1-7 показано в Таблице 26, а результаты для метаболита 1-8 и метаболита 1-2 показаны в Таблице 27. У крыс наблюдали низкие уровни действия соединения 1, но наблюдали высокие уровни метаболита 1-7, нуклеозидного метаболита активного трифосфата (метаболит 1-6). У обезьян наблюдали действие соединения 1, приблизительно пропорциональное дозе. У собак измеряли сверхпропорциональное действие соединения 1, что свидетельствует о метаболическом клиренсе первого прохождения в печени. На протяжении всего исследования наблюдали значительно большее количество случаев рвоты у собак (5/5 в группе с высокой дозой), чем у обезьян (1/5 в группе с высокой дозой).

Таблица 26. Уровни соединения 1 и метаболита 1-7 в плазме после однократного перорального введения соединения 1-А

Вид	Доза* (мг/кг)	Соединение 1			Метаболит 1-7	
		C _{макс} (нг/мл)	T _{макс} (час)	AUC _{0-посл} (час *нг/мл)	C _{макс} (нг/мл)	AUC _{0-посл} (час *нг/мл)
Крыса ^a	500	70,5	0,25	60,9	748	12000
Собака ^b	30	15:30	0,25-1	1300	783	9270
	100	8120	0,5-1	10200	2030	24200
	300	21300	204	44300	4260	60800
Обезьяна ^b	30	63,5	0,5-2	176	42,5	1620 г.
	100	783	1-2	1100	131	3030
	300	501	204	1600	93,6	3660

3 самца на дозу для каждого вида;

^a среда для введения дозы: 0,5% КМЦ, 0,5% Tween 80 в воде;

^b порошок в капсулах

Таблица 27. Уровни метаболитов **1-8** и **1-2** в плазме после введения однократной пероральной дозы соединения **1-A**

Вид	Доза* (мг/кг)	Метаболит 1-8		Метаболит 1-2	
		C _{макс} (нг/мл)	AUC _{0-посл} (час * нг/мл)	C _{макс} (нг/мл)	AUC _{0-посл} (час * нг/мл)
Крыса ^a	500	5060	35100	9650	20300
Собака ^b	30	291	905	196	610
	100	12:30	4370	886	2830
	300	5380	35300	2380	8710
Обезьяна ^b	30	209	5690	300	1730 г.
	100	406	12300	1350	8160
	300	518	16800	1420	11400

3 самца на дозу для каждого вида;

^a среда для введения дозы: 0,5% КМЦ, 0,5% Tween 80 в воде;

^b порошок в капсулах

Пример 18. Воздействие на ткани активного трифосфата после введения пероральной дозы соединения 1-A

Уровни активного трифосфата (ТР) соединения **1-A** (метаболита **1-6**) в тканях сердца и печени измеряли через 4 часа после перорального введения соединения **1-A**. Образцы печени и сердца получали через 4 часа после введения однократной дозы соединения **1-A**, быстро замораживали, гомогенизировали и анализировали методом ЖХ-МС/МС для определения внутриклеточных уровней активного ТР. Уровни в тканях измеряли у крыс, собак и обезьян, как показано на Фиг. 16А. Высокие уровни активного ТР были обнаружены в печени всех протестированных видов. Относительно низкие уровни активного ТР были обнаружены в сердцах собак из-за насыщения печеночного метаболизма первого прохождения, а в сердцах крыс и обезьян были обнаружены не поддающиеся количественному измерению уровни ТР, что указывает на специфическое для печени образование активного ТР. Хотя это и не показано, но по сравнению с введением доз соединения **1**, введение соединения **1-A** показало лучшее распределение ТР.

Пример 19. Фармакологическое сравнение соединения 1 и соединения 1-A у собак

Прямое сравнение собак, которым вводили соединение **1** и соединение **1-А**. В исследовании измеряли уровни соединения **1** и метаболита **1-7** (из Схемы 1) в плазме в течение 4 часов после введения доз соединения **1** (25 мг/кг) и соединения **1-А** (30 мг/кг) (Таблица 28) Установили, что $AUC_{(0-4 \text{ часа})}$ метаболита **1-7** была в два раза выше для соединения **1-А** по сравнению с соединением **1**. Нормированные по дозе показатели действия соединения **1** и метаболита **1-7** показаны в Таблице 28. Значения $AUC_{(0-4 \text{ часа})}$ для соединения **1**, метаболита **1-7** и суммы соединения **1** + метаболита **1-7** были выше после дозирования соединения **1-А**.

Таблица 28. Сравнение уровней в плазме после введения дозы соединения **1** и соединения **1-А**

Соединение (доза)	Среднее значение $AUC_{(0-4 \text{ часа})}$, нормализованное по дозе ^a (мкМ * ч) для:		
	Соединение 1	Метаболит 1-7	Соединение 1 + Метаболит 1-7
Соединение 1 (25 мг/кг)	0,2	1,9	2.1
Соединение 1-А (30 мг/кг)	1.0	4.1	5.1

$AUC_{(0-4 \text{ часа})}$, нормализовано до дозы 25 мг/кг.

Соотношения концентраций трифосфата в печени и в сердце указывают на то, что введение дозы соединения **1-А** по сравнению с соединением **1** увеличивает селективную доставку трифосфата в печень, как показано в Таблице 29. Величина $AUC_{(0-4 \text{ часа})}$ активного метаболита гуанина (**1-6**) после введения соединения **1**, измеренная в сердце, составила 174 мкМ * ч, тогда как $AUC_{(0-4 \text{ часа})}$ активного метаболита гуанина (**1-6**) после введения соединения **1-А**, измеренная в сердце, составила 28 мкМ*ч. Соотношение печень/сердце для соединения **1-А** составило 20 по сравнению с соотношением печень/сердце 3,1 полученного для соединения **1**.

Таблица 29. Сравнение воздействия на печень и сердце после введения дозы соединения **1** и соединения **1-А**

Соединение	Среднее значение $AUC_{(0-4 \text{ часа})}$, нормализованное по дозе ^a (мкМ * ч) для:		
	Печень	Сердце	Печень/Сердце

Соединение 1-А	565	28 ^b	20
Соединение 1	537	174	3,1

^a Концентрации активного ТР (1-6; Схема 1), нормированные до дозы 25 мг/кг.

^b Экстраполировано ниже нижнего предела количественного определения калибровочной кривой.

Эффект повышенной селективности в отношении печени по сравнению с сердцем при введении соединения 1-А по сравнению с соединением 1 также показан на Фиг. 1В. Уровни активного трифосфата в тканях сердца и печени после введения дозы соединения 1-А (30 мг/кг) сравнивали с уровнями активного трифосфата в тканях после введения дозы соединения 1 (25 мг/кг). Концентрация активного ТР в печени была выше, чем в сердце, как для соединения 1, так и для соединения 1-А, но активный ТР был более селективным для печени по сравнению с сердцем при введении дозы соединения 1-А по сравнению с соединением 1.

Пример 20. Профили метаболитов соединения 1-А в плазме у крыс и обезьян

Самцам крыс Sprague-Dawley и яванским макакам (3 животных на группу получавших дозы) однократно вводили пероральные дозы соединения 1-А. Аликвоты плазмы, приготовленные из образцов крови, обработанных дихлофосом, анализировали методом ЖХ-МС/МС для определения концентраций соединения 1 и метаболита 1-7 (нуклеозидного метаболита активного трифосфата соединения 1-А, показанного на схеме 1) и фармакокинетических (ПК) параметров, которые получали с использованием программного обеспечения WinNonlin. Результаты, полученные для однократной дозы 500 мг/кг у крыс показаны на Фиг. 17, а результаты, полученные для однократных доз 30, 100 или 300 мг/кг у обезьян показаны на Фиг. 18. Результаты также обобщены в Таблице 30.

Высокие уровни метаболита 1-7, нуклеозидного метаболита активного трифосфата (ТР) соединения 1-А, в плазме указывают на образование высоких уровней ТР даже у крыс, у которых наблюдали очень низкие уровни исходного нуклеотидного пролекарства в плазме из-за короткого периода полужизни в крови соединения 1 крыс (<2 мин). Постоянные уровни метаболита 1-7 в плазме отражают длительный период полужизни ТР.

Величина AUC для соединения 1 в плазме у обезьян была приблизительно пропорциональна вводимой дозе, в то время как величина AUC для метаболита 1-7 была несколько меньше, чем пропорциональная доза, хотя величины AUC как для исходного

препарата, так и для нуклеозидного метаболита активного ТР продолжали увеличиваться вплоть до самой высокой испытанной дозы (300 мг/кг).

Пероральное введение соединения **1-А** крысам и обезьянам приводило к высокому и дозозависимому действию в плазме метаболита **1-7** (нуклеозидного метаболита внутриклеточного активного трифосфата соединения **1-А**); Действие метаболитов **1-7** продолжало увеличиваться вплоть до самой высокой испытанной дозы, что отражает значительное образование активного ТР у этих видов.

Таблица 30. Уровни Соединений **1** и **1-7** в плазме после однократной пероральной дозы соединения **1-А**

	Вид	Крыса ^a	Обезьяна ^b		
		500	30	100	300
Соединение 1	Доза (мг/кг)				
	С_{макс} (нг/мл)	60,8	63,5	783	501
	Т_{макс} (час)	0,25	0,5-2	1-2	204
	AUC 0-посл. (час * нг/мл)	78,2	176	1100	1600
Метаболит 1-7	С_{макс} (нг/мл)	541	42,5	131	93,6
	AUC 0-посл. (час * нг/мл)	9640	1620 г.	3030	3660
	Т_{макс} (час)	6-8	12-24	4	4-24
	Т_{1/2} (час)	15.3	11,5	15,0	18,8

^a среда для введения дозы: 0,5% КМЦ, 0,5% Tween 80 в воде;

^b порошок в капсулах

Пример 21. Действие активного трифосфата соединения **1 и соединения **1-А** в отношении целостности митохондрий**

Относительную эффективность включения активного трифосфата (ТР) соединения **1** и соединения **1-А**, метаболита **1-6** (Схема 1), за счет митохондриальной РНК-полимеразы человека, сравнивали с относительной эффективностью активного ТР софосбувира и активного ТР INX-189. Соединение **1** и соединение **1-А** вряд ли повлияют на целостность митохондрий, поскольку их активный трифосфат плохо инкорпорируется митохондриальной РНК-полимеразой человека с эффективностью, аналогичной эффективности трифосфата софосбувира; относительная эффективность включения трифосфата INX-189 была до 55 раз выше. Результаты показаны в Таблице 31. Включение этих аналогов за счет митохондриальной РНК-зависимой полимеразы человека (POLRMT)

определяли согласно Arnold et al. (Sensitivity of Mitochondrial Transcription and Resistance of RNA Polymerase II Dependent Nuclear Transcription to Antiviral Ribonucleotides. PLoS Pathog., 2012, 8, e1003030).

Таблица 31. Кинетические параметры нуклеотидных аналогов, оцененные с помощью митохондриальной РНК-полимеразы человека

Нуклеотидный аналог	K_{pol} (с ⁻¹)	$K_{d,app}$ (мкМ)	$K_{pol}/K_{d,app}$ (мкМ ⁻¹ с ⁻¹)	Относительная эффективность *
2'-дезоксид-2'-F-2'-С-метил UTP (активный TP софосбувира)	0,00034 ± 0,00005	590 ± 250	5,8 × 10 ⁻⁷ ± 2,6 × 10 ⁻⁷	1,0 × 10 ⁻⁶
2'-С-метил GTP (активный TP NX-189)	0,051 ± 0,002	240 ± 26	2,1 × 10 ⁻⁴ ± 0,2 × 10 ⁻⁴	5,5 × 10 ⁻⁵
Активный TP соединения 1 и соединения 1-А (метаболит 1-б)	0,0017 ± 0,0002	204 ± 94	8,3 × 10 ⁻⁶ ± 4,0 × 10 ⁻⁶	2,2 × 10 ⁻⁶

*Относительная эффективность = $(K_{pol}/K_{d,app})$ нуклеотидного аналога / $(K_{pol}/K_{d,app})$ природного нуклеотида

Пример 22. Активность соединения 1 в отношении репликонов, содержащих последовательность NS5В

Для определения и сравнения активности соединения 1 и софосбувира использовали образцы плазмы пациентов с HCV (GT1a, 1b, 2a, 2b, 3a-1, 3a-2, 4a и 4d) (Фиг. 20).

Против клинических и лабораторных штаммов HVC соединение 1 оказалось более эффективным, чем софосбувир. Соединение 1 показало очень высокую пангенотипную противовирусную активность *in vitro* против клинических изолятов дикого типа с EC₉₅ <80 нМ, что свидетельствует о том, что это соединение в 4-14 раз более эффективно, чем софосбувир. Как показано на Фиг. 20, значения EC₉₅ для соединения 1 были в 7-33 раза ниже, чем у софосбувира, при сравнении с клиническими изолятами всех

протестированных генотипов HCV. В отношении лабораторных штаммов генотипов 1-5 HCV значения EC₅₀ для соединения 1 были в 6-11 раз ниже, чем у софосбувира (Фиг. 19).

Пример 23. Исследование по введению однократной возрастающей дозы (SAD) соединения 1-А на здоровых добровольцах (Часть А) и пациентах, инфицированных HCV-GT1 (Часть В)

Соединение 1-А испытывали в рамках исследования по введению однократной возрастающей дозы (SAD) для оценки его безопасности, переносимости и фармакокинетики у здоровых субъектов (Часть А). Часть А в исследовании представляла собой рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование SAD. Здоровые субъекты в Части А исследования получали натошак однократную дозу соединения 1-А или плацебо. Субъекты находились в клинике с дня -1 по день 6.

Введение доз в каждой группе было распределено таким образом, что 2 субъекта (1 активное вещество: 1 плацебо) контролировались в течение 48 часов после введения дозы, прежде чем было осуществлено введение доз остальным членам группы. Каждая группа получала соединение 1-А в порядке возрастания. Последовательное введение доз в группах осуществляли на основе анализа данных по безопасности (в течение 5-го дня) и фармакокинетических данных анализа плазмы (в течение 24 часов), полученных от предыдущей группы.

Повышение дозы продолжалось после получения удовлетворительных результатов анализа всех полученных данных. Поскольку в предыдущих группах были получены результаты и данные о фармакокинетики и безопасности, дозы, то в группах 3а-4а, были скорректированы вводимые дозировки с шагом не более 100 мг. Общая максимальная доза, оцененная в Части А, не превышала 800 мг. Режим дозирования в Части А исследования показан в Таблице 32.

Таблица 32. Режим дозирования для введения соединения 1-А, Часть А исследования

Группа	Состав	N (активный агент:плацебо)	Соединение 1-А (соединение 1)*
1a	Здоровые субъекты	6:2	50 (45) мг x 1 день
2a	Здоровые субъекты	6:2	100 (90) мг x 1 день

3a	Здоровые субъекты	6:2	200 (180) мг x 1 день
4a	Здоровые субъекты	6:2	400 (360) мг x 1 день

* Клинические дозы выражены в пересчете на соединение **1-А**, с приблизительным эквивалентным количеством соединения **1**, которое приведено в скобках.

Здоровыми добровольцами в Части А исследования были субъекты мужского и женского пола в возрасте от 18 до 65 лет. Активные участники и участники, получавшие плацебо, были объединены в каждой группе Части А, чтобы исследование оставалось слепым.

Соединение **1-А** также тестировали в исследовании по введению однократной возрастающей дозы (SAD) для оценки его безопасности, переносимости, фармакокинетической и противовирусной активности у пациентов, инфицированных HCV-GT1 (Часть В). Пациенты в Части В исследования получали натошак однократную дозу соединения **1-А**. Пациенты находились в клинике с 1-го дня по 6-й день исследования.

Часть В исследования начинали после анализа данных по безопасности (до дня 5) и фармакокинетики в плазме (в течение 24 часов) в группе 3a в Части А. Полученные данные по безопасности (до дня 5) и фармакокинетические данные (в течение 24 часов) были приняты во внимание для первой группы пациентов в Части В (группа 1b) перед регистрацией последующих групп, принимавших участие в Части В исследования. Последующие группы пациентов в Части В получали дозы только после анализа полученных данных по безопасности и фармакокинетики для соответствующих доз, использованных в Части А исследования, а также полученных данных по безопасности (до дня 5) для предыдущих групп из Части В исследования.

Повышение дозы до 600 мг у пациентов, инфицированных HCV, продолжали после удовлетворительного анализа полученных предыдущих данных. Режим дозирования, используемый в Части В исследования показан в Таблице 33.

Таблица 33. Режим дозирования соединения **1-А** в Части В исследования

Группа	Состав	N (активный агент)	Соединение 1-А (соединение 1)*
1b	HCV GT1-- инфицированные	3	100 (90) мг x 1 день

2b	HCV GT1-- инфицированные	3	300 (270) мг x 1 день
3b	HCV GT1-- инфицированные	3	400 (360) мг x 1 день
4b	HCV GT1-- инфицированные	3	600 (540) мг x 1 день

* Клинические дозы выражены в пересчете на соединение **1-А**, с приблизительным эквивалентным количеством соединения **1**, которое приведено в скобках.

Пациенты, инфицированные HCV, представляли собой не получавших лечения пациентов, инфицированных GT1, без цирроза, с вирусной нагрузкой $\geq 5 \log_{10}$ ME/мл.

Не было зарегистрировано серьезных нежелательных явлений и побочных эффектов, и преждевременного прекращения лечения ни в Части А, ни в Части В исследования не потребовалось. Все нежелательные явления и эффекты были от легкой до умеренной интенсивности, и не было очевидных дозозависимых закономерностей, включая лабораторные показатели, показатели жизнедеятельности и ЭКГ.

Пример 24. Результаты исследования по введению однократной возрастающей дозы (SAD) соединения 1-А

После однократного введения соединения **1-А** регистрировали и оценивали фармакокинетику (PK) соединения **1** и нуклеозидного метаболита **1-7**. Минимальные концентрации C_{24} в плазме (C_{24} часа) метаболита **1-7** у HCV-инфицированных пациентов после введения дозы 600 мг соединения **1-А** составили 25,8 нг/мл, что более чем вдвое превышает концентрации в плазме после введения дозы 300 мг соединения **1-А**. Метаболит **1-7** (показан на схеме 1) может быть получен только посредством дефосфорилирования внутриклеточного фосфатного метаболита **1-4**, метаболита **1-5** и метаболита **1-6**, которые являются активными соединениями. Следовательно, метаболит **1-7** можно считать аналогом активного соединения. Фармакокинетические данные, полученные для всех групп, приведены в Таблице 34 и Таблице 35. Значения представлены как среднее \pm SD, за исключением T_{\max} , где указаны медиана и диапазон. Фармакокинетические параметры были сопоставимы у здоровых и HCV-инфицированных пациентов.

Таблица 34. Фармакокинетика соединения **1** и метаболита **1-7** у человека после введения однократной дозы соединения **1-А** здоровым добровольцам

	Доза (мг)	C _{макс} (нг/мл)	T _{макс} (час)	AUC _{общая} (нг*ч/мл)	T _½ (час)	C _{24 часа} (нг/мл)
Часть А. Здоровые субъекты						
Соединение 1	50	46,4 ± 17,6	0,5 (0,5-0,5)	36,4 ± 12,3	0,32 ± 0,02	--
	100	156 ± 96,3	0,5 (0,5-1,0)	167 ± 110	0,53 ± 0,24	--
	200	818 ± 443	0,5 (0,5-3,0)	656 ± 255	0,71 ± 0,16	--
	400	1194 ± 401	0,5 (0,5-1,0)	1108 ± 326	0,86 ± 0,15	--
Метаболит 1-7	50	27,9 ± 5,62	3,5 (3,0-4,0)	285 ± 69,4	7,07 ± 4,59	2,28 ± 0,95
	100	56,6 ± 14,0	4,0 (3,0-6,0)	663 ± 242	17,7 ± 14,7	4,45 ± 1,87
	200	111 ± 38,8	5,0 (3,0-6,0)	1524 ± 497	15,9 ± 7,95	13,7 ± 5,09
	400	153 ± 49,4	6,0 (4,0-8,0)	2342 ± 598	15,6 ± 6,37	23,5 ± 6,31

*На основе 24-часового профиля.

Таблица 35. Фармакокинетика соединения 1 и метаболита 1-7 у человека после введения соединения 1-А пациентам, инфицированным HCV-GT1

	Доза (мг)	C _{макс} (нг/мл)	T _{макс} (час)	AUC _{общая} (нг*ч/мл)	T _{1/2} (час)	C _{24 часа} (нг/мл)
Соединение 1	100	212 ± 32,0	0,5 (0,5-1,0)	179 ± 54,4	0,54 ± 0,12	--
	300	871 ± 590	0,5 (0,5-1,0)	818 ± 475	0,64 ± 0,20	--
	300	2277 ± 893	0,5 (0,5-1,0)	1856 ± 1025	0,84 ± 0,18	--
	400	2675 ± 2114	1,0 (1,0-2,0)	2408 ± 1013	0,86 ± 0,18	--
	600	3543 ± 1649	1,0 (0,5-1,0)	4132 ± 1127	0,70 ± 0,13	--
	Метаболит 1-7	100	50,2 ± 15,4	6,0 (4,0-6,0)	538 ± 103*	8,4 ± 4,3*
300		96,9 ± 38,9	6,0 (3,0-6,0)	1131 ± 273*	8,1 ± 2,4*	10,9 ± 3,51
300		123 ± 16,6	4,0 (3,0-6,0)	1420 ± 221	--	18,0 ± 8,83
400		160 ± 36,7	4,0 (4,0-4,0)	2132 ± 120	11,6 ± 1,21	22,5 ± 3,29

	600	198 ± 19,3	4,0 (4,0-6,0)	2176 ± 116	--	25,8 ± 4,08
--	-----	------------	---------------	---------------	----	-------------

*На основе 24-часового профиля.

Профили зависимости средней концентрации в плазме от времени для соединения **1** и метаболита **1-7** также рассчитывали для всех групп из Части А и Части В исследования. На Фиг. 21 представлена средняя концентрация соединения **1** в плазме после однократного введения соединения **1-А**, а на Фиг. 22 представлена средняя концентрация метаболита **1-7** в плазме после однократного введения соединения **1-А**. Как показано на Фиг. 21, соединение **1** быстро абсорбировалось и быстро метаболизировалось у субъектов во всех группах из Части В. Как показано на Фиг. 22, метаболит **1-7** оказался основным метаболитом и он показал устойчивые концентрации в плазме. Концентрация соединения **1** в плазме была дозозависимой, тогда как концентрация метаболита **1-7** была пропорциональна дозе.

Для HCV-инфицированных субъектов из Части В измерения количественного содержания РНК HCV проводили до, во время и после введения соединения **1-А**. Определение РНК HVC в плазме проводились с использованием проверенного коммерческого анализа. Исходный уровень определяли как среднее значение для дня -1 и для дня 1 (до введения дозы). Однократная доза 300 мг соединения **1-А** (эквивалентно 270 мг соединения **1**) приводила к значительной противовирусной активности у пациентов, инфицированных HCV-GT1b. Среднее максимальное снижение РНК HVC через 24 часа после введения однократной дозы 300 мг составило 1,7 log₁₀ МЕ/мл, что можно сравнить со снижением -2 log₁₀ МЕ/мл после 1 дня монотерапии дозой 400 мг софосбувира у больных, инфицированных HVC-GT1a. Среднее максимальное снижение РНК HVC через 24 часа после введения однократной дозы 100 мг составило 0,8 log₁₀ МЕ/ мл. Среднее максимальное снижение РНК HVC составило 2,2 log₁₀ МЕ/мл после однократного введения дозы 400 мг. Индивидуальные фармакокинетические/фармакодинамические (PK/PD) данные анализов для отдельных пациентов из Части В исследования показаны на Фиг. 23А-23F. Концентрация метаболита **1-7** показана на графике в зависимости от снижения концентрации РНК HCV, и, как показано на Фиг. 23А-23F, снижение уровня РНК HCV в плазме коррелирует с действием метаболитов **1-7** в плазме. Вирусологический ответ поддерживается при концентрациях метаболитов **1-7** в плазме, превышающих значение EC₉₅ против GT1b. Корреляция между концентрацией в плазме и снижением уровня РНК HCV указывает на то, что более высокий ответ будет достижим при использовании более высоких доз соединения **1-А**.

Пример 25. Прогнозируемые минимальные устойчивые уровни метаболита 1-7 превышают значения EC₉₅ соединения 1 против клинических изолятов HCV GT 1-4

Как показано на Фиг. 24, минимальные равновесные уровни метаболита 1-7 в плазме ($C_{24,ss}$) после введения дозы соединения 1-А людям (600 мг один раз в день (эквивалентно 550 мг свободного основания) и 450 мг один раз в день (эквивалентно 400 мг свободного основания)) были предсказаны, и их сравнивали с EC₉₅ для соединения 1 *in vitro* для всех протестированных клинических изолятов, чтобы определить, является ли стабильная концентрация в плазме выше, чем EC₉₅, что должно привести к высокой эффективности против любого или всех протестированных клинических изолятов *in vivo*. Величина EC₉₅ для соединения 1 такая же, как величина EC₉₅ для соединения 1-А. Чтобы соединение 1-А было эффективным, минимальный равновесный уровень метаболита 1-7 в плазме должен превышать величину EC₉₅.

Как показано на Фиг. 24, величина EC₉₅ для соединения 1-А по отношению ко всем протестированным клиническим изолятам находилась в диапазоне приблизительно от 18 до 24 нМ.

Как показано на Фиг. 24, соединение 1-А, вводимое один раз в день в дозе 450 мг (эквивалентно 400 мг свободного основания), у людей обеспечивает минимальную равновесную концентрацию в плазме ($C_{24,ss}$) приблизительно равную 40 нг/мл. Соединение 1-А, вводимое один раз в день в дозе 600 мг (эквивалентно 550 мг свободного основания), у людей обеспечивает минимальную равновесную концентрацию в плазме ($C_{24,ss}$) приблизительно равную 50 нг/мл.

Таким образом, равновесная концентрация суррогатного метаболита 1-7 в плазме почти вдвое превышает величину EC₉₅ в отношении всех протестированных клинических изолятов (включая даже с трудно поддающийся лечению генотип GT3a), что указывает на превосходную эффективность соединения по изобретению.

Напротив, величина EC₉₅ для стандарта медицинской помощи нуклеотида софосбувира варьируется от 50 до 265 нМ в отношении всех протестированных клинических изолятах HCV, при этом при рекомендованной коммерческой дозе 400 мг величина EC₉₅ была меньше прогнозируемой концентрации в равновесном состоянии только для двух изолятов: GT2a и GT2b. Величина EC₉₅ для коммерческой дозы 400 мг софосбувира превышала прогнозируемую равновесную концентрацию для других клинических изолятов: GT1a, GT1b, GT3a, GT4a и GT4d.

Минимальную равновесную концентрацию соединения **1-А** в плазме при дозе 450 мг ($C_{24,ss}$) прогнозировали с использованием величины минимальной равновесной концентрации в плазме ($C_{24,ss}$) при дозе 300 мг. Средняя равновесная концентрация в плазме ($C_{24,ss}$) при дозе 300 мг составляла 26,4 нг/мл, поэтому расчетная величина составила $26,4 \cdot 450 / 300 = 39,6$ нг/мл.

Минимальную концентрацию C_{24} в равновесном состоянии ($C_{24,ss}$) при дозе 600 мг прогнозировали с использованием трех подходов: 1) среднее значение C_{24} при дозе 600 мг в день 1 составляло 25,8 нг/мл, и предполагалось 60%-ное увеличение для достижения равновесного состояния. Поэтому расчетная величина составила: $25,8 \cdot 1,6 = 41,3$ нг/мл; 2) среднее значение C_{24} в день 1 при дозе 400 мг составляло 22,5 нг/мл, и предполагалось увеличение на 60% для достижения устойчивого состояния. С учетом пропорциональности фармакинетики доз расчетная величина составила: $22,5 \cdot 1,6 \cdot 600 / 400 = 54$ нг/мл; и 3) минимальная равновесная концентрация в плазме ($C_{24,ss}$) при дозе 300 мг составляла 26,4 нг/мл, и предполагая пропорциональность фармакинетики доз расчетная величина составила: $26,4 \cdot 2 = 52,8$ нг/мл. Минимальная равновесная концентрация в плазме 600 мг ($C_{24,ss}$) представляет собой среднее значение данных из трех точек ($(41,3 + 54 + 52,8) / 3 = 49,3$ нг/мл). Обычно в равновесном состоянии наблюдается приблизительно 60% увеличение уровня C_{24} по сравнению с величиной C_{24} после однократного введения.

Данные сравнения эффективности и фармакокинетических параметров равновесного состояния представлены на Фиг. 24, где наглядно и ясно показана неожиданная терапевтическая значимость соединения **1-А** для лечения гепатита С. Прогнозируемый равновесный уровень в плазме после введения соединения **1-А** будет по меньшей мере в 2 раза выше, чем величина EC_{95} для всех протестированных генотипов, и соединение по изобретению будет в 3-5 раз более эффективно против генотипа GT2. Эти данные указывают на то, что соединение **1-А** обладает мощной пангенотипной противовирусной активностью у людей. Как показано на Фиг. 24, величина EC_{95} софосбувира в отношении GT1, GT3 и GT4 превышает 100 нг/мл. Таким образом, неожиданно оказалось, что соединение **1-А** активно против HVC, и дозированная лекарственная форма, содержащая это соединение, обеспечивает более низкую минимальную равновесную концентрацию (40-50 нг/мл), чем минимальная равновесная концентрация (приблизительно равная 100 нг/мл), достигаемая аналогичной дозированной лекарственной формой софосбувир.

Пример 26. Исследование, состоящее из трех частей, для оценки безопасности/переносимости, фармакокинетики (ФК) и противовирусной активности соединения 1-А

Было проведено исследование соединения **1-А**, состоящее из трех частей, для оценки безопасности/переносимости, фармакокинетики (ФК) и противовирусной активности этого соединения. Три части включали: 1) многократное введение доз до 600 мг соединения **1-А** (эквивалентно 550 мг соединения **1**) один раз в день (QD) в течение 7 дней у НС (нецирротических) пациентов, инфицированных HCV GT1 (Часть С); 2) введение 600 мг соединения **1-А** (эквивалентно 550 мг соединения **1**) один раз в день в течение 7 дней НС пациентам, инфицированным HCV GT3 (Часть D); и 3) введение 600 мг соединения **1-А** (эквивалентно 550 мг соединения **1**) один раз в день в течение 7 дней группе пациентов с циррозом печени А по классификации Чайлд-Пью (CPA) с HCV-инфекцией GT1, GT2 или GT3 (Часть E). Дозы вводили в виде соли соединения **1-А**. Эквивалент свободного основания соединения **1** обычно указан в скобках.

Часть С исследование представляло собой рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование MAD, разделенное на три группы. Субъектам вводили натошак 150 мг, 300 мг или 600 мг соединения **1-А** или плацебо в течение 7 дней. Повышение дозы продолжалось только после удовлетворительного результата анализа предыдущих данных. Часть D и Часть E представляли собой открытые исследования, где пациенты получали натошак дозу 600 мг соединения **1-А** (эквивалентно 550 мг соединения **1**) в течение 7 дней.

Пациенты, инфицированные HVC, ранее не получавшие лечения, имели концентрацию РНК HVC $\geq 5 \log_{10}$ МЕ/ мл. РНК HVC определяли количественно с помощью набора COBAS® AmpliPrep TaqMAN® v2.0 с LLQ 15 МЕ/ мл. Уровни лекарственного средства в плазме измеряли с помощью LC-MS/MS. Исходный уровень РНК HCV в среднем составлял $>6 \log$ во всех группах пациентов, которым вводили 500 мг соединения **1-А**. Цирроз подтверждали предварительной биопсией печени или показателем $>12,5$ кПа при фибросканировании с использованием Fibrosan. Среднее исходное давление, зарегистрированное с помощью Fibrosan, составляло 6,3, 6,8 и 17,6 кПа у пациентов, которым вводили 600 мг эквивалента соединения **1-А** в исследованиях Части С, Части D и Части E, соответственно. Средний возраст субъектов, включенных в исследование, составлял 44, 39 и 56 лет, соответственно в группе нецирротических пациентов с GT1b, получавших дозу 600 мг, в группе нецирротических пациентов с GT3 и в группе цирротических пациентов.

Исследования Части А и Части В были проведены ранее и они описаны в WO 2018/144640. Часть А и Часть В исследования представляли собой исследования с однократной возрастающей дозой (SAD). В Части А здоровым субъектам вводили до 400 мг соединения **1-А** (эквивалентно 367 мг соединения **1**), а в Части В NS пациентам, инфицированным HVC GT1, вводили разовые дозы до 600 мг соединения **1-А** (эквивалентно 550 мг соединения **1**).

Пример 27. Результаты исследования соединения 1-А

О серьезных нежелательных явлениях и побочных эффектов (АЕ), дозолимитирующей токсичности или преждевременном прекращении лечения не сообщалось. Соединение **1-А** хорошо переносилось вплоть до самых высоких испытанных доз (600 мг соли) в течение семи дней. Единственной наблюдаемой закономерностью была более высокая частота нарушений липидов, но преимущественно низкой степени (увеличение уровня холестерина и триглицеридов), у субъектов, получавших соединение **1-А**, по сравнению с плацебо. Однако это наблюдение согласуется с ранее опубликованными данными, показывающими быстрое увеличение уровня липидов по мере клиренса вируса гепатита С после начала ДАА терапии у пациентов, инфицированных вирусом гепатита С. Кроме того, не установлено никаких проявлений, указывающих на повреждение печени. Значения АЛТ/АСТ снижались со временем в течение периода лечения у пациентов, получавших соединение **1-А**. Наконец, при анализе случаев АЕ, лабораторных параметров, ЭКГ и других клинически значимых и жизненно важных показателей дозозависимых закономерностей не выявлено.

В Части В однократную дозу соединения **1-А**, эквивалентную 92 мг, 275 мг, 368 мг или 550 мг соединения **1**, вводили разделенным на группы дозирования (n=3 для в каждой группе) для определения среднего максимального снижения РНК HVC. Результаты показаны на Фиг. 25 и в Таблице 36. Однократную дозу 600 мг соединения **1-А** (эквивалентно 550 мг соединения **1**) вводили субъектам, инфицированным HCV GT1b, не имеющим цирроза, (n=3), и среднее максимальное снижение РНК HVC составило 2,3 log₁₀ МЕ/мл, при этом индивидуальное максимальное снижение РНК HVC составило 2,1, 2,3 и 2,6 log₁₀ МЕ/мл в этой группе.

Таблица 36. Изменение РНК HVC по сравнению с исходным уровнем у пациентов с HVC GT1b после однократной дозы соединения **1-А**

Доза соединения 1-А (эквивалент соединения 1), вводимая в группе	Среднее (индивидуальное) максимальное снижение
---	--

	(log ₁₀ МЕ/мл)
92 мг	0,8 (0,6, 0,8, 0,9)
275 мг	1,7 (1,1, 1,8, 2,2)
368 мг	2,2 (1,8, 2,2, 2,6)
550 мг	2,3 (2,1, 2,3, 2,6)

В Части С исследования дозозависимую противовирусную активность наблюдали через 7 дней после введения дозы со средним максимальным снижением РНК HVC до 4,4 log₁₀ МЕ/мл у нецирротических пациентов, инфицированных HVC GT1b (n=6). У 50% испытуемых уровень РНК HVC был ниже LOQ. На Фиг. 26 представлен график среднего изменения РНК HVC по сравнению с исходным уровнем у субъектов, получавших плацебо, 150 мг, 300 мг или 600 мг соединения **2** один раз в день (QD). Среднее максимальное снижение наблюдали после 7 дней введения дозы в трех группах, получавших 150 мг, 300 мг или 600 мг соединения **1-А** один раз в день (QD).

В Части D исследования наблюдали высокую противовирусную активность у пациентов, инфицированных HCV GT3 без цирроза печени (n=6), со средним максимальным снижением РНК HCV 4,5 log₁₀ МЕ/мл. Среднее снижение РНК HVC составило 2,4 log₁₀ МЕ/мл после введения первой дозы 600 мг соединения **1-А** (эквивалентно 550 мг соединения **1**), и у одного пациента уровни РНК HVC достигли величины <LOQ через четыре дня после первой дозы.

Противовирусная активность у пациентов с циррозом СРА, инфицированных HVC, из Части E исследования была аналогична таковой, которую наблюдали у группы пациентов, инфицированных HCV GT1b и GT3, без цирроза печени. В Части E исследования среднее максимальное снижение РНК HVC у пациентов, инфицированных HVC с циррозом печени, составило 4,6 log₁₀ МЕ/мл. Средние изменения РНК HVC по сравнению с исходным уровнем в этих группах представлены на Фиг. 27. Для сравнения кривые для групп, получавших возрастающие дозы (Часть С, пациенты, инфицированные HCV GT1b без цирроза) показаны на Фиг. 26, а кривые для всех групп в дозе 600 мг. Когорты QD (части С/D/E) представлены на Фиг. 27. Противовирусная активность метаболитов **1-7**, наблюдаемая в каждой группе, обобщена в Таблице 39А, Таблице 39В и Таблице 39С.

Среднее максимальное изменение РНК HCV у пациентов в Части С, Части D и Части E исследования показано в Таблице 37. На Фиг. 28А-28С представлены графики, сравнивающие среднее максимальное снижение количества пациентов без цирроза печени с инфекцией HCV GT1 из Части С исследования, пациентов без цирроза печени с

инфекцией GT3 HCV из Части D исследования, и пациентов с циррозом печени с инфекцией HCV GT1/GT2/GT3 HCV из Части E исследования. Среднее максимальное снижение через 7 дней после введения дозы было одинаковым для пациентов, независимо от того, был ли пациент инфицирован HCV GT1 или HCV GT3, и независимо от того, был ли у пациента цирроз или нет. Сводная информация о противовирусной активности для этих групп пациентов представлена в Таблице 37 и Таблице 38. Наблюдали высокий ранний вирусологический ответ у пациентов с циррозом печени, который приводил к снижению уровня РНК HVC на 2,4 и 2,2 \log_{10} для пациентов с HVC GT1 и GT3, соответственно, в течение первых 24 часов. У пяти пациентов, получавших дозу 600 мг метаболита 1-7 один раз в день (3 субъекта в Части C исследования (50%), у одного субъекта в Части D исследования и у одного субъекта в Части E исследования (17%)), уровни РНК HVC достигли величины ниже нижнего предела количественного определения (LOQ).

Таблица 37. Максимальное изменение РНК HVC в Части B, Части C, Части D и Части E исследования

Конечная точка, \log_{10} МЕ/мл	Часть C				Часть D	Часть E
	Плацебо N = 6	150 мг/день соед. 2 N = 6	300 мг/день соед. 2 N = 6	600 мг/день соед. 2 N = 6	600 мг/день соед. 2 N = 6	600 мг/день соед. 2 N = 6
Среднее \pm SD: изменение РНК HVC от исходного уровня до 24 часов	0,0 \pm 0,2	1,2 \pm 0,3	1,9 \pm 0,2	2,1 \pm 0,2	2,3 \pm 0,3	2,4 \pm 0,2
Среднее \pm SD: максимальное изменение РНК HVC по сравнению с исходным уровнем	0,4 \pm 0,1 (0,2-0,5)*	2,6 \pm 1,1 (1,5-3,7)*	4,0 \pm 0,4 (3,5-4,4)*	4,4 \pm 0,7 (3,7-5,1)*	4,5 \pm 0,3 (4,1-5,0)*	4,6 \pm 0,5
Максимальное изменение	0,3, 0,3, 0,4, 0,4,	1,7, 1,8, 1,8, 2,7,	3,4, 3,7, 3,9, 4,2,	3,5, 4,0, 4,1, 4,3,	4,2, 4,4, 4,4, 4,5,	GT1b: 4,0, 4,0,

индивидуально й РНК НВС по сравнению с исходным уровнем	0,5, 0,6	3,0, 4,5	4,2, 4,5	5,2, 5,3	4,5, 5,0	4,5 GT2: 4,8 GT3: 5,0, 5,2
---	----------	----------	----------	----------	----------	-------------------------------------

*95% доверительный интервал

Таблица 38. Сводная информация о противовирусной активности соединения 1-А в Части С, Части D и Части E исследования для дозы 600 мг соединения 1-А

Группа, получавшая дозу соединения	Среднее снижение через 24 часа (log ₁₀ МЕ/мл)	Среднее максимальное снижение у отдельных пациентов (log ₁₀ МЕ/мл)	РНК НВС <LOQ (15 МЕ/мл)
GT1, без цирроза (n=6)	2,1	4,4 (3,5, 4,0, 4,1, 4,3, 5,2, 5,3)	3/6
GT3, без цирроза (n=6)	2,4	4,5 (4,2, 4,4, 4,5, 4,5, 5,0)	1/6
GT1, цирроз А по Чайлд-Пью (n=3)	2,4	4,2 (4,0, 4,1, 4,5)	1/3
GT3, цирроз А по Чайлд-Пью (n=1)	2,2	4,8 (n=1)	0/1

Соединение 1, свободное основание соединения 1-А, быстро и хорошо абсорбировалось, при этом предполагаемая абсорбированная фракция составляла приблизительно 50%, исходя из выделения с мочой. После повторного введения QD натошак в течение семи дней соединение 1 быстро всасывалось с последующей быстрой метаболической активацией.

В Части С исследования после ежедневного введения в течение 7 дней соединение 1 показало короткий период полужизни, и оно не накапливалось с течением времени. Содержание соединения 1 в плазме была немного больше, чем ожидалось из пропорциональности для доз от 150 мг до 300 мг, но после она была в основном пропорциональна дозе. В то время как пик в плазме и общее действие метаболита 1-7 были пропорциональны для доз от 150 до 300 мг и менее пропорциональны для доз от 300

мг до 600 мг, минимальные уровни метаболита **1-7** в основном были пропорциональны дозе в изучаемом диапазоне доз. На основе уровней метаболита **1-7**, минимальное равновесное состояние ФК по существу достигалось после третьей или четвертой дозы. Образование метаболита **1-7** достигало пика приблизительно через 6 часов после введения дозы, и метаболит **1-7** показал длительный период полужизни (~ 13-30 часов), что позволяет принимать дозу один раз в день (QD). Длительный период полужизни приводит к образованию желаемого высшего метаболита **1-7** (50-60%) при достижении минимального равновесного состояния. (Активный трифосфат **1-6** не поддается измерению в плазме, поскольку он не покидает клетку, и поэтому метаболит **1-7**, который находится в плазме и поддается измерению, действует как заменитель трифосфата **1-6** и отражает внутриклеточный активный трифосфат).

Концентрации метаболита **1-7** в равновесном состоянии достигались к 3-му или 4-му дню у пациентов без цирроза, и к 5-му дню у субъектов с циррозом печени. В целом, легкая печеночная недостаточность не оказывала существенного влияния на ФК соединения **1-А**, исходя из его действия в плазме. Никакого влияния приема пищи на общее и минимальное действие метаболита **1-7** не наблюдали.

На Фиг. 29 представлен график зависимости средней концентрации метаболита **1-7** в плазме от времени в равновесном состоянии при сравнении пациентов без цирроза печени с инфекцией HCV GT1, получавшими соединение **1-А**, эквивалентное 138 мг/день QD соединения **1**, пациентов с циррозом печени и инфекцией GT1 HCV, получавшими соединение **1-А**, эквивалентное 275 мг/день соединения **1** в день, пациентов без цирроза печени с инфекцией GT3 HCV, получавшими 600 мг соединения **1-А** (эквивалентно 550 мг соединения **1**) и пациентов с циррозом печени и инфекцией HCV GT1 или GT3, которые получали 600 мг соединения **1-А** (эквивалентно 550 мг соединения **1**). Уровни метаболита **1-7** в плазме измеряли с помощью LC-MS/MS.

В Таблицах 39А, 39В и 39С представлены показатели ФК у пациентов, включенных в исследование. Как показано в Таблицах 39А-39С и на Фиг. 29, ФК метаболита **1-7** одинакова у пациентов с циррозом и без цирроза печени.

Таблица 39А. Значения величин $C_{\text{макс}}$ и $T_{\text{макс}}$ для соединения **1** и метаболита **1-7** в день 1 и в равновесном состоянии (SS)

Аналит	Часть	Доза (n) (мг/день)	$C_{\text{макс}}$ (нг/мл)		$T_{\text{макс}}$ (час)	
			1 день	SS	1 день	SS
Соед. 1	С	150 (6)	573 ± 280	462 ± 409	0,5 (0,5-1,0)	1,0 (0,5-1,0)
		300 (6)	2277 ± 893	1834 ± 1313	0,5 (0,5-0,9)	0,5 (0,4-1,0)

		600 (6)	4211 ± 2302	3604 ± 1742	0,5 (0,5-0,5)	0,5 (0,5-1,0)
	D	600 (6)	3971 ± 1943	4144 ± 2280	0,5 (0,5-0,5)	0,5 (0,5-1,0)
	E	600 (6)	3412 ± 2175	3192 ± 2085	0,5 (0,5-1,0)	0,5 (0,5-1,0)
Мета-болит 1-7	C	150 (6)	75,6 ± 15,4	81,1 ± 33,9	4,0 (4,0-6,0)	4,0 (4,0-8,0)
		300 (6)	123 ± 16,6	220 ± 203	4,0 (2,9-6,0)	4,0 (2,0-5,9)
		600 (6)	197 ± 57,1	233 ± 42,9	5,0 (4,0-6,0)	4,0 (4,0-6,0)
	D	600 (6)	195 ± 42,9	263 ± 104	5,0 (3,0-6,0)	4,0 (4,0-6,0)
	E	600 (6)	201 ± 68,1	255 ± 95,4	5,0 (3,0-6,0)	6,0 (4,0-6,0)

Таблица 39В. AUC и T_{1/2} для соединения **1** и метаболита **1-7** в день 1 и в равновесном состоянии (SS)

Аналит	Часть	Доза (n)	AUC [#] (нг/мл * час)		T _{1/2} (час)	
			1 день	SS	1 день	SS
		(мг/день)				
Соед. 1	C	150 (6)	492 ± 141	475 ± 301	0,62 ± 0,11	0,64 ± 0,20
		300 (6)	1947 ± 1120 г.	1510 ± 976	0,80 ± 0,18	0,73 ± 0,15
		600 (6)	3335 ± 1502	4036 ± 2093	0,86 ± 0,11	0,85 ± 0,12
	D	600 (6)	3333 ± 1241	3754 ± 2275	0,73 ± 0,12	0,83 ± 0,06
	E	600 (6)	3323 ± 1467	3527 ± 1605	0,86 ± 0,18	0,81 ± 0,12
Мета-болит 1-7	C	150 (6)	800 ± 213	962 ± 409		12,5 ± 6,33
		300 (6)	1414 ± 220	1828 ± 453		24,5 ± 15,3
		600 (6)	2204 ± 486	2839 ± 572		28,9 ± 14,4
	D	600 (6)	2253 ± 595	3117 ± 1048		27,9 ± 18,3
	E	600 (6)	2625 ± 873	3569 ± 1214		24,4 ± 9,81

[#] AUC_∞ для соединения 1 и AUC_t для метаболита 1-7

Таблица 39С. C_{24 часа} для соединения **1** и метаболита **1-7** в день 1 и в равновесном состоянии (SS)

Аналит	Часть	Доза (n)	C _{24 ч} [*] (нг/мл)	
			1 день	SS [*]
		(мг/день)		
Соединение 1	C	150 (6)		
		300 (6)		
		600 (6)		
	D	600 (6)		
	E	600 (6)		
Метаболит 1-7	C	150 (6)	8,08 ± 3,48	12,8 ± 4,45

		300 (6)	18,0 ± 8,83	26,1 ± 7,56
		600 (6)	27,5 ± 5,21	46,9 ± 15,5
	D	600 (6)	30,1 ± 10,9	37,8 ± 11,4
	E	600 (6)	41,6 ± 12,9	69,9 ± 18,5

* Величина C_{24} указана только для метаболита 1-7; величина C_{24} в равновесном состоянии представляет собой среднее значение C_{24} через 72, 96, 120, 144 и 168 часов.

На Фиг. 30А-30D представлены результаты фармакинетического и фармадинамического анализа у пациентов без цирроза печени с инфекцией HCV GT1 (Фиг. 30А), у пациентов без цирроза с инфекцией HCV GT3 (Фиг. 30В), у пациентов с циррозом печени с инфекцией HCV GT1 (Фиг. 30С) и у пациентов с циррозом печени и инфекцией GT3 HCV (Фиг. 30D). Левая ось Y - средняя концентрация метаболита 1-7, правая ось Y - среднее снижение уровней РНК HVC.

Пунктирная горизонтальная линия (-----) представляет значение EC_{95} для соединения 1, а точки обозначают C_t , минимальный равновесный уровень метаболита 1-7 в плазме после введения 600 мг соединения 1-А (эквивалентно 550 мг соединения 1). Как показано на Фиг. 30А-30D, минимальный уровень метаболита 1-7 в равновесном состоянии в плазме постоянно превышает величину EC_{95} для соединения 1 при ингибировании HCV GT1 и GT3 у субъектов с циррозом печени и без цирроза печени. Минимальный равновесный уровень метаболита 1-7 в плазме у пациентов с циррозом печени составляет 45,7 нг/мл, и EC_{95} для соединения 1 при HVC GT1, GT2 и GT3 составляет соответственно приблизительно 21,7 нг/мл, 11,6 нг/мл и 17,5 нг/мл эквивалентов метаболита 1-7. Фиг. 30А-30D также демонстрируют, что противовирусная активность коррелирует с действием в плазме.

Величина E_{\max} , полученная из графика AUC метаболита 1-7 в зависимости от снижения РНК HVC, использовалась для прогнозирования того, что воздействие метаболита 1-7 в концентрации ≥ 2000 нг/мл * час приведет к максимальному снижению вирусной нагрузки как минимум на 4 log единиц после 7 дней введения QD соединения 1-А (Фиг. 31). Доза 600 мг соединения 1-А (эквивалентно 550 мг соединения 1) последовательно достигает этого порога у пациентов с циррозом и без цирроза печени, подтверждая, что 550 мг соединения 1 (эквивалентно 600 мг соединения 1-А), вводимого один раз в день, приведут к максимальному снижению вирусной нагрузки.

Пример 28. Описание состава и изготовления препаратов соединения 1-А

Типичный неограничивающий состав партии таблеток соединения **1-А** (50 мг и 100 мг) представлена в Таблице 40. Таблетки изготавливали из обычной смеси с использованием процесса прямого прессования, как показано на Фиг. 32.

Таблица 40. Состав таблеток 50 мг и 100 мг соединения **1-А**

Исходные продукты	% (по массе)	г/партия	мг на единицу	
			Таблетка 50 мг	Таблетка 100 мг
Соединение 1-А	50,0	180,0	50,0	100,0
Микрокристаллическая целлюлоза, USP/NF, EP	20,0	72,0	20,0	40,0
Моногидрат лактозы, USP/NF, BP, EP, JP	24,0	86,4	24,0	48,0
Кроскармеллоза натрия, USP/NF, EP	5,0	18,0	5,0	10,0
Стеарат магния, USP/NF, BP, EP JP	1,0	3,6	1,0	2,0
Всего			100,0	200,0

Соединение **1-А** использовали на основе анализа «как есть», корректируя процентное содержание микрокристаллической целлюлозы. Соединение **1-А** и эксципиенты (микрокристаллическая целлюлоза, моногидрат лактозы и кроскармеллоза натрия) просеивали, помещали в V-образный блендер (ПК Blendmaster, чаша емкостью 0,5 л) и смешивали в течение 5 минут при 25 об/мин. Затем просеивали и добавляли стеарат магния, и смесь перемешивали еще 2 минуты. Общую смесь делили для использования ее при изготовлении таблеток по 50 мг и 100 мг. Затем смесь со смазкой прессовали при скорости 10 таблеток в минуту с использованием однопуансонного исследовательского таблеточного пресса (Korsch XP1) и дозатора порошков гравитационного типа. Таблетки по 50 мг изготавливали с использованием стандартных круглых вогнутых матриц и пуансонов диаметром 6 мм и при усилии 3,5 кН. Таблетки по 100 мг изготавливали с использованием стандартных вогнутых матриц и пуансонов диаметром 8 мм и при усилии 3,9-4,2 кН. Характеристики таблеток по 50 мг и 100 мг приведены в Таблице 41.

Таблица 41. Таблетки соединения **1-А** по 50 мг и 100 мг

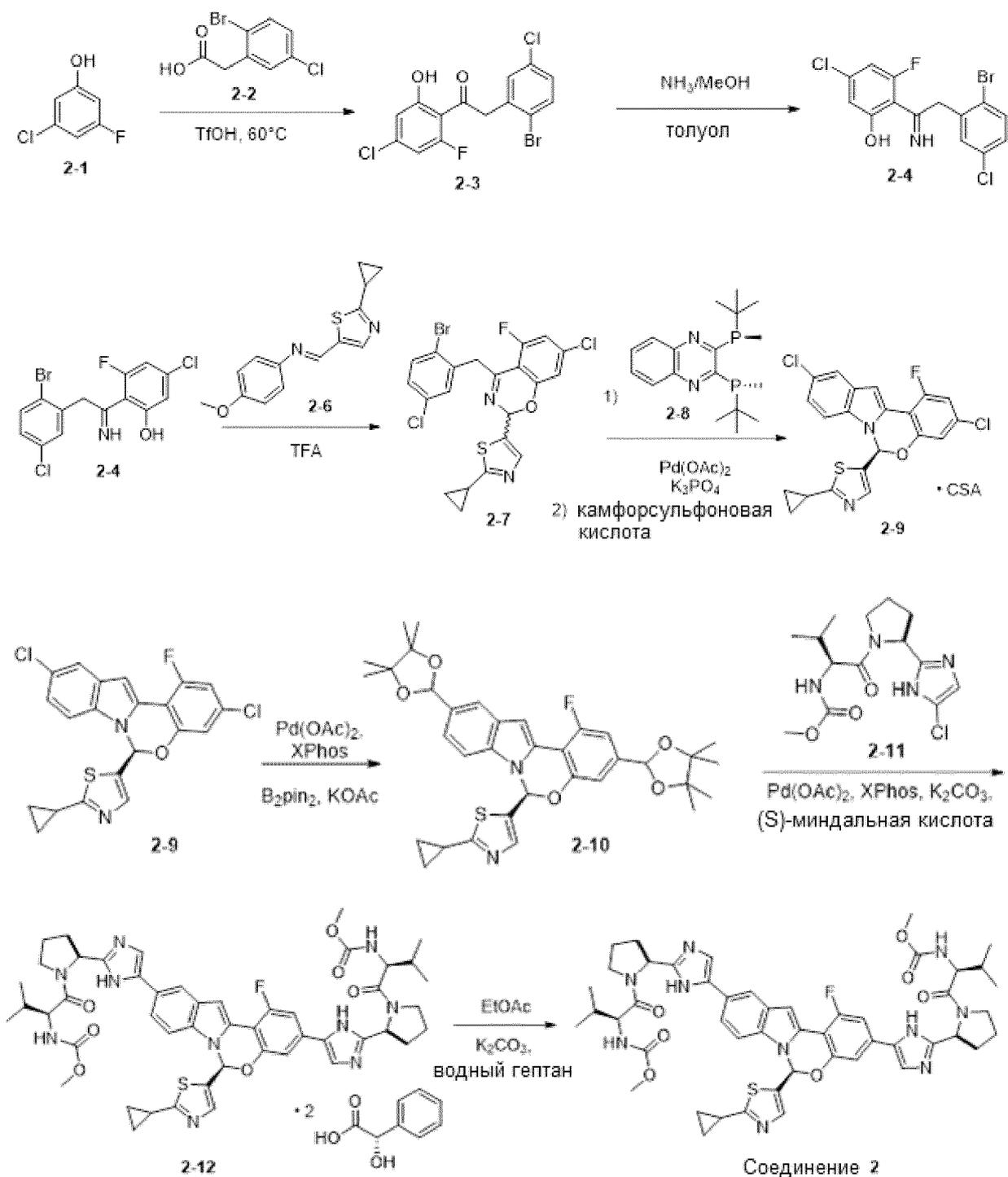
	Таблетки 50 мг	Таблетки 100 мг
Средняя масса (n=10)	100 ± 5 мг	200 ± 10 мг
Индивидуальная масса	100 ± 10 мг	200 ± 20 мг
Твердость	5,3 кП	8,3 кП
Распадаемость	< 15 минут	< 15 минут
Истираемость	не более 0,5%	не более 0,5%

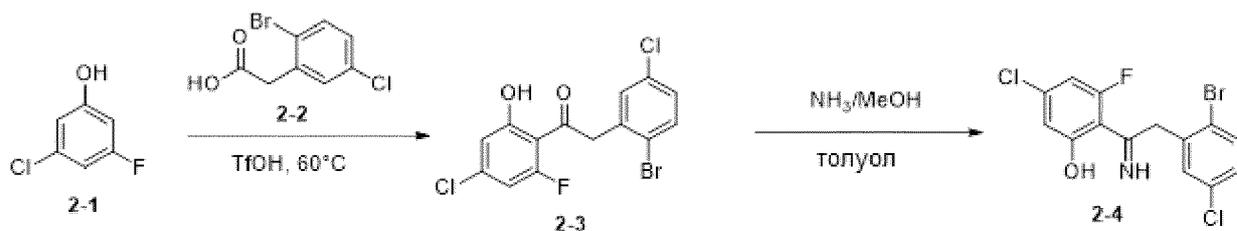
Таблетки с дозировкой 50 мг и 100 мг, полученные, как описано выше, подвергали 6-месячным исследованиям стабильности при трех условиях: 5°C (охлаждение), 25°C и 60% относительной влажности (окружающая среда), и 40°C и 75% относительной влажности (ускоренный режим). Таблетки с дозировкой 50 мг и 100 мг были химически стабильны при всех трех тестируемых условиях.

В условиях охлаждения (5°C) таблетки как 50 мг, так и 100 мг оставались белыми и твердыми, внешний вид которых не менялся от T=0 до T=6 месяцев. На протяжении 6-месячного исследования не обнаружили какие-либо примеси, количество которых превысило 0,05%, как для таблеток по 50 мг, так и для таблеток по 100 мг. Содержание воды через 6 месяцев также составило менее 3,0% по массе для обеих таблеток. Аналогичные результаты были получены, когда таблетки подвергались воздействию условий окружающей среды (25°C и 60% относительной влажности); в течение 6 месяцев для обеих таблеток не обнаружили какие-либо примеси, количество которых превысило 0,05%, и по истечении 6 месяцев содержание воды не превысило 3,0% по массе. Когда таблетки подвергались воздействию условий ускоренного режима (40°C и 75% относительной влажности), внешний вид таблеток 50 мг и 100 мг не изменился: они представляли собой белые круглые таблетки. Одну примесь обнаружили через 3 месяца, но содержание этой примеси составило всего 0,09%. Вторую примесь обнаружили через 6 месяцев, но общий процент примесей составил всего 0,21% как для таблеток 50 мг, так и для таблеток 100 мг. Содержание воды составило 3,4% по массе через 6 месяцев для таблеток по 50 мг и 3,2% по массе для таблеток по 100 мг.

В отдельном исследовании оценивалась стабильность таблеток по 50 мг и 100 мг соединения 1-А в условиях окружающей среды (25°C и 60% относительной влажности) в течение 9 месяцев. Внешний вид таблеток по 50 мг и 100 мг не изменился по сравнению с исходными белыми круглыми таблетками в течение 9 месяцев. Через 9 месяцев содержание примесей в таблетках по 50 мг составило менее 0,10%, а в таблетках по 100 мг - менее 0,05%. Содержание воды в таблетках по 50 мг и таблетках по 100 мг через 9 месяцев составляло соответственно только 2,7% по массе и 2,6% по массе.

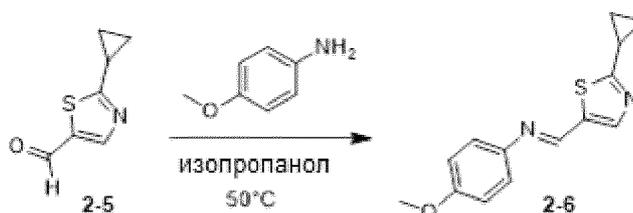
Пример 29: Синтез соединения 2

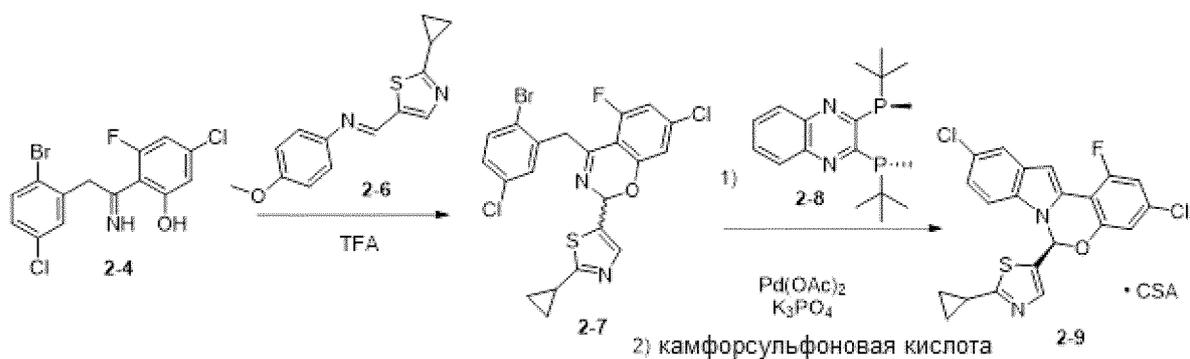
Синтез соединения 2-9



В круглодонную колбу емкостью 250 мл добавляли 3-хлор-5-фторофенол (соединение **2-1**) и 2-(2-бром-5-хлорфенил)уксусную кислоту (соединение **2-2**, 20,02 г, 80,0 ммоль), смешивали с TfOH (91 мл) и нагревали до 60°C в атмосфере азота. После перемешивания при этой температуре в течение 16 часов смесь охлаждали до комнатной температуры, и в течение 20 минут выливали в изопропанол (500 мл), охлажденный на бане лед/вода. Полученную суспензию разбавляли водой (125 мл), которую добавляли в течение 10 минут. После выдержки в течение 30 минут на бане лед/вода смесь фильтровали, и собранное твердое вещество промывали смесью изопропанол/вода 4:1 (50 мл). Твердое вещество сушили в вакууме с получением соединения **2-3** (20,14 г, 53,3 ммоль, выход 80%).

Соединение **2-3** (2,03 г, 5,37 ммоль) растворяли в 2-метилтетрагидрофуране (20,3 мл, 10 объемов) и к этому раствору добавляли аммиак в метаноле (11,51 мл 7N, 81 ммоль, 15 экв.). Полученный раствор выдерживали при комнатной температуре в течение 16 часов, затем концентрировали путем удаления 25 мл растворителя, и суспензию обрабатывали толуолом (70 мл). Полученный раствор затем повторно перегоняли для удаления еще 35 мл растворителя, с получением конечного раствора соединения **2-5** в 20 объемах толуола. Этот раствор использовали далее без дополнительной очистки.





В круглодонную колбу объемом 1 л, снабженную воздушным конденсатором, загружали соединение **2-5** (25 г, 163 ммоль), 4-метоксианилин (22,1 г, 180 ммоль) и изопропанол (250 мл). Полученную суспензию нагревали при 50°C и перемешивали в течение 3,5 часов, в течение этого времени образовывался осадок. Полученную суспензию охлаждали до 0°C, выдерживали в течение 1 часа и фильтровали. Колбу и осадок дважды промывали изопропанолом при 0°C (84 мл), и твердое вещество сушили до постоянной массы в вакуумной печи при 50°C, получая соединение **2-6** (39,0 г, выход 93%).

¹H-ЯМР (DMSO-d₆, 400 МГц): δ 8,77 (с, 1H), 8,06 (с, 1H), 7,26 (д, J=8,8 Гц, 2H), 6,96 (д, J=8,8 Гц, 2H), 3,77 (с, 3H), 2,45 (м, 1H), 1,19 (м, 2H), 1,05 (м, 2H) - геометрия имина не определена, для удобства обозначена как (E).

В трехгорлую круглодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой, температурным зондом и отверстием для ввода азота, загружали соединение **2-6** (7,54 г, 29,2 ммоль) и раствор соединения **2-4** в толуоле (5,72 мас. %, 174,8 г, 26,5 ммоль). Полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре до растворения твердого вещества, и полученный раствор охлаждали с помощью бани лед/вода. Добавляли TFA (2,45 мл, 31,8 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C. Полученный раствор перемешивали на бане лед/вода в течение 16 часов, пока он нагревался до комнатной температуры. Полученную суспензию фильтровали, колбу и осадок промывали толуолом (27 мл), и органический раствор промывали водным раствором NaHCO₃ (4 мас. %, 54 мл) и водой (54 мл). Органический слой концентрировали в вакууме до ~25 мл, разбавляли изопропанолом (110 мл) и концентрировали в вакууме до общего объема ~50 мл. Полученную суспензию нагревали до 40°C, разбавляли водой (10 мл, добавляли в течение 30 минут), выдерживали при 0°C в течение 1 часа и фильтровали. Колбу и осадок промывали смесью изопропанол/вода 4:1 (25 мл), и твердое вещество сушили до постоянной массы в вакуумной печи при 50°C, с получением соединения **2-7** (10,1 г, выход 74%)

К раствору Pd(OAc)₂ (219 мг, 0,98 ммоль) и (R)-QuinoxP* (соединение **2-8**) (343 мг, 1,03 ммоль) в круглодонной колбе емкостью 100 мл добавляли дегазированный толуол (45 мл). Раствор подвергали трем циклам вакуумирования и обратной подачи азота, а затем продували над поверхностью азотом в течение 5 минут. Раствору катализатора давали возможность состариться при 20°C в течение 2 часов. Затем в 3-горлую круглодонную колбу объемом 1 л, снабженную верхнеприводной мешалкой, загружали соединение **2-7** (25 г, 48,8 ммоль) и K₃PO₄ (41,4 г, 195 ммоль) и толуол (700 мл). Смесь подвергали трем циклам вакуумирования и обратной подачи азота, а затем продували над поверхностью азотом в течение 5 минут. Затем по каплям добавляли дегазированную воду (0,88 мл, 48,8 ммоль), после чего добавляли заранее приготовленный раствор катализатора, и полученную реакционную смесь нагревали до 50-55°C и перемешивали при этой температуре в течение 11 часов. В течение первых 6 часов к реакционной смеси добавляли дополнительную воду (5,28 мл, 293 ммоль) шестью равными порциями каждый час. Спустя в общей сложности 11 часов при 50-55°C реакционную смесь охлаждали до 20°C и добавляли 75 мл воды и 5 мл 50% мас./об. КОН (~9 н.). Водный слой отделяли, и органический слой промывали водой (100 мл). Органический слой фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на колонке, получая соединение **2-9**.

Энантиомерный избыток (ee) определяли с использованием SFC (сверхкритическая флюидная хроматография) при следующих условиях:

Колонка: ChiralCel OJ-3; 4,6×150 мм; Размер частиц 3 мкм

Температура: 40°C.

Давление: 200 бар

Модификатор: IPA с добавлением 25 mM изобутиламина.

Скорость потока: 3,0 мл/мин

Условия: от 1% модификатора/99% CO₂ до 40% модификатора/60% CO₂ в течение 5 минут с 1-минутным удержанием модификатора 40%.

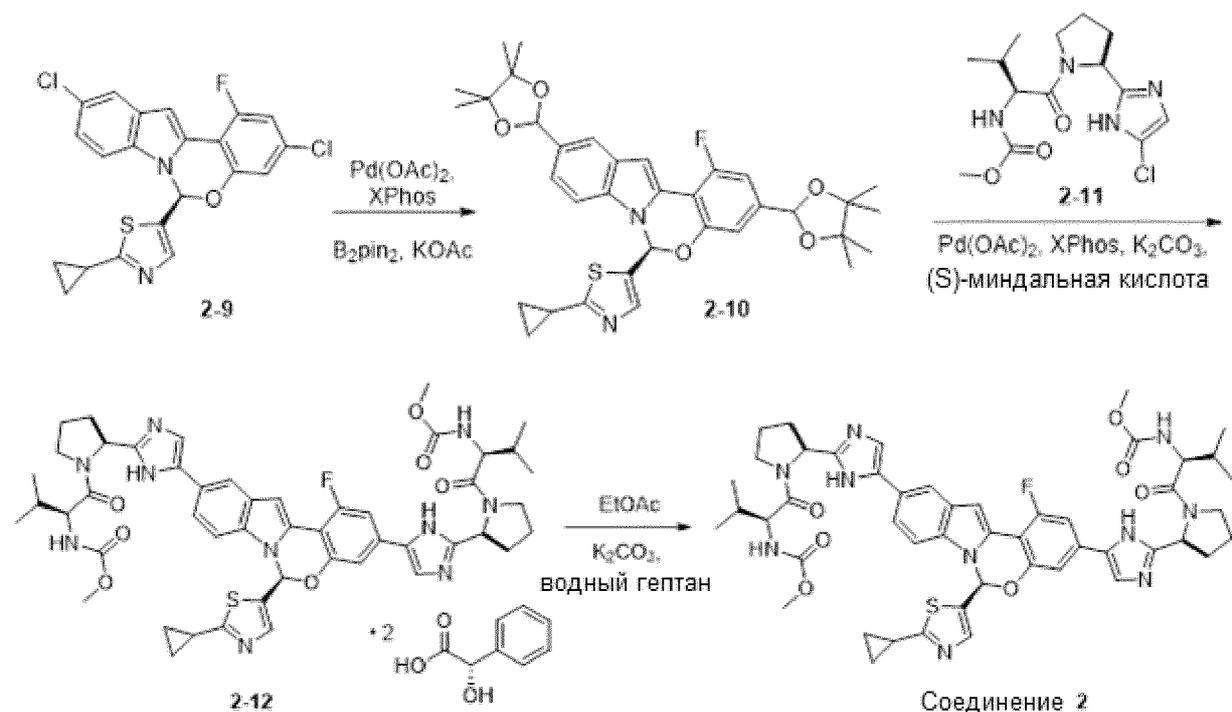
Для очищенного соединения **2-9**: (23 мг, выход 90%, в 91% ee).

¹H-ЯМР (CDCl₃, 500 МГц): δ 7,663 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,407 (д, J=0,4 Гц, 1H), 7,200 (дд, J=2,0, 8,8 Гц, 1H), 7,092 (д, J=0,4-8,4 Гц, 1H), 7,048-7,039 (м, 2H), 6,958-6,910 (м, 2H), 2,194-2,153 (м, 1H), 1,275-1,075 (м, 2H), 1,018 -0,991 (м, 2H).

Неочищенный продукт, соединение **2-9**, растворяли приблизительно в 50 мл толуола и 128 мл iPAC при 45°C. Затем в течение 2,5 часов при 45°C добавляли тремя порциями (S)-камфорсульфоновую кислоту (10,8 г, 46,4 ммоль). Смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли дополнительное количество (S)-камфорсульфоновой

кислоты (0,57 г, 2,4 ммоль). Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 16 часов, затем фильтровали. Твердое вещество промывали 50 мл смеси 1/2,5 толуол/изопропилацетат, а затем промывали 50 мл изопропилацетата и сушили в вакууме, получая 27,1 г соединения **2-9** в виде соли камфорсульфоновой кислоты с энантиомерным избытком (ee) от 96 до >99%.

Синтез соединения 2



В 3-горлую круглодонную колбу емкостью 500 мл с верхнеприводной мешалкой в атмосфере азота загружали соединение **2-9** (соль (S)-CSA, 10,0 г или эквивалентное количество свободного основания), бис(пинаколато)дифтор (8,50 г), ацетат калия (8,78 г) и 5-хлориндол (0,46 г). Добавляли дегазированный 2-Ме-ТНФ (130 мл) и воду (0,54 мл). В отдельный сосуд в атмосфере азота загружали ацетат палладия (0,067 г) и Xphos (2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропилбифенил) (0,293 г) и дегазированный 2-Ме-ТНФ (20 мл), и смеси давали перемешиваться в течение 30 минут, затем в колбу добавляли соединение **2-9**. Смесь нагревали до 75°C и оставляли стареть при этой температуре в течение 1 часа или до полной конверсии, затем давали остыть до комнатной температуры. К смеси добавляли воду (30 мл) и разделяли слои. Органический слой промывали 10% насыщенным соевым раствором (30 мл), затем обрабатывали Сипо-3-углеродом (1,0 г) в течение приблизительно 15 часов. Смесь фильтровали через слой целита для удаления углерода. Раствор концентрировали в вакууме до остаточного объема около 35 мл. Для инициирования кристаллизации добавляли затравочные кристаллы. Смеси давали

выстояться при комнатной температуре в течение 10 минут, а затем медленно добавляли ацетонитрил (105 мл). Полученную суспензию фильтровали, и собранное твердое вещество промывали смесью ацетонитрил/2-Ме-ТНФ (3:7, 30 мл), затем сушили в потоке азота, с получением соединения **2-10**.

^1H -ЯМР (CDCl_3 , 500 МГц), 8,23 (с, 1H), 7,70 (д, $J=8,3$ Гц, 1H), 7,50 (с, 1H), 7,31 (д, $J=9,6$ Гц, 1H), 7,29 (д, $J=7,1$ Гц, 1H), 7,23 (д, $J=8,3$ Гц, 1H), 7,18 (д, $J=3,3$ Гц, 1H), 7,10 (с, 1H), 2,15-2,10 (м, 1H), 1,39 (с, 6H), 1,37 (с, 3H), 1,37 (с, 3H), 1,06-1,02 (м, 4H), 1,01-0,95 (м, 4H).

В сосуд высокого давления загружали соединение **2-10** (10,0 г, 16,28 ммоль, 1,0 экв.), соединение **2-11** (11,5 г, 2,15 экв.), 2-Ме-ТНФ (90 мл) и K_2CO_3 (98 мл, 1 М, 6 экв.). Сосуд дегазировали. Во второй реакционный сосуд загружали $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,11 г, 3%) и Xphos (0,58 г, 7,5%), затем дегазировали с последующим добавлением дегазированного 2-Ме-ТНФ (20 мл). Полученной суспензии катализатор/лиганд давали возможность стареть в течение 2 часов при комнатной температуре в атмосфере азота. Затем суспензию переносили в реакционный сосуд, содержащий соединение **2-11**, и промывали дегазированным 2-Ме-ТНФ (10 мл). Полученную реакционную смесь снова дегазировали, реакционный сосуд закрывали и нагревали до температуры от 85 до 90°C в течение приблизительно 8 часов до достижения конверсии >99,5%. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, и органический слой последовательно промывали 10% раствором NaCl (18 мл) и 3% раствором NaCl (18 мл). Органический слой концентрировали в вакууме и азеотропно сушили путем перегонки с получением неочищенного продукта (14,66 г).

Неочищенный продукт (14,66 г) в 2-Ме-ТНФ (135 мл) добавляли к раствору три-*n*-бутилфосфина (2,32 мл) в MeOH (19,4 мл). Смесь нагревали до 70°C, затем добавляли раствор (S)-миндальной кислоты (0,94 г), растворенной в 2-Ме-ТНФ (3,87 мл). После выдержки при 70°C в течение нескольких часов реакционную смесь охлаждали до 60°C и добавляли еще порцию (S)-миндальной кислоты (3,06 г) в 2-Ме-ТНФ (12,58 мл). В партию вносили затравку миндальной соли соединения **2-12**. Конечную порцию S-миндальной кислоты (35,41 г) в 2-Ме-ТНФ (22,25 мл) загружали в течение 4 часов при 60°C. Реакционную смесь постепенно охлаждали до 20°C в течение 8 часов, и выдерживали при 20°C в течение 1 часа. Взвесь фильтровали и промывали 2-Ме-ТНФ (содержащим 2 мас.% (S)-миндальной кислоты). Собранное твердое вещество сушили при 60°C с получением бисманделатной соли соединения **2-12** в виде твердого вещества (18,74 г).

Бисманделатную соль соединения **2-12** (6 г) смешивали с этилацетатом (48 мл) и водой (25,7 мл). К двухфазной смеси в течение 10 минут добавляли 2М раствор карбоната

калия (6 мл, 2,5 эквивалента), получая двухфазный раствор. Нижний водный слой удаляли, а органический слой последовательно промывали 8% соляным раствором (30 мл) и водой (2×30 мл). Органический слой сушили азеотропной перегонкой (конечный объем раствора = 30 мл). В инертную колбу загружали гептан (66 мл). К гептану в течение 2 часов добавляли поток этилацетата, содержащий продукт. После выдержки еще в течение 2 часов суспензию продукта фильтровали и влажный осадок на фильтре промывали смесью гептана (10,8 мл) и EtOAc (2 мл). Твердое вещество сушили в вакууме в течение приблизительно 15 часов при 60°C, с получением соединения **2** в виде свободного основания. (4,40 г, МС: М+Н 947,4047).

¹H-ЯМР (d6-DMSO, 500 МГц) δ (м.д.) 8,30 (с, 1 H), 8,22 (уш. с, 1 H), 8,10 (уш. с, 1 H), 8,00 (с, 1 H), 7,78 (д, J=8,7 Гц, 1 H), 7,67-7,65 (м, 2 H), 7,52 (уш. с, 1 H), 7,38 (с, 1 H), 7,31-7,28 (м, 2 H), 7,19 (д, J=3,2 Гц, 1 H), 5,16 (т, J=7,4 Гц, 1 H), 5,14 (т, J=7,4 Гц, 1 H), 4,15-4,11 (м, 2 H), 3,91-3,81 (м, 4 H), 3,55 (с, 6 H), 2,45-2,36 (м, 2 H), 2,26 (м, 1 H), 2,20-2,13 (м, 2 H), 2,13-2,06 (м, 2 H) H), 2,06-2,00 (м, 4 H), 0,99 (м, 2 H), 0,85-0,77 (м, 14 H).

¹³C-ЯМР (d6-DMSO, 126 МГц) δ (м.д.) 175,20, 171,21, 171,15, 158,61 (д, J=251,0 Гц), 156,95, 156,94, 150,05, 149,54 (д, J=7,3 Гц), 148,88, 14 1,37, 133,88, 133,00, 131,11, 130,68, 129,14, 128,78, 125,35, 121,40, 120,38, 118,15, 117,01, 114,18, 111,04, 110,75, 107,30 (д, J=23,4 Гц), 106,67 (д, J=18,2 Гц), 102,94 (г, J=8,6 Гц), 78,46, 57,95, 57,93, 53,06, 52,91, 51,51, 47,16, 47,11, 31,02, 30,95, 29,08, 24,80, 24,75, 19,35, 19,32, 17,74, 13.88, 11.17, 11.05.

Пример 30: Синергическая активность соединения 1 и соединения 2 против HCV

Клеточная культура. Репортерная клеточная линия Huh-luc/neo-ET содержит постоянно реплицирующийся репликон 13sgui-ubi-neo/NS3-3'/ET, содержащий слитый белок гена люциферазы светлячка-убиквитин-неомицин-фосфотрансферазы и ген NS3-5B HCV, управляемый кодирующей последовательностью EMCV IRES, содержащая адаптивные мутации культуры ткани ET (E1202G, T1208I и K1846T). Исходную культуру Huh-luc/neo-ET размножали культивированием в среде DMEM с добавлением 10% FCS, 2 mM глутамина, пенициллина (100 ME/мл)/стрептомицина (100 мкг/мл) и 1X заменимых аминокислот плюс 1 мг/мл G418. Клетки разделяли в соотношении 1:4 и культивировали в течение двух пассажей в одной и той же среде с добавкой 250 мкг/мл G418. Клетки обрабатывали трипсином, подсчитывали путем окрашивания трипановым синим и высевали в 96-луночные планшеты для тканевых культур с плотностью культуры клеток $7,5 \times 10^3$ клеток на лунку, и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 24 часов.

Добавление соединения. После 24-часовой инкубации среду удаляли и заменяли той же средой без G418 с добавлением разбавленных тестируемых соединений в трех повторностях. В шесть лунок в каждой планшете вводили только среду в качестве контроля без обработки. Клетки инкубировали еще 72 часа при 37°C и 5% CO₂, затем измеряли активность против HCV по конечной точке люциферазы. Параллельно обрабатывали и инкубировали дубликаты планшетов для оценки клеточной токсичности посредством окрашивания тетразолиевым красителем ХТТ.

Жизнеспособность клеток. Для оценки клеточной жизнеспособности репортерной клеточной линии Nuhlc/neo-ET в присутствии соединений монослои клеточной культуры обработанных клеток после 72 часов инкубации окрашивали тетразолиевым красителем ХТТ (2,3-бис(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-5-[(фениламино)карбонил]-2Н-тетразолийгидроксид). Клетки окрашивали тетразолиевым красителем ХТТ. ХТТ-тетразолий метаболизируется митохондриальными ферментами метаболически активных клеток до растворимого продукта формазана, что позволяет проводить быстрый количественный анализ ингибирования вирус-индуцированной гибели клеток противовирусными тестируемыми веществами. Раствор ХТТ готовили ежедневно в виде исходного раствора 1 мг/мл в RPM1640. Раствор феназина метосульфата (PMS) готовили в концентрации 0,15 мг/мл в PBS и хранили в темноте при -20°C. Исходный раствор ХТТ/PMS готовили непосредственно перед использованием его путем добавления 40 мкл PMS на один мл раствора ХТТ. В каждую лунку планшета добавляли пятьдесят микролитров ХТТ/PMS, и планшет повторно инкубировали в течение 4 часов при 37°C. Планшеты герметизировали с помощью клейких пленок-герметиков для планшетов, и несколько раз осторожно встряхивали или переворачивали для смешивания растворимого продукта формазана. Затем планшет считывали спектрофотометрически при 450/650 нм с помощью планшет-ридера Molecular Devices Vmax.

Измерение репликации вируса. Репликацию HCV в системе анализа репликонов измеряли по активности люциферазы после 72-часовой инкубации с использованием набора генов-репортеров Britelite plus luminescence reporter gene в соответствии с инструкциями производителя (Perkin Elmer, Шелтон, Коннектикут). Вкратце, один флакон с лиофилизированным субстратом из набора Britelite plus растворяли в 10 мл буфера для восстановления, и осторожно перемешивали переворачиванием. После 5-минутной инкубации при комнатной температуре в 96-луночные планшеты добавляли реагент из набора Britelite plus по 100 мкл на лунку. Планшеты герметизировали клейкой пленкой и инкубировали при комнатной температуре в течение приблизительно 10 минут для лизиса клеток. Содержимое лунок переносили в белый 96-луночный планшет и измеряли

люминесценцию в течение 15 минут с использованием установки Wallac 1450 Microbeta и жидкостного сцинтилляционного счетчика Trilux. Данные для каждой концентрации вводили в подготовленную электронную таблицу Microsoft Excel 2010 для определения 50% концентрации ингибирования вируса (EC_{50}).

Анализы для комбинированной терапии

Соединение **2** оценивали с использованием максимальной тестируемой концентрации, равной 0,008 нМ, и четырех серийных двукратных разведений в комбинации с девятью концентрациями соединения **1**, путем анализа активности против HCV, как описано выше. Пятьдесят микролитров каждого соединения в 4-кратной (4X) желаемой концентрации добавляли в 96-луночный титрационный микропланшет, содержащий клетки для антивирусных анализов. Добавляли в лунки пятьдесят микролитров среды для анализа, и тестируемое соединение оценивали на противовирусную активность как отдельное соединение.

Анализ данных. Необработанные данные из программного обеспечения Softmax Pro вводили в матрицу программного обеспечения Prichard and Shipman MacSynergy II (Prichard et al. 1993. Antiviral Research 14: 181-206). Эффекты действия комбинации лекарств рассчитываются на основе активности двух соединений при тестировании их по отдельности. Ожидаемую аддитивную противовирусную защиту вычитали из экспериментально определенной противовирусной активности при каждой концентрации комбинации, получая при этом положительное значение (синергизм или усиление), отрицательное значение (антагонизм) или ноль (аддитивность). Результаты комбинационных анализов представлены в трехмерном виде для каждой концентрации комбинации, где поверхность активности, простирается выше (синергия) или ниже (антагонизм) плоскости аддитивности. Объем поверхности рассчитывали и выражали как объем синергии ($\text{мкМ}^2 \%$) при 95% доверительном интервале.

В этих исследованиях считали, что синергия комбинации лекарственных средств имеет место, когда объем синергии превышает $50 \text{ мкМ}^2 \%$ при 95% доверительном интервале. Считали, что имеет место слабая синергическая активность и высокая синергическая активность, когда объемы синергии составляли соответственно от 50 до $100 \text{ мкМ}^2 \%$ и $>100 \text{ мкМ}^2 \%$. Объемы синергии между -50 и $50 \text{ мкМ}^2 \%$ считали как аддитивные, а объемы синергии менее $-50 \text{ мкМ}^2 \%$ считали как антагонистические.

Оценка комбинированной терапии против HCV. Соединение **2** оценивали в комбинации с соединением **1** в отношении ингибирования репликации HCV в клетках репликона Huh-1uc/neo-ET. Процент ингибирования репликации вируса выше ожидаемого

при каждой концентрации для каждой комбинации двух препаратов рассчитывали при интервалах доверительных вероятностей 95%, 99% и 99,9%. Данные, полученные при доверительной вероятности 95%, наносили на трехмерный график, и рассчитаны объемы синергии. Объемы синергии для комбинации при доверительной вероятности 95% обобщены в Таблице 42, приведенной ниже.

Таблица 42: Оценка комбинированной активности против HCV

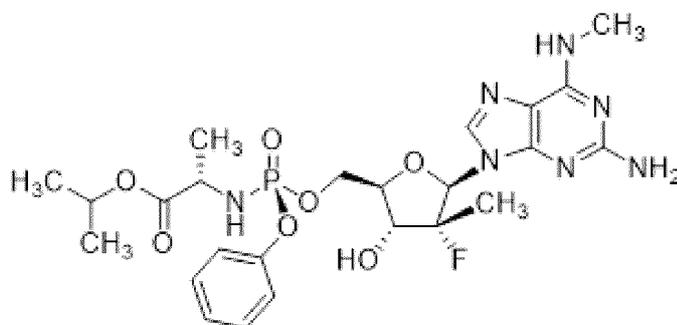
Соединение	Репликон HCV 1b	
	Объем синергии/антагонизма (мкМ ² /%)	Оценка взаимодействия
Соединение 1, 20 нМ Соединение 2, 0,004 нМ	103/-6,01	Высокая синергия
Соединение 1, 40 нМ Соединение 2, 0,008 нМ	255/-25,1	Высокая синергия

Результаты анализов репликонов HCV показывают, что в диапазонах концентраций, используемых в противовирусных анализах комбинации, соединение 1 при 20 и 40 нМ обеспечивает синергическое взаимодействие с соединением 2 при концентрациях 0,004 и 0,008 нМ. При оцененных концентрациях антагонистических или синергических взаимодействий в отношении токсичности отсутствовали.

Настоящее описание проиллюстрировано путем ссылки на варианты осуществления настоящего изобретения. Однако специалисту в данной области техники понятно, что различные модификации и изменения могут быть выполнены не выходя за рамки изобретения, объем которого определен в формуле изобретения, представленной ниже. Соответственно, настоящее описание следует рассматривать как иллюстративное, а не ограничивающее, и предполагается, что все модификации описанных технических решений входят в объем изобретения.

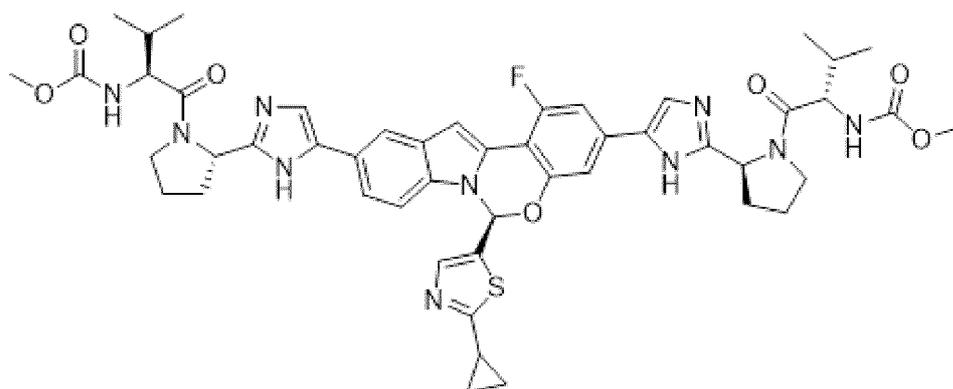
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения инфекции, вызванной HVC, или состояния, возникшего в результате инфекции гепатита С, у хозяина, нуждающегося в этом, предусматривающий введение эффективного количества соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли,



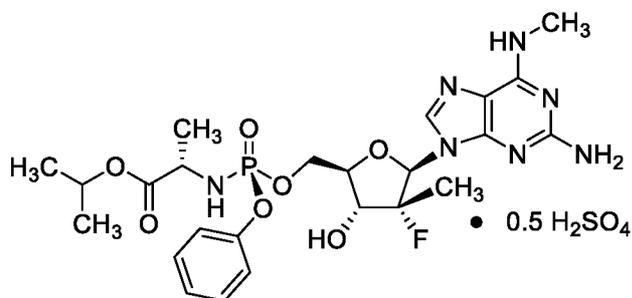
Соединение 1

в комбинации с эффективным количеством соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.



Соединение 2.

2. Способ по п. 1, где соединение 1 представляет собой соединение 1-А.



Соединение 1-А.

3. Способ по п. 1-2, где в составе комбинации используют третий агент, эффективный против HVC.

4. Способ по п. 3, где третий агент, эффективный против HVC, выбран из группы, состоящей из ингибитора протеазы, другого ингибитора NS5A, другого ингибитора NS5B, несубстратного ингибитора NS5B, интерферона альфа-2а, рибавирина и несубстратного ингибитора.

5. Способ по п. 4, где ингибитор протеазы представляет собой ингибитор протеазы NS3/4A.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где комбинацию вводят перорально.

7. Способ по любому из пп. 1-5, где комбинацию вводят парентерально.

8. Способ по п. 7, где комбинацию вводят внутривенно.

9. Способ по любому из пп. 1-7, где состояние, возникшее в результате инфекции гепатита С, выбрано из группы, состоящей из хронического вирусного воспаления печени, рака печени, возникшего в результате прогрессирующего гепатита С (гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК)), цирроза печени, хронического или острого гепатита С, молниеносного гепатита С, хронического персистирующего гепатита С и усталости, вызванной терапией против HVC.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где вводят от приблизительно 100 мг до приблизительно 800 мг соединения 1 или эквивалентное количество его фармацевтически приемлемой соли.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где вводят по меньшей мере приблизительно 550 мг соединения 1 или эквивалентное количество его фармацевтически приемлемой соли.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где вводят от приблизительно 90 до приблизительно 360 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где вводят по меньшей мере приблизительно 180 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где у пациента имеется цирроз печени.

15. Способ по любому из пп. 1-13, где у пациента отсутствует цирроз печени.

16. Способ по любому из пп. 1-15, где комбинацию вводят один раз в день.

17. Способ по любому из пп. 1-15, где комбинацию вводят два раза в день.

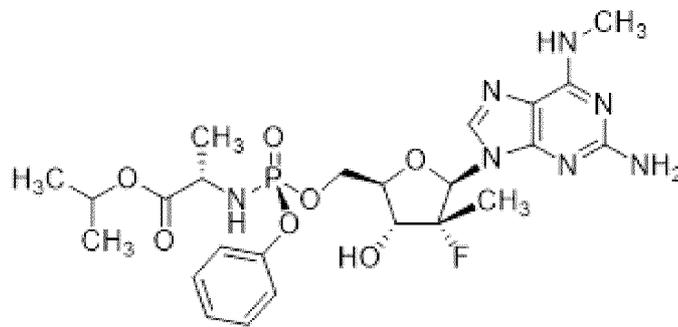
18. Способ по любому из пп. 1-17, где комбинацию вводят в течение по меньшей мере 12 недель.

19. Способ по любому из пп. 1-17, где комбинацию вводят в течение по меньшей мере 8 недель.

20. Способ по любому из пп. 1-17, где комбинацию вводят в течение по меньшей мере 6 недель.

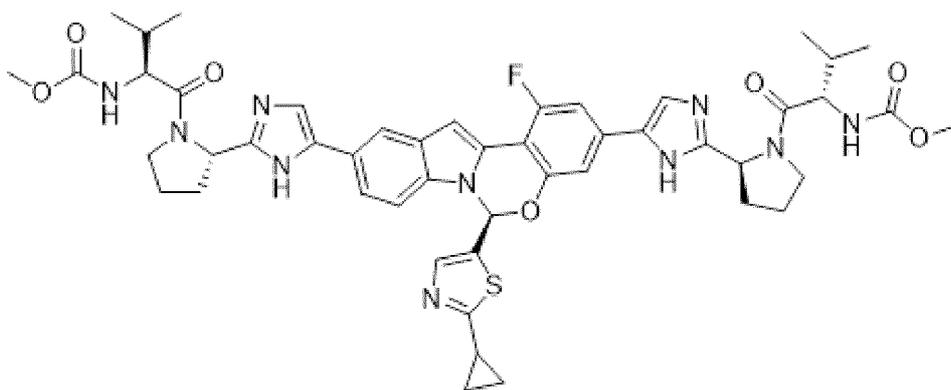
21. Способ по любому из пп. 1-20, где хозяином является человек.

22. Способ по любому из пп. 1-21, где инфекция HCV относится к генотипу 1.
 23. Способ по любому из пп. 1-21, где инфекция HCV относится к генотипу 2.
 24. Способ по любому из пп. 1-21, где инфекция HCV относится к генотипу 3.
 25. Способ по любому из пп. 1-21, где инфекция HCV относится к генотипу 4.
 26. Способ по любому из пп. 1-21, где инфекция HCV относится к генотипу 5.
 27. Способ по любому из пп. 1-21, где инфекция HCV относится к генотипу 6.
 28. Способ по любому из пп. 22-27, где HCV представляет собой мутант с лекарственной устойчивостью.
 29. Комбинация эффективного количества соединения **1** или его фармацевтически приемлемой соли,



Соединение 1

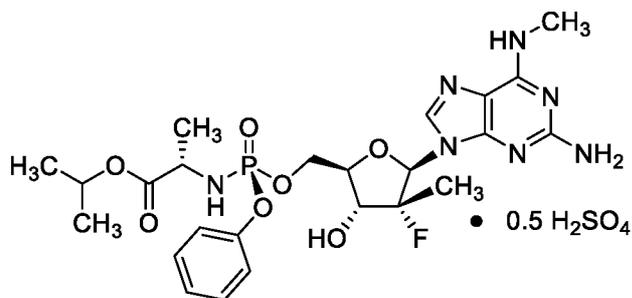
в комбинации с эффективным количеством соединения **2** или его фармацевтически приемлемой соли:



Соединение 2

для применения при лечении инфекции HCV или состояния, возникшего в результате инфекции гепатита С, у хозяина, нуждающегося в этом.

30. Комбинация по п. 29, где соединение **1** представляет собой соединение **1-A**:



Соединение 1-А.

31. Комбинация по пп. 29-30, где комбинация содержит третий агент, эффективный против HVC.

32. Комбинация по п. 31, где третий агент, эффективный против HVC, выбран из группы, состоящей из ингибитора протеазы, другого ингибитора NS5A, другого ингибитора NS5B, несубстратного ингибитора NS5B, интерферона альфа-2а, рибавирин и несубстратного ингибитора.

33. Комбинация по п. 32, где ингибитор протеазы представляет собой ингибитор протеазы NS3/4A.

34. Комбинация по любому из пп. 29-33, где комбинацию вводят перорально.

35. Комбинация по любому из пп. 29-33, где комбинацию вводят парентерально.

36. Комбинация по п. 35, где комбинацию вводят внутривенно.

37. Комбинация по любому из пп. 29-36, где состояние, возникшее в результате инфекции гепатита С, выбрано из группы, состоящей из хронического вирусного воспаления печени, рака печени, возникшего в результате прогрессирующего гепатита С (гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК)), цирроза печени, хронического или острого гепатита С, молниеносного гепатита С, хронического персистирующего гепатита С и усталости, вызванной терапией против HVC.

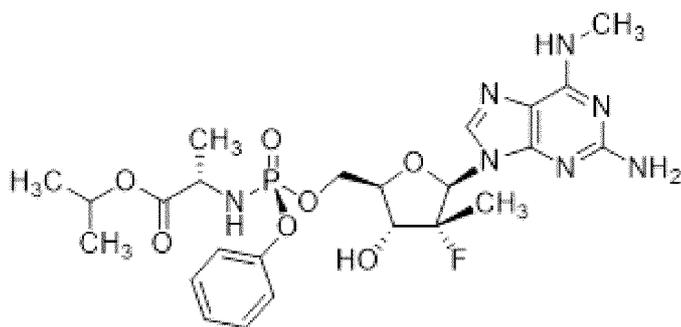
38. Комбинация по любому из пп. 29-37, содержащая от приблизительно 100 мг до приблизительно 800 мг соединения 1 или эквивалентное количество его фармацевтически приемлемой соли.

39. Комбинация по любому из пп. 29-38, содержащая по меньшей мере приблизительно 550 мг соединения 1 или эквивалентное количество его фармацевтически приемлемой соли.

40. Комбинация по любому из пп. 29-39, содержащая от приблизительно 90 до приблизительно 360 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

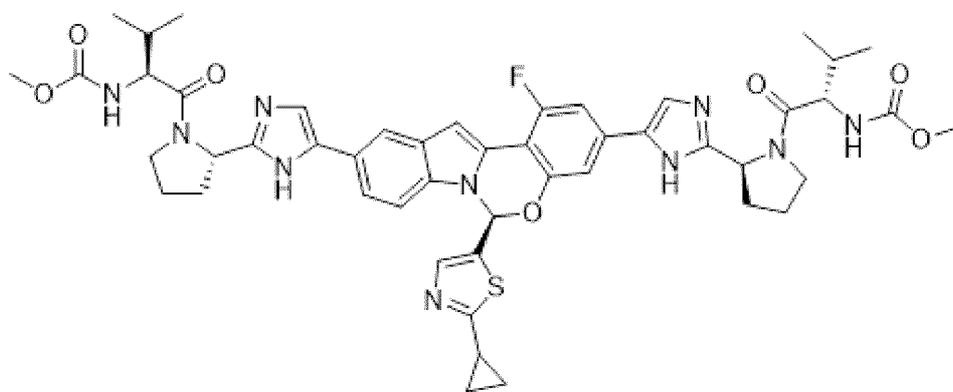
41. Комбинация по любому из пп. 29-40, содержащая по меньшей мере приблизительно 180 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

42. Применение комбинации соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли



Соединение 1

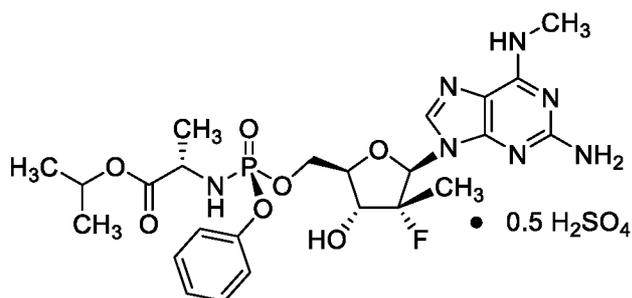
и соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли,



Соединение 2

при изготовлении лекарственного средства для лечения инфекции вируса гепатита С или состояния, вызванного инфекцией вируса гепатита С.

43. Применение по п. 42, где соединение 1 представляет собой соединение 1-А:



Соединение 1-А.

44. Применение по пп. 42-43, где третий агент, эффективный против HVC, выбран из группы, состоящей из ингибитора протеазы, другого ингибитора NS5A, другого ингибитора NS5B, несубстратного ингибитора NS5B, интерферона альфа-2а, рибавирин и несубстратного ингибитора.

45. Применение по п. 44, где ингибитор протеазы представляет собой ингибитор протеазы NS3/4А.

46. Применение по любому из пп. 42-45, комбинацию вводят перорально.

47. Применение по любому из пп. 42-45, где комбинацию вводят парентерально.

48. Применение по п. 47, где комбинацию вводят внутривенно.

49. Применение по любому из пп. 42-48, где состояние, возникшее в результате инфекции гепатита С, выбрано из группы, состоящей из хронического вирусного воспаления печени, рака печени, возникшего в результате прогрессирующего гепатита С (гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК)), цирроза печени, хронического или острого гепатита С, молниеносного гепатита С, хронического персистирующего гепатита С и усталости, вызванной терапией против HVC.

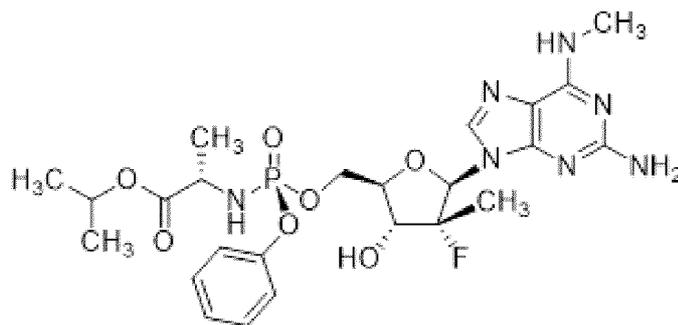
50. Применение по любому из пп. 42-49, где вводят от приблизительно 100 мг до приблизительно 800 мг соединения 1 или эквивалентное количество его фармацевтически приемлемой соли.

51. Применение по любому из пп. 42-50, где вводят по меньшей мере приблизительно 550 мг соединения 1 или эквивалентное количество его фармацевтически приемлемой соли.

52. Применение по любому из пп. 42-51, где вводят от приблизительно 90 до приблизительно 360 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

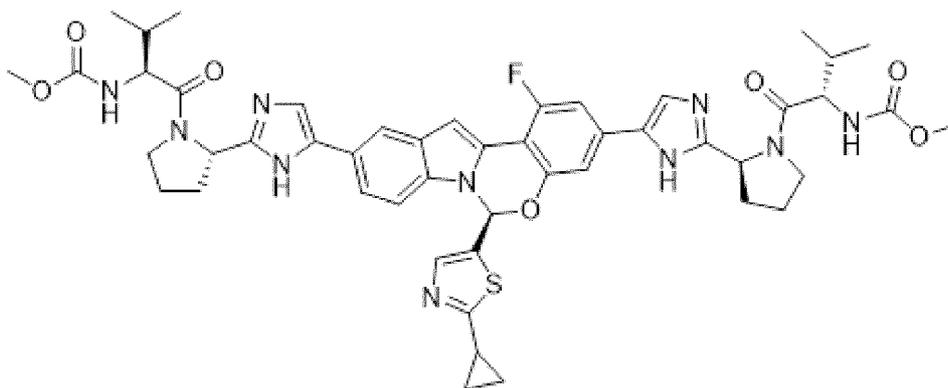
53. Применение по любому из пп. 42-52, где вводят по меньшей мере приблизительно 180 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

54. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль:



Соединение 1

и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль:



Соединение 2.

55. Фармацевтическая композиция по п. 54, где комбинацию вводят в виде единичной дозированной лекарственной формы.

56. Фармацевтическая композиция по п. 54, где комбинацию вводят в двух или более дозированных лекарственных формах.

57. Фармацевтическая композиция по п. 56, где одна дозированная лекарственная форма в комбинации содержит соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль, а вторая дозированная лекарственная форма в комбинации содержит соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль.

58. Фармацевтическая композиция по п. 56, в которой обе дозированные лекарственные формы содержат соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и соединение 2 или его фармацевтически приемлемую соль.

59. Фармацевтические композиции по пп. 54-58, содержащие от приблизительно 100 мг до приблизительно 800 мг соединения 1 или эквивалентное количество его фармацевтически приемлемой соли.

60. Фармацевтическая композиция по пп. 54-59, содержащая по меньшей мере приблизительно 550 мг соединения 1 или эквивалентное количество его фармацевтически приемлемой соли.

61. Фармацевтическая композиция по пп. 54-60, содержащая по меньшей мере приблизительно 150-200 мг соединения 2 или эквивалентное количество его фармацевтически приемлемой соли.

62. Фармацевтическая композиция по пп. 54-61, содержащая по меньшей мере приблизительно 180 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

63. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 54-62, где композиция представлена в виде дозированной лекарственной форме, подходящей для перорального введения.

64. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 54-62, где композиция представлена в виде препарата, подходящего для парентерального введения.

65. Фармацевтическая композиция по п. 64, где композиция представлена в виде препарата, подходящего для внутривенного введения.

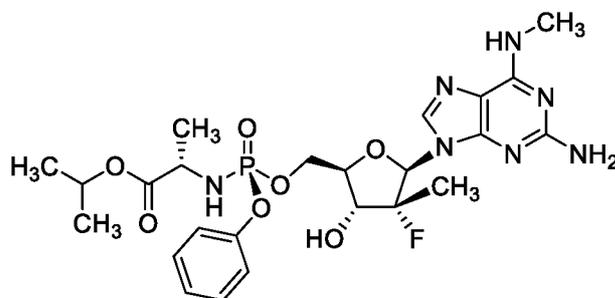
66. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 54-63, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

67. Фармацевтическая композиция по п. 66, где носитель представляет собой лубрикант, гранулирующее вещество, связующее, дезинтегрант, сахарный носитель или крахмал.

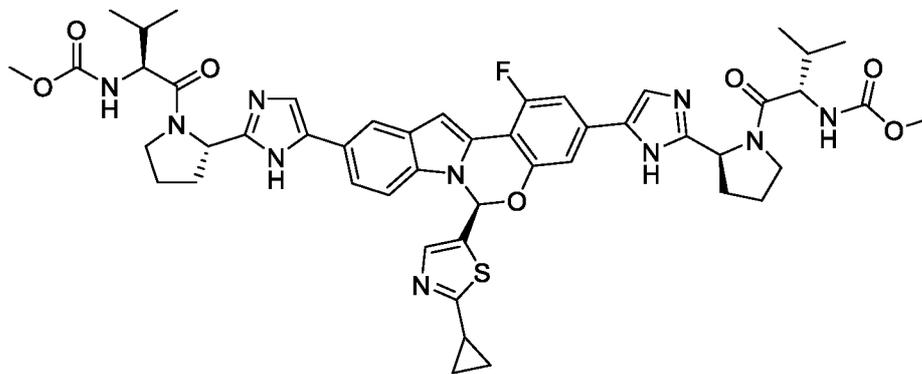
68. Фармацевтическая композиция по п. 67, где носитель выбран из группы, состоящей из маннита, микрокристаллической целлюлозы, коллоидного диоксида кремния, кроскармеллозы натрия, стеарата магния и силикатизированной микрокристаллической целлюлозы.

69. Фармацевтическая композиция по пп. 63 и 66-68, где композиция представлена в форме пилюли, таблетки или капсулы.

70. Набор для лечения инфекции, вызванной HVC, у пациента, нуждающегося в этом, где набор содержит эффективную дозированную лекарственную форму соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли и эффективную дозированную лекарственную форму соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли:

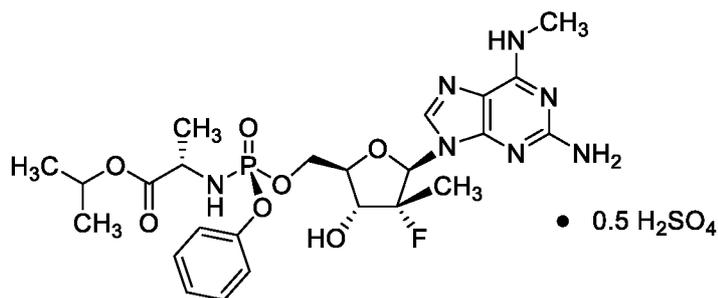


Соединение 1



Соединение 2.

71. Набор по п. 70, в котором фармацевтически приемлемая соль соединения 1 представляет собой соединение 1-А:



Соединение 1-А

72. Набор по пп. 70-71, содержащий от приблизительно 100 мг до приблизительно 800 мг соединения 1 или эквивалентное количество его фармацевтически приемлемой соли.

73. Набор по пп. 70-71, содержащий по меньшей мере приблизительно 550 мг соединения 1 или эквивалентное количество его фармацевтически приемлемой соли.

74. Набор по любому из пп. 70-73, содержащий от приблизительно 150 мг до приблизительно 200 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

75. Набор по любому из пп. 70-74, содержащий по меньшей мере приблизительно 180 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

76. Набор по любому из пп. 70-75, где комбинация представлена в двух дозированных лекарственных формах.

77. Набор по любому из пп. 70-75, где комбинация представлена в трех или более дозированных лекарственных формах.

78. Способ по любому из пп. 1-12, в котором вводят по меньшей мере приблизительно 90 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

79. Способ по любому из пп. 1-12, в котором вводят по меньшей мере приблизительно 270 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

80. Способ по любому из пп. 1-12, в котором вводят по меньшей мере приблизительно 360 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

81. Комбинация по любому из пп. 29-40, содержащая по меньшей мере приблизительно 90 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

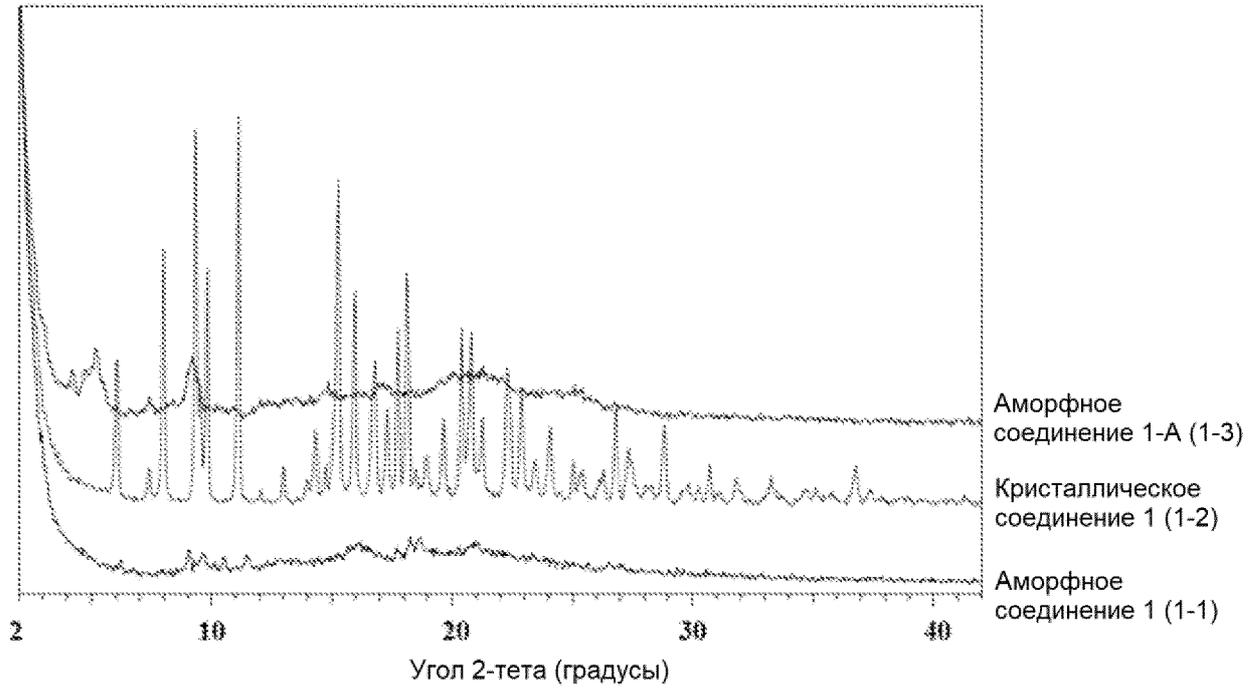
82. Комбинация по любому из пп. 29-40, содержащая по меньшей мере приблизительно 270 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

83. Комбинация по любому из пп. 29-40, содержащая по меньшей мере приблизительно 360 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

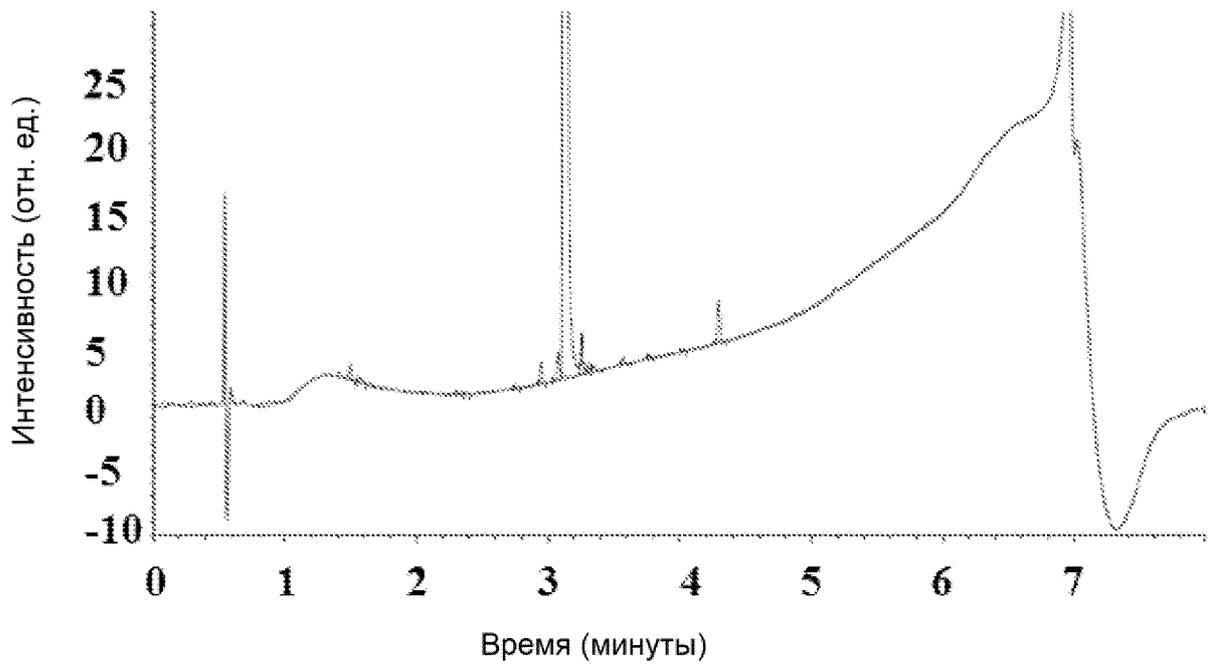
84. Применение по любому из пп. 42-52, где вводят по меньшей мере приблизительно 90 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

85. Применение по любому из пп. 42-52, где вводят по меньшей мере приблизительно 270 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.

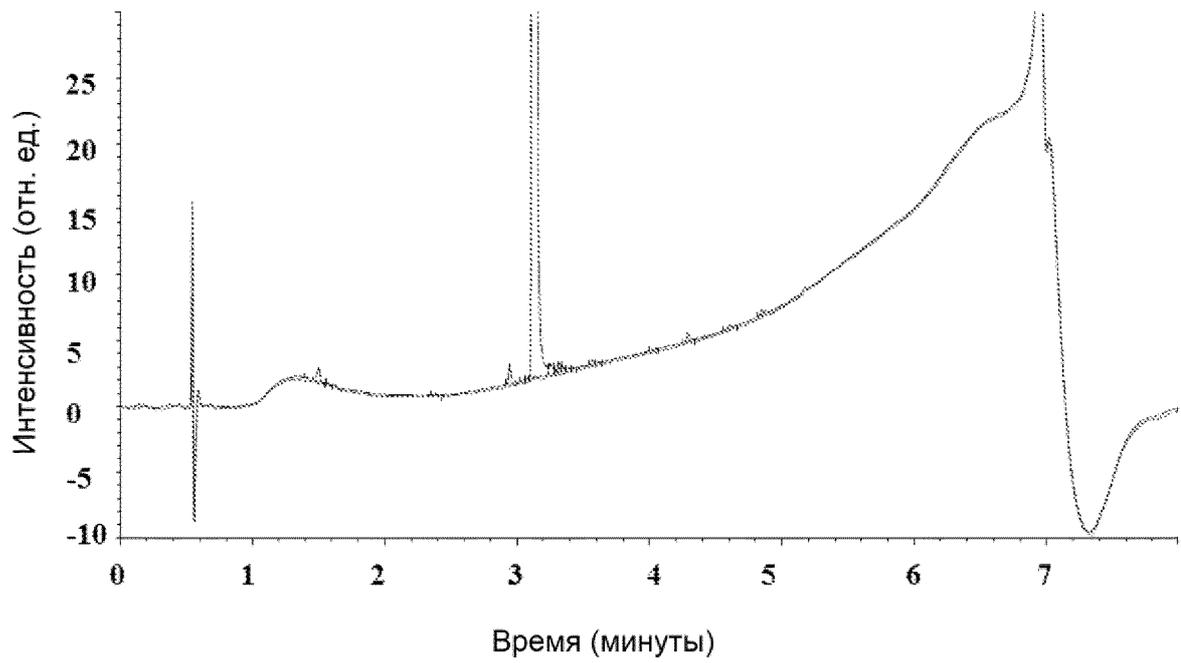
86. Применение по любому из пп. 42-52, где вводят по меньшей мере приблизительно 360 мг соединения 2 или его фармацевтически приемлемой соли.



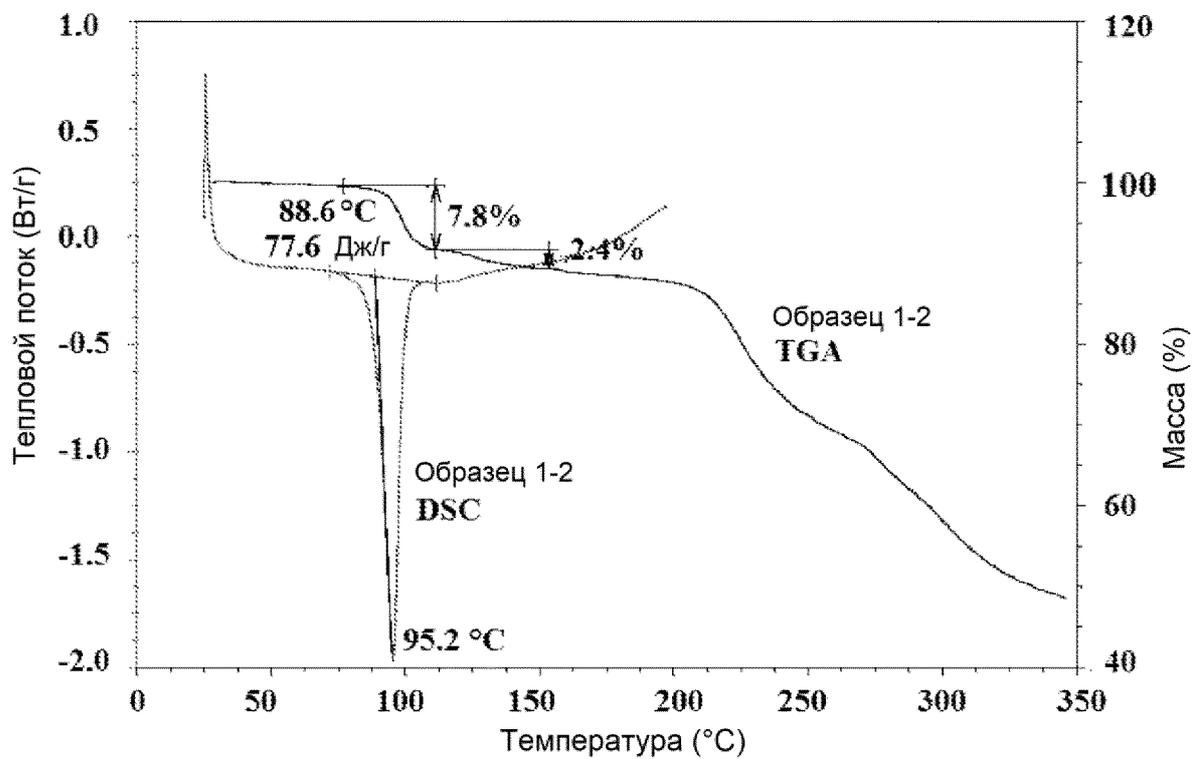
Фиг. 1А



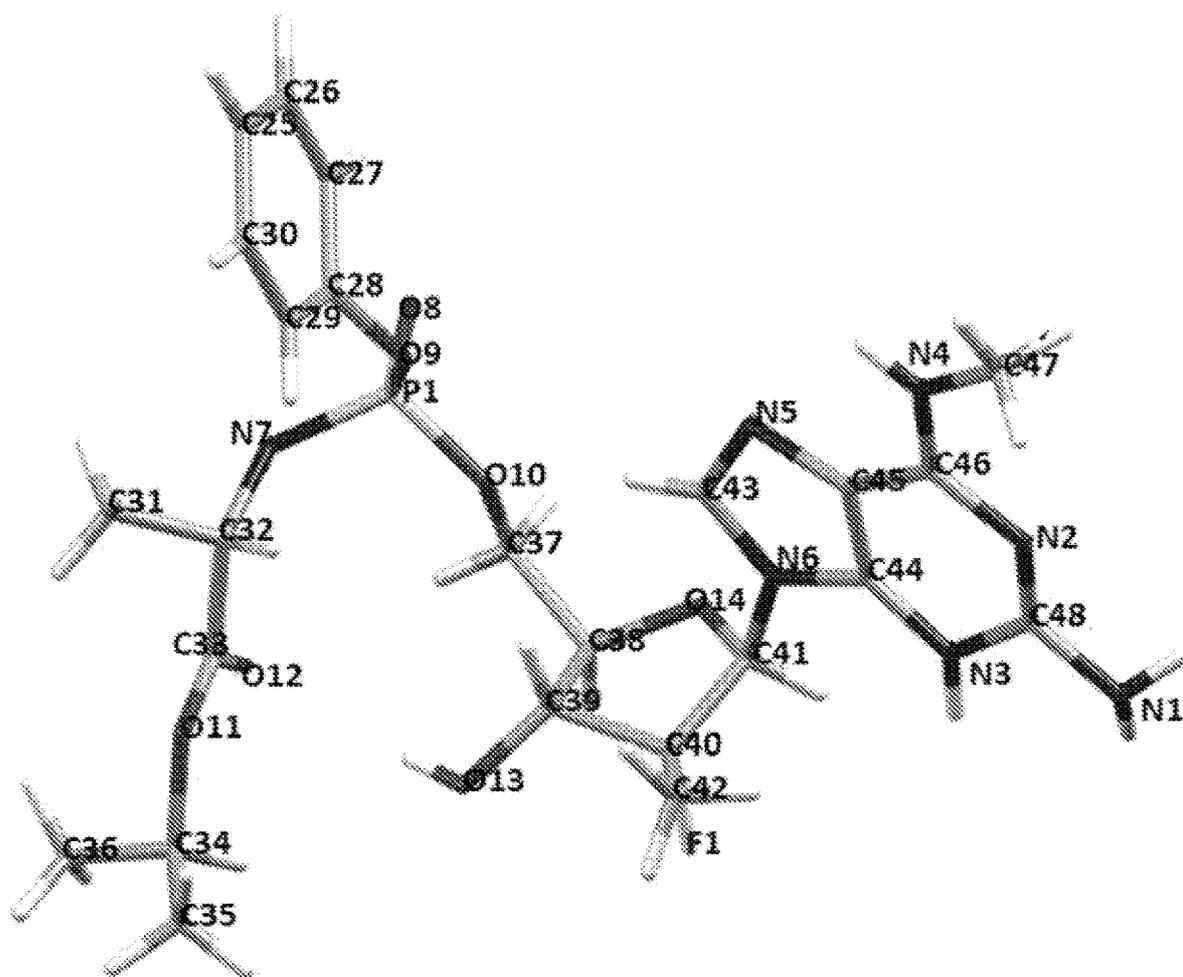
Фиг. 1В



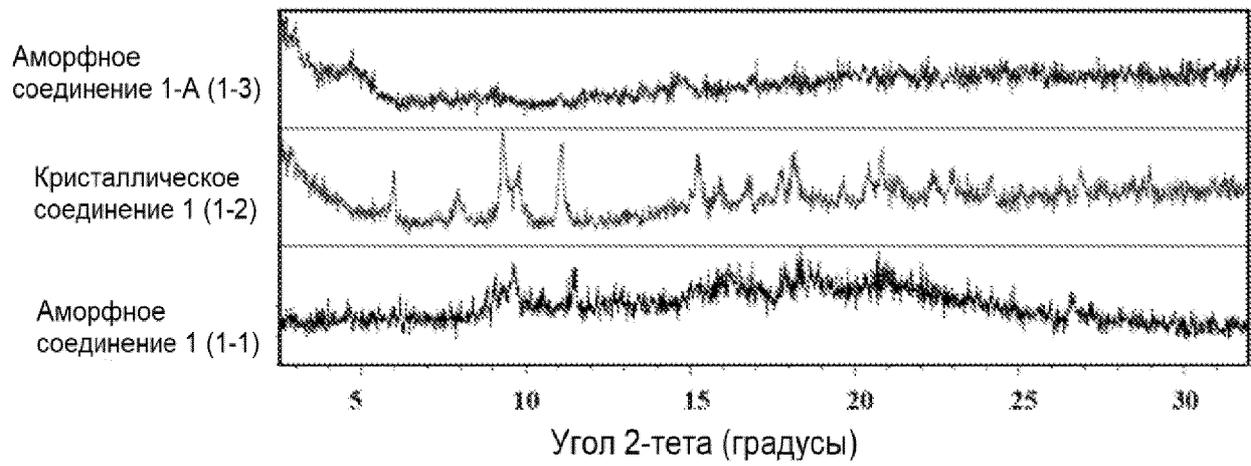
Фиг. 2А



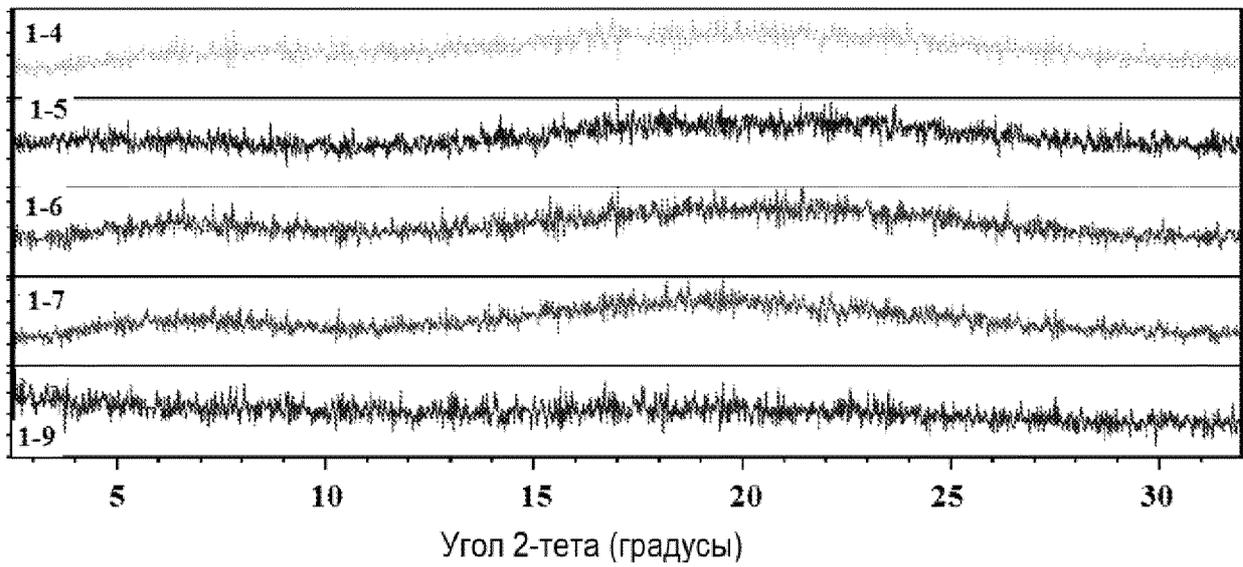
Фиг. 2В



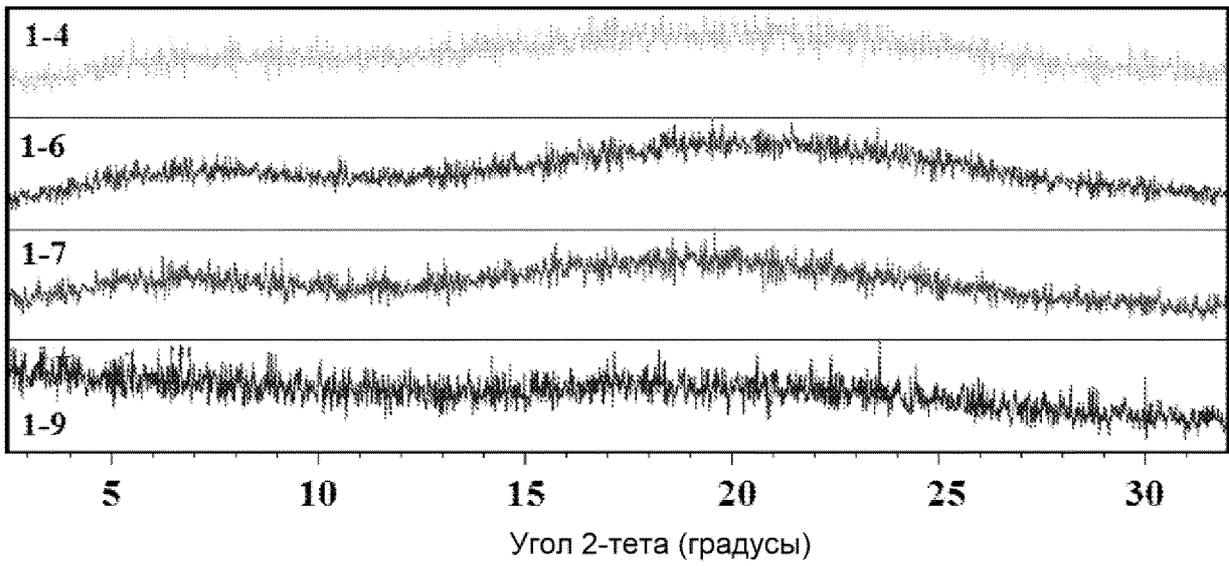
Фиг. 3



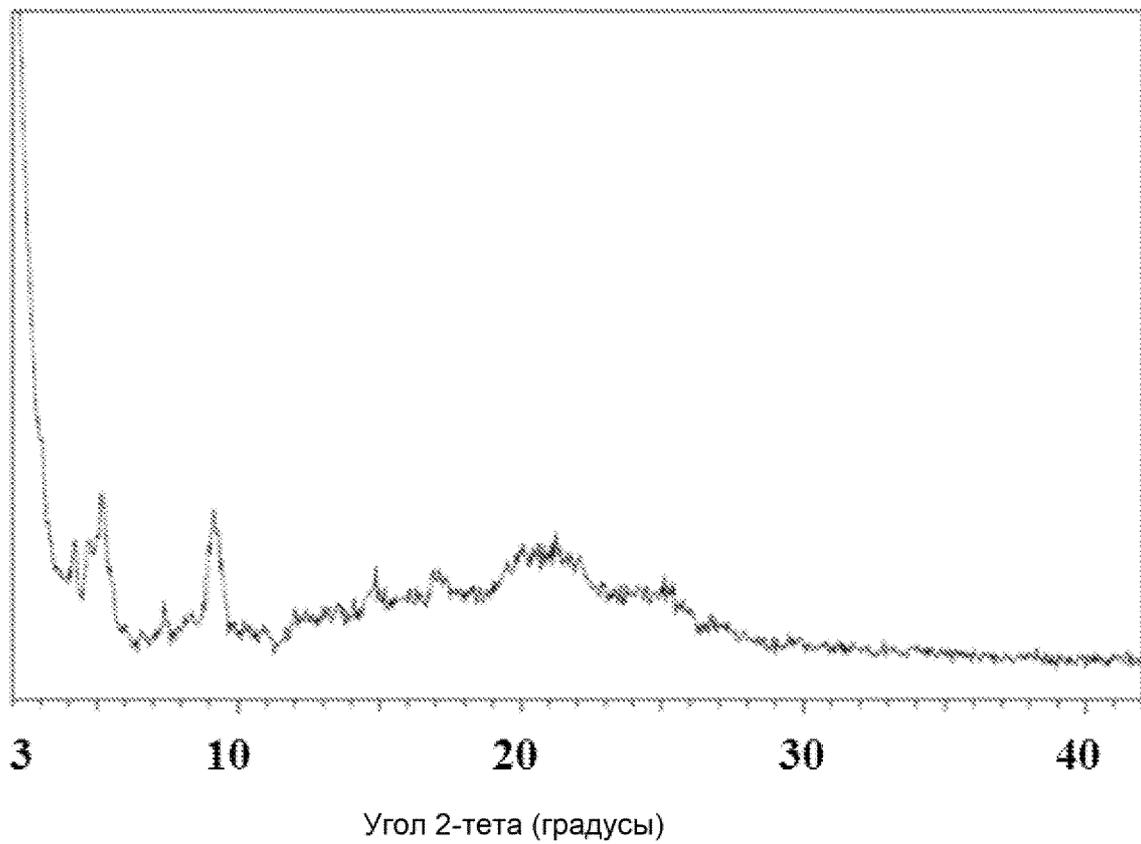
Фиг. 4А



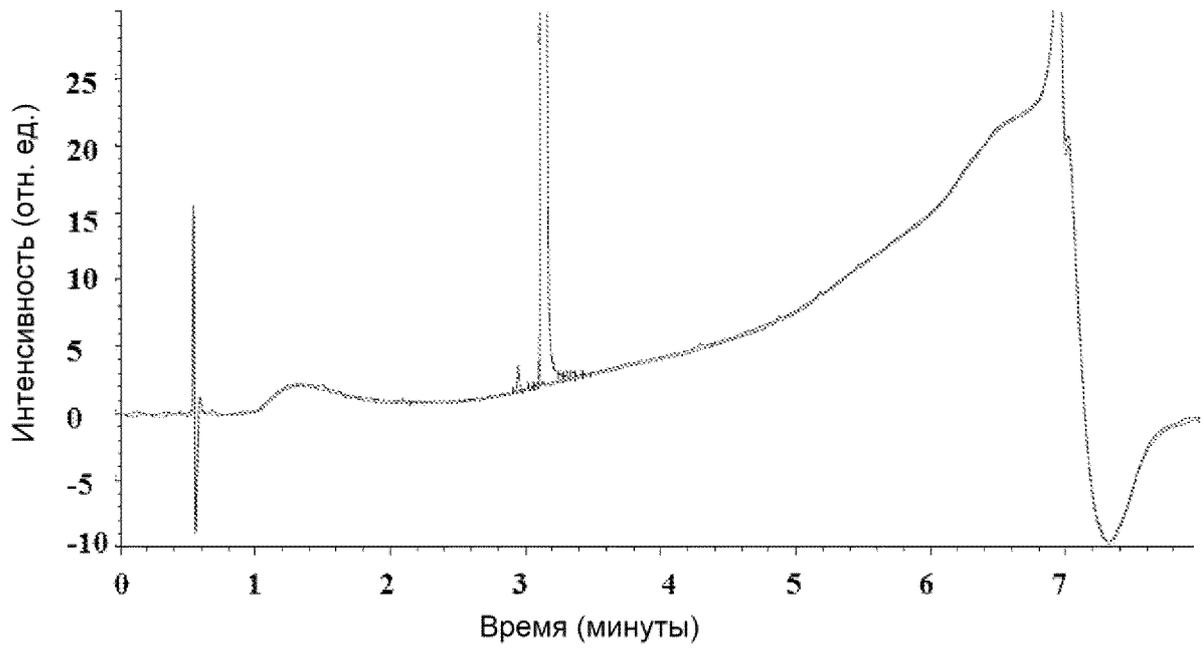
Фиг. 4В



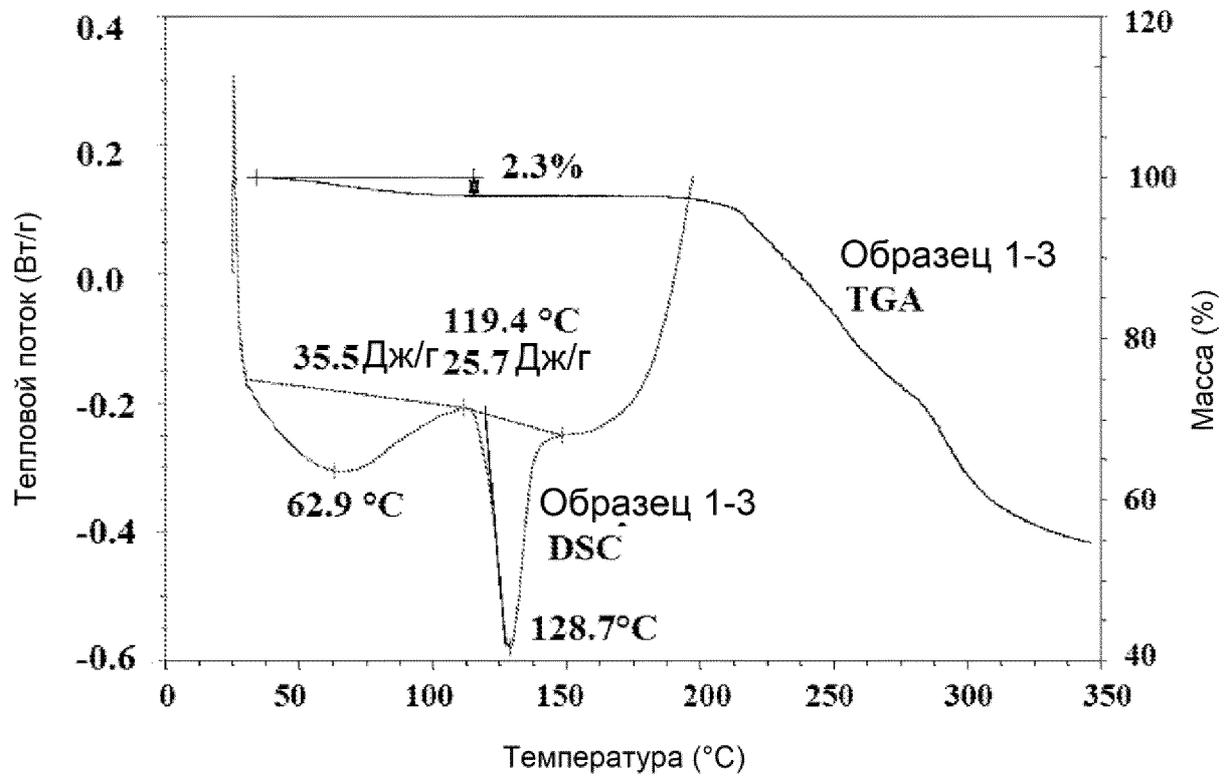
Фиг. 5А



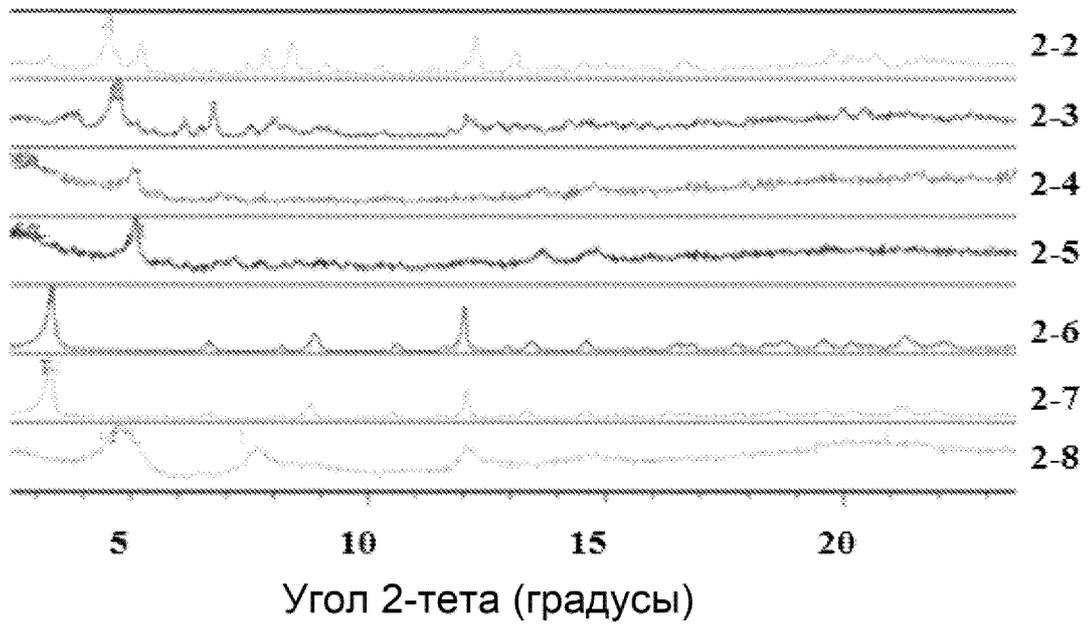
Фиг. 5В



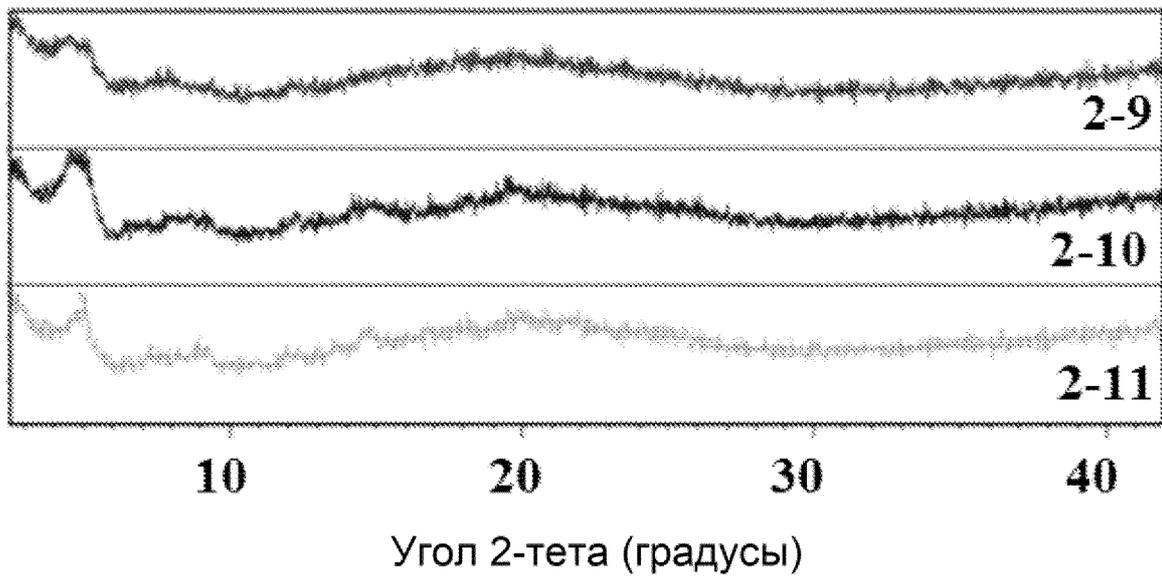
Фиг. 6А



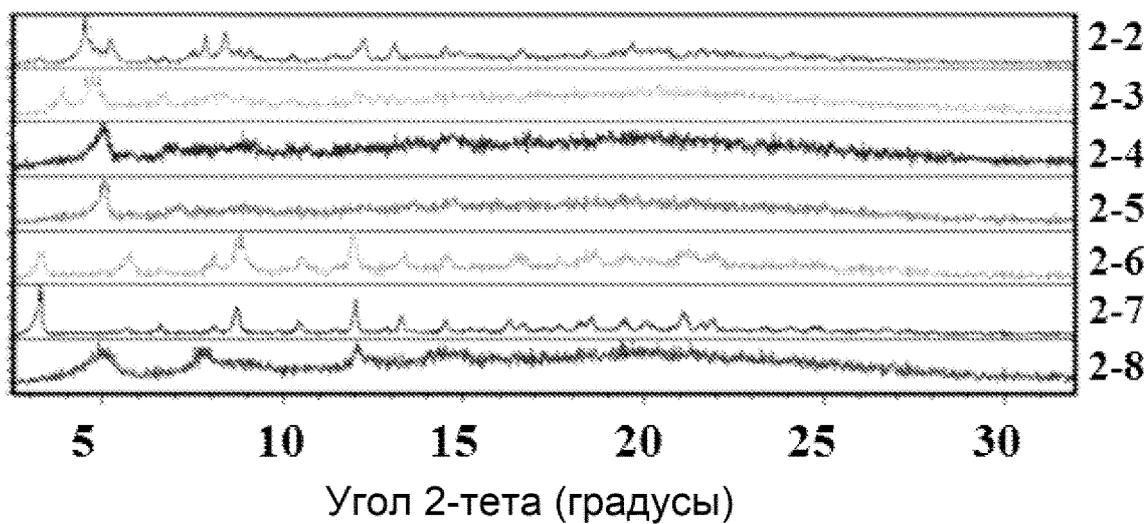
Фиг. 6В



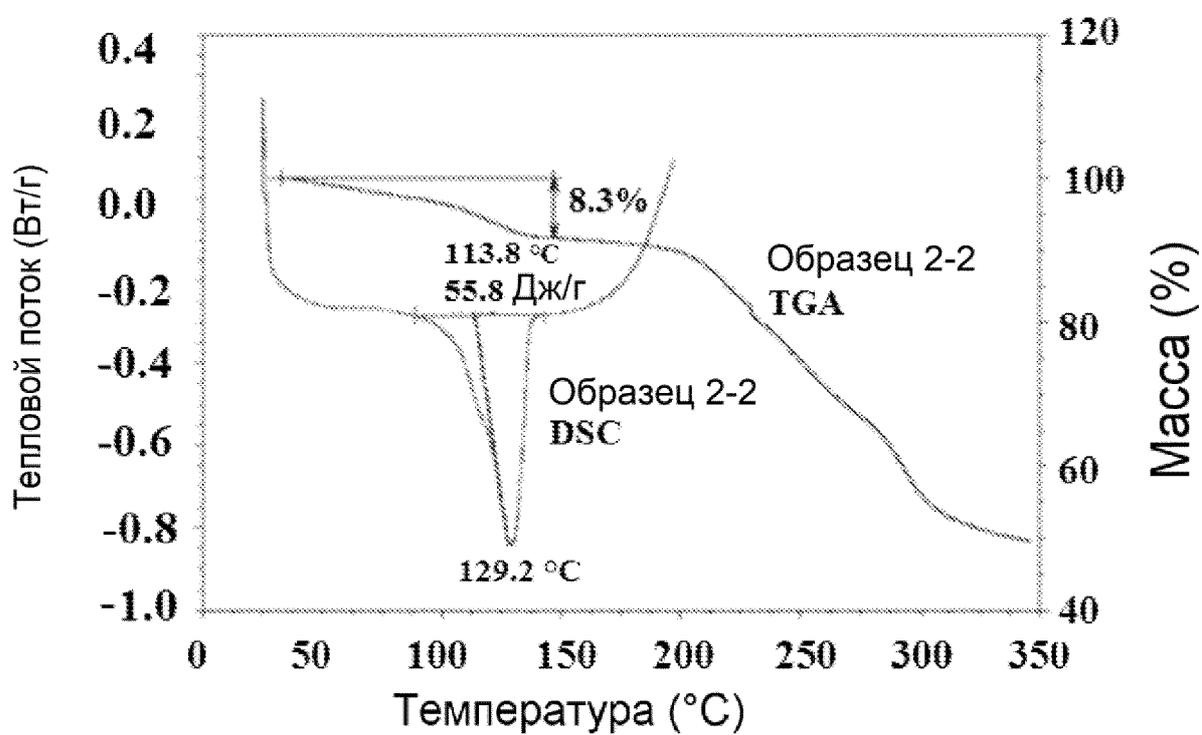
Фиг. 7А



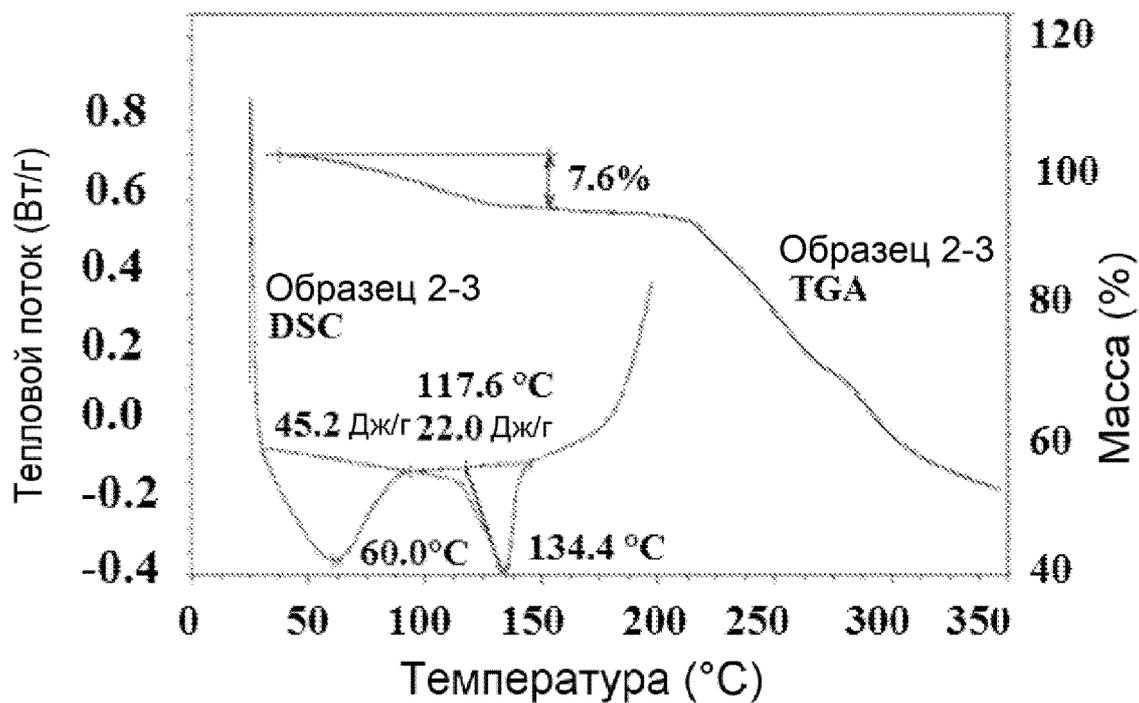
Фиг. 7В



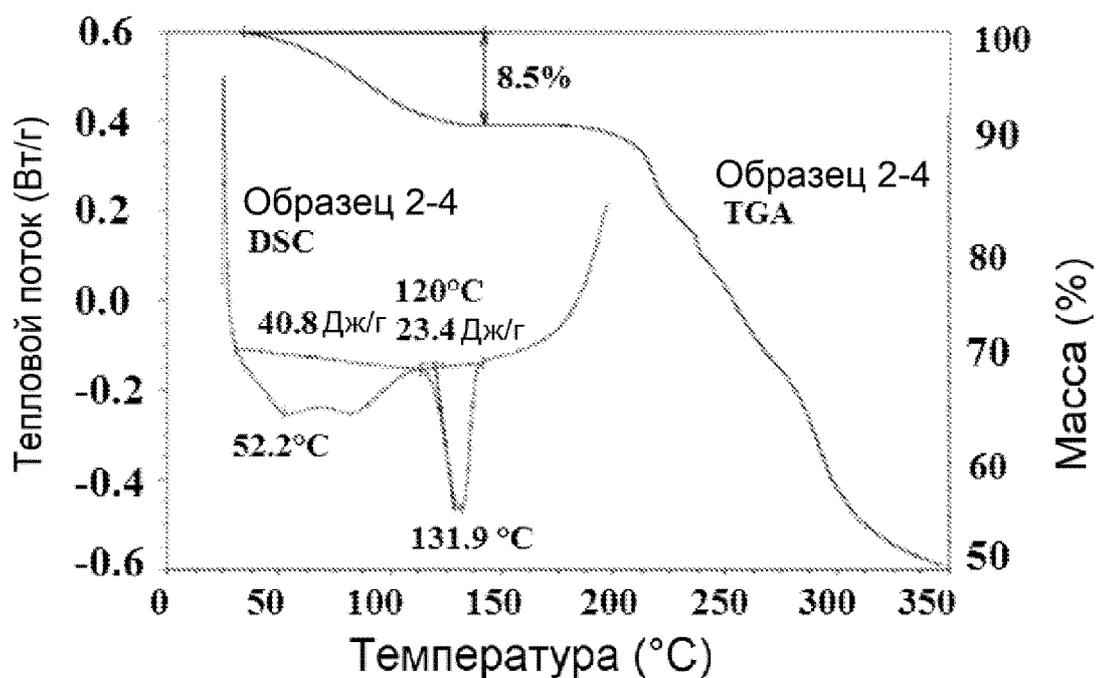
Фиг. 8А



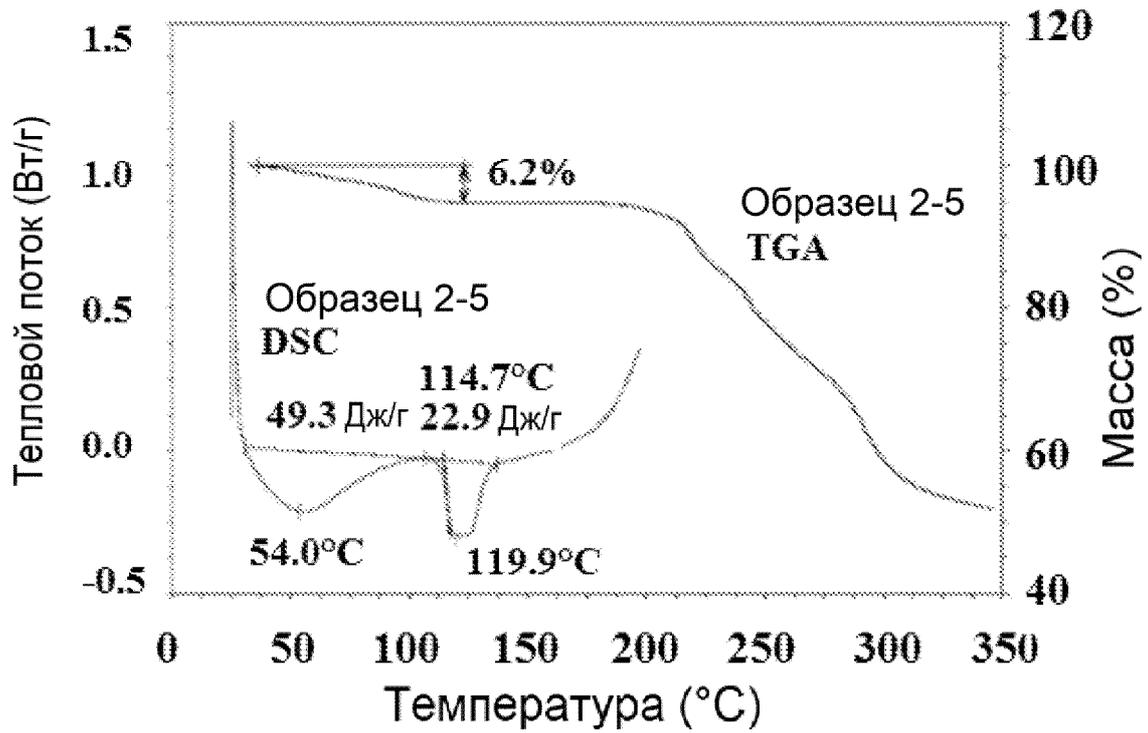
Фиг. 8В



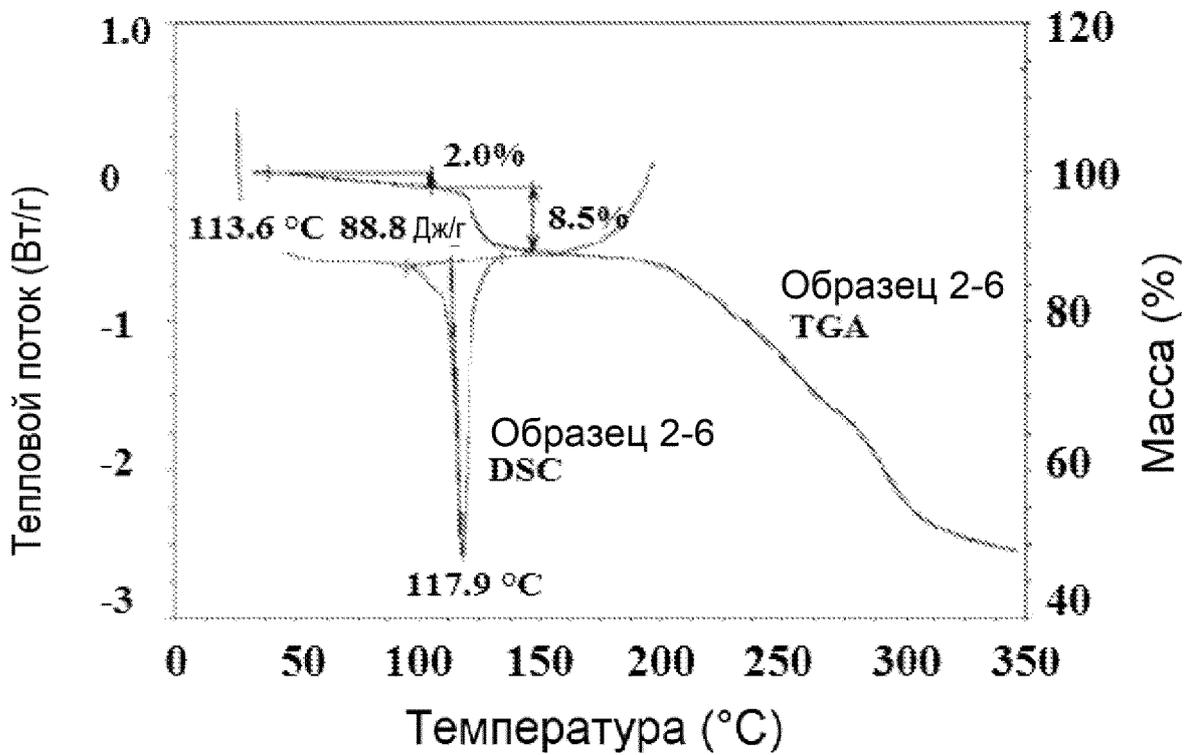
Фиг. 9А



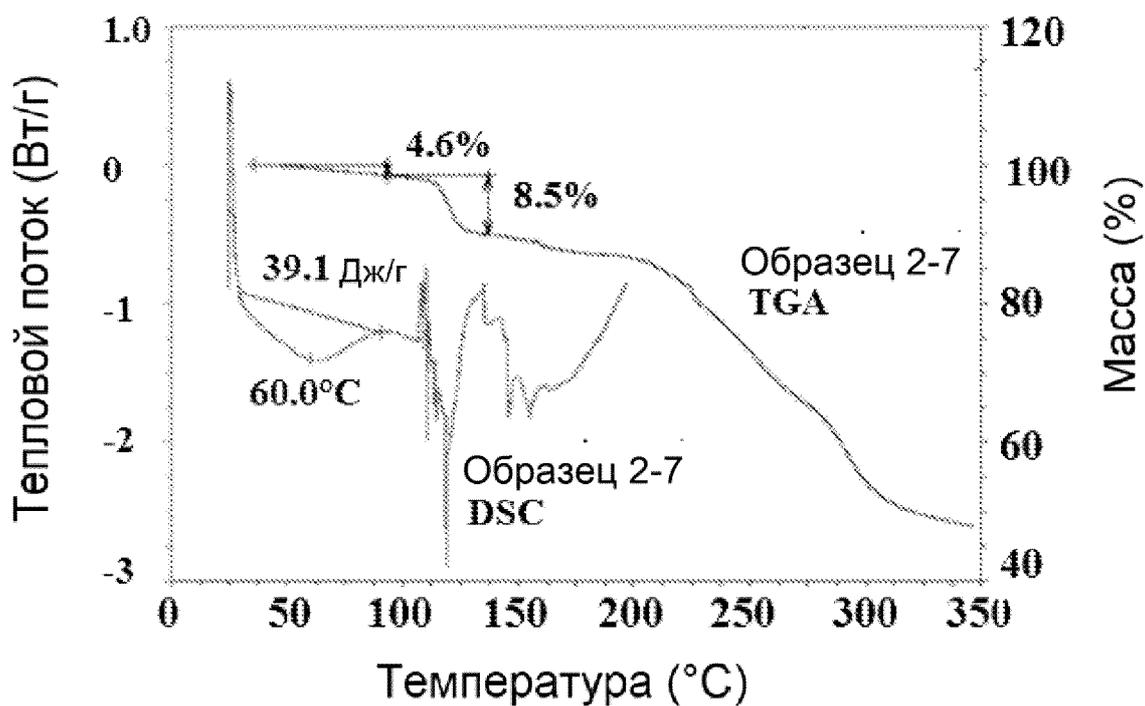
Фиг. 9В



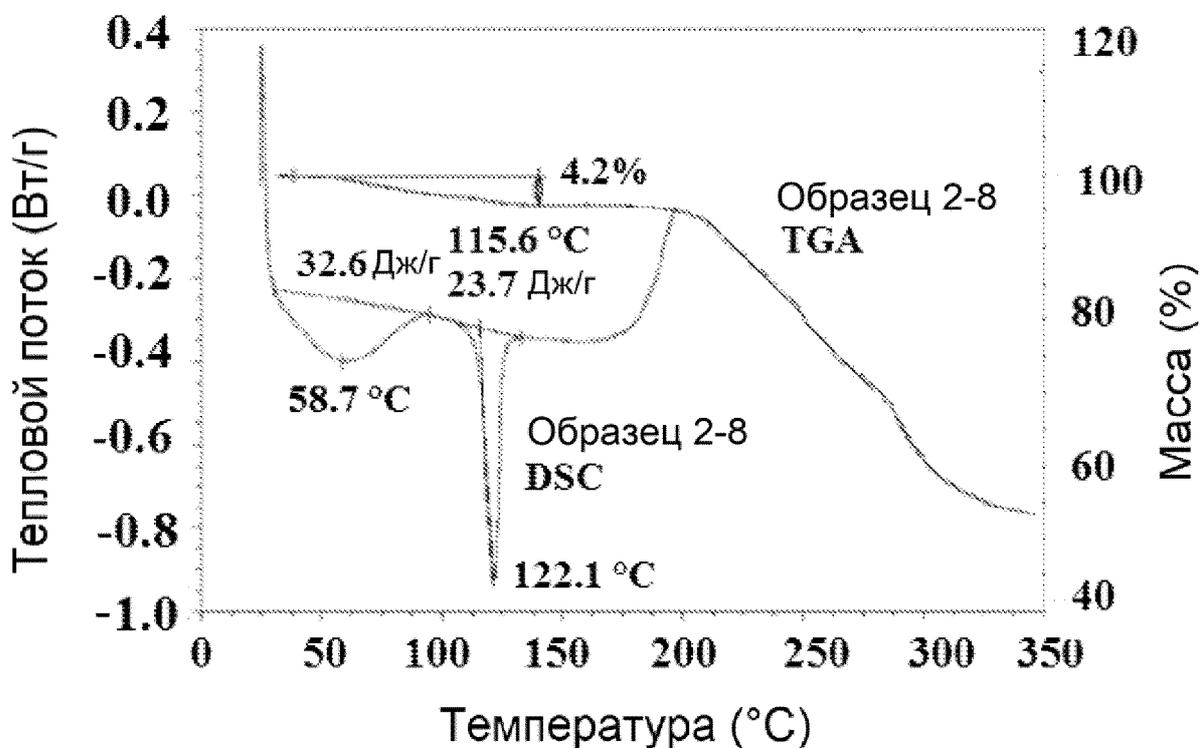
Фиг. 10А



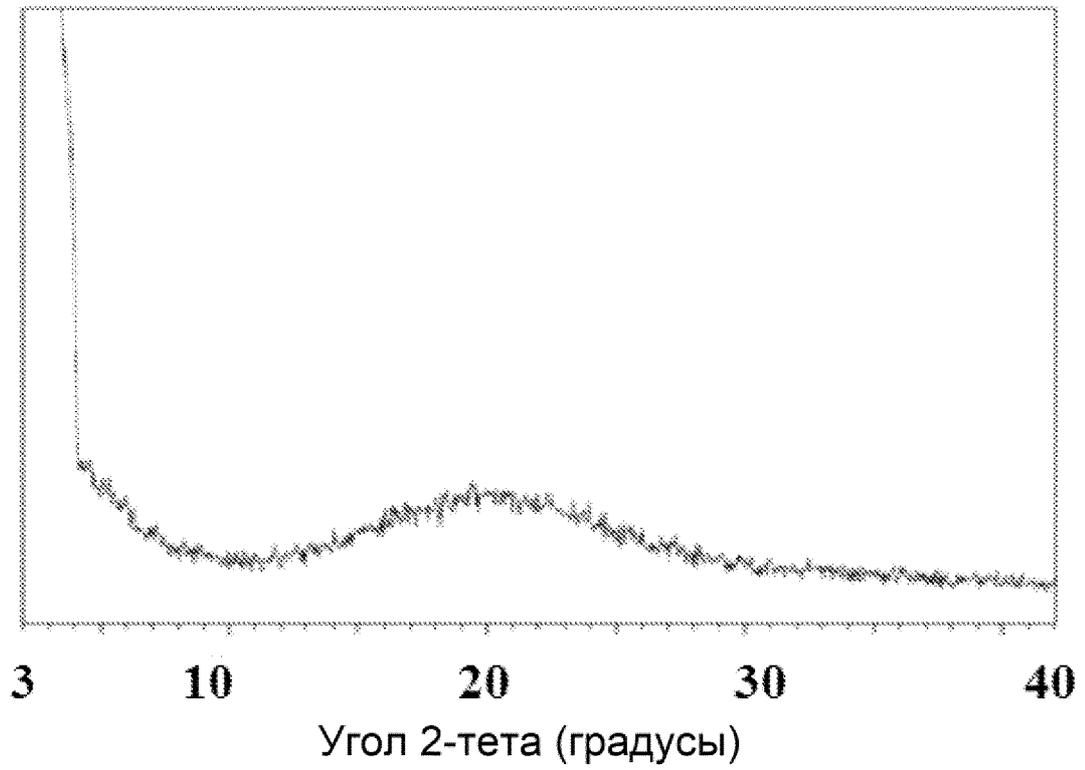
Фиг. 10В



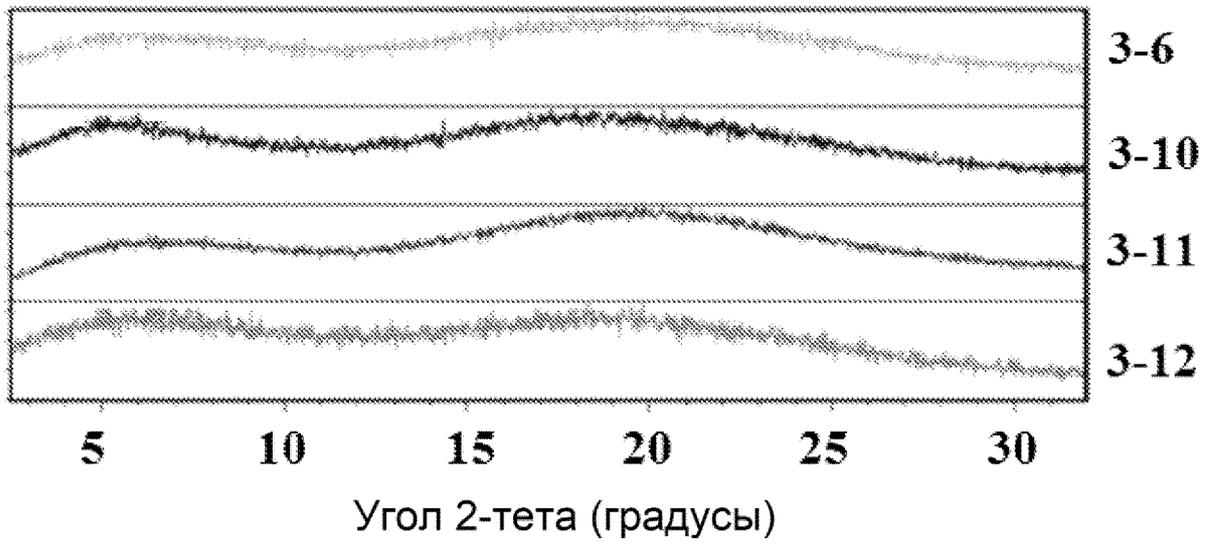
Фиг. 11А



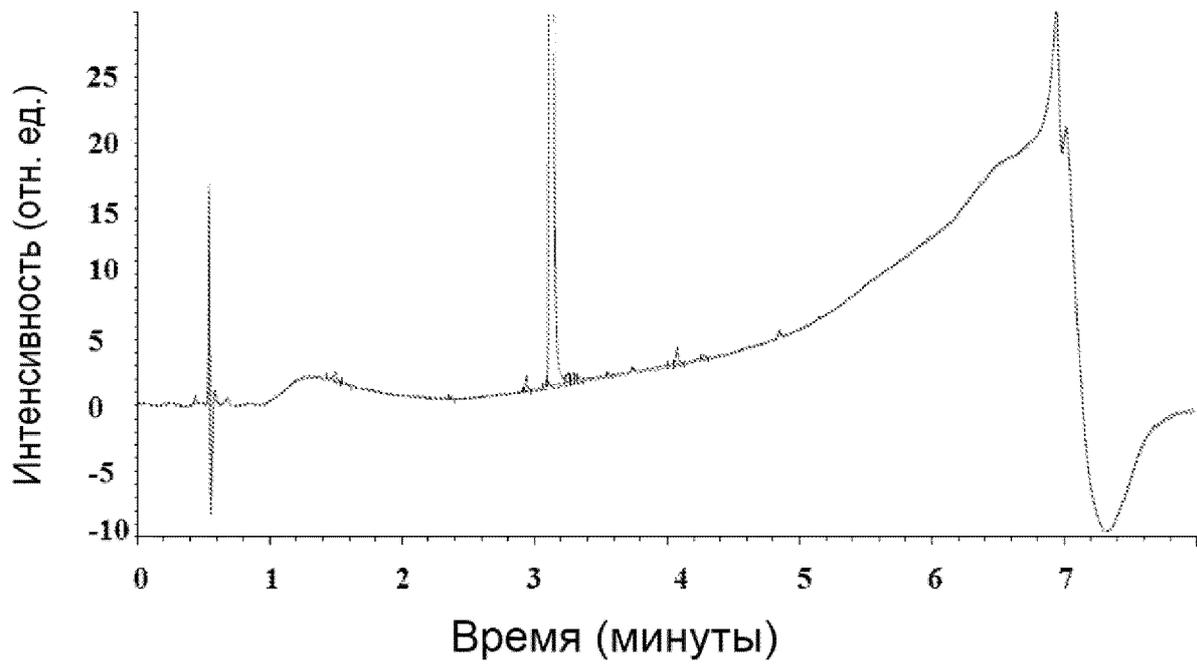
Фиг. 11В



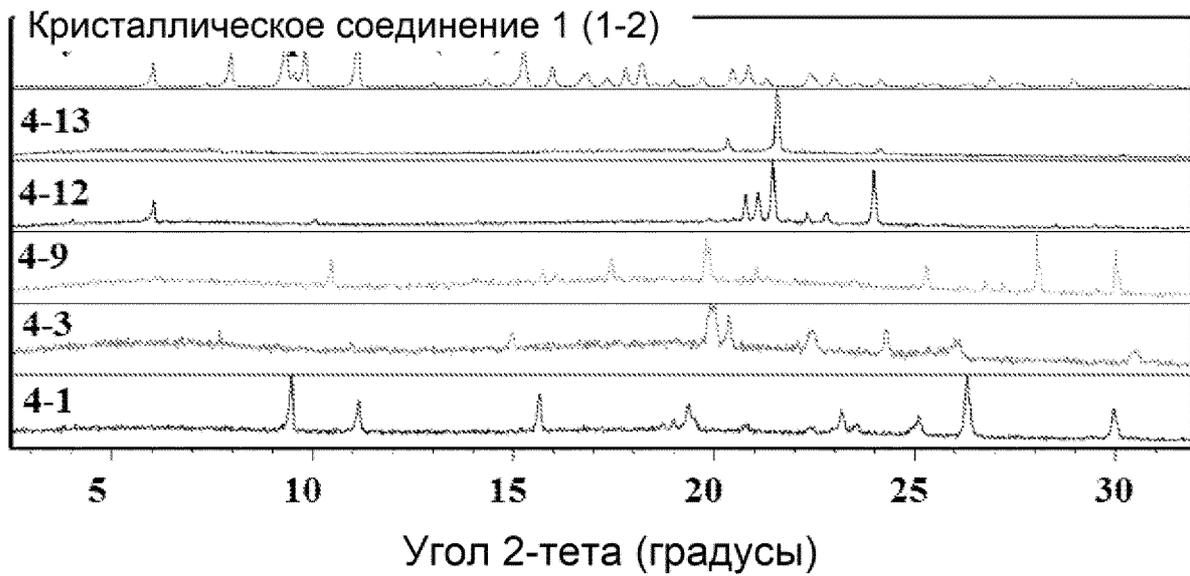
Фиг. 12А



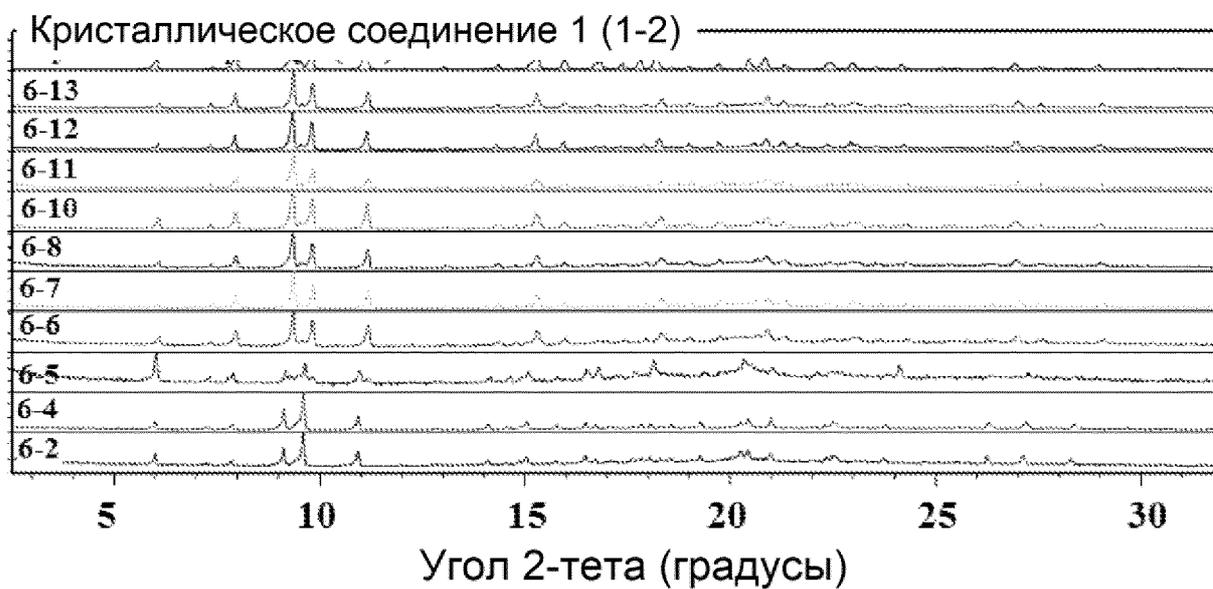
Фиг. 12В



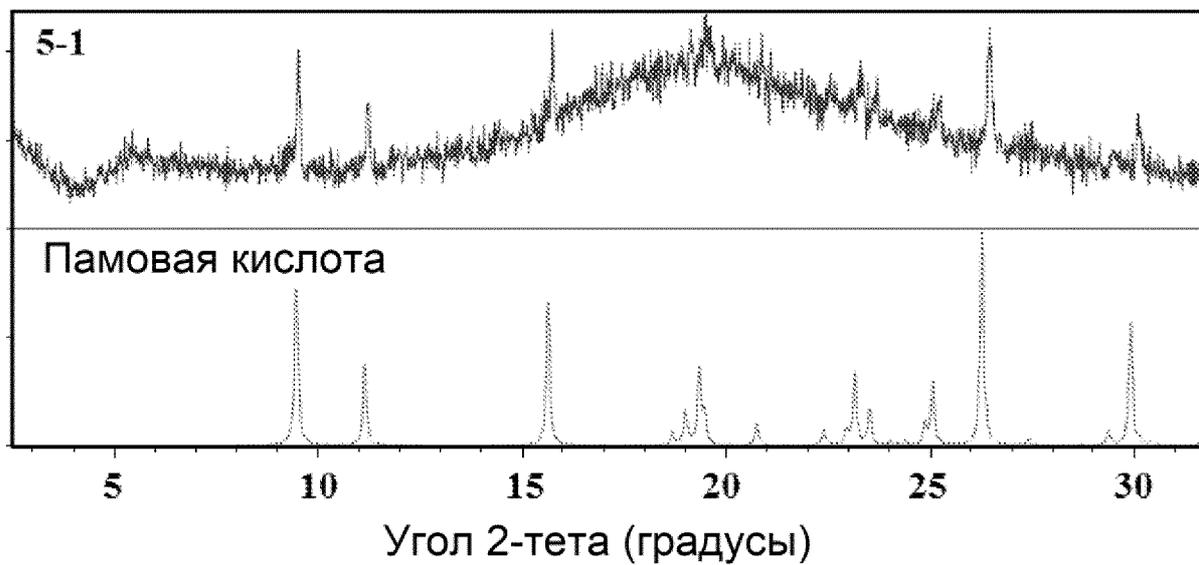
Фиг. 13А



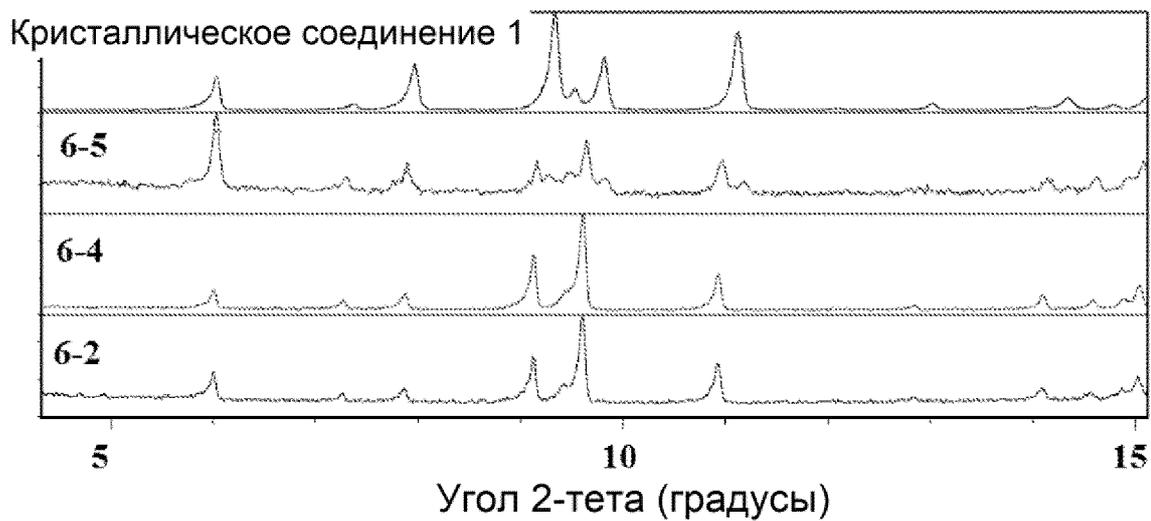
Фиг. 13В



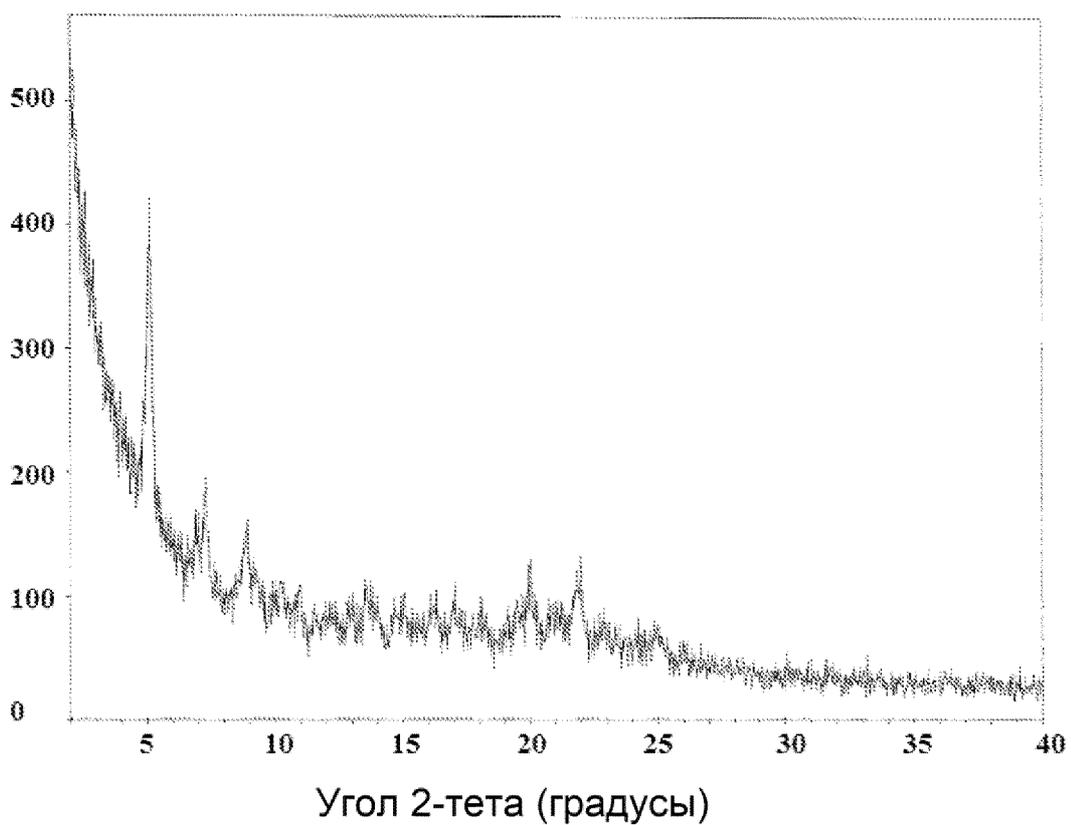
Фиг. 14А



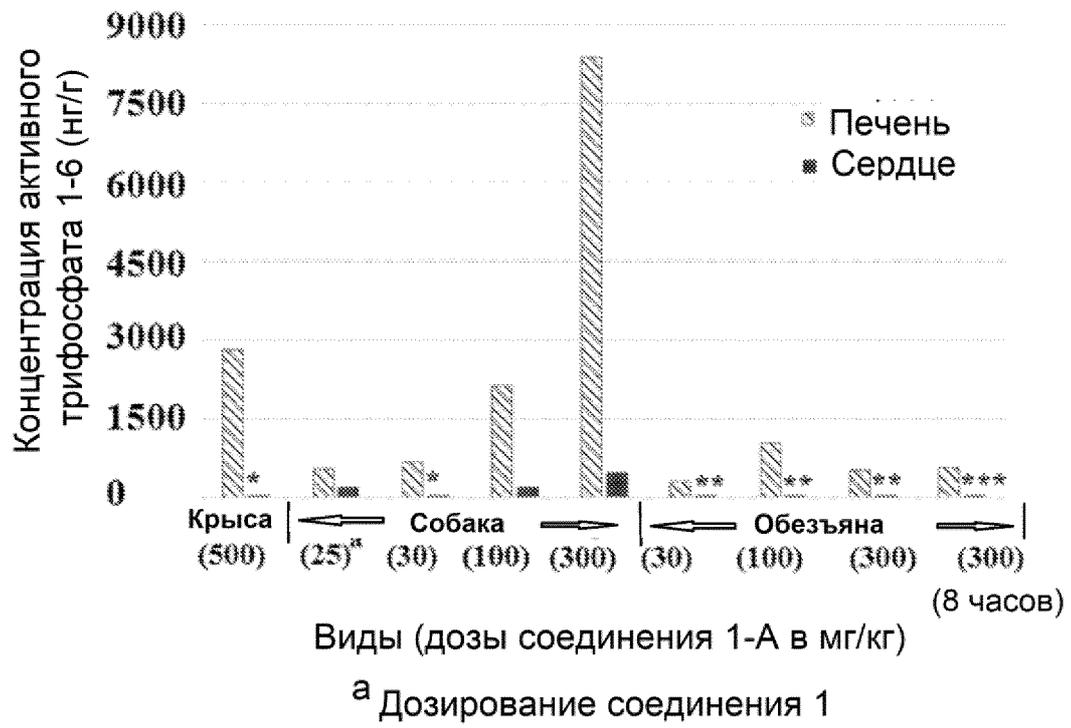
Фиг. 14В



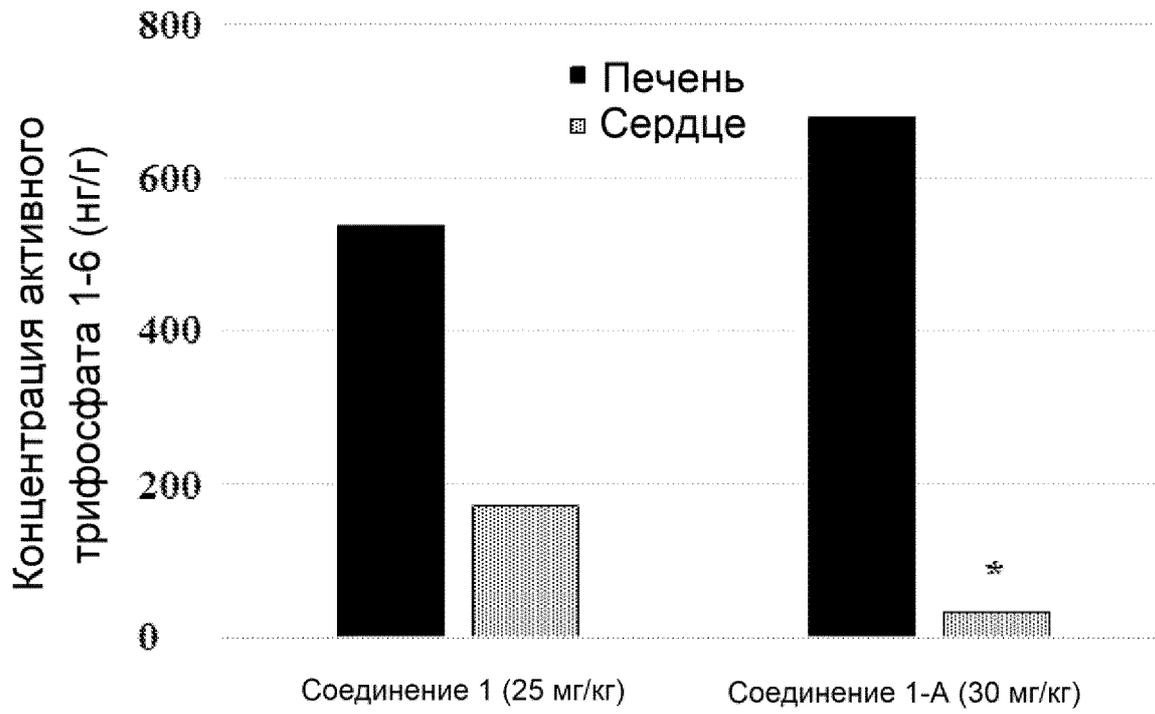
Фиг. 15А



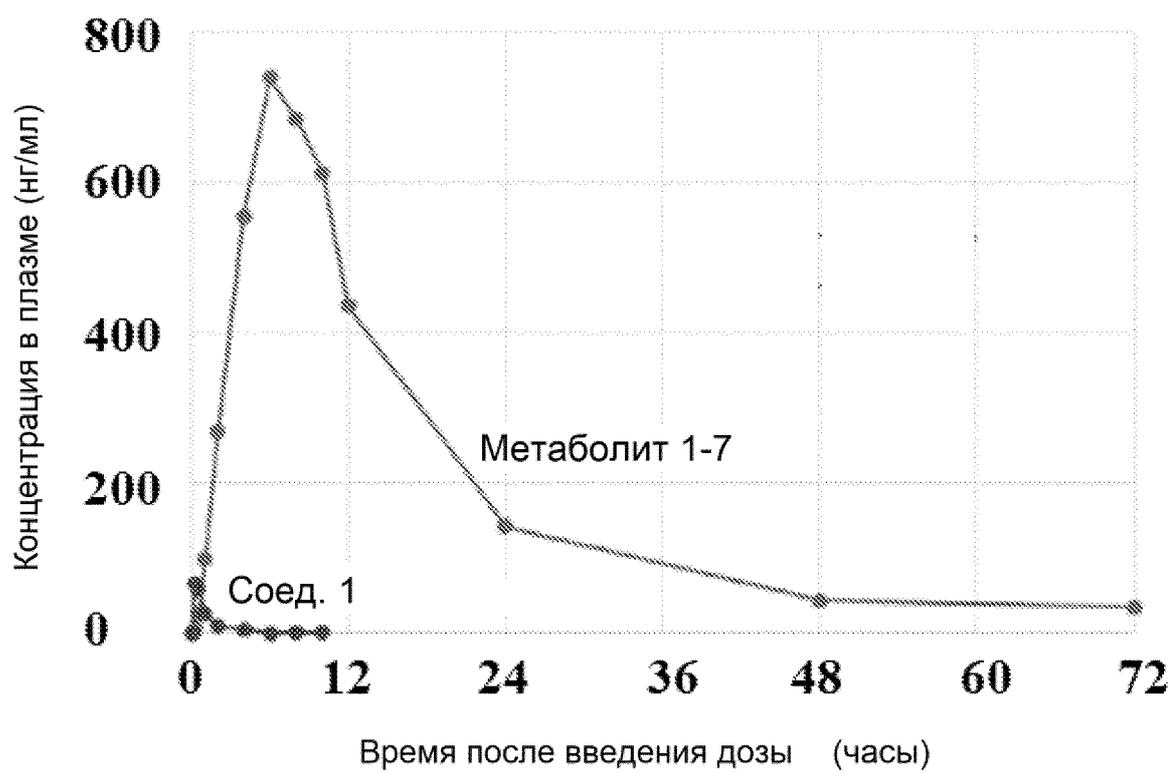
Фиг. 15В



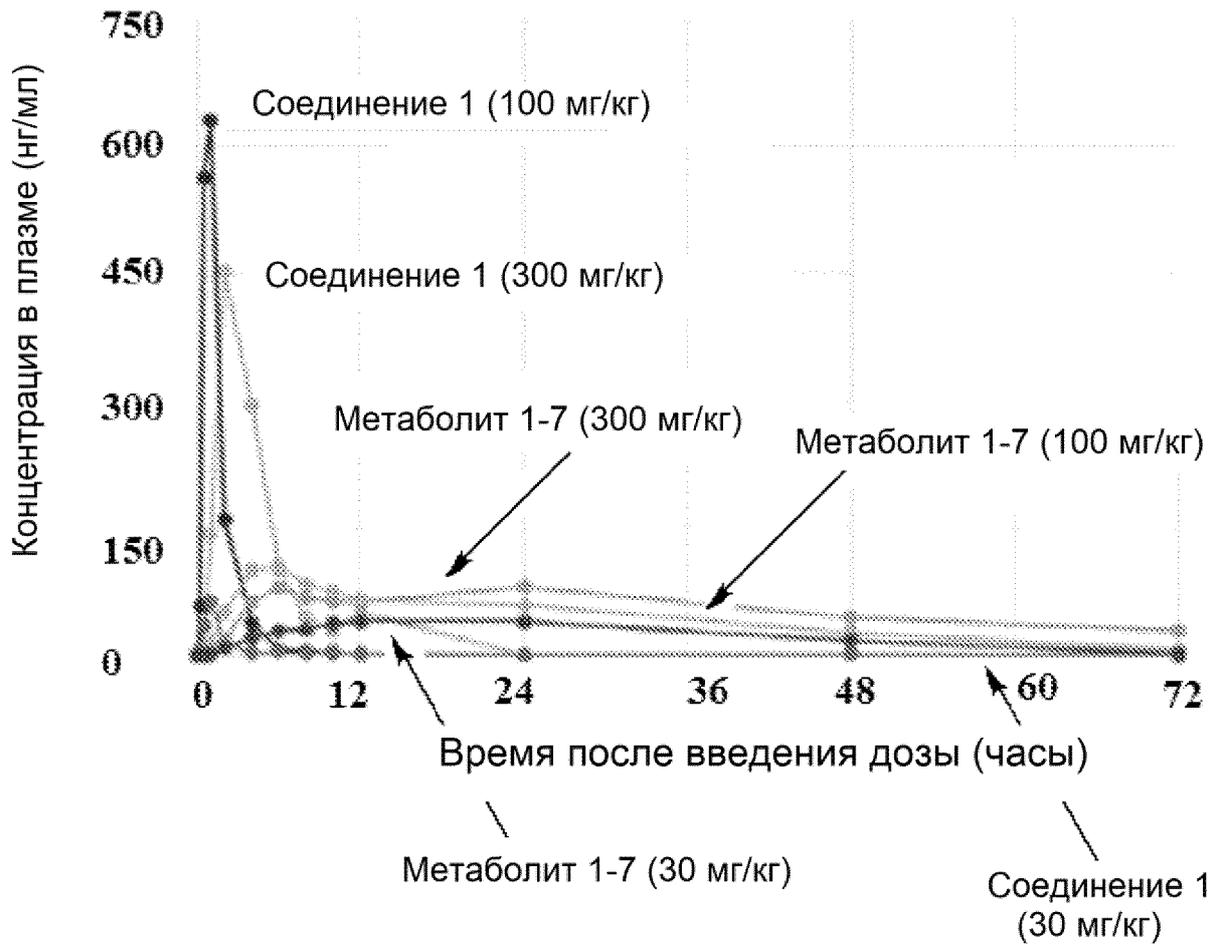
Фиг. 16А



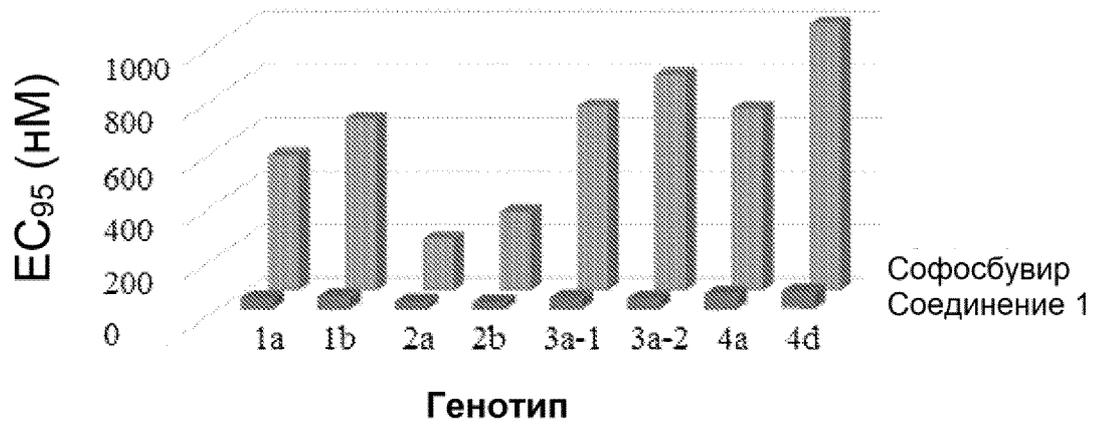
Фиг. 16В



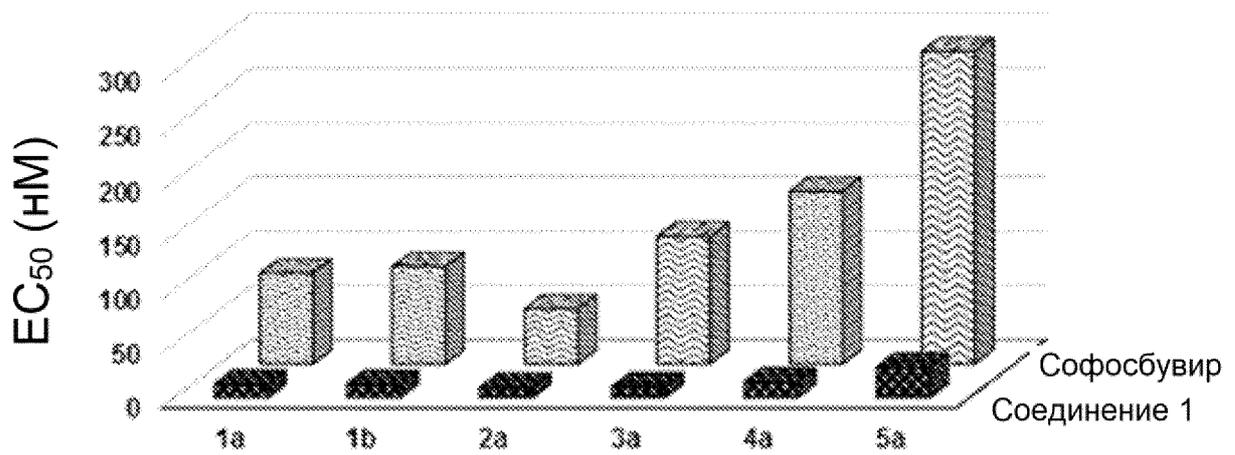
Фиг. 17



Фиг. 18

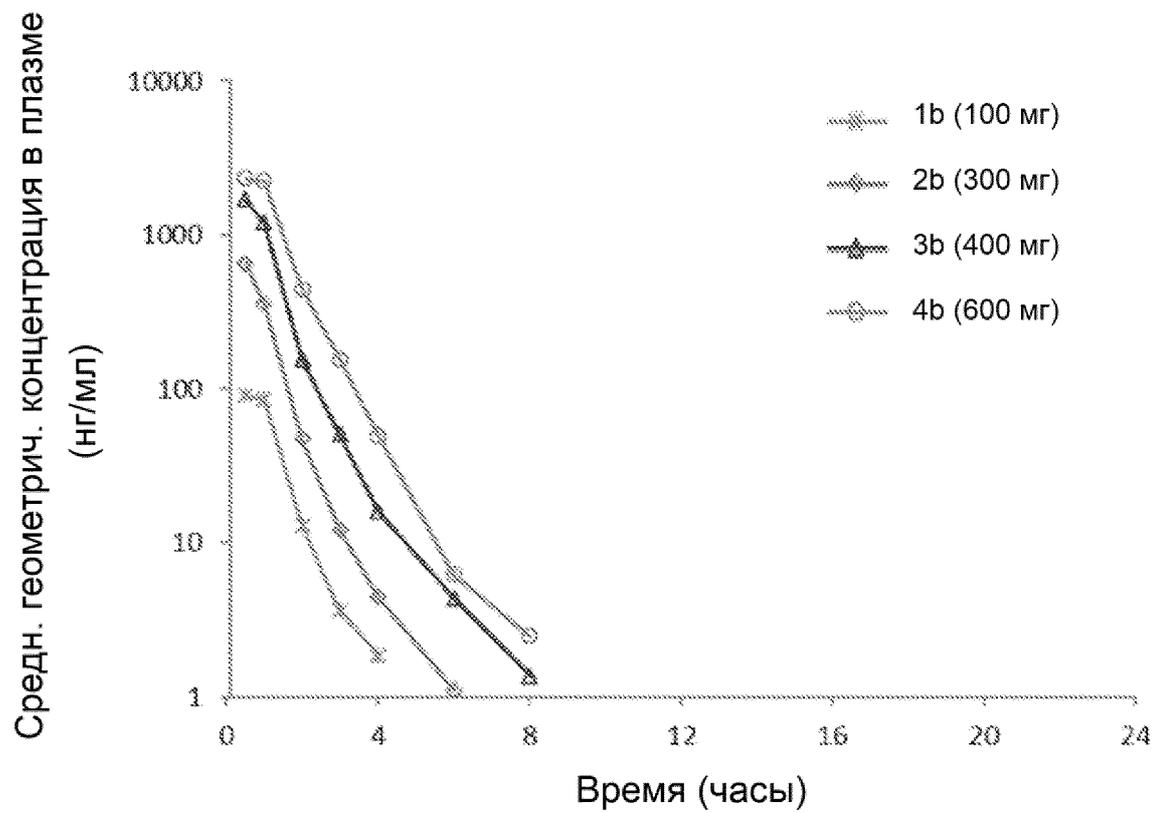


Фиг. 19



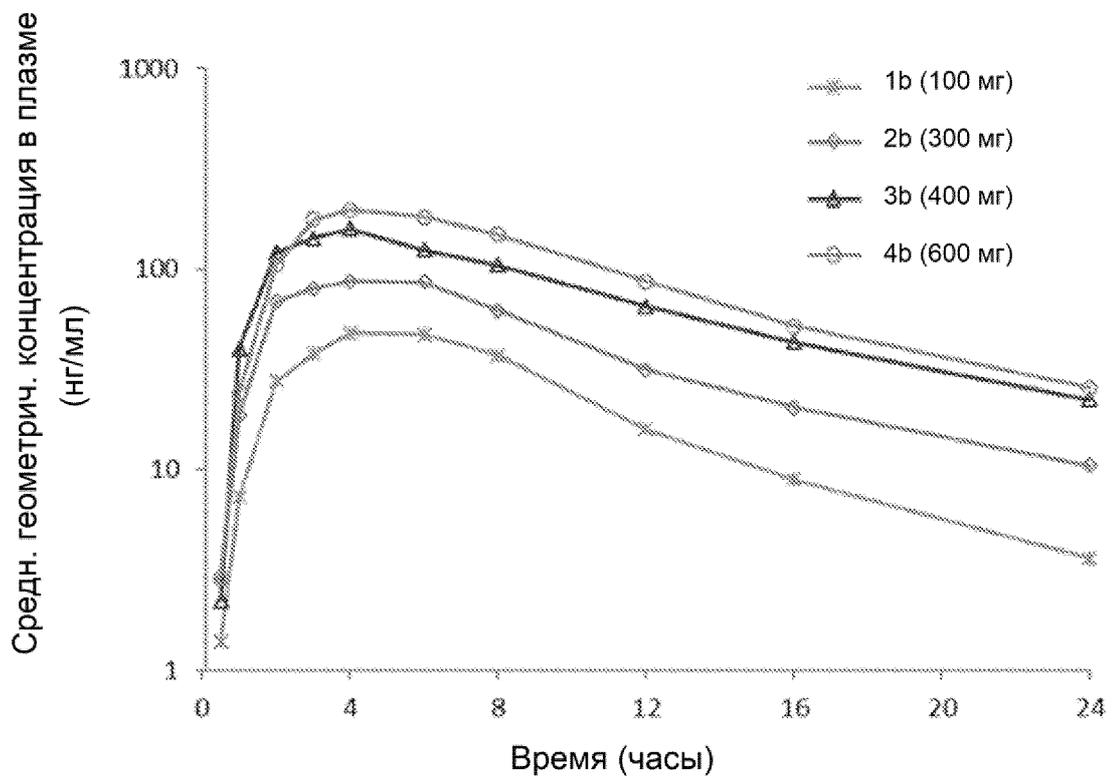
Фиг. 20

Фармакокинетика соединения 1 в плазме

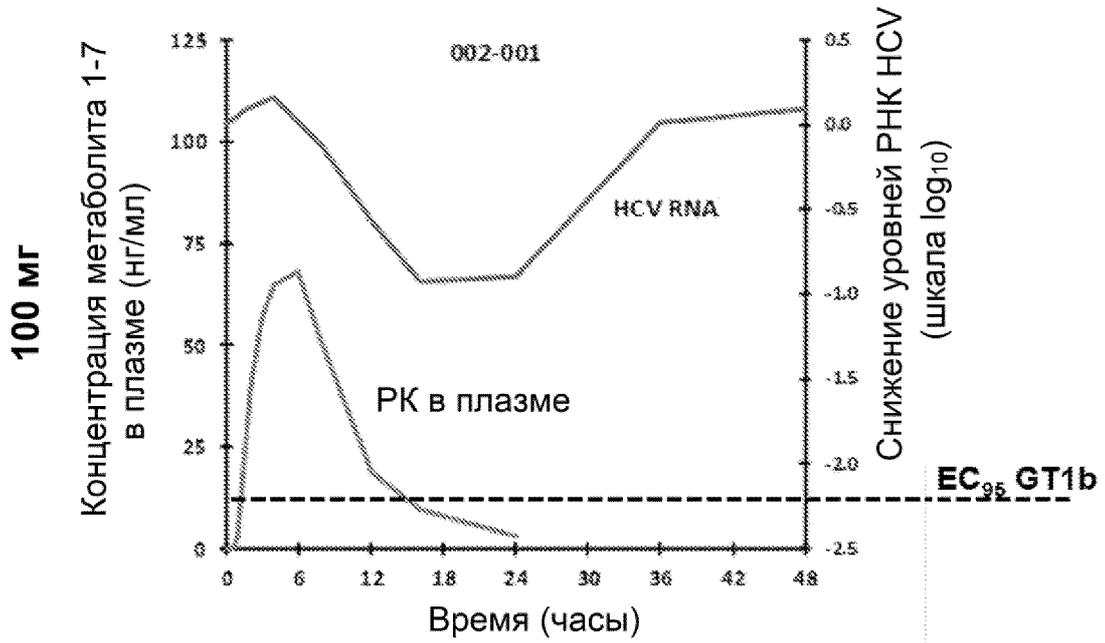


Фиг. 21

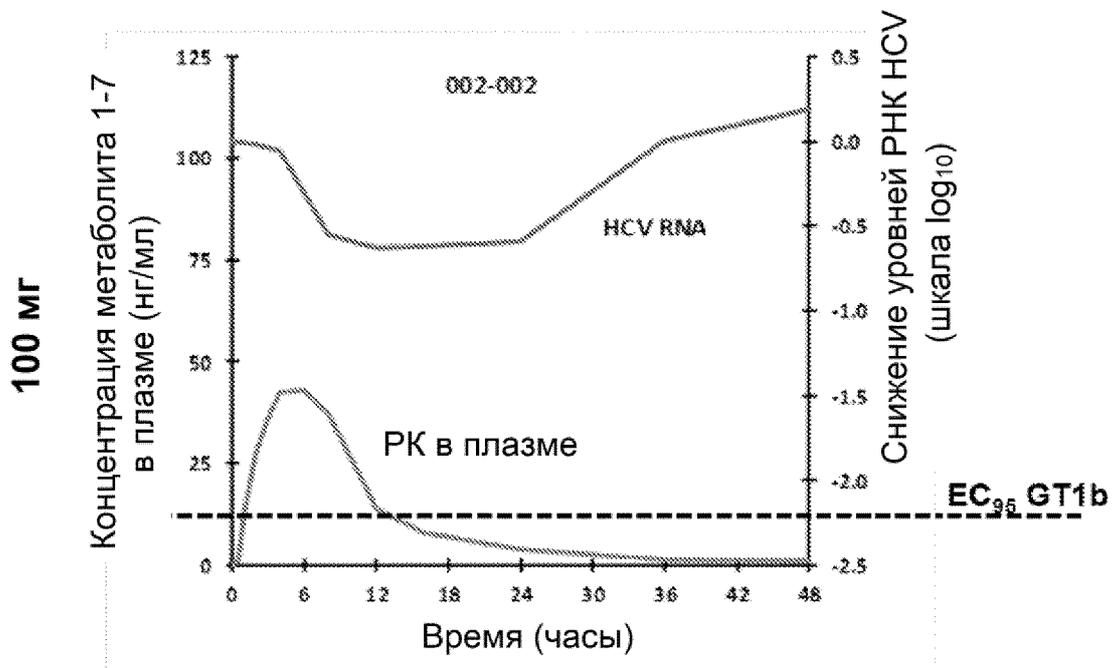
Фармакокинетика метаболита 1-7 в плазме



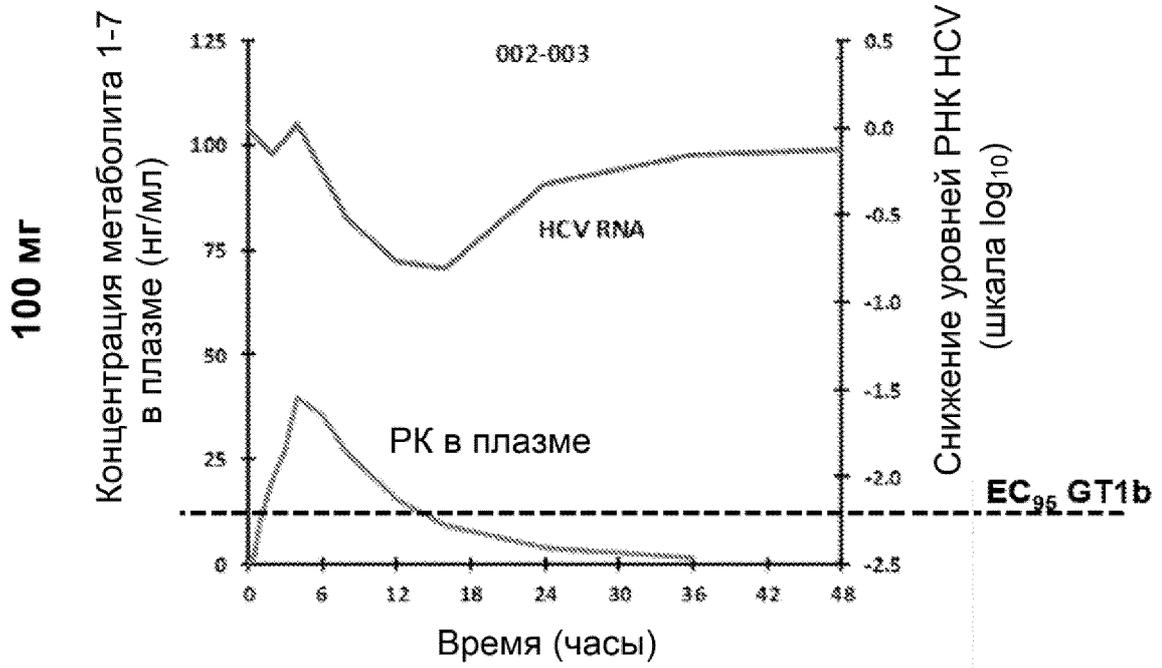
Фиг. 22



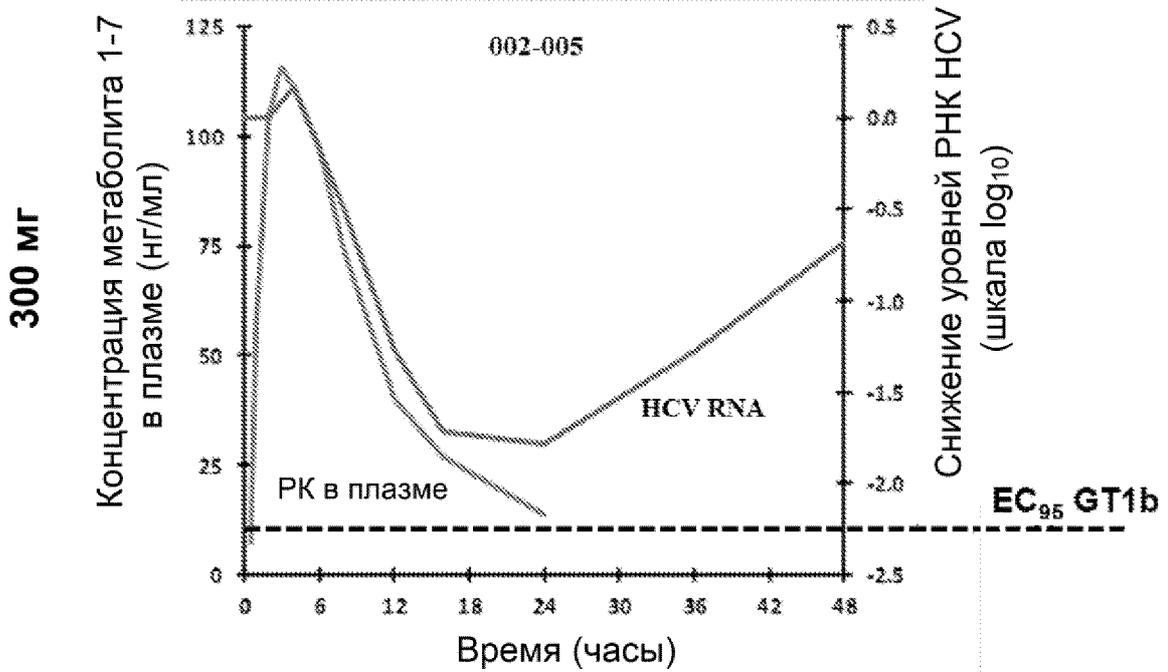
Фиг. 23А



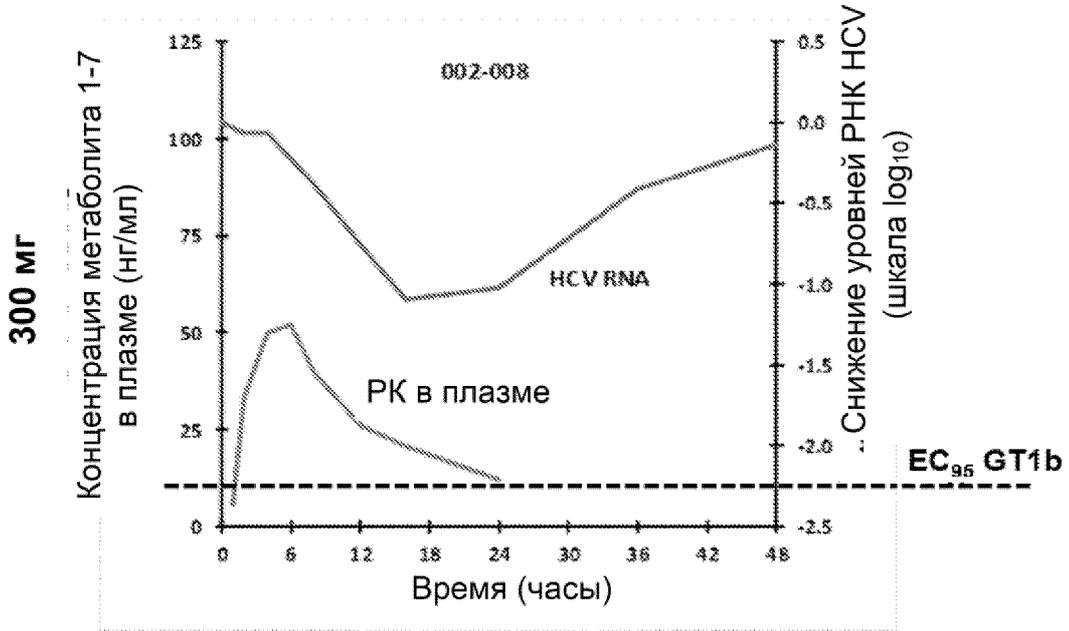
Фиг. 23В



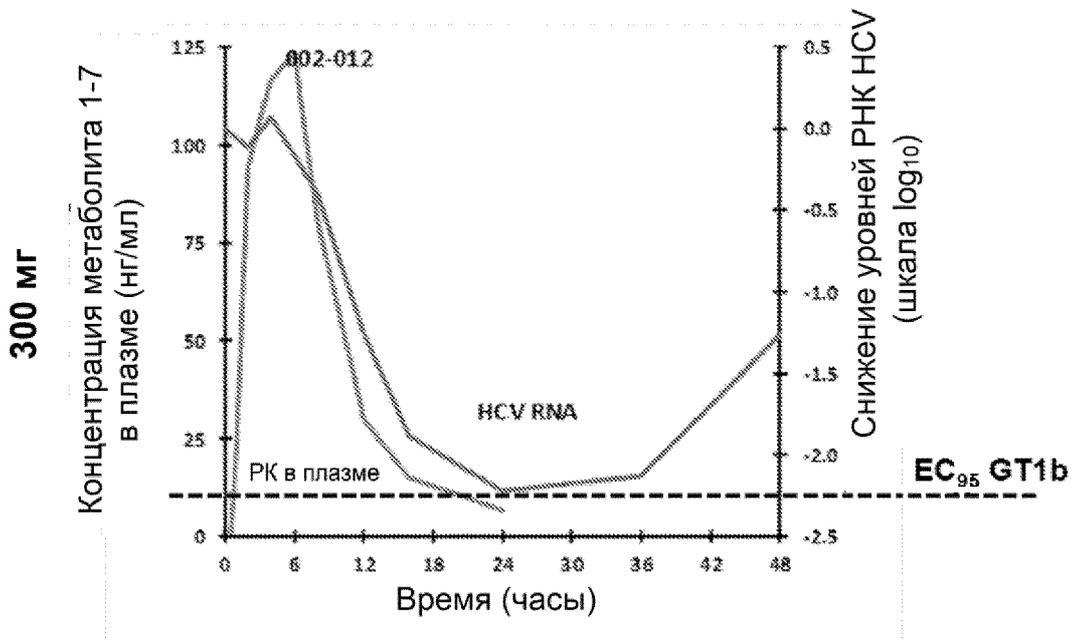
Фиг. 23С



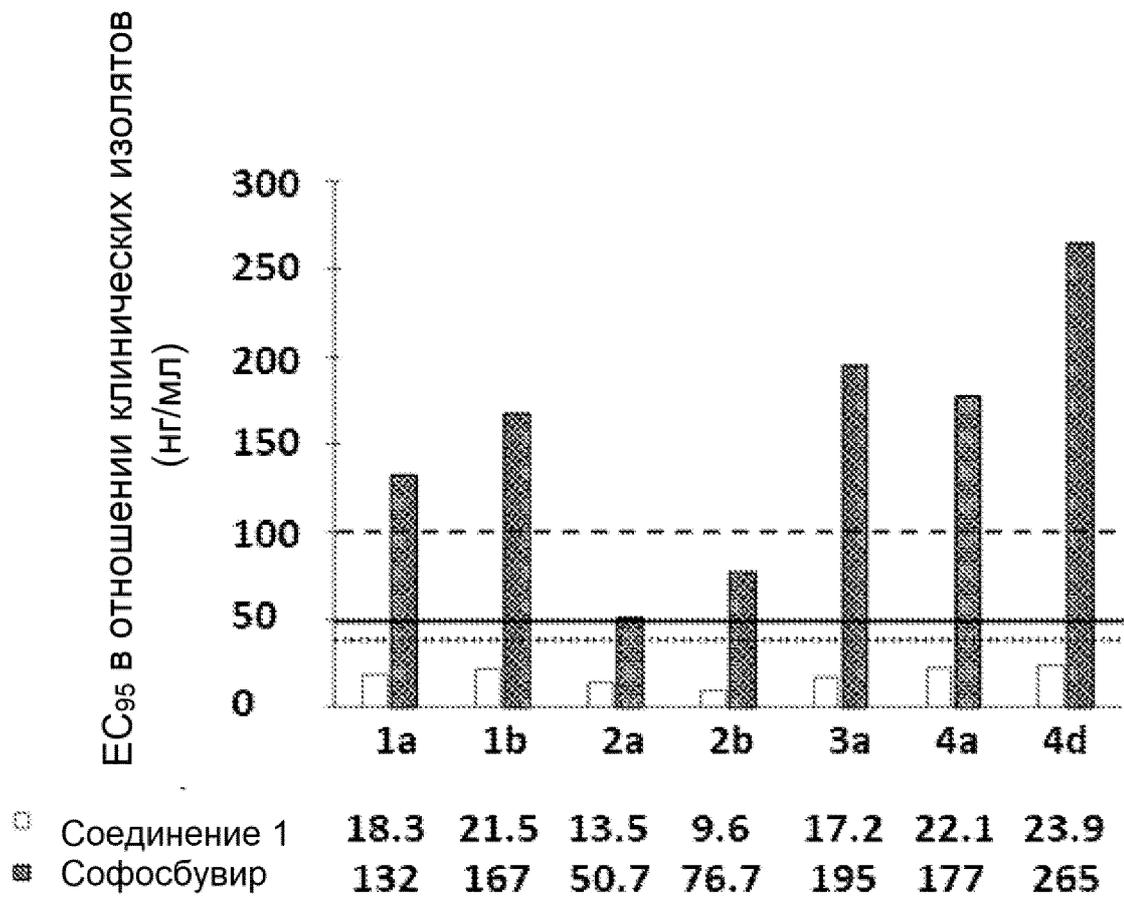
Фиг. 23D



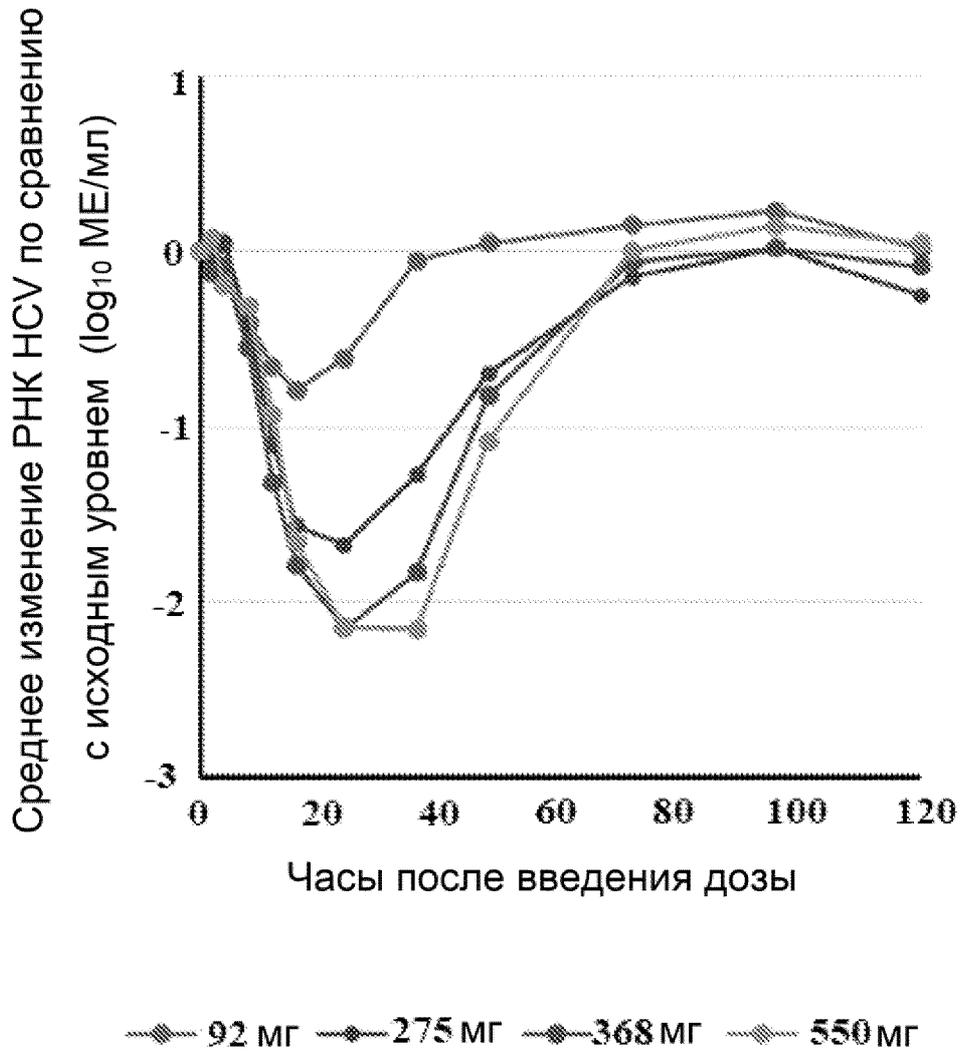
Фиг. 23Е



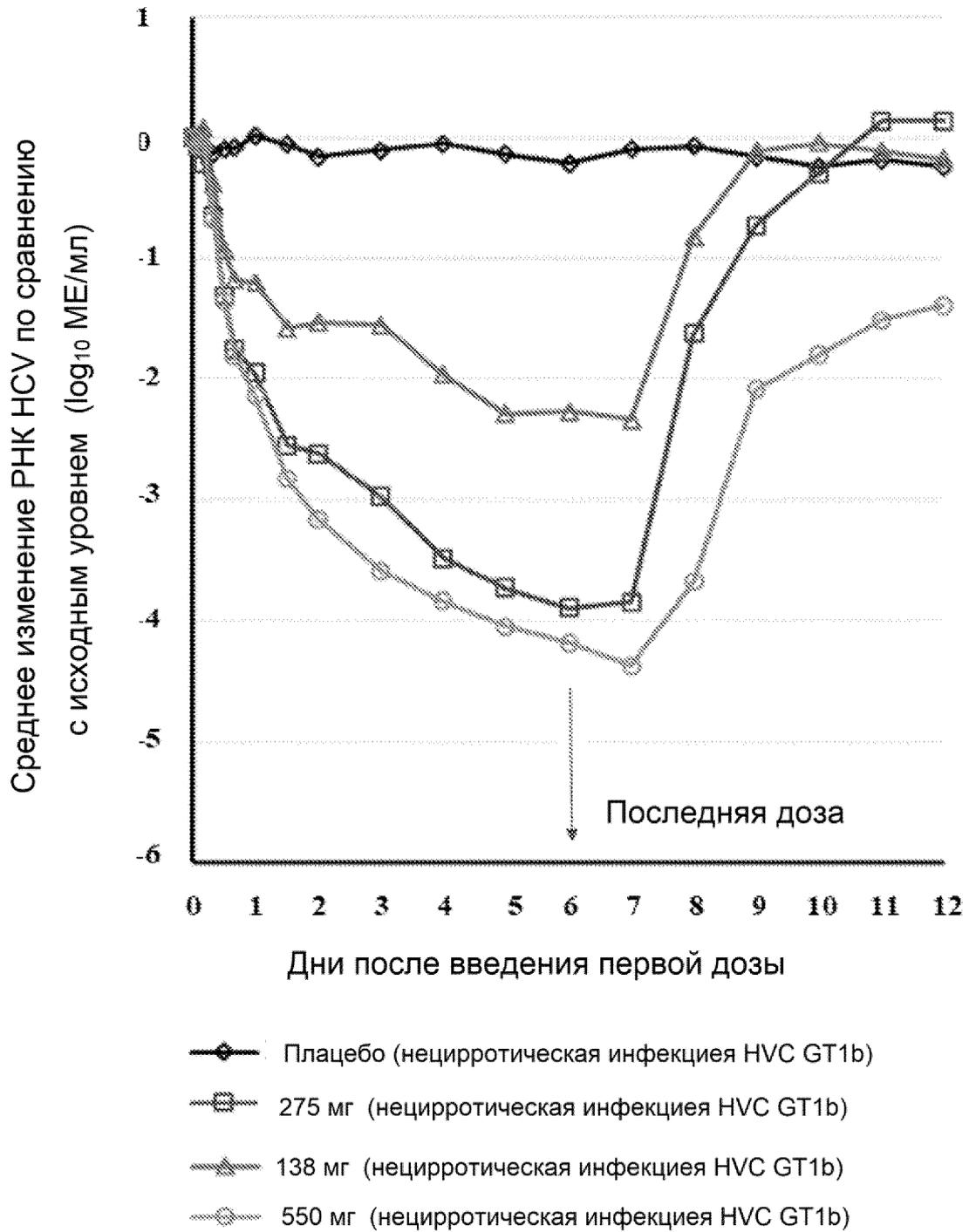
Фиг. 23F



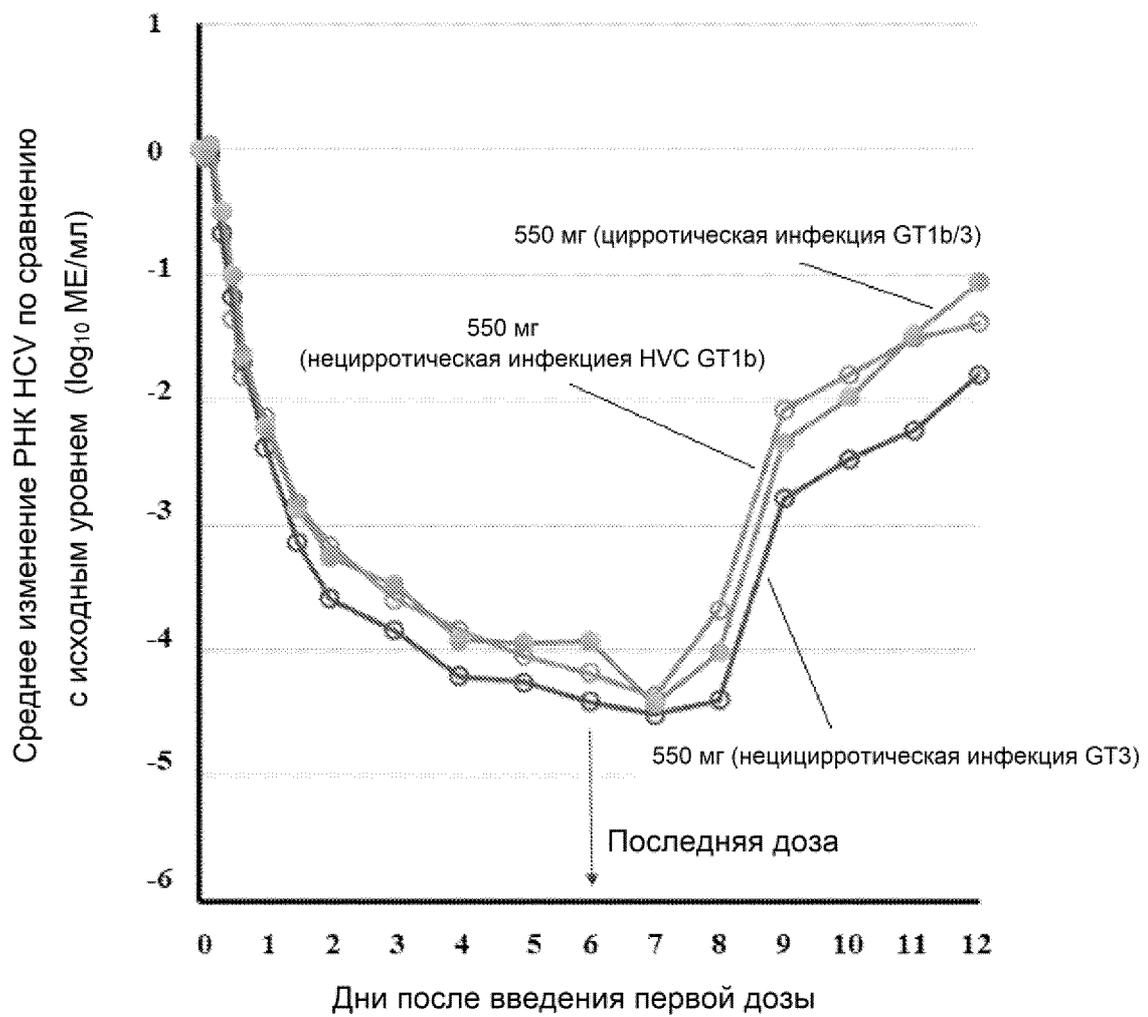
Фиг. 24



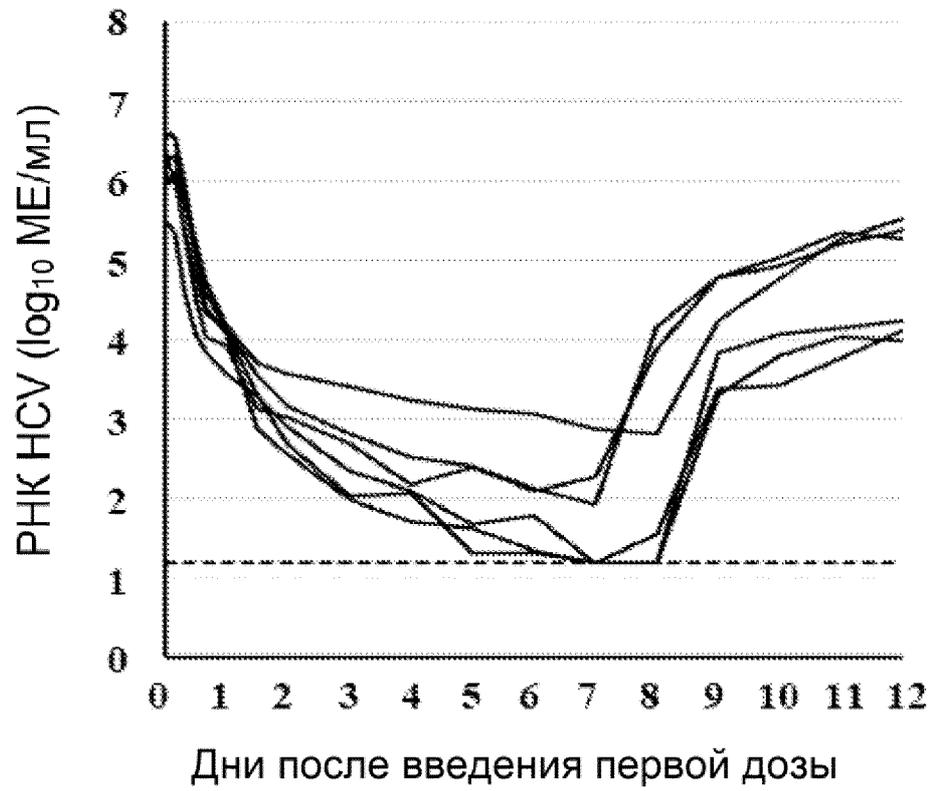
Фиг. 25



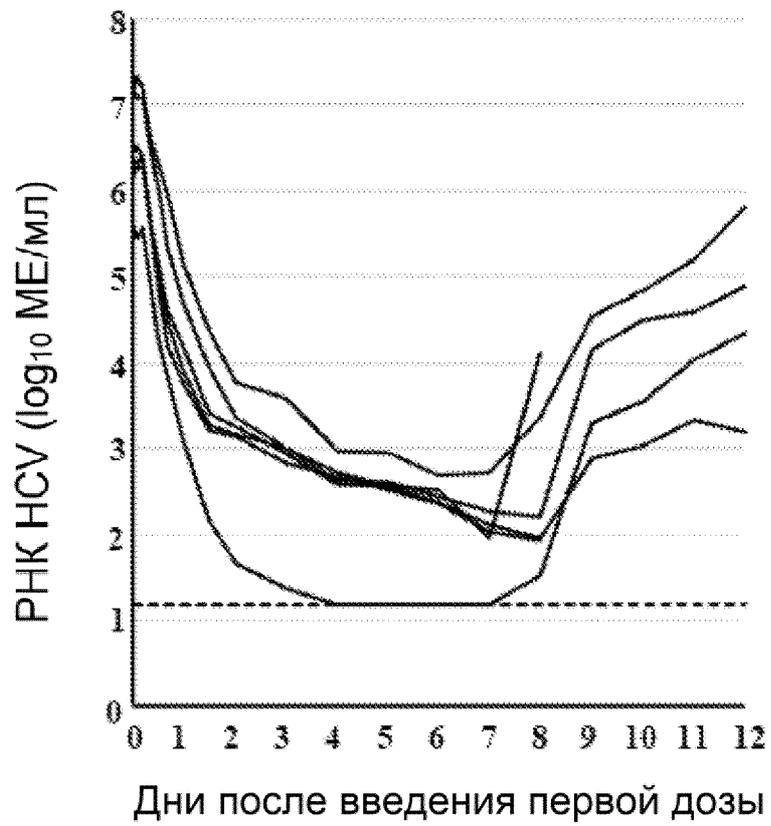
Фиг. 26



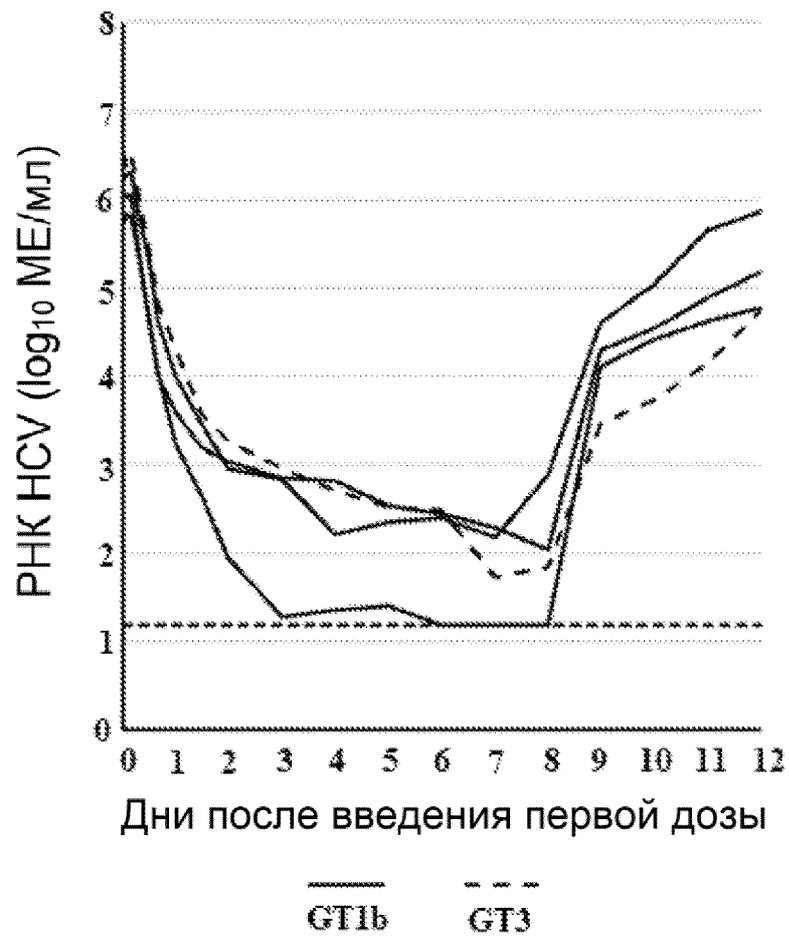
Фиг. 27



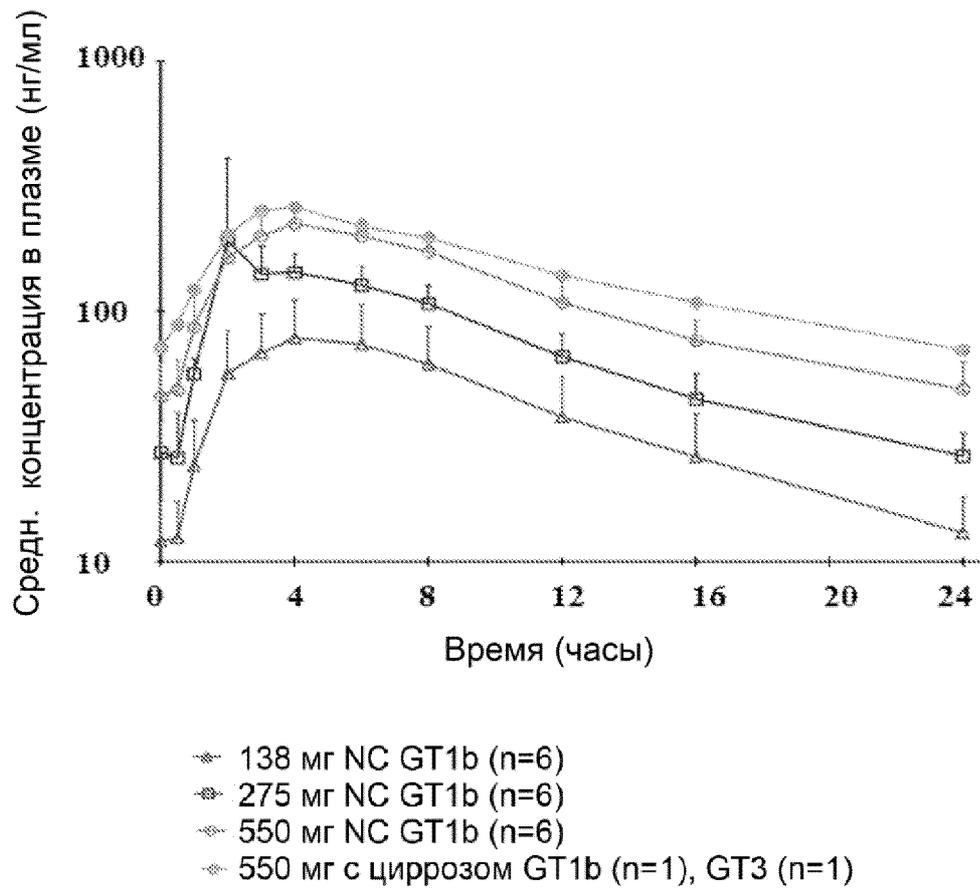
Фиг. 28А



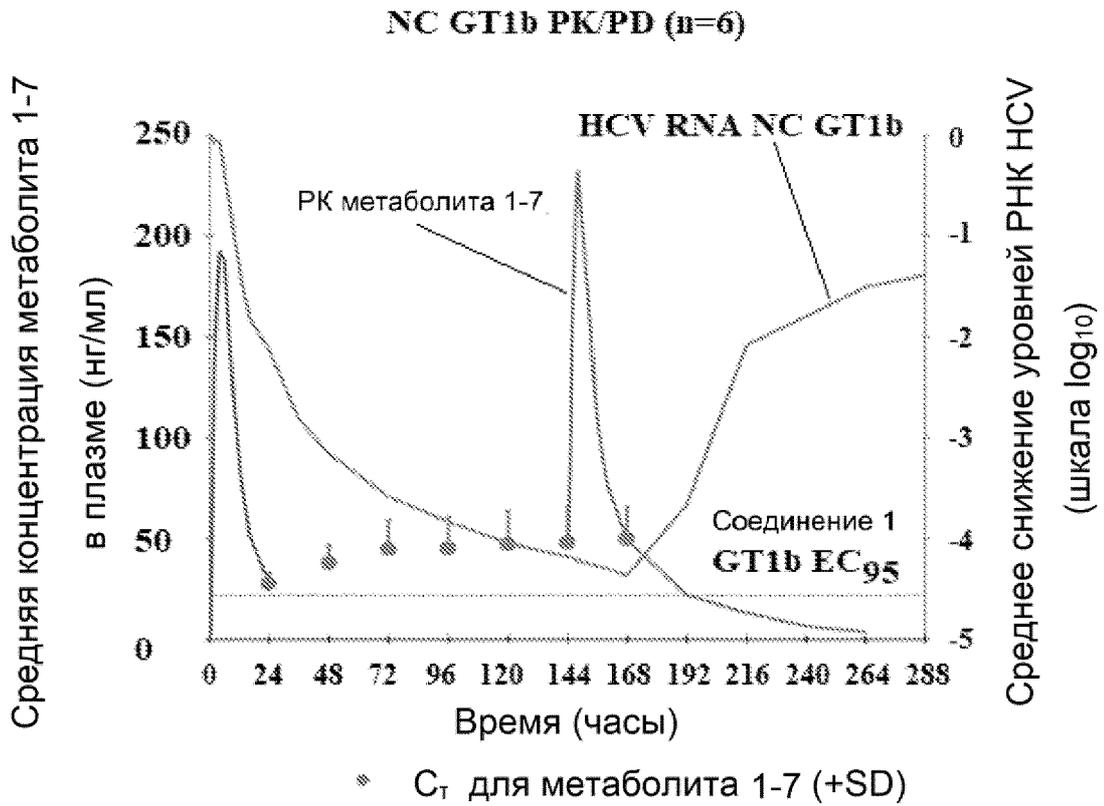
Фиг. 28В



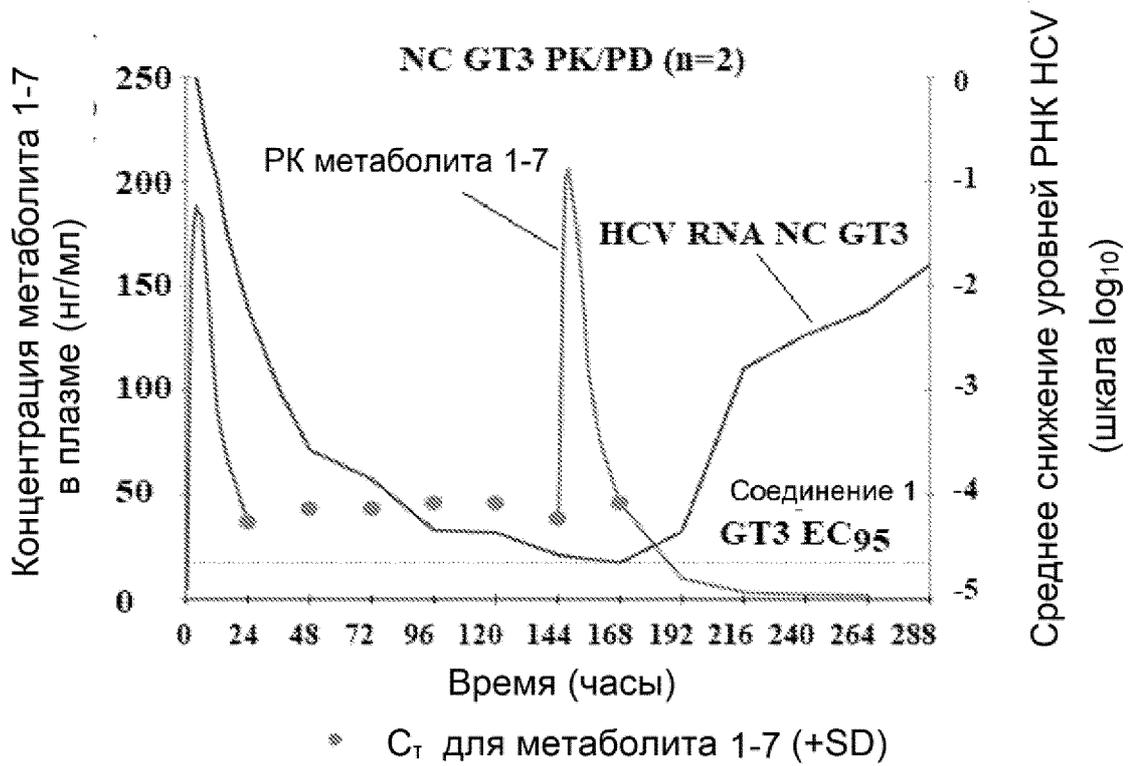
Фиг. 28С



Фиг. 29

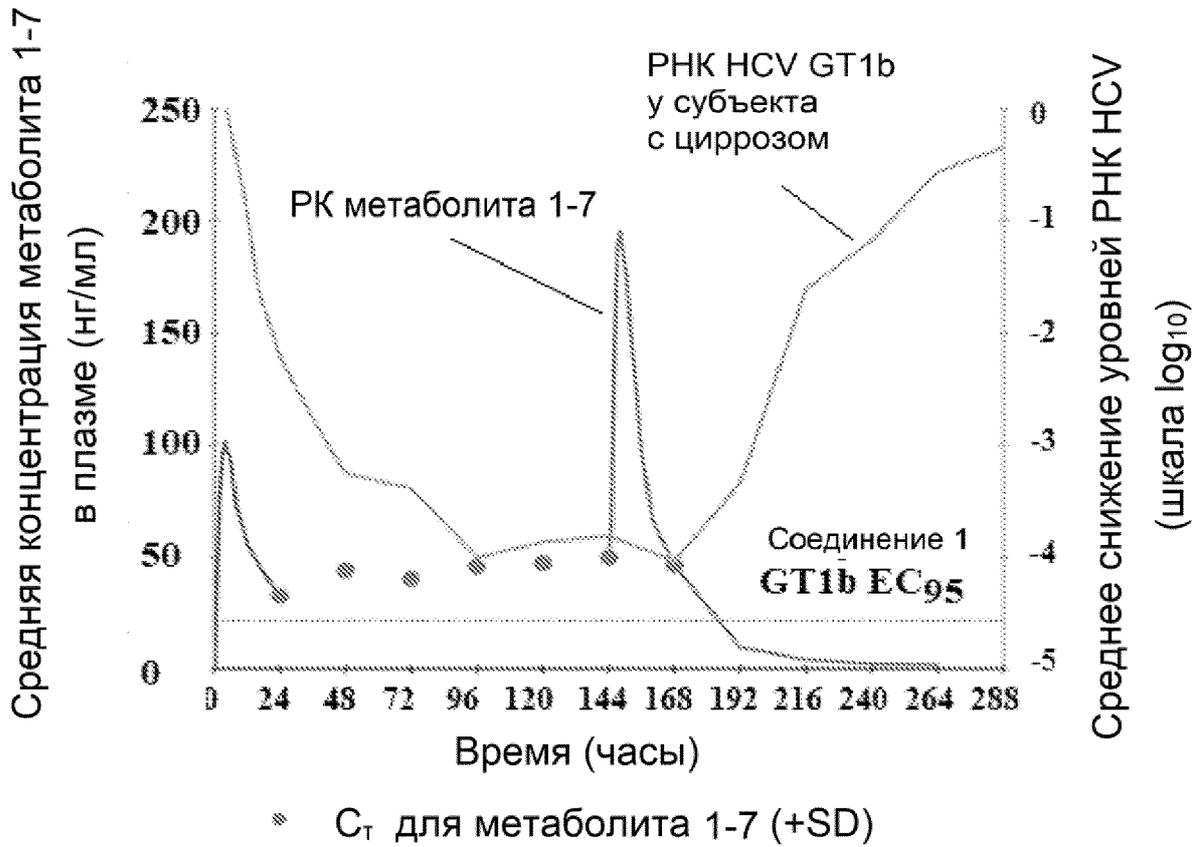


Фиг. 30А

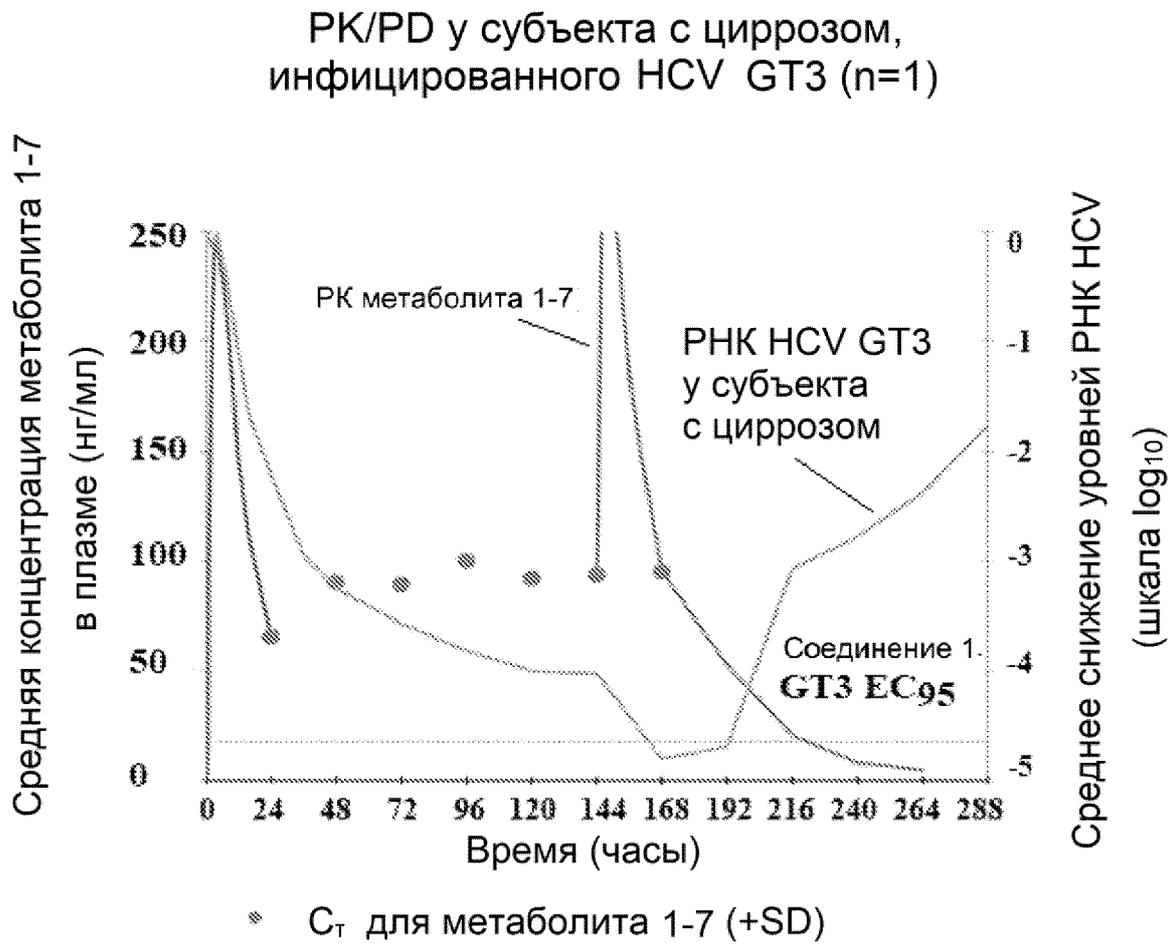


Фиг. 30В

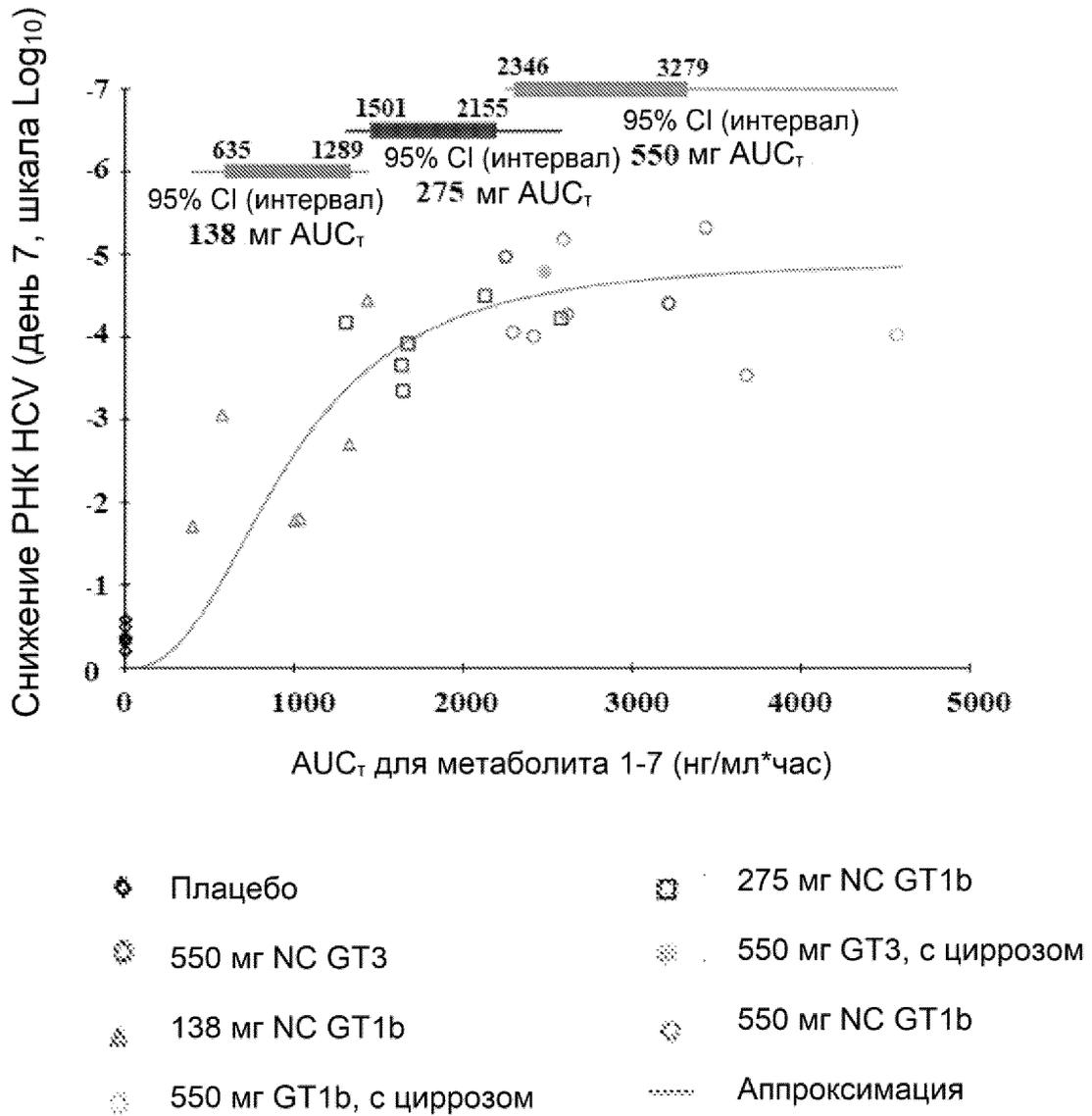
PK/PD у субъекта с циррозом,
инфицированного HCV GT1b (n=1)



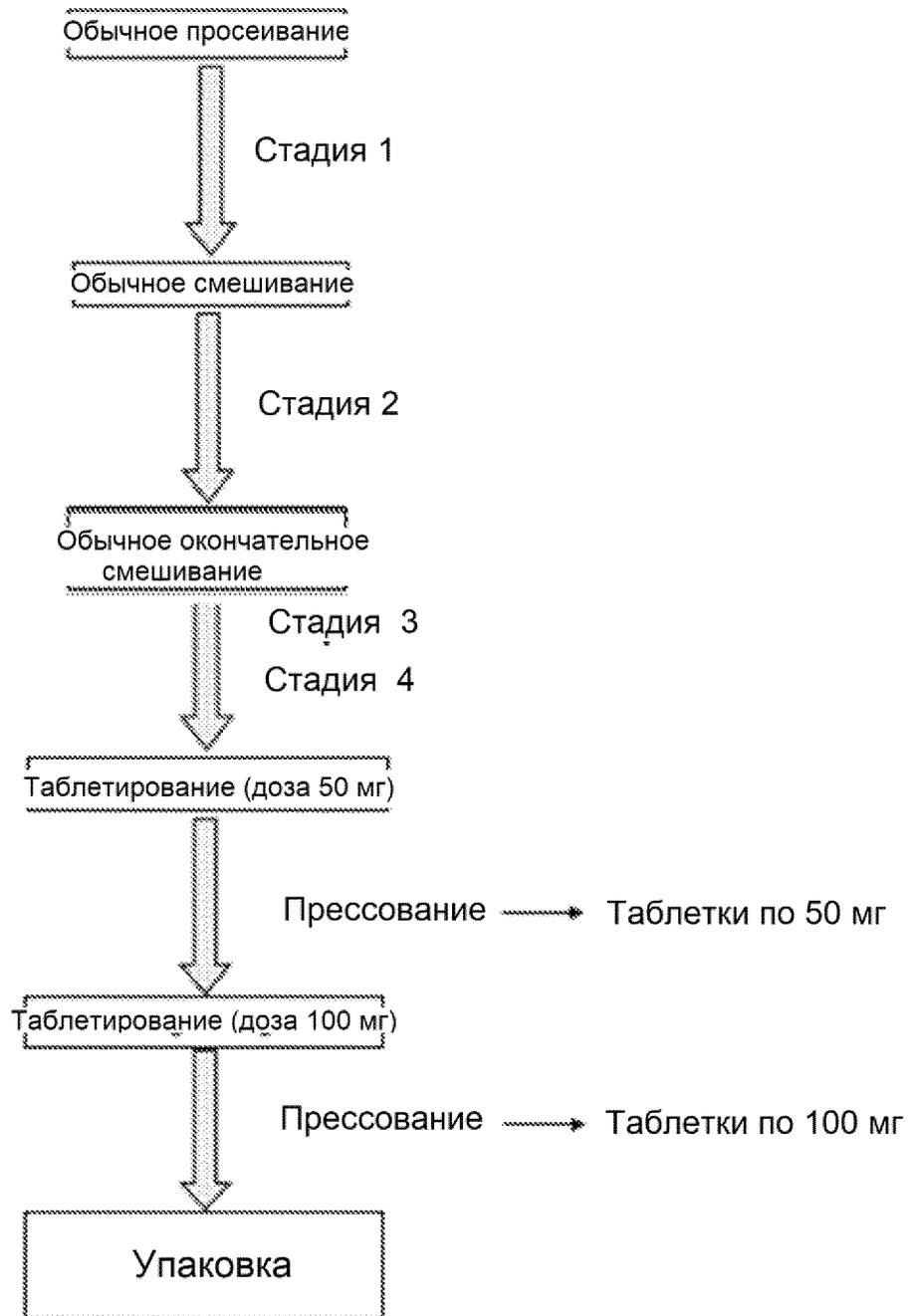
Фиг. 30С



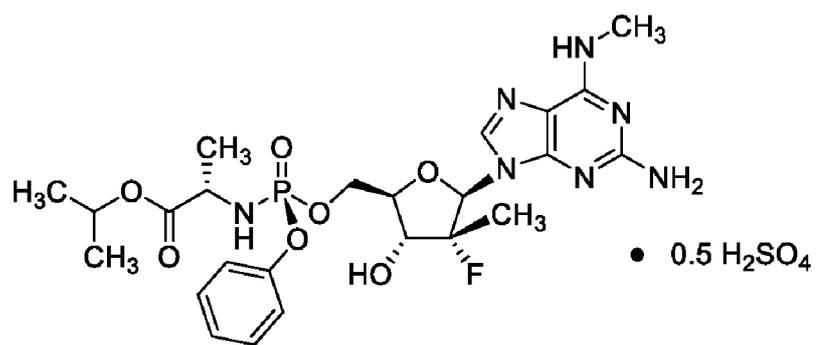
Фиг. 30D



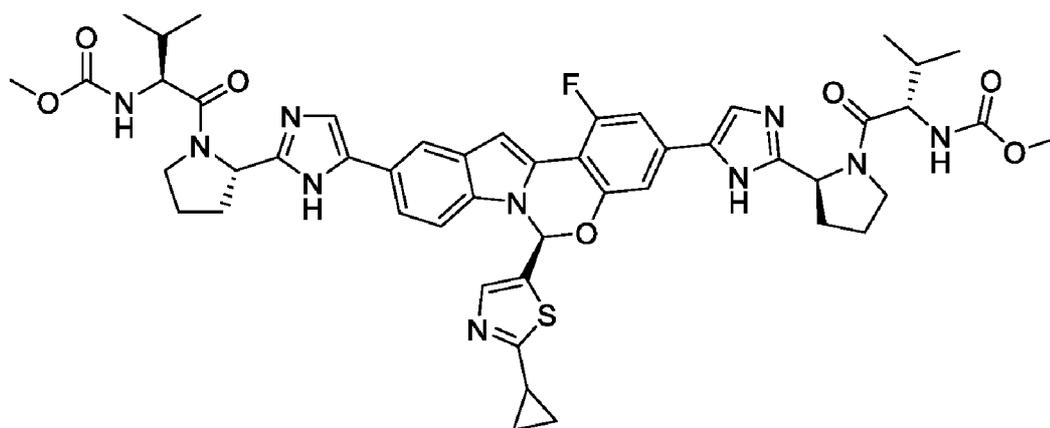
Фиг. 31



Фиг. 32



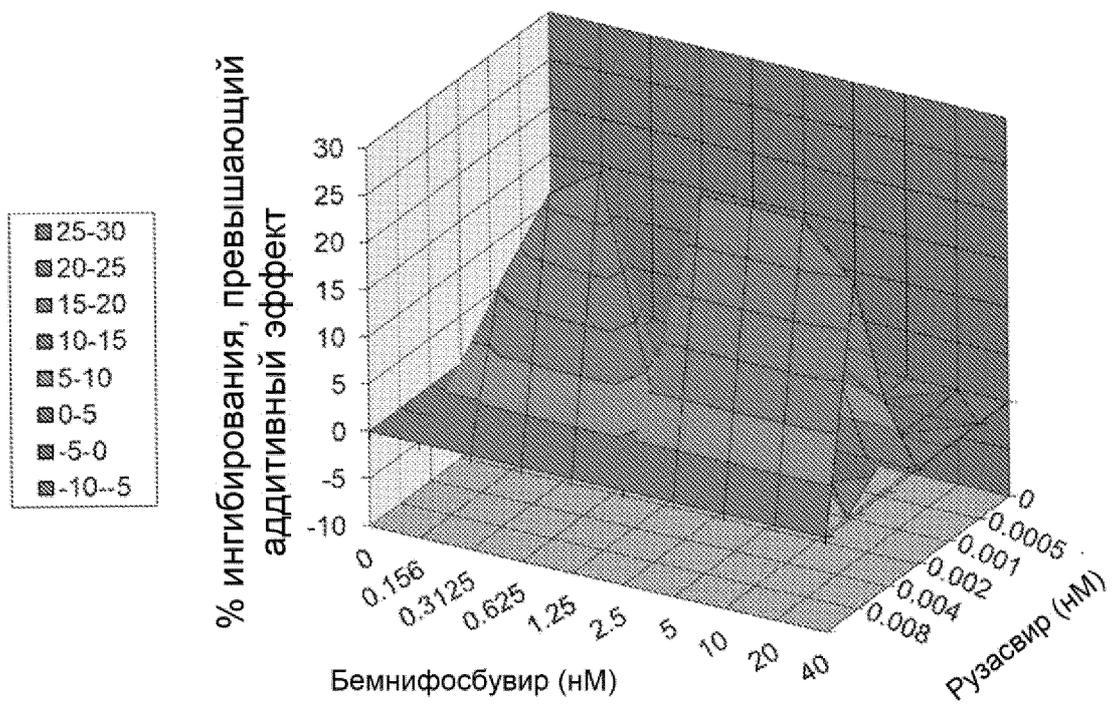
Соединение 1-A



Соединение 2

Фиг. 33

Анализ MacSynergy комбинации в отношении
репликона HCV (Huh-luc/neo-ET)



Фиг. 34