

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **033921**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2019.12.10**(21) Номер заявки  
**201891072**(22) Дата подачи заявки  
**2016.11.16**(51) Int. Cl. **C07D 407/12** (2006.01)  
**C07D 407/14** (2006.01)  
**A61P 31/16** (2006.01)  
**A61K 31/351** (2006.01)  
**C07K 9/00** (2006.01)(54) **ПРОИЗВОДНЫЕ СИАЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЛЕЧЕНИИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСОМ ГРИППА**(31) **2015904895**(32) **2015.11.20**(33) **AU**(43) **2018.11.30**(86) **PCT/AU2016/051100**(87) **WO 2017/083914 2017.05.26**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ОСТРЭЛИАН БАЙОМЕДИКАЛ КО.  
ПТИ ЛТД (AU)**(72) Изобретатель:  
**Джин Бетти, Сиа Е-Лин, Джонс Пол  
Артур, Дженкинс Питер Джеймс,  
Уиндл Генри Кеннет, Ву Вэнь Ян (AU)**(74) Представитель:  
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев  
А.В. (RU)**(56) **WO-A1-2002020514****WO-A1-2000055149****WO-A1-2013155375**ZANINI, D. et al., "Synthesis of New  $\alpha$ -Thiosialodendrimers and Their Binding Properties to the Sialic Acid Specific Lectin from *Limax flavus*", Journal of the American Chemical Society, 1997, vol. 119, p. 2088-2095, Abstract; Introduction; Formulae 31-34, chart 1, p. 2092; Table 1, p. 2093

ROY, R. et al., "Solid-phase Synthesis of Dendritic Sialoside Inhibitors of Influenza A Virus Haemagglutinin", Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1993, p. 1869-1872, Title; scheme 1-2; Experimental; Compounds 8-17; Scheme 1, p. 1871; Fig. 1 and final paragraph, p. 1872

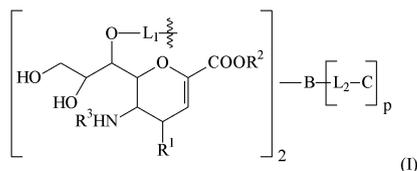
ROYTMAN, R. et al., "Exploring the self-assembly of glycopeptides using a diphenylalanine scaffold", Organic &amp; Biomolecular Chemistry, 2011, vol. 9, p. 5755-5761, Compound 5, Fig. 1, p. 5755; Nanostructure sample preparation and imaging, p. 5760

**WO-A1-2015011441**

WATSON, K.G. et al., "Highly potent and long-acting trimeric and tetrameric inhibitors of influenza virus neuraminidase", Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters, 2004, vol. 14, p. 1589-1592, Abstract; Table 2, p. 1590, Compounds 6-11; Table 1, p. 1590; tables 3a and 3b, p. 1591

**WO-A1-2003040138****CN-A-105085455**

(57) Согласно изобретению предложены соединения общей формулы (I)



где  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $L_1$ ,  $L_2$ , B, C и p являются такими, как определено в формуле изобретения, и их применение в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения инфекции, вызываемой вирусом гриппа. Предложены также фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры и стереоизомеры соединений.

**B1****033921****033921 B1**

### Дата подачи

Эта заявка связана с и имеет приоритет Австралийской патентной заявки № 2015904895, поданной 20 ноября 2015 г., полное содержание которой включено в данное описание посредством ссылки.

### Область изобретения

Эта заявка относится к соединениям для медицинского применения, в частности для лечения или профилактики вирусных инфекций. Эта заявка также относится к способам получения соединений.

### Предшествующий уровень техники

Грипп является респираторной инфекцией, которой ежегодно заражается 5-25% населения США, и из них приблизительно 200000 требуется госпитализация и 25000 умирают. Гриппозная инфекция продолжает оставаться постоянной угрозой для здоровья человека и обременять службы здравоохранения. Совсем недавнее появление высокопатогенных вирусов H5N1 и вирусов H7N9, источником которых являются птицы, и их потенциал приобретения способности передаваться человеку увеличили риск, связанный с гриппозной инфекцией. Хотя вакцины остаются краеугольным камнем предупреждения, требуется значительное количество времени для разработки эффективной вакцины против частых мутаций любого нового штамма вируса. Противогриппозные лекарственные средства, такие как ингибиторы вирусной нейраминидазы (ингибиторы NA), в том числе занамивир (Relenza) и осельтамивир (Tamiflu), и блокаторы ионных каналов M2, являющиеся производными адамантанов, в том числе амантадин и римантадин, доступны и поставляются на рынок в течение свыше 20 лет, но их эффективность ограничена механизмом действия. Их эффективность может также ослабляться из-за мутации вирусов и развития последующей лекарственной устойчивости.

Например, блокаторы ионных каналов M2 в настоящее время не рекомендуются для применения, поскольку почти все циркулирующие сезонные вирусы А (включая H1N1pdm09) несут точковую мутацию S31N в гене M2, которая порождает устойчивость как к амантадину, так и к римантадину. Это привело к сильной зависимости от альтернативных ингибиторов NA, таких как занамивир, осельтамивир и перамивир.

Ингибиторы NA воздействуют на сборку и почкование вирусов гриппа А в жизненном цикле вируса. Для выхода вирионов потомства из клетки нейраминидаза (NA) должна отщеплять группу сиаловой кислоты от гликопротеинов хозяина, что является важным для распространения вируса и повторного инфицирования. Таким образом, блокирование функции нейраминидазы специфическими ингибиторами (ингибиторами NA) представляет собой способ лечения гриппа. Однако поскольку такое ингибирование происходит на последней стадии жизненного цикла вируса (то есть после вхождения вируса, репликации, сборки и почкования на поверхности клетки), клетке уже нанесен большой ущерб. Более того, подвергаться воздействию могут только вирусы, почкующиеся на поверхности клетки. Несдерживаемое вирусное потомство может инфицировать новые клетки. Это приводит к прогрессированию тяжести заболевания. Чтобы ослабить тяжесть заболевания, оптимальным терапевтическим окном для лечения лекарственными средствами, представляющими собой ингибиторы NA, является период в начале прогрессирования заболевания. Тем не менее, так как терапевтическая эффективность данного активного агента обычно определяется механизмом действия, лекарственные средства, являющиеся ингибиторами NA, считаются относительно мягкими и приносящими ограниченную клиническую пользу.

Имеется потребность в новых подходах к лечению гриппа.

Жизненный цикл вируса гриппа А включает в себя несколько стадий.

(а) Вирус гриппа А имеет липидную двухслойную оболочку, внутри которой находятся восемь генных РНК-сегментов, каждый из которых ассоциирован с тримерной вирусной РНК-полимеразой (PB1, PB2, PA) и покрыт множеством нуклеопротеинов (NP) для образования vRNP (вирусные рибонуклеопротеиды). Внешний слой липидной оболочки пронизан множеством копий HA (гемагглютинин), NA и небольшим количеством M2, а молекулы M1 удерживают vRNP прикрепленными к внутреннему слою.

(б) Вирусный поверхностный гликопротеин HA связывается с поверхностными рецепторами сиаловой кислоты клетки-хозяина, и вирус транспортируется в клетку в эндоцитозных везикулах. Низкий pH в эндосоме инициирует конформационное изменение белка HA, которое приводит к слиянию вирусной и эндосомальной мембран. Низкий pH также инициирует поток протонов в вирус через ионный канал M2, в результате чего происходит диссоциация vRNP из матриксных белков M1. Когда молекулы M1 диссоциируются, vRNP, которые высвобождаются в цитоплазму, транспортируются в ядро посредством распознавания последовательностей ядерной локализации (NLS) на нуклеопротеинах.

(в) В ядре вирусная полимераза инициирует синтез вирусной мРНК с использованием 5'-экспонированных РНК-фрагментов, отщепляемых от пре-мРНК хозяина. Субъединица PB2 связывается с 5'-кэпом пре-мРНК хозяина, и эндонуклеазный домен в субъединице PA расщепляет пре-мРНК в точке от 10 до 13 нуклеотида ниже кэпа. Впоследствии инициируется транскрипция вирусной мРНК от отщепленного 3'-конца экспонированного РНК-сегмента. Эта "кража кэпа" происходит на растущих цепях пре-мРНК.

(г) Вирусные мРНК транспортируются в цитоплазму для трансляции в вирусные белки. Поверхностные белки HA, M2 и NA подвергаются процессингу в эндоплазматическом ретикулуме (ER), гликозилируются в аппарате Гольджи и транспортируются в клеточную мембрану.

(д) Белок NS1 вируса гриппа А играет решающую роль в подавлении продуцирования мРНК хозяина, ингибируя процессинг 3'-конца пре-мРНК хозяина и в результате блокируя продуцирование мРНК хозяина, в том числе мРНК интерферона-β. В отличие от пре-мРНК хозяина вирусные мРНК не требуют процессинга 3'-конца по механизму клетки-хозяина. Таким образом, вирусные мРНК транспортируются в цитоплазму, а синтез мРНК хозяина преимущественно блокируется.

(е) Вирусная полимераза ответственна не только за синтез мРНК, примированной экпированной РНК, но и за непримированную репликацию вРНК следующим образом:



Для этих двух стадий репликации требуются молекулы нуклеопротеинов, и они депонируются на кРНК и вРНК во время синтеза РНК. Образовавшиеся vRNP затем транспортируются в цитоплазму при посредничестве комплекса M1-NS2, который связывается с vRNP; NS2 взаимодействует с белком CRM1 человека, который экспортирует vRNP из ядра.

(ж) vRNP достигают клеточной мембраны для встраивания в новые вирусы, которые отпочковываются. Белки HA и NA в новых вирусах содержат концевые сиаловые кислоты, которые вызывают фиксирование и прикрепление вирусов к клеточной поверхности. NA вновь образовавшихся вирусов расщепляет остатки этих сиаловых кислот, тем самым высвобождая вирус из клетки-хозяина.

Во время стадий (а) и (б) жизненного цикла вируса гриппа вирусный поверхностный гликопротеин гемагглютинин (HA) связывается с рецепторами сиаловой кислоты на клетке-хозяине, после чего происходит рецепторно-опосредованный эндоцитоз вируса в клетку. Низкий pH в эндосоме инициирует конформационное изменение в белке HA, которое приводит к слиянию вирусной и эндосомальной мембраны. В то же время, низкий pH также инициирует поток протонов в вирус через ионный канал M2, в результате чего вирусный генетический материал высвобождается ядро для запуска вирусного инфекционного процесса в клетке.

Понятно, что воздействие на вирус низкого pH во внеклеточном окружении инактивирует вирус. Было показано, что интраназальные гелевые спреи с низким pH подавляют вирусы гриппа *in vitro* и защищают хорьков от гриппозной инфекции. Однако в таких исследованиях эффективная концентрация кислот составляет примерно 0,15 М (приблизительное значение pH 3,5). Кроме того, для осуществления противовирусного действия необходим контакт с вирусом. Дополнительно, эти спреи продемонстрировали эффективность только во время ранних стадий вирусной инфекции. Хотя значение pH, близкое к 3,5, может достигаться при введении забуференного назального спрея с pH 3,5, существует ограничение этой назальной доставки, которая обеспечивает относительно короткое время удерживания продукта в носу вследствие мукоцилиарного клиренса. Нормальное время нахождения назально введенного раствора у человека составляет примерно 12-15 мин.

Кроме того, в случае лечения вирусной инфекции будет необходим кислотный буфер для доставки глубоко в дыхательные пути. Вероятно, что кислотная природа такого буфера будет вызывать раздражение и непереносимость у людей.

Следовательно, кислотные интраназальные спреи могут быть неподходящими в качестве терапевтических агентов для лечения инфекции, вызываемой вирусом гриппа, поскольку они существенно ограничены и неспецифичны.

Полианионные соединения в качестве агентов против ВИЧ проявляют аттрактивные свойства. Спектр противовирусной активности полианионов расширен до разнообразных вирусов в оболочке, включающих орто- и пара-миксовирусы (вирус гриппа). Было показано, что такие полианионы ингибируют репликацию вирусов в культурах клеток в концентрациях от 0,1 до 1 мкг/мл. Преимущественно такие соединения являются нетоксичными даже в концентрациях вплоть до концентраций в 10000 раз более высоких. Однако эти вещества страдают рядом фармакокинетических и токсикологических недостатков, которые по всей вероятности компрометируют их клиническую применимость. Например, прежде чем достичь места их действия, они могут удерживаться в кровотоке различными белками плазмы крови. Кроме того, известно, что некоторые сульфатированные полисахариды проявляют нежелательную антикоагулянтную активность.

Существует потребность в новых противовирусных агентах, которые эффективны против гриппа. В частности, существует потребность в новых противовирусных агентах, которые проявляют одно или более из следующего: 1) высокая сила действия против вирусов гриппа, 2) быстрое действие для борьбы с инфекцией, 3) широкий спектр противовирусной активности (включая грипп А, В, птичий грипп), 4) эффективность против устойчивых к лекарственным средствам штаммов, 5) низкая тенденция к лекарственной устойчивости, 6) увеличенная продолжительность эффективности, 7) высокая селективность, 8) увеличенное терапевтическое окно, 9) низкая токсичность, 10) меньше побочных эффектов и/или 11) подходят для терапевтического и профилактического применения.

#### **Сущность изобретения**

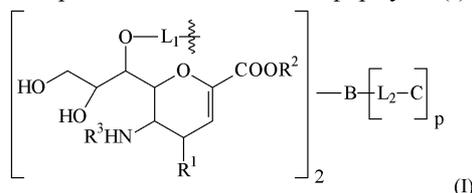
Согласно настоящему изобретению предложены соединения и их применение в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения инфекции, вызываемой вирусом гриппа.

Считается, что соединения по настоящему изобретению, также упоминаемые как "модифицирую-

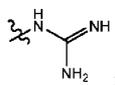
щие поверхность соединения", изменяют поверхность вируса, преобразуя поверхность в микрокислотную/анионную среду, селективно препятствующую жизненному циклу вируса, включая стадии (а) и (б), изложенные выше.

Предполагается, что это достигается соединениями по настоящему изобретению, которые объединяют группу, которая связывается с вирусом гриппа и с кислотной(ыми) или анионной(ыми) группой(ами), препятствующими связыванию гемагглютинина с клеткой. Это дает преимущество, так как соединения по изобретению предотвращают инфицирование клетки и оказывают свое действие внеклеточно. Это позволяет избежать необходимости в проникании молекулы в клетку, что должно приводить к снижению токсичности и/или меньшим побочным эффектам.

В одном аспекте изобретения предложено соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемые соль, сложный эфир или стереоизомер, где R<sup>1</sup> представляет собой



R<sup>2</sup> представляет собой H;

R<sup>3</sup> представляет собой -C(O)-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил;

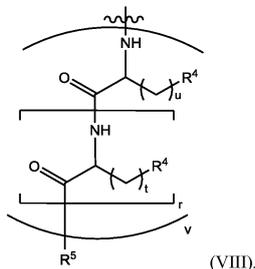
L<sub>1</sub> представляет собой двухвалентный линкер, выбранный из -C(O)-NH- или -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-NH-;

x означает целое число от 0 до 10 или 12;

B представляет собой многовалентную группу, выбранную из группы, состоящей из циклогексан-1,3,5-трикарбонила, пропан-1,2,3-трикарбонила и бензол-1,2,4,5-тетракарбонила;

L<sup>2</sup> представляет собой связь;

C представляет собой анионную группу формулы (VIII)



где R<sup>4</sup> в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из -COOH, -SO<sub>3</sub>H, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H и -C(O)-NH-CH(COOH)-CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H;

R<sup>5</sup> выбран из -OH или -NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H;

u означает целое число от 0 до 3;

t означает целое число от 0 до 3;

r означает целое число от 0 до 6;

v означает целое число от 1 до 12 и

r равен 1 или 2.

В дополнительном аспекте предложено применение соединения по изобретению или его фармацевтически приемлемых соли, сложного эфира или стереоизомера в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения инфекции, вызываемой вирусом гриппа, выбранным из гриппа А, гриппа В, птичьего гриппа или устойчивого к лекарственным средствам штамма гриппа.

Если не дано иного определения, все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют значения, которые обычно понятны специалисту в области, к которой данное изобретение относится.

Ссылка на предшествующий уровень техники в данном описании не является и не должна восприниматься как подтверждение или какая-либо форма предположения, что уровень техники является частью всеобщего знания.

Все документы, процитированные в данном описании, включены в него во всей их полноте посредством ссылки.

#### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - краткая информация о переменных условиях предварительной обработки вируса (A/Sydney/250/99 или A/Sydney/5/97) тестируемыми соединениями до инфицирования клеток MDCK.

Фиг. 2 - предварительная обработка вируса (A/Sydney/250/99) тестируемыми соединениями до инфицирования клеток MDCK соединениями А) MD348, В) MD345 и С) занамивиром (контроль).

Фиг. 3 - предварительная обработка вируса (A/Sydney/5/97) тестируемыми соединениями до инфицирования клеток MDCK соединениями А) MD348, В) MD345 и С) занамивиром (контроль).

Фиг. 4 - предварительная обработка вируса (A/Sydney/250/99) MD345 (тестируемое соединение) и занамивиром (контроль) в течение варьируемых периодов времени и условия до инфицирования клеток MDCK.

Фиг. 5 - сравнение противовирусной активности MD314-1 и MD021-7 против A/Sydney/5/97 (H3N2).

Фиг. 6 - сравнение противовирусной активности MD314-1 и MD021-7 против A/Mississippi/03/01 (H1N1) дикого типа.

Фиг. 7 - сравнение противовирусной активности MD021-7 и MD051-3 против A/Mississippi/03/01 (H1N1) дикого типа.

Фиг. 8 - сравнение противовирусной активности MD021-7 и MD051-3 против A/Mississippi/03/01 (H1N1) H274Y (устойчивый к осельтамивиру).

Фиг. 9 - сравнение противовирусной активности MD314-1 и MD021-7 против A/Mississippi/03/01 (H1N1) H274Y (устойчивый к осельтамивиру).

Фиг. 10 - краткая информация о сроках введения соединений, инфицировании и сборе органов для оценки скоростей клиренса вируса в легких и носовых раковинах у мышей.

Фиг. 11 - сравнительные титры вируса в легких у мышей для оценки скоростей клиренса вируса с использованием MD021, занамивира и PBS.

Фиг. 12 - сравнительные титры вируса в легких у мышей для оценки скоростей клиренса вируса с использованием MD021, занамивира и PBS в дни 1, 3, 5 и 7 после инфицирования.

Фиг. 13 - сравнительный титр вируса, выраженный в процентах от среднего значения для группы PBS-контроля.

Фиг. 14 - сравнительная потеря массы тела у мышей для оценки скоростей клиренса вируса с использованием MD021, занамивира и PBS.

Фиг. 15 - нейтрализация A/California/7/09 (pan H1N1) *in vitro*.

#### **Подробное описание изобретения**

Как обсуждалось выше, считается, что соединения по настоящему изобретению изменяют поверхность вируса, преобразуя поверхность в микрокислотную/анионную среду для селективного препятствования стадиям жизненного цикла вируса.

Считается, что кислотные/анионные группы соединений по настоящему изобретению преобразуют поверхность вируса в микрокислотную/анионную среду, которая снижает или инактивирует вирусную активность. Кроме того, считается, что эти соединения действуют внеклеточно и, следовательно, могут обуславливать снижение инцидентности побочных эффектов, снижение токсичности и/или снижение тенденции к развитию устойчивости. Более подробно, считается, что соединения по настоящему изобретению действуют внеклеточно во множестве целевых точек жизненного цикла вируса, в том числе, без ограничения:

кислотные/анионные группы создают низкий pH на поверхности вируса, что инициирует преждевременное конформационное изменение белка гемагглютинаина (HA), которое впоследствии может снижать или задерживать слияние вируса и клеток. Это изменение является специфичным для стадии (б) жизненного цикла вируса, упомянутой выше;

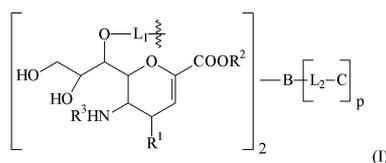
дополнительно, считается, что создание среды с низким pH на поверхности вируса возбуждает поток протонов в вирус через ионный канал M2, который может вызывать высвобождение генетического материала вне клеток. Это является специфичным для стадии (б) жизненного цикла вируса, упомянутой выше;

считается, что якорные группы соединений по изобретению могут перекрестно связывать NA/HA и агрегировать вирусные частицы, что снижает подвижность и инфективность вирусов. Это является специфичным для стадий (а) и (б) жизненного цикла вируса, упомянутым выше;

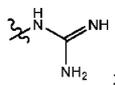
считается, что якорные группы ингибируют функцию нейраминидазы (NA), снижая или предупреждая высвобождение новых вирусов из клеточной мембраны. Это является специфичным к стадии (ж) жизненного цикла вируса, упомянутой выше.

Считается, что прерывание стадий (а) и (б) жизненного цикла вируса может снижать потенциальную тяжесть инфекции за счет снижения вирусной инфективности, в том числе за счет снижения проникновения вируса в клетки, вирусного нарушения нормальных функций ядер клеток и/или репликации вируса. Соответственно считается, что введение соединений по настоящему изобретению может обеспечить более эффективное лечение вирусной инфекции и/или более быстрое выздоровление пациентов, чем введение доступных в настоящее время лекарственных средств, являющихся ингибиторами NA. Считается также, что соединения по настоящему изобретению могут быть использованы профилактически в предупреждении гриппозной инфекции.

Соответственно в одном аспекте настоящего изобретения предложено соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемые соль, сложный эфир или стереоизомер, где  $R^1$  представляет собой



$R^2$  представляет собой H;

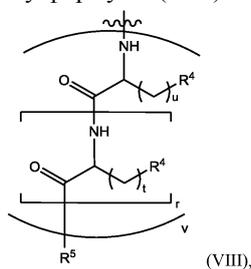
$R^3$  представляет собой  $-C(O)-C_1-C_6$ алкил;

$L_1$  представляет собой двухвалентный линкер, выбранный  $-C(O)-NH-$  или  $-C(O)-NH-(CH_2)_x-NH-$ ;  $x$  означает целое число от 0 до 10 или 12;

$B$  представляет собой многовалентную группу, выбранную из группы, состоящей из циклогексан-1,3,5-трикарбонила, пропан-1,2,3-трикарбонила и бензол-1,2,4,5-тетракарбонила;

$L^2$  представляет собой связь;

$C$  представляет собой анионную группу формулы (VIII)



где  $R^4$  в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из  $-COOH$ ,  $-SO_3H$ ,  $-C(O)-NH-CH_2SO_3H$  и  $-C(O)-NH-CH(COOH)-CH_2SO_3H$ ;

$R^5$  выбран из  $-OH$  или  $-NHCH_2SO_3H$ ;

$u$  означает целое число от 0 до 3;

$t$  означает целое число от 0 до 3;

$r$  означает целое число от 0 до 6;

$v$  означает целое число от 1 до 12 и

$p$  равен 1 или 2.

В данном описании изобретения "соединение по изобретению" или "соединение формулы (I)" означает соединение или его фармацевтически приемлемые соль, сложный эфир или стереоизомер.

Термин "якорная группа" в данном документе относится к группе, которая связывается с поверхностью вирусов гриппа. Якорная группа представляет собой группу сиаловой кислоты, которая связывается с нейраминидазой, такую как ингибитор нейраминидазы.

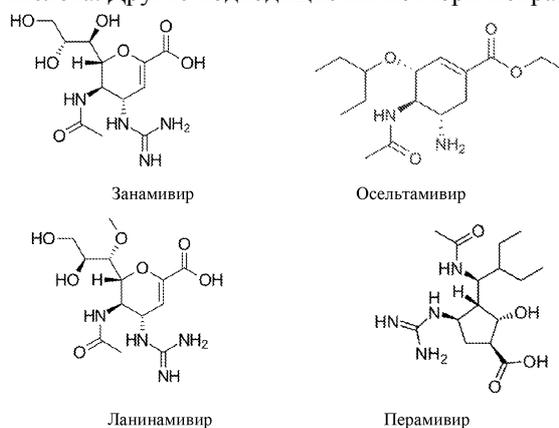
Термин "каркасная группа" в данном документе относится к многовалентной группе, к которой присоединены две якорные группы и одна или более кислотных или анионных групп. В некоторых аспектах каркасная группа может представлять собой трехвалентную группу. В других аспектах каркасная группа может представлять собой четырехвалентную группу. Примеры каркасных групп включают пропан-1,2,3-трикарбоксилат, циклогексан-1,3,5-трикарбоксилат и бензол-1,2,4,5-тетракарбоксилат.

Термины "кислотная или анионная группа" и "кислотная/анионная группа" относятся к функциональной группе, имеющей кислотные и/или анионные свойства, которая действует, препятствуя связыванию гемагглютинина с клеткой. Конкретно, термин "анионная" описывает суммарный отрицательный заряд функциональной группы или вещества. Должно быть понятно, что данное отрицательно заряженное вещество может иметь один или более положительно заряженных противоионов, ассоциированных с ним, или наоборот. В растворе отрицательно заряженное вещество может иметь один или более диссоциированных положительно заряженных противоионов, с которыми оно ассоциировано. В данном документе термин "анионный" использован для описания свойства этого вещества или функциональной группы, а не общего комплекса с одним или более противоионами, которые обычно будут делать комплекс нейтральным. Понятно, что при различных значениях pH некоторые функциональные группы являются отрицательно заряженными, нейтральными или положительно заряженными. Является ли вещество анионным, определяется исходя из суммы этих зарядов. Например, в рамках объема изобретения кислотная или анионная группа может включать одну или более из следующих функциональных групп: карбоновые или сульфоновые кислоты. Примеры подходящих кислотных или анионных групп включают карбоновые кислоты, аминокислоты, дипептиды, трипептиды или полипептиды или их производные, имеющие кислотные и/или анионные свойства, такие как аспарагиновая кислота и цистеиновая кислота.

Термин "сиаловая кислота" понятен в данной области и относится к 9-углерод-моносахариду, в ча-

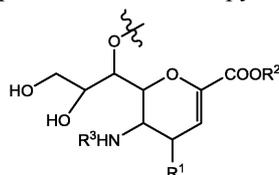
стности к производным нейраминовой кислоты. Примеры подходящих групп включают, без ограничения, возможно замещенные моносахариды, получаемые в результате N- и/или O-замещения N-ацетилнейраминовой кислоты (Neu5Ac) и N-гликолилнейраминовой кислоты (Neu5Gc).

Термин "ингибитор нейраминидазы" общеизвестен в данной области и относится к классу соединений, которые блокируют фермент нейраминидазу. В некоторых воплощениях якорная группа может представлять собой ингибитор нейраминидазы или его производное. Примеры подходящих ингибиторов нейраминидазы включают, без ограничения, сиаловую кислоту или производное сиаловой кислоты, такое как 2,3-дифторсиаловая кислота. Другие подходящие ингибиторы нейраминидазы включают



и их производные.

Якорная группа в каждом случае представляет собой группу формулы VI



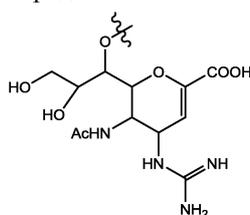
(Формула VI)

где  $R^1$  представляет собой гуанидино;

$R^2$  представляет собой H и

$R^3$  представляет собой  $C_1$ - $C_6$ ацил.

В одном воплощении якорная группа представляет собой группу формулы (VIa)



Формула (VIa)

В воплощении изобретения линкер (такой как  $L^1$  и/или  $L^2$  в соединении формулы I) в каждом случае представляет собой двухвалентный линкер. Линкер  $L^1$  независимо выбран из  $-C(O)-NR-$  и  $-C(O)-NR-(CH_2)_x-NR-$ , где R представляет собой H и x означает целое число от 0 до 10 или 12. Линкер  $L^2$  в соединении формулы (I) представляет собой связь.

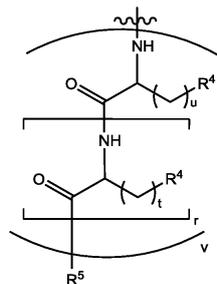
В воплощении каркасная группа представляет собой многовалентную группу. В одном из воплощений каркасная группа представляет собой трехвалентную каркасную группу. В другом воплощении каркасная группа представляет собой четырехвалентную каркасную группу. В одном из воплощений каркасная группа выбрана из трикарбоксилатной группы или тетракарбоксилатной группы. В других воплощениях каркасная группа выбрана из пропан-1,2,3-трикарбоксилата, циклогексан-1,3,5-трикарбоксилата и бензол-1,2,4,5-тетракарбоксилата. В других воплощениях каркасная группа выбрана из возможно замещенного пропан-1,2,3-трикарбоксилата, возможно замещенного циклогексан-1,3,5-трикарбоксилата, возможно замещенного бензол-1,2,4,5-тетракарбоксилата, возможно замещенной пиромеллитовой кислоты и возможно замещенной ди-пирометилловой кислоты, образованной посредством связи  $-C(O)-NH-NH-C(O)-(5,5'-(\text{гидразин-1,2-дикарбонил})-\text{бис}-(\text{бензол-1,2,4-трикарбоновая кислота}))$ . В других воплощениях каркасная группа представляет собой многовалентный пептид.

В воплощении кислотная или анионная группа представляет собой функциональную группу, имеющую кислотные и/или анионные свойства, которая действует, препятствуя связыванию гемагглютина с клеткой. В некоторых воплощениях кислотная или анионная группа представляет собой группу, со-

держущую одну или более функциональных групп, выбранных из карбоновых кислот и сульфоновых кислот. В некоторых воплощениях кислотная или анионная группа представляет собой аминокислоту, дипептид, трипептид, полипептид или их производные, содержащие одну или более кислотных функциональных групп. В одном из воплощений кислотная или анионная группа представляет собой аспарагиновую кислоту или цистеиновую кислоту.

В воплощении соединения по изобретению содержат в сумме от 2 до 26 кислотных/анионных остатков, предпочтительно от 4 до 10 кислотных/анионных остатков. Например, если кислотная или анионная группа содержит дикарбоновую кислоту, то очевидно, что такая группировка содержит два отдельных кислотных/анионных остатка. В качестве примера, ссылаясь на репрезентативные примеры соединений по изобретению, следует отметить, что MD349 содержит в сумме девять кислотных или анионных остатков (пять остатков карбоновых кислот и четыре остатка сульфоновых кислот), MD348 содержит в сумме семь кислотных или анионных остатков (четыре остатка карбоновых кислот и три остатка сульфоновых кислот), MD345 содержит в сумме восемь кислотных или анионных остатков (один остаток карбоновой кислоты и семь остатков сульфоновых кислот), MD352 содержит в сумме девять кислотных или анионных остатков (два остатка карбоновых кислот и семь остатков сульфоновых кислот), MD356 содержит в сумме шесть кислотных или анионных остатков (два остатка карбоновых кислот и четыре остатка сульфоновых кислот), MD357 содержит в сумме шесть кислотных или анионных остатков (два остатка карбоновых кислот и четыре остатка сульфоновых кислот), MD358 содержит в сумме восемь кислотных или анионных остатков (восемь остатков карбоновых кислот), MD359 содержит в сумме восемь кислотных или анионных остатков (два остатка карбоновых кислот и шесть остатков сульфоновых кислот), MD373 содержит в сумме восемь кислотных или анионных остатков (восемь остатков карбоновых кислот) и MD376 содержит в сумме десять кислотных или анионных остатков (десять остатков карбоновых кислот).

В другом воплощении кислотная или анионная группа представляет собой группу формулы VIII



(Формула VIII)

где  $R^4$  в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$  и  $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ;

$R^5$  выбран из группы, состоящей из  $-\text{OH}$  и  $-\text{NHCH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ;

$u$  означает целое число от 0 до 3;

$t$  означает целое число от 0 до 3;

$r$  означает целое число от 0 до 6;

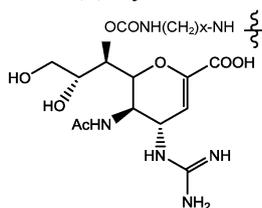
$v$  означает целое число от 1 до 12.

В воплощении  $p$  означает целое число от 1 до 2. В некоторых воплощениях  $p$  означает 1. В других воплощениях  $p$  означает 2.

Дополнительно или альтернативно, в некоторых воплощениях соединения формулы (I) могут быть модифицированы либо до, либо во время, либо после сборки для усиления или модифицирования биологической активности и/или аффинности связывания с поверхностью вируса гриппа. В воплощении, где кислотные или анионные группы содержат одну из карбоновых кислот, включая аминокислоты, карбоновая кислота может быть модифицирована путем сульфатирования, фосфорилирования, взаимопревращения функциональных групп и/или присоединения боковых цепей. Например, если кислотные или анионные группы содержат карбоновую кислоту, то карбоновая кислота может быть модифицирована до образования амида или сульфатированного амида, включая  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ . Альтернативно или дополнительно, если кислотные или анионные группы содержат аминокислоту или пептид, C-конец может быть модифицирован с целью введения альтернативных функциональных групп, например путем превращения концевой кислоты в амид или сульфатированный амид, включая  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ .

Для удобства или ссылки в репрезентативных примерах соединений по изобретению могут быть использованы сокращения. Например, в контексте репрезентативных примеров для удобства ссылки якорная группа и линкер (включающий  $L_1$  в формуле (I)) в каждом случае могут быть указаны в виде единой группы, обозначенной  $Z_x$ . Конкретно, если соединения по изобретению содержат группу формулы  $Z_x$ , то такие группы представляют собой производные сиаловой кислоты, в которых функциональная группа гуанидино замещает гидроксильную группу в положении 4 кольца сиаловой кислоты. Такая модификация позволяет группам формулы  $Z_x$  взаимодействовать с нейраминидазами вирусов гриппа, но не

с нейраминидазами млекопитающих. Это обеспечивает аспект безопасности при введении соединений по изобретению млекопитающим, включая людей. Для удобства ссылки структура  $Z_x$  изображена ниже



Формула  $Z_x$

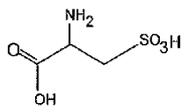
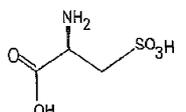
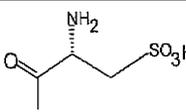
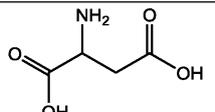
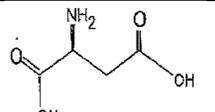
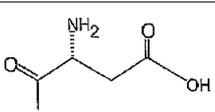
Для удобства или ссылки в контексте репрезентативных примеров для соединений, из которых может быть получена каркасная группа В в соединениях формулы (I), использованы следующие сокращения.

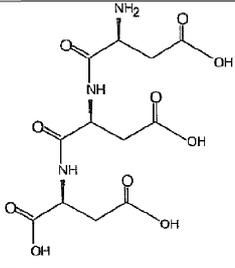
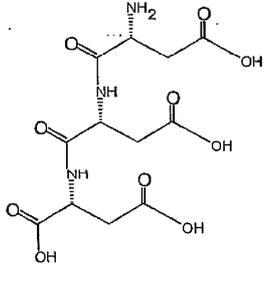
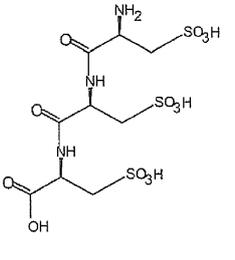
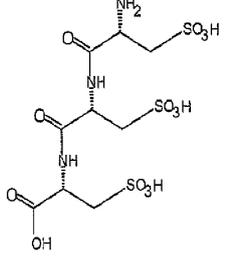
Сокращение	Структура	Название
СНТСА		<i>цис</i> -1,3,5-циклогексантрикарбоновая кислота
TCA		Трикарбоновая кислота
PYR		Пиромеллитовая кислота

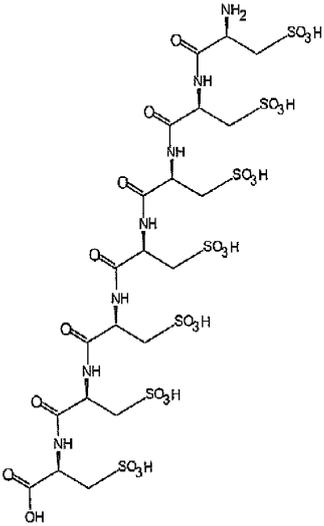
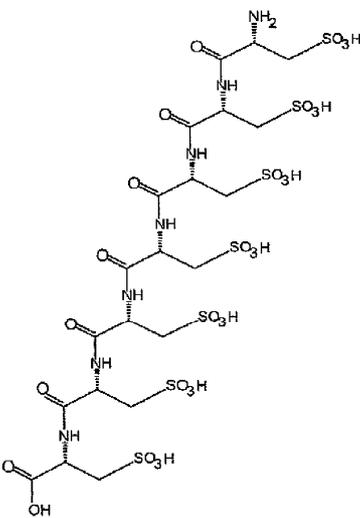
Для удобства или ссылки в контексте репрезентативных примеров для якорной группы, линкера  $L^1$  и каркасной группы В в соединениях формулы (I) могут быть использованы следующие сокращения.

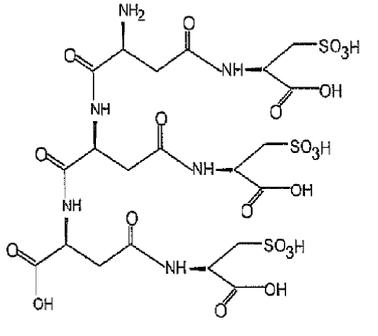
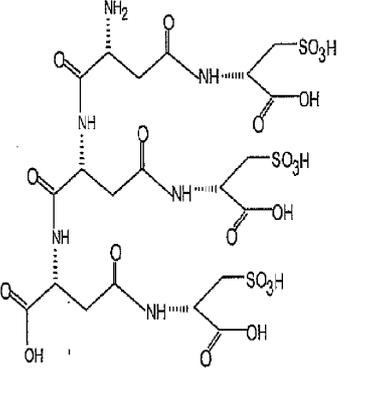
Сокращение	Структура	Сокращение	Структура
PK2 TCA( $Z_x$ ) <sub>2</sub>		PK1 TCA( $Z_x$ ) <sub>2</sub>	
PK1 PYR( $Z_x$ ) <sub>2</sub>		PK2 PYR( $Z_x$ ) <sub>2</sub>	
СНТСА( $Z_x$ ) <sub>2</sub>			
PK2PYR( $Z_x$ ) <sub>2</sub> (NHCH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H) <sub>2</sub>			

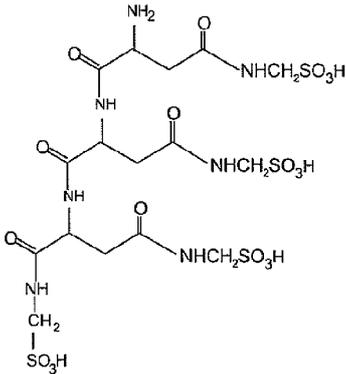
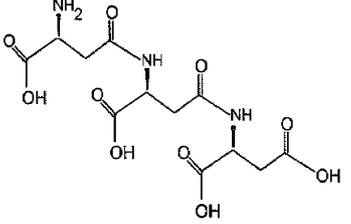
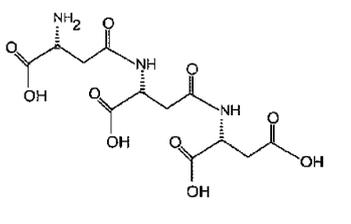
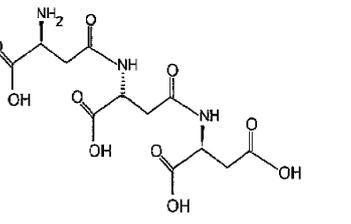
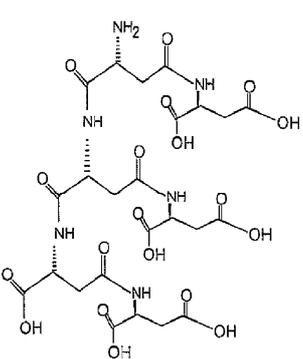
Для удобства или ссылки в контексте репрезентативных примеров для соединений, из которых могут быть получены кислотные или анионные группы в соединениях формулы (I), использованы следующие сокращения.

Сокращение	Структура	Название
Суа Суа-SO <sub>3</sub> H		Цистеиновая кислота
L-Суа L-Суа-SO <sub>3</sub> H		L-Цистеиновая кислота
D-Суа D-Суа-SO <sub>3</sub> H		D-Цистеиновая кислота
Асп		Аспарагиновая кислота
L-Асп		L-Аспарагиновая кислота
D-Асп		D-Аспарагиновая кислота

(L-Asp) <sub>3</sub> или L-Asp-L-Asp-L-Asp	 <p>The structure shows three L-aspartic acid units linked by amide bonds. The amino group of the top unit is on a wedge, and the carboxyl group is on a dash. The middle unit has the amino group on a dash and the carboxyl group on a wedge. The bottom unit has the amino group on a wedge and the carboxyl group on a dash.</p>	
(D-Asp) <sub>3</sub> или D-Asp-D-Asp-D-Asp	 <p>The structure shows three D-aspartic acid units linked by amide bonds. The amino group of the top unit is on a dash, and the carboxyl group is on a wedge. The middle unit has the amino group on a wedge and the carboxyl group on a dash. The bottom unit has the amino group on a dash and the carboxyl group on a wedge.</p>	
(L-Cya) <sub>3</sub> или L-Cya-L-Cya-L-Cya	 <p>The structure shows three L-cysteic acid units linked by amide bonds. The amino group of the top unit is on a wedge, and the sulfonic acid group is on a dash. The middle unit has the amino group on a dash and the sulfonic acid group on a wedge. The bottom unit has the amino group on a wedge and the sulfonic acid group on a dash.</p>	
(D-Cya) <sub>3</sub> или D-Cya-D-Cya-D-Cya	 <p>The structure shows three D-cysteic acid units linked by amide bonds. The amino group of the top unit is on a dash, and the sulfonic acid group is on a wedge. The middle unit has the amino group on a wedge and the sulfonic acid group on a dash. The bottom unit has the amino group on a dash and the sulfonic acid group on a wedge.</p>	

<p>(L-Cya)<sub>7</sub>-OH или (L-Cya)<sub>7</sub></p>	 <p>The structure shows a linear chain of seven L-cysteine residues. The C-terminal residue (top) has a free amino group (NH<sub>2</sub>) and a carboxylate group (COO<sup>-</sup>). Each residue is linked to the next via a peptide bond. The side chains of all residues are -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>H. The hydroxyl group (OH) is attached to the C-terminal carbon.</p>	
<p>(D-Cya)<sub>7</sub>-OH (D-Cya)<sub>7</sub></p>	 <p>The structure shows a linear chain of seven D-cysteine residues. The C-terminal residue (top) has a free amino group (NH<sub>2</sub>) and a carboxylate group (COO<sup>-</sup>). Each residue is linked to the next via a peptide bond. The side chains of all residues are -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>H. The hydroxyl group (OH) is attached to the C-terminal carbon. The stereochemistry at the chiral centers is the mirror image of the L-isomer.</p>	

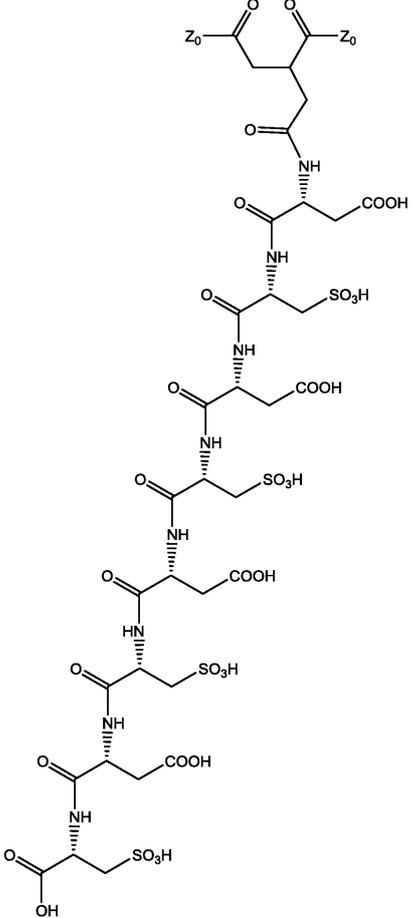
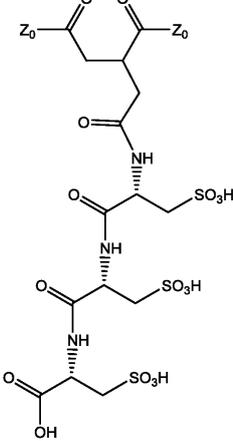
<p>L-Asp(L-Cya)-L-Asp(L-Cya)-L-Asp(L-Cya)-OH или [L-Asp(L-Cya)]<sub>3</sub></p>		
<p>D-Asp(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)-OH или [D-Asp(D-Cya)]<sub>3</sub></p>		

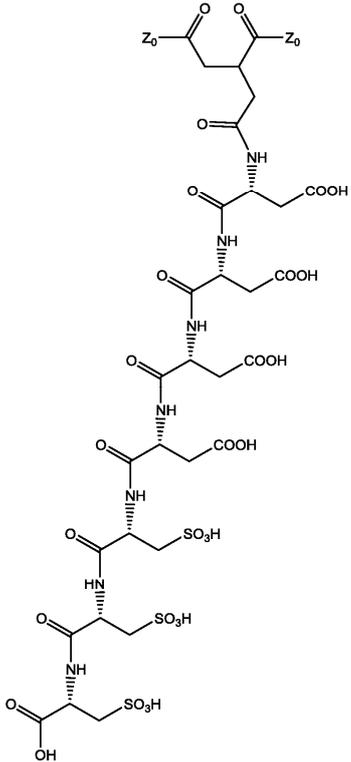
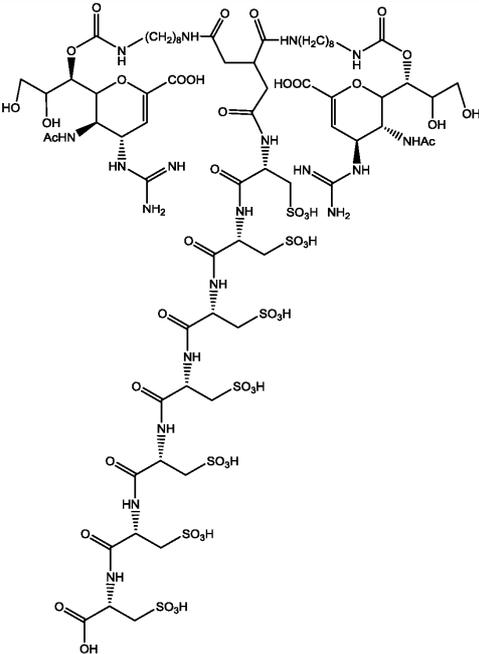
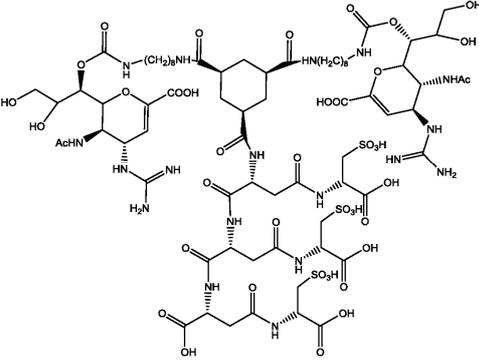
<p>Asp(NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H)- Asp(NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H)- Asp(NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H)<sub>2</sub></p>		
<p>L-(Asp)(β)-L- (Asp)(β)-L-(Asp)</p>		
<p>D-(Asp)(β)-D- (Asp)(β)-D-(Asp)</p>		
<p>L-(Asp)(β)-D- (Asp)(β)-L-(Asp)</p>		
<p>D-Asp(L-Asp)-D- Asp(L-Asp)-D- Asp(L-Asp)</p>		

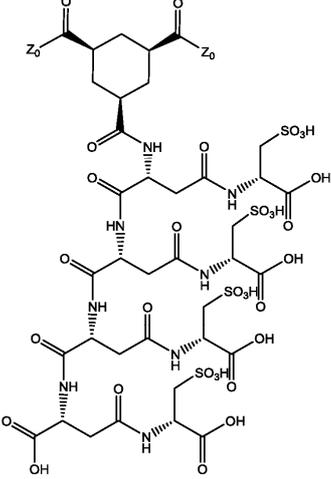
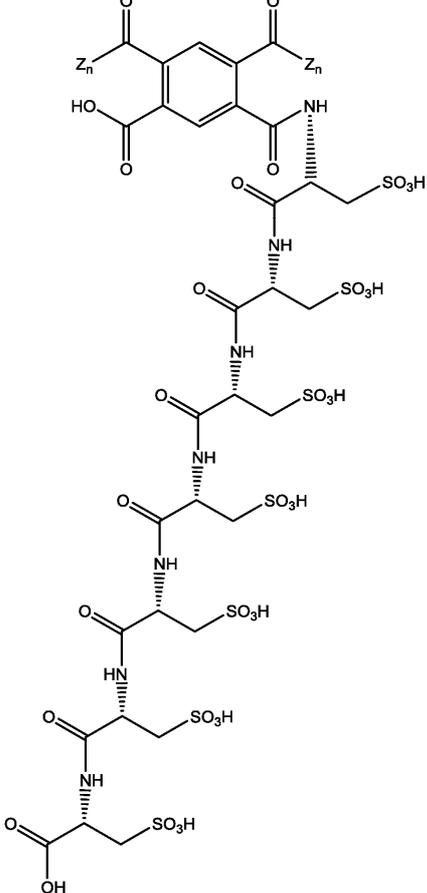
Репрезентативные примеры соединений по изобретению и пример референсного соединения MD012 приведены ниже.

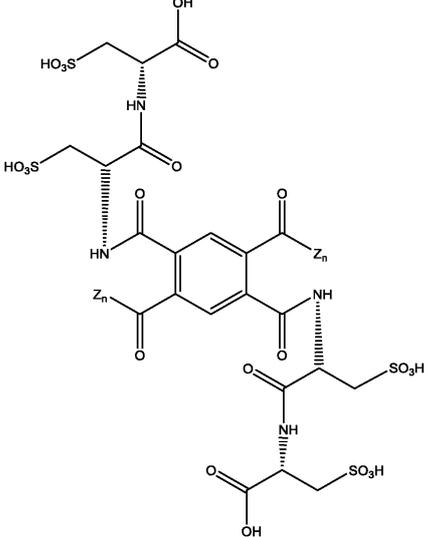
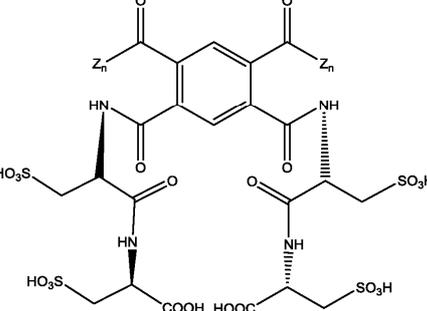
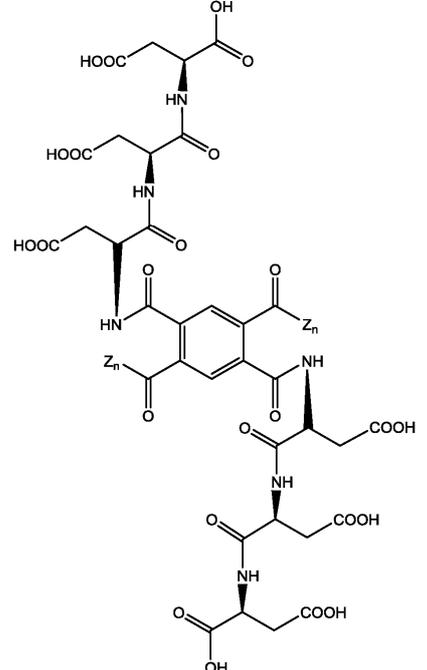
Ссылочный №	Сокращение	Структура
MD021 Мол. масса 1243	CHTCA(Z) <sub>2</sub> -L-Asp	
MD154 Мол. масса 1485	CHTCA(Z <sub>0</sub> ) <sub>2</sub> -L-Asp(NHCH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H) <sub>2</sub>	
MD155 Мол. масса 1485	CHTCA(Z <sub>0</sub> ) <sub>2</sub> -D-Asp(NHCH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H) <sub>2</sub>	
MD012 Мол. масса 1534	CHTCA(Z) <sub>2</sub> (S <sub>6</sub> )	
MD051 Мол. масса 1318	PK2 TCA(Z) <sub>2</sub> -[L-Asp-L-Asp]	

<p>MD185</p> <p>Мол. масса 1852</p>	<p>PK2PYR(Zn)<sub>2</sub>[(D-Asp)(NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub></p>	
<p>MD314</p> <p>Мол. масса 1982</p>	<p>CHTCA(Zn)-L-Asp(L-Cya)-L-Asp-(L-Cya)-L-Asp(L-Cya)</p>	
<p>MD317</p> <p>Мол. масса 1318</p>	<p>PK2 TCA(Zn)<sub>2</sub>-[D-Asp-D-Asp]</p>	

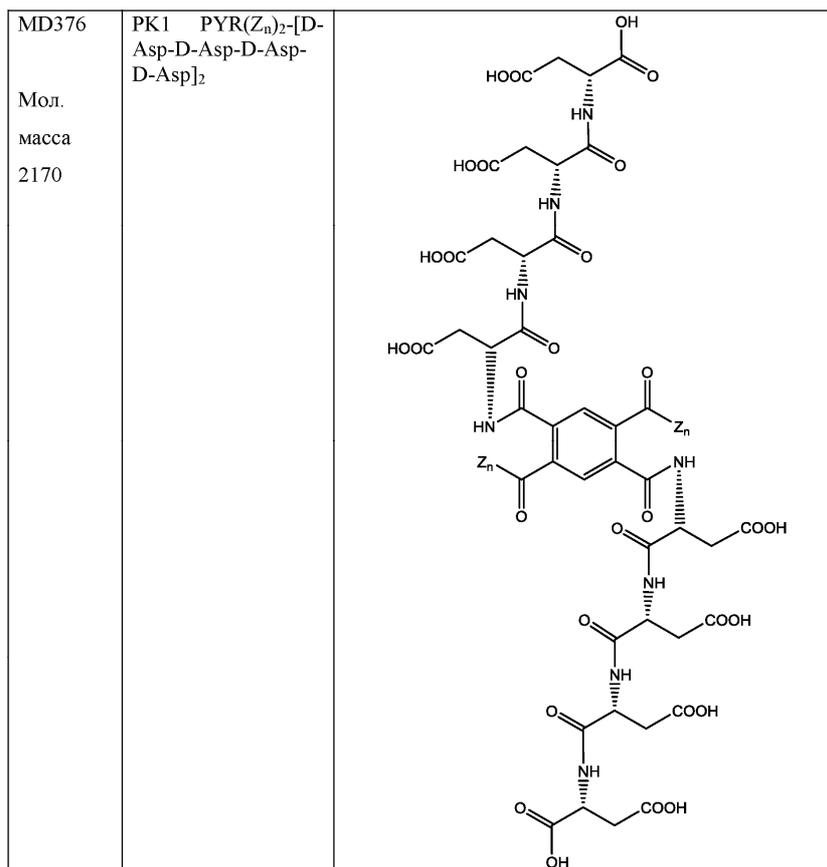
<p>MD342</p> <p>Мол. масса 2208</p>	<p>PK2 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>-[D-Asp-D-Cya]<sub>4</sub>-OH</p>	
<p>MD343</p> <p>Мол. масса 1597</p>	<p>PK2 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>-[D-Cya]<sub>3</sub>-OH</p>	

<p>MD344</p> <p>Мол. масса 2058</p>	<p>PK2 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>[(D-Asp)<sub>4</sub>D-Cya]<sub>3</sub>-OH</p>	
<p>MD345</p> <p>Мол. масса 2201</p>	<p>PK2TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>-[D-Cya(SO<sub>3</sub>H)]<sub>7</sub>-OH</p>	
<p>MD348</p> <p>Мол. масса 1982</p>	<p>CHTCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>-[D-Asp(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)]-OH</p>	

<p>MD349</p> <p>Мол. масса 2248</p>	<p>CHTCA(<math>Z_0</math>)[D-Asp(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)]-OH</p>	
<p>MD352</p> <p>Мол. масса 1994</p>	<p>PK2 PYR(<math>Z_n</math>)<sub>2</sub>[D-Cya]<sub>7</sub>-COOH</p>	

<p>MD356</p> <p>Мол. масса 1940</p>	<p>PK1 PYR(Z<sub>n</sub>)<sub>2</sub>-[D-Cya-D-Cya]<sub>2</sub></p>	
<p>MD357</p> <p>Мол. масса 1854</p>	<p>PK2 PYR(Z<sub>n</sub>)<sub>2</sub>-D-Cya-D-Cya]<sub>2</sub></p>	
<p>MD358</p> <p>Мол. масса 1940</p>	<p>PK1 PYR(Z<sub>n</sub>)<sub>2</sub>[L-Asp-L-Asp-L-Asp]<sub>2</sub></p>	

<p>MD359</p> <p>Мол. масса 2158</p>	<p>PK1 PYR(Zn)<sub>2</sub>[(D-Cya)<sub>3</sub>-OH]<sub>2</sub></p>	
<p>MD371</p> <p>Мол. масса 1710</p>	<p>PK1 PYR(Zn)<sub>2</sub>-[D-Asp-D-Asp]<sub>2</sub></p>	
<p>MD373</p> <p>Мол. масса 1940</p>	<p>PK1 PYR(Zn)<sub>2</sub>-[D-Asp-D-Asp-D-Asp]<sub>2</sub></p>	



Термин "алкил", использованный сам по себе или в комбинации, в данном документе относится к насыщенной углеводородной группе с прямой или разветвленной цепью. Термин "C<sub>1-12</sub>алкил" относится к такой группе, содержащей от одного до двенадцати атомов углерода, и "низший алкил" относится к C<sub>1-6</sub>алкильным группам, содержащим от одного до шести атомов углерода, таким как метил ("Me"), этил ("Et"), н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил и т.п.

Термин "ацил" относится к группе C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил-C(O)-.

Термин "хиральный" относится к молекулам, которые имеют свойство неналожения на свое зеркальное отображение, а термин "ахиральный" относится к молекулам, которые накладываются на свое зеркальное отображение.

Термин "стереоизомеры" относится к соединениям, которые имеют идентичный химический состав, но отличаются друг от друга расположением атомов или групп в пространстве.

Термин "диастереомер" относится к стереоизомеру с двумя или более центрами хиральности, чьи молекулы не являются зеркальными отображениями друг друга. Диастереомеры имеют разные физические свойства, например точки плавления, точки кипения, спектральные свойства и реакционные способности. Смеси диастереомеров могут быть разделены аналитическими методами высокого разрешения, такими как электрофорез и хроматография.

Термин "энантиомеры" относится к стереоизомерам соединения, зеркальные отображения которых не накладываются друг на друга.

Стереохимические определения и конвенции, использованные в данном описании, как правило, соответствуют S.P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; и Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Многие органические соединения существуют в оптически активных формах, т.е. они обладают способностью вращать плоскость плоскополяризованного света. При описании оптически активного соединения префиксы D и L или R и S используются для обозначения абсолютной конфигурации молекулы вокруг ее хирального(ых) центра(ов). Префиксы d и l или (+) и (-) используются для обозначения знака вращения плоскополяризованного света соединением, при этом (-) или l означают, что соединение является левовращающим. Соединение с префиксом (+) или d является правовращающим. Для данной химической структуры эти стереоизомеры являются идентичными, за исключением того, что они являются зеркальными отображениями друг друга. Конкретный стереоизомер может также называться энантиомером, и смесь таких изомеров часто называется энантиомерной смесью. Смесь энантиомеров в соотношении 50:50 называется рацемической смесью или рацематом, и такая смесь образовывается при отсутствии стереоселективности или стереоспецифичности в химической реакции или в химическом процессе. Термины "рацемическая смесь" и "рацемат" относятся к эквимольной смеси двух

энантиомерных молекул, лишенной оптической активности.

В данном документе, в тех случаях, когда это необходимо, названия аминокислот и их производных могут быть указаны сокращенно с использованием их соответствующих трехбуквенных или однобуквенных кодов. Например, цистеиновая кислота может упоминаться как Cys, Cyst или Cyst-SO<sub>3</sub>H, аспарагиновая кислота может упоминаться как Asp.

Соли соединений по изобретению предпочтительно являются фармацевтически приемлемыми, но следует понимать, что нефармацевтически приемлемые соли также входят в объем настоящего изобретения, поскольку они полезны в качестве промежуточных соединений в получении фармацевтически приемлемых солей.

Следует понимать, что соединения по изобретению и их соли могут быть представлены в форме фармацевтически приемлемых производных. Термин "фармацевтически приемлемое производное" охватывает фармацевтически приемлемые сложные эфиры, пролекарства, сольваты и гидраты соединений формулы (I) или их солей. Фармацевтически приемлемые производные могут включать любой фармацевтически приемлемый гидрат или любое другое соединение или пролекарство, которое после введения субъекту способно превращаться (напрямую или опосредованно) в соединение по изобретению или его активный метаболит или остаток.

Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты, соли присоединения основания и соли четвертичных аминов и пиридиниевые соли. Соли присоединения кислоты образуются из соединения по изобретению и фармацевтически приемлемой неорганической или органической кислоты, включая, без ограничения, соляную, бромоводородную, серную, фосфорную, метансульфоновую, толуолсульфоновую, бензолсульфоновую, уксусную, пропионовую, аскорбиновую, лимонную, малоновую, фумаровую, малеиновую, молочную, салициловую, сульфаминовую, винную кислоты или аминокислоты. Противоионы четвертичных аминов и пиридиниевые соли включают хлорид, бромид, йодид, сульфат, фосфат, метансульфонат, цитрат, ацетат, малонат, фумарат, сульфамат и тартрат. Соли присоединения основания включают, без ограничения, соли натрия, калия, кальция, лития, магния, аммония и алкиламмония. Кроме того, основные азотсодержащие группы могут быть кватернизированы такими агентами, как низшие алкилгалогениды, такие как метил-, этил-, пропил- и бутилхлориды, -бромиды и -йодиды; диалкилсульфаты, такие как диметил- и диэтилсульфат, и другие. Соли могут быть получены известным способом, например путем обработки соединения подходящей кислотой или подходящим основанием в присутствии подходящего растворителя.

Соединения по изобретению могут находиться в кристаллической форме и/или в виде сольватов (например, гидратов), и обе формы входят в объем настоящего изобретения. Термин "сольват" представляет собой комплекс переменной стехиометрии, образованный растворенным веществом (в данном изобретении соединением по изобретению) и растворителем. Такие растворители не должны влиять на биологическую активность растворенного вещества. Растворителями могут быть, в качестве примера, вода, этанол или уксусная кислота. Способы сольватации общеизвестны в данной области.

Термин "пролекарство" использован в его самом широком смысле и охватывает те производные, которые *in vivo* превращаются в соединения по изобретению. Такие производные известны специалистам в данной области и включают, например, соединения, в которых свободная гидроксигруппа превращена в сложноэфирное производное, или кольцевой атом азота превращен в N-оксид. Примеры сложноэфирных производных включают алкиловые сложные эфиры, фосфатные сложные эфиры и те, которые образуются из аминокислот, предпочтительно валина. Любое соединение, которое является пролекарством соединения по изобретению, входит в объем и замысел изобретения.

Термин "фармацевтически приемлемый сложный эфир" охватывает биологически приемлемые сложные эфиры соединения по изобретению, такие как производные сульфоновых, фосфоновых и карбоновых кислот.

Таким образом, в настоящем изобретении раскрыто пролекарство или фармацевтически приемлемый сложный эфир соединения по изобретению или его соли.

Следует понимать, что соединения по изобретению имеют по меньшей мере один асимметрический центр и, следовательно, способны существовать в более чем одной стереоизомерной форме. Изобретение распространяется на каждую из этих форм индивидуально и на их смеси, включая рацематы. Изомеры обычно могут быть разделены хроматографическими методами или с использованием разделяющего агента. Альтернативно, индивидуальные изомеры могут быть получены в результате асимметрического синтеза с использованием хиральных промежуточных соединений. Если соединение имеет по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь, то оно может существовать в Z- и E- формах, причем все изомерные формы соединений входят в объем настоящего изобретения.

Изобретение также охватывает в тех случаях, когда это возможно, соль или фармацевтически приемлемое производное, такое как фармацевтически приемлемый сложный эфир, сольват и/или пролекарство вышеупомянутых воплощений изобретения.

В настоящем изобретении раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество одного или более вышеупомянутых соединений или их фармацевтически приемлемых солей, включая их фармацевтически приемлемые производные, и возможно фармацевтически

приемлемый носитель или разбавитель.

В настоящем изобретении раскрыты фармацевтические композиции для использования в лечении или предупреждении инфекции, вызванной вирусом гриппа, содержащие эффективное количество соединения по изобретению или его фармацевтически приемлемой соли, включая его фармацевтически приемлемое производное, и возможно фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Термин "композиция" включает в себя препарат активного ингредиента с инкапсулирующим веществом в качестве носителя, образующим капсулу, в которой активный ингредиент (с другим носителем или без другого носителя) окружен носителями.

Фармацевтические композиции или препараты включают те из них, которые являются подходящими для перорального, ректального, назального, местного (включая трансбуккальное и сублингвальное), вагинального или парентерального (включая внутримышечное, подкожное и внутривенное) введения, или в форме, подходящей для введения ингаляцией или инсуффляцией. В одном из воплощений соединения по изобретению приготовлены в форме для ингаляционного введения, перорального введения, интраназального введения, интраперитонеального введения, внутривенного введения или внутримышечного введения.

Общее рассмотрение приготовления и/или изготовления агентов фармацевтических композиций можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) и в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition (Lippincott Williams & Wilkins, 2005).

В одном из воплощений композиции и препараты в соответствии с изобретением можно вводить нуждающемуся в них субъекту любым подходящим ингаляционным, инсуффляционным или интраназальным способом доставки. Подходящие способы ингаляции, инсуффляции или интраназального введения общеизвестны специалисту в данной области.

В одном из воплощений композиции или препараты соединений по изобретению могут быть в форме, подходящей для введения ингаляцией или инсуффляцией. Например, композиции или препараты соединений по изобретению могут быть приготовлены в виде сухого порошка, раствора, суспензии или аэрозоля для ингаляции или инсуффляции через рот или нос. Препараты, подходящие для введения в виде аэрозоля или сухого порошка, могут быть приготовлены стандартными способами и могут доставляться с другими терапевтическими агентами, такими как соединения, прежде используемые в лечении или профилактике инфекций, описанных в данном документе.

В одном из воплощений композиции или препараты соединений по изобретению можно вводить посредством ингалятора сухого порошка. Могут быть использованы ингаляторы сухого порошка тех типов, которые раскрыты в данной области, а также могут быть использованы микронизированные стружки изостатически прессованных таблеток или дисков лекарственного средства с инертными связывающими веществами или без них, такими как лактоза. Этот способ введения обеспечивает особенно быструю доставку в легкое. Когда соединение по изобретению предоставляют в форме сухого порошка, оно может быть предоставлено само по себе или в смеси с подходящим фармацевтически приемлемым разбавителем, таким как крахмал, производные крахмала, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза или поливинилпирролидин (PVP), производные сахаров, такие как маннит или лактоза.

Порошковая композиция может присутствовать в форме стандартной дозы, например в капсулах или картриджах, например желатиновых, или в сформованных пластиковых или блистерных упаковках, из которых порошок можно вводить посредством ингаляционного устройства, или в многодозовой форме из, например, резервуара с порошком.

Для ингаляции капель, туманов и аэрозолей легкодоступными являются различные устройства, такие как небулайзеры или генераторы аэрозоля под давлением. Кроме того, такие устройства могут быть дозирующими для обеспечения однородности дозирования.

Все ингаляторы могут быть сконструированы и приспособлены для доставки жидкости или твердых частиц в слизистую оболочку носа, а также в верхние и/или нижние дыхательные пути.

В другом воплощении композиции или препараты соединений по изобретению можно вводить ингаляцией или инсуффляцией с помощью ингалятора влажного аэрозоля. Например, композиции или препараты соединений по изобретению могут быть приготовлены для введения ингаляцией влажного аэрозоля из ингалятора, обеспечивающего предварительное отмеривание дозы.

В дополнительном воплощении композиции или препараты соединений по изобретению находятся в форме, подходящей для введения интраназально. Интраназальные композиции, раскрытые в данном документе, можно вводить в виде спрея или капель. Соответственно подходящие товарные упаковки, содержащие интраназальный препарат, могут представлять собой любой спрей-контейнер, известный в данной области. В одном или более воплощениях препараты в соответствии с изобретением можно вводить посредством распыляющего устройства или контейнера. Распыляющие устройства в соответствии с изобретением могут представлять собой системы однократной стандартной дозы или многодозовые системы, например, содержащие флакон, насос и/или исполнительный механизм. Такие устройства-распылители коммерчески доступны. Подходящие коммерческие устройства-распылители включают устройства, доступные от Nemera, Aptar, Bepak и Becton-Dickinson. Другие подходящие средства для

введения композиций или препаратов интраназально в соответствии с изобретением включают капельницу, шприц, пластиковый флакон и любые другие средства, известные в данной области для нанесения жидкости на слизистую оболочку носа точным и воспроизводимым образом.

Соединения по настоящему изобретению можно также вводить в разнообразных пероральных и парентеральных дозировочных формах. Для специалистов в данной области будет очевидно, что указанные ниже дозировочные формы могут содержать в качестве активного компонента либо соединение по изобретению, либо фармацевтически приемлемую соль соединения по изобретению.

Композиции или препараты соединений по изобретению могут быть в форме стерильного инъекционного препарата, такого как стерильная инъекционная водная или масляная суспензия. Эта суспензия может быть приготовлена способами, известными в данной области, с использованием тех подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов, которые упомянуты в данном описании. Стерильный инъекционный препарат может также представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например раствор в 1,3-бутан-диоле, или может быть приготовлен в виде лиофилизированного порошка. Среди приемлемых разбавителей и растворителей, которые могут быть использованы, находятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, обычно могут быть использованы стерильные нелетучие масла в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели может быть использовано любое мягкое нелетучее масло, в том числе синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, также могут быть использованы в приготовлении инъекционного препарата. Более того, препараты, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, бактериостатические средства и растворенные вещества, которые делают препарат изотоническим с кровью назначенного реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие агенты и загустители.

Композиции или препараты соединений по изобретению можно также вводить перорально. Например, могут быть приготовлены таблетки, пастилки, леденцы, водные или масляные суспензии, диспергируемые порошки или гранулы, эмульсии, твердые или мягкие капсулы, сиропы или эликсиры. Композиции, предназначенные для перорального применения, могут быть приготовлены любым способом, известным в данной области для изготовления фармацевтических композиций, и с целью получения приятного на вид и на вкус препарата такие композиции могут содержать один или более агентов, включающих подсластители, корригенты, красители и консерванты.

Соединения по изобретению вместе с традиционным вспомогательным веществом, носителем или разбавителем могут быть приготовлены в форме фармацевтических композиций и их стандартных лекарственных форм, и в такой форме они могут быть использованы в виде твердых веществ, таких как таблетки или заполненные капсулы, или в виде жидкостей, таких как растворы, суспензии, эмульсии, эликсиры или капсулы, заполненные ими, все для перорального применения; в форме суппозитория для ректального введения; или в форме стерильных инъекционных растворов для парентерального (в том числе подкожного) применения.

Такие фармацевтические композиции и их стандартные лекарственные формы могут содержать традиционные ингредиенты в традиционных пропорциях, с дополнительными активными соединениями или началами или без них, и такие стандартные лекарственные формы могут содержать любое подходящее эффективное количество активного ингредиента, соответствующее назначенному для использования суточному диапазону дозировки. Препараты, содержащие 10 мм активного ингредиента или, более широко, от 0,1 до 100 мм на таблетку, являются, следовательно, подходящими репрезентативными стандартными лекарственными формами.

Для приготовления фармацевтических композиций из соединений по настоящему изобретению фармацевтически приемлемые носители могут представлять собой либо твердое вещество, либо жидкость. Препараты в твердой форме включают порошки, таблетки, пилюли, капсулы, облатки, суппозитории и диспергируемые гранулы. Твердым носителем может быть одно или более веществ, которые могут также действовать в качестве разбавителей, корригентов, солубилизаторов, смазывающих веществ, суспендирующих агентов, связывающих веществ, консервантов, агентов, разрыхляющих таблетки, или инкапсулирующего вещества.

В порошках носитель представляет собой тонкоизмельченное твердое вещество и находится в смеси с тонкоизмельченным активным компонентом.

В таблетках активный компонент смешан с носителем, имеющим необходимую связывающую способность, в подходящих пропорциях и спрессован в желаемую форму желаемого размера.

Порошки и таблетки предпочтительно содержат от пяти или десяти до семидесяти процентов активного соединения. Подходящими носителями являются карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар, лактоза, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, натрий-карбоксиметилцеллюлоза, низкоплавкий воск, масло какао и т.п. Термин "препарат" охватывает композицию активного соединения с инкапсулирующим веществом в качестве носителя, создающим капсулу, в которой активный компонент, с носителями или без них, окружен носителем, который таким образом

находится в ассоциации с ним. Аналогично, охвачены облатки и пастилки. Таблетки, порошки, капсулы, пилюли, облатки и пастилки могут быть использованы в качестве твердых форм, подходящих для перорального введения.

Для изготовления суппозитория сначала плавят низкоплавкий воск, такой как смесь глицеридов жирных кислот или масло какао, и активный компонент гомогенно диспергируют в нем при перемешивании. Расплавленную гомогенную смесь затем заливают в подходящие формы определенного размера и оставляют охлаждаться и, следовательно, затвердевать.

Композиции, подходящие для вагинального введения, могут быть представлены в форме пессариев, тампонов, кремов, гелей, паст, пенки или спреев, содержащих помимо активного ингредиента такие носители, которые известны в данной области как подходящие.

Препараты в жидкой форме включают растворы, суспензии и эмульсии, например водные или водно-пропиленгликолевые растворы. Например, парентеральные инъекционные жидкие препараты могут быть приготовлены в виде растворов в водно-полиэтиленгликолевом растворе.

Стерильные жидкие композиции включают стерильные растворы, суспензии, эмульсии, сиропы и эликсиры. Активный ингредиент может быть растворен или суспендирован в фармацевтически приемлемом носителе, таком как стерильная вода, стерильный органический растворитель или их смесь.

Таким образом, соединения по настоящему изобретению могут быть приготовлены для парентерального введения (например, введения инъекцией, например болюсной инъекцией или непрерывной инфузией) и могут быть представлены в форме стандартной дозы в ампулах, предварительно заполненных шприцах, инфузий небольшого объема или в многодозовых контейнерах с добавленным консервантом. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных разбавителях, и могут содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, активный ингредиент может быть в форме порошка, полученного путем асептического выделения стерильного твердого вещества или лиофилизации из раствора, для разведения перед применением подходящим носителем, например стерильной, апиrogenной водой.

Водные растворы, подходящие для перорального применения, могут быть приготовлены путем растворения активного компонента в воде и добавления, при необходимости, подходящих красителей, корригентов, стабилизирующих агентов и загустителей.

Водные суспензии, подходящие для перорального применения, могут быть получены путем диспергирования тонкоизмельченного активного компонента в воде с вязким веществом, таким как природные или синтетические камеди, смолы, метилцеллюлоза, натрий-карбоксиметилцеллюлоза или другие общеизвестные суспендирующие агенты.

Охвачены также препараты в твердой форме, которые предназначены для превращения непосредственно перед использованием в препараты в жидкой форме для перорального введения. Такие жидкие формы включают растворы, суспензии и эмульсии. Эти препараты могут содержать, в дополнение к активному компоненту, красители, корригенты, стабилизаторы, буферы, искусственные и натуральные подсластители, разрыхлители, загустители, солибилизирующие агенты и т.п.

Для местного введения на эпидермис соединения по изобретению могут быть приготовлены в виде мазей, кремов или лосьонов или в виде трансдермального пластыря. Мази и кремы могут быть приготовлены, например, с использованием водной или масляной основы с добавлением подходящих загустителей и/или желирующих агентов. Лосьоны могут быть приготовлены с использованием водной или масляной основы и будут, как правило, содержать также один или более эмульгирующих агентов, стабилизирующих агентов, диспергирующих агентов, суспендирующих агентов, загущающих агентов или красящих агентов.

Препараты, подходящие для местного введения в ротовую полость, включают леденцы, содержащие активный агент в корригирующей основе, обычно сахарозе и аравийской камеди или трагаканте; пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь; и полоскания, содержащие активный ингредиент в подходящем жидком носителе.

Растворы или суспензии наносят непосредственно в носовую полость традиционными средствами, например с использованием капельницы, пипетки или спрея. Композиции могут быть предоставлены в одно- или многодозовой форме. В случае капельницы или пипетки введение выполняется пациентом, вводящим соответствующий предопределенный объем раствора или суспензии. В случае спрея это достигается, например, с помощью дозирующего распыляющего спрей насоса. Для улучшения назальной доставки и удерживания соединения по изобретению могут быть инкапсулированы с использованием циклодекстринов или могут быть приготовлены с другими агентами, которые, как ожидается, улучшают доставку и удерживание в носовой слизистой оболочке.

Введение в дыхательные пути также можно осуществлять посредством аэрозольного препарата, в котором активный ингредиент присутствует в упаковке под давлением с подходящим пропеллентом, таким как гидрофторалкан (HFA) или хлорфторуглерод (CFC), например дихлордифторметан, трихлорфторметан или дихлортетрафторэтан, диоксид углерода или другой подходящий газ. Аэрозоль для удоб-

ства может также содержать поверхностно-активное вещество, такое как лецитин. Дозу лекарственного средства можно контролировать положением дозирующего клапана.

Альтернативно, активные ингредиенты могут быть предоставлены в форме сухого порошка, например порошковой смеси соединения в подходящей порошковой основе, такой как лактоза, крахмал, производные крахмала, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза и поливинилпирролидон (PVP). Для удобства порошковый носитель будет образовывать гель в носовой полости. Порошковая композиция может быть представлена в форме стандартной дозы, например в капсулах или картриджах, например желатиновых, или в блистерных упаковках, из которых порошок можно вводить с помощью ингалятора.

В композициях, предназначенных для введения в дыхательные пути, включая интраназальные композиции, соединение обычно будет иметь частицы малого размера, например порядка 5-10 мкм или меньше. Такой размер частиц достигается способами, известными в данной области, например микронизацией.

Если требуется, могут быть использованы композиции с возможностью длительного высвобождения активного ингредиента.

Фармацевтические препараты предпочтительно находятся в стандартных лекарственных формах. В такой форме препарат подразделен на стандартные дозы, содержащие соответствующие количества активного компонента. Стандартная лекарственная форма может представлять собой упакованный препарат в упаковке, содержащей дискретные количества препарата, например упакованные таблетки, капсулы и порошки в флаконах или ампулах. Также стандартная лекарственная форма может представлять собой саму капсулу, таблетку, пастилку или сам леденец, или она может представлять собой подходящее количество любого из них в упакованной форме.

Изобретение также охватывает соединения в отсутствие носителя в тех случаях, когда соединения находятся в стандартной лекарственной форме.

Количество соединения по изобретению, предназначенное для введения, может находиться в диапазоне от примерно 0,01 до 2000 мг в сутки в зависимости от активности соединения и заболевания, подлежащего лечению.

Количество соединения, необходимое для применения в лечении, будет зависеть от пути введения, характера состояния, которое лечат, и от возраста и состояния животного (включая пациентов-людей) и, в конечном счете, будет на усмотрении лечащего ветеринара или врача.

Например, подходящая доза будет находиться в диапазоне от примерно 0,1 мг до 100 мг/кг массы тела в сутки, предпочтительно в диапазоне от 0,1 мг до 50 мг/кг/сутки.

В некоторых воплощениях дозировка для перорального введения может находиться в диапазоне от 1 до 100 мг/кг/сутки. Доза для инъекции может находиться в диапазоне от 1 до 100 мг/кг/сутки. Доза для ингаляции может находиться в диапазоне от 0,01 до 1 мг/кг/сутки. В некоторых предпочтительных воплощениях доза может находиться в диапазоне от 5 мг до 50 мг/кг для перорального или инъекционного введения два-три раза в сутки в течение периода времени от 1 до 15 суток, предпочтительно от 3 до 12 суток, более предпочтительно от 5 до 10 суток. В других предпочтительных воплощениях доза может находиться в диапазоне 0,1-0,5 мг/кг для ингаляции один-пять раз в сутки в течение периода времени от 1 до 15 суток, предпочтительно от 3 до 12 суток, более предпочтительно в течение периода времени от 5 до 10 суток. Альтернативно, в другом предпочтительном воплощении доза может находиться в диапазоне от 0,2 до 0,4 мг/кг для введения ингаляцией один раз в сутки на всем протяжении лечения. Понятно, что требуемую дозу можно вводить в однократной дозе или в виде разделенной дозы, вводимой через соответствующие интервалы времени, например два, три, четыре или более субдоз в сутки.

Соединения по изобретению удобно вводить в стандартной лекарственной форме, например содержащей от 0,1 до 10 мг активного ингредиента на стандартную лекарственную форму.

Хотя для применения в терапии возможным является введение соединений в виде сырьевого химического соединения, предпочтительно предоставлять активный ингредиент в виде фармацевтической композиции. В настоящем изобретении также раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая соединения вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями и возможно другими терапевтическими и/или профилактическими ингредиентами. Носитель или носители должны быть "приемлемыми" в том смысле, что они должны быть совместимыми с другими ингредиентами композиции и не должны наносить вред реципиенту.

Фармацевтические композиции включают композиции, подходящие для перорального, ректального, назального или парентерального (включая внутримышечное, интрадермальное, подкожное и внутривенное) введения, или в форме, подходящей для введения в желудочно-кишечный тракт, или в форме, подходящей для введения в дыхательные пути (включая носовые раковины), например ингаляцией или инсуффляцией, или для интрадермальной или подкожной имплантации, или для трансдермального пластыря. Композиции, если это целесообразно, для удобства могут быть представлены в дискретных дозирочных формах и могут быть приготовлены любыми способами, известными в данной области. Все способы включают стадию приведения активного соединения в контакт с носителем, таким как жидкий носитель или тонкоизмельченный твердый носитель или их комбинации, и затем, если необходимо, стадию придания продукту формы желаемого препарата.

Жидкости или порошки для интраназального введения, таблетки или капсулы для перорального введения и жидкости для внутривенного введения являются предпочтительными композициями.

Фармацевтические препараты соединений по настоящему изобретению можно вводить совместно с одним или более другими активными агентами в комбинированной терапии. Например, фармацевтический препарат активного соединения можно вводить совместно (например, отдельно, параллельно или последовательно) с одним или более другими противовирусными агентами, антибиотиками и противовоспалительными лекарственными средствами.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, которое является достаточным для эффективного лечения, как определено выше, при введении нуждающемуся в таком лечении субъекту, такому как млекопитающее, включая человека. Терапевтически эффективное количество будет варьировать в зависимости от субъекта и болезненного состояния, подлежащего лечению, тяжести болезни и способа введения, и может быть определено рутинно специалистом в данной области.

Термин "лечение", использованный в данном документе, охватывает любое лечение заболевания или болезни у животного, предпочтительно млекопитающего, более предпочтительно человека, и включает (1) предупреждение возникновения заболевания или состояния у субъекта; (2) торможение заболевания или состояния, (3) ослабление заболевания или состояния или (4) ослабление состояний/симптомов, вызванных заболеванием.

Термины "предупреждение" и "профилактика" в данном документе относятся к введению лекарственного средства заранее, чтобы избежать или предотвратить появление одного или более симптомов заболевания или расстройства. Специалист в области медицины знает, что термин "предупреждать" не является абсолютным термином. Понятно, что в медицине он относится к профилактическому введению лекарственного средства для значительного снижения вероятности и серьезности состояния или симптома состояния и в этом значении подразумевается в данном описании. Как используется в стандартном в данной области тексте Настольного справочника врача (Physician's Desk Reference), термины "предупреждать", "предупреждающий" и "предупреждение" применительно к расстройству или заболеванию относятся к предотвращению причины, эффектов, симптомов или прогрессирования заболевания или расстройства до того, как само заболевание или расстройство полностью проявится.

Термины "вводить", "осуществление введения" или "введение" при упоминании соединения, композиции или препарата по изобретению означают введение соединения в систему животного, нуждающегося в лечении. Когда соединение по изобретению предоставляют в комбинации с одним или более другими активными агентами, тогда понятно, что термин "введение" и его варианты включают в себя параллельное и/или последовательное введение соединения и других активных агентов.

### Примеры

Раскрытые в данном описании аспекты дополнительно описаны приведенными ниже примерами, не являющимися ограничивающими.

Общие методы и примечания.

Если не указано иное, ЯМР-спектры регистрировали на Bruker Avance 300, Xwin-HMR версия 3.5 на DPX 300A.

Если не указано иное, масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Waters Micromass ZMD с ЭРИ (электрораспылительная ионизация) с использованием программного обеспечения Water Mass Lynx NT.

Если не указано иное, колоночную флэш-хроматографию осуществляли на силикагеле 60 F245 (E. Merck).

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) выполняли на пластинах, предварительно покрытых силикагелем (E. Merck).

Если не указано иное, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) осуществляли на разделительном модуле Waters Alliance 2690, используя двухволновой УФ-детектор Waters 2487 UV и программное обеспечение Waters Millennium 32.

Общие правила процедур с лабораторными животными.

Релевантные эксперименты с использованием лабораторных животных проводили в соответствии с правилами этики, одобренными Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (Institutional Animal Care and Use Committee) соответствующих институтов/университетов.

Общая методика анализа снижения бляшкообразования.

Клетки MDCK (клетки Мадин-Дарби почек собак) высевали в шестилуночные планшеты для культуры ткани и выращивали до конfluence стандартными методами. Вирусы гриппа разводили в минимальном объеме забуференного фосфатами физиологического раствора (PBS), дополненного 0,2% BSA (бычий сывороточный альбумин), с получением расчетного титра от 50 до 100 БОЕ (бляшкообразующая единица) на лунку. После абсорбции на клетки MDCK в течение 1 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> вирусный инокулят аспирировали и заменяли вирусной ростовой средой (минимальная среда Игла, дополненная BSA, трипсином и инсулин-трансферрин-селеном), содержащей агар или агарозу в количестве (обычно 1-2%), достаточном для того, чтобы среда образовывала гель при комнатной температуре. Планшеты инкубировали при 37°C в CO<sub>2</sub> атмосфере до развития бляшек (обычно 2-4 суток). Бляшки ви-

зуализировали подходящим красителем (например, 0,4%-ным кристаллическим фиолетовым в формальном физиологическом растворе), после чего их подсчитывали. Противовирусную эффективность ( $EC_{50}$ ) определяли как концентрацию соединения в среде, снижающую число бляшек на 50% от значения для необработанного контроля.

Материалы и общая методика для анализа CPE (цитопатический эффект).

Тестируемые соединения растворяли в стерильной воде и хранили при  $-20^{\circ}C$ . Соединения затем разводили в среде для анализа (MEM + трипсин) до желаемых концентраций.

Среда для анализа содержала среду Gibco 1 MEM (500 мл), дополненную 1 mM MEM заменимых аминокислот, 50 ед. пенициллина-50 мкг/мл стрептомицина, 1 mM пирувата натрия. Трипсин (обработанный TPCK (N-фенил-L-фенилаланил-хлорметилкетон)) добавляли в среду до конечной концентрации 1 мкг/мл, после чего проводили анализ.

Клетки MDCK (ATCC (Американская коллекция типовых культур)) выращивали в ростовой среде Gibco 1xMEM (500 мл), дополненной 1 mM MEM заменимых аминокислот, 50 ед. пенициллина-50 мкг/мл стрептомицина, 1 mM пирувата натрия и 10% FBS (фетальная бычья сыворотка).

Вирусный исходный материал разводили в PBS.

Анализ проводили с использованием набора для определения клеточной пролиферации CellTitre 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Analysis (Promega).

Если не указано иное, следующий общий метод использовали для анализов CPE.

- 1) Клетки MDCK выращивали до конfluence в 96-луночных планшетах в ростовой среде.
- 2) Среда удаляла.
- 3) 46 мкл разведенного вируса добавляли на лунку, включая ложно инфицированные лунки.
- 4) Планшеты инкубировали при  $37^{\circ}C$  в течение 1,5 ч. В это же время подготавливали тестируемые соединения.
- 5) Через 1,5 ч вирусный инокулят удаляли.
- 6) Соединения, предназначенные для тестирования, подготавливали путем осуществления серийного разведения 1:3 соединений на вышеупомянутых планшетах:
  - а) 100 мкл среды для анализа добавляли в лунки рядов 3-11;
  - б) 150 мкл соединений добавляли в лунки ряда 2;
  - в) выполняли титрование 50 мкл от ряда 2 до 10, затем 50 мкл декантировали из ряда 10;
  - г) лунки ряда 11 служили в качестве положительного и отрицательного контроля.
- 7) Клетки инкубировали при  $37^{\circ}C$  в течение 48-96 ч.
- 8) Через 48-96 ч после инфицирования среду удаляли.
- 9) Среда заменяли 100 мкл среды для анализа без трипсина.
- 10) Добавляли 20 мкл на лунку детекционного раствора.
- 11) Планшеты инкубировали при  $37^{\circ}C$  в течение еще 1 ч.
- 12) Поглощение планшетов измеряли при 490 нм.

Пример 1. Предварительная обработка вируса тестируемыми соединениями до инфицирования клеток MDCK.

Репрезентативные соединения формулы (I) использовали для оценки противовирусной активности до инфицирования клеток MDCK. MD345 [(PK2 TCA( $Z_0$ )<sub>2</sub>-[D-Cya-SO<sub>3</sub>H]<sub>7</sub>-OH)], MD345 [(PK2 TCA( $Z_0$ )<sub>2</sub>-[Cya]<sub>7</sub>-OH)], MD348 [(CHTCA( $Z_0$ )<sub>2</sub>-D-Asp-(D-Cya)-D-Asp-(D-Cya)-D-Asp-(D-Cya)-OH)] и MD348 [(CHTCA( $Z_0$ )<sub>2</sub>-D-Asp-(D-Cya-SO<sub>3</sub>H)-D-Asp-(D-Cya-SO<sub>3</sub>H)-D-Asp-(D-Cya-SO<sub>3</sub>H)-OH)] тестировали в качестве репрезентативных соединений формулы (I). Тестировали активность против двух вирусных штаммов, A/Sydney/250/99 (H1N1) и A/Sydney/5/97 (H3N2). Занамивир использовали в качестве контроля.

Условия детально изложены в табл. 1 и суммарно представлены на фиг. 1.

Таблица 1

## Краткое изложение условий для предварительной обработки вируса до инфицирования клеток MDCK

Условие 1	Вирус в PBS предварительно адсорбировали на клетки MDCK при 37°C в течение 1 ч, суспензию вируса удаляли, затем клетки промывали PBS (x 1), добавляли среду для анализа и инкубировали при 37°C в течение 72 ч. Тестирование осуществляли методом колориметрического анализа с использованием МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид).
Условие 2	Вирус обрабатывали PBS при комнатной температуре (к.т.) в течение 60 минут, затем преадсорбировали на клетки MDCK при 37°C в течение 1 ч. Суспензию вируса удаляли. Клетки промывали PBS (x 1), добавляли среду для анализа и инкубировали при 37°C в течение 72 ч. Тестирование осуществляли методом колориметрического анализа с использованием МТТ.
Условие 3	Вирус обрабатывали трипсином (11 тг/мл) при к.т. в течение 60 минут, затем преадсорбировали на клетки MDCK при 37°C в течение 1 ч, суспензию вируса удаляли, после этого клетки промывали PBS (x 1), добавляли среду для анализа и инкубировали при 37°C в течение 72 ч. Тестирование осуществляли методом колориметрического анализа с использованием МТТ.
Условие 4	Вирус обрабатывали трипсином (1 мкг/мл) при к.т. в течение 30 минут, затем смешивали с соединением при к.т. в течение 30 минут, после этого преадсорбировали на клетки MDCK при 37°C в течение 1 ч. Суспензию вируса удаляли. Клетки промывали PBS (x 1), добавляли среду для анализа и инкубировали при 37°C в течение 72 ч. Тестирование осуществляли методом колориметрического анализа с использованием МТТ.
Условие 5	Вирус обрабатывали соединением при к.т. в течение 30 минут, затем смешивали с трипсином (1 мкг/мл) при к.т. в течение 30 минут, после этого преадсорбировали на клетки MDCK при 37°C в течение 1 ч. Суспензию вируса удаляли. Клетки промывали PBS (x 1), добавляли среду для анализа и инкубировали при 37°C в течение 72 ч. Тестирование осуществляли методом колориметрического анализа с использованием МТТ.
Условие 6	Вирус, соединение и трипсин (1 мкг/мл) смешивали при к.т. в течение 1 ч, затем преадсорбировали на клетки MDCK при 37°C в течение 1 ч. Суспензию вируса удаляли. Клетки промывали PBS (x 1), добавляли среду для анализа и инкубировали при 37°C в течение 72 ч. Тестирование осуществляли методом колориметрического анализа с использованием МТТ.
Условие 7	Вирус смешивали с соединением при к.т. в течение 1 ч, затем преадсорбировали на клетки MDCK при 37°C в течение 1 ч, суспензию вируса удаляли. Клетки промывали PBS (x 1), добавляли среду для анализа и инкубировали при 37°C в течение 72 ч. Тестирование осуществляли методом колориметрического анализа с использованием МТТ.

Результаты для A/Sydney/250/99 суммированы в табл. 2 и на фиг. 2А-2С. Результаты для A/Sydney/5/97 суммированы в табл. 3 и на фиг. 3А-3С.

Результаты свидетельствуют о том, что соединения формулы (I), MD345 и MD348, нейтрализовали

вирусы A/Sydney/25/99 (H1N1) и A/Sydney/5/97 (H3N2) внеклеточно. Предварительная обработка вирусов занамивиром не влияла на инфективность вирусов.

Последующее сравнение действия в зависимости от времени соединения MD345-2 и занамивира против A/Sydney/250/99 показывает, что соединение MD345-2 нейтрализует вирус менее чем за 1 мин. Результаты для A/Sydney/250/99 суммированы в табл. 2 и на фиг. 2А-2С. Результаты для A/Sydney/5/97 суммированы в табл. 4 и на фиг. 4.

Таблица 2

Предварительная обработка вируса до инфицирования клеток MDCK.  
Тестируемые соединения: MD348-2, MD345-2 и занамивир (контроль).  
Титр вируса: A/Sydney/25/99

<i>MD348-2</i>				
Условия				Среднее значение
1	0,368	0,404	0,332	0,368
2	0,386	0,307	0,372	0,355
3	0,361	0,347	0,326	0,345
4	1,963	2,507	2,44	2,303
5		2,501	2,386	2,444
6	2,301	2,26	2,29	2,284
7	2,083	2,407	2,413	2,301
Отсутствие инфицирования	2,236	2,268	2,285	2,263

<i>MD348-2</i>	
% от контроля (отсутствие инфицирования)	
1	16%
2	16%
3	15%
4	102%
5	108%
6	101%
7	102%
Отсутствие инфицирования	100%

<i>MD345-2</i>				
Условия				Среднее значение
1	0,368	0,404	0,332	0,368
2	0,386	0,307	0,372	0,355
3	0,361	0,347	0,326	0,345
4	2,384	2,468	2,219	2,357
5	2,37	2,109	2,277	2,252
6	2,305	2,303	2,206	2,271
7	2,203	2,14	2,168	2,170
Отсутствие инфицирования	2,236	2,268	2,285	2,263

<i>MD345-2</i>	
% от контроля (отсутствие инфицирования)	
1	16%
2	16%
3	15%
4	104%
5	100%
6	100%
7	96%
Отсутствие инфицирования	100%

<i>Занамивир</i>				
Условия				Среднее значение
1	0,368	0,404	0,332	0,368
2	0,386	0,307	0,372	0,355
3	0,361	0,347	0,326	0,345
4	0,466	0,461	0,967	0,631
5	0,419	0,409	0,625	0,484
6	0,446	0,512	0,443	0,467
7	0,663	0,791		0,727
Отсутствие инфицирования	2,236	2,268	2,285	2,263

<i>Занамивир</i>	
% от контроля (отсутствие инфицирования)	
1	16%
2	16%
3	15%
4	28%
5	21%
6	21%
7	32%
Отсутствие инфицирования	100%

Примечания: соединения растворяли в H<sub>2</sub>O до 50 мкг/мл. Дальнейшие разведения делали в 1×PBS до 5 мкг/мл. Клетки выдерживали в среде, содержащей 1 мкг/мл трипсина. Анализировали через 72 ч после инфицирования. (1000 140711) 0,5×10<sup>-4</sup> вируса преадсорбировали в течение 1 ч, вирус удаляли, клетки промывали однократно, добавляли свежую среду и инкубировали в течение 72 ч.

Таблица 3

Предварительная обработка вируса до инфицирования клеток MDCK.  
Тестируемые соединения: MD348-2, MD345-2 и занамивир (контроль).  
Титр вируса: A/Sydney/5/97

<i>MD348-2</i>				
Условия				Среднее значение
1	0,296	0,308	0,299	0,301
2	0,283	0,298	0,291	0,291
3	0,269	0,277	0,262	0,269
4	1,82	2,526	2,682	2,343
5	2,6	2,488	2,625	2,571
6	2,69	2,48	2,658	2,609
7	2,597	2,46	2,69	2,582
Отсутствие инфицирования	2,581	2,501	2,581	2,554

<i>MD348-2</i>	
% от контроля (отсутствие инфицирования)	
1	12%
2	11%
3	11%
4	92%
5	101%
6	102%
7	101%
Отсутствие инфицирования	100%

<i>MD345-2</i>				
Условия				Среднее значение
1	0,296	0,308	0,299	0,301
2	0,283	0,298	0,291	0,291
3	0,269	0,277	0,262	0,269
4	2,547	2,621	2,451	2,540
5	2,444	2,473	2,486	2,468
6	2,568	2,523	2,456	2,516
7	2,491	2,437	2,437	2,455
Отсутствие инфицирования	2,581	2,501	2,581	2,554

<i>MD345-2</i>	
% от контроля (отсутствие инфицирования)	
1	12%
2	11%
3	11%
4	99%
5	97%
6	98%
7	96%
Отсутствие инфицирования	100%

<i>Занамивир</i>				
Условия				Среднее значение
1	0,296	0,308	0,299	0,301
2	0,283	0,298	0,291	0,291
3	0,269	0,277	0,262	0,269
4	0,329	0,322	0,322	0,324
5	0,329	0,325	0,303	0,319
6	0,32	0,336	0,324	0,327
7	0,322	0,298	0,293	0,304
Отсутствие инфицирования	2,581	2,501	2,581	2,554

<i>Занамивир</i>	
% от контроля (отсутствие инфицирования)	
1	12%
2	11%
3	11%
4	13%
5	12%
6	13%
7	12%
Отсутствие инфицирования	100%

Примечания: соединения растворяли в H<sub>2</sub>O до 50 мкг/мл. Дальнейшие разведения делали в 1×PBS до 5 мкг/мл. Клетки выдерживали в среде, содержащей 1 мкг/мл трипсина. Анализировали через 72 ч после инфицирования. (2000 271011) 1×10<sup>-4</sup> вируса преадсорбировали в течение 1 ч, вирус удаляли, клетки промывали однократно, добавляли свежую среду и инкубировали в течение 72 ч.

Таблица 4

Сравнение действия в зависимости от времени для предварительной обработки вируса до инфицирования клеток MDCK. Тестируемые соединения: MD345-2 и занамивир (контроль). Титр вируса: A/Sydney/250/99

MD345-2								
Время (мин)	Условие 3			Среднее значение	Условие 6			Среднее значение
	1	0,335	0,354		0,395	0,361	1,752	
5	0,337	0,366	0,367	0,357	1,856	1,723	1,727	1,769
10	0,354	0,363	0,337	0,351	1,764	1,724	1,717	1,735
20	0,354	0,373	0,359	0,362	1,705	1,645	1,626	1,659
25	0,311	0,437	0,346	0,365	1,588	1,539	1,693	1,607
30	0,314	0,347		0,331	1,762	1,756	1,746	1,755
Контроль	1,829	1,71	1,625	1,721	1,829	1,71	1,625	1,721

Занамивир						
Время (мин)	Условие 3		Среднее значение	Условие 6		Среднее значение
	1	0,356		0,318	0,337	
5	0,347	0,355	0,351	0,394	0,609	0,502
10	0,323	0,37	0,347	0,326	0,487	0,407
20	0,347	0,358	0,353	0,461	0,728	0,595
25	0,411	0,339	0,375	0,375	0,322	0,349
30	0,383	0,373	0,378	0,357	0,353	0,355
Контроль			1,721			1,721

Время (мин)	MD345-2		Занамивир	
	Условие 3	Условие 6	Условие 3	Условие 6
1	21%	100%	20%	33%
5	21%	103%	20%	29%
10	20%	101%	20%	24%
20	21%	96%	20%	35%
25	21%	93%	22%	20%
30	19%	102%	22%	21%

Примечание: соединения растворяли в H<sub>2</sub>O до 50 мкг/мл. Дальнейшие разведения делали в 1×PBS до 5 мкг/мл. Клетки выдерживали в среде, содержащей 1 мкг/мл трипсина. Анализировали через 72 ч после инфицирования. (1000 140711) 1×10<sup>-4</sup> вируса преадсорбировали в течение 1 ч, вирус удаляли, клетки промывали однократно, добавляли свежую среду и инкубировали в течение 72 ч.

Пример 2. Сравнение влияния переменных кислотных/анионных групп на противовирусную активность тестируемых соединений.

Репрезентативные соединения формулы (I) использовали для сравнения влияния кислотных/анионных групп на противовирусную активность. В качестве репрезентативных соединений формулы (I) тестировали следующие соединения:

MD314-1: (CHTCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>-L-Asp-(L-Cyst-SO<sub>3</sub>H)-Asp-(L-Cyst-SO<sub>3</sub>H)-L-Asp-(L-Cyst-SO<sub>3</sub>H)-OH, содержащее 3 сульфоновых кислоты и 4 карбоновых кислоты;

MD021-7: CHTGA(Z)<sub>2</sub>-L-Asp, содержащее 2 карбоновых кислоты и

MD051-3: PK2 TCA(Z)<sub>2</sub>-L-Asp-L-Asp, содержащее 3 карбоновых кислоты.

Тестировали активность против трех вирусных штаммов, A/Sydney/250/99 (H1N1), A/Mississippi/03/01 (H1N1) дикого типа и A/Mississippi/03/01 (H1N1) H274Y (устойчивый к осельтамивиру).

Результаты для A/Sydney/5/97 (H3N2) суммированы в табл. 5 и на фиг. 5. Результаты для A/Mississippi/03/01 (H1N1) дикого типа суммированы в табл. 5 и на фиг. 6 и 7. Результаты для A/Mississippi/03/01 (H1N1) H274Y (устойчивый к осельтамивиру) суммированы в табл. 5 и на фиг. 8 и 9.

Таблица 5

Сравнение влияния кислотных/анионных групп на противовирусную активность

Тестируемое соединение	A/Sydney/5/97 (H3N2)	A/Mississippi/03/01 (H1N1) дикого типа	A/Mississippi/03/01 (H1N1) H274Y (устойчивый к осельтамивиру)
MD314-1	0,535 нг/мл (0,27 нМ)	0,18 нг/мл (0,09 нМ)	0,18 нг/мл (0,09 нМ)
MD021-7	1,65 нг/мл (1,32 нМ)	0,535 нг/мл (0,43 нМ)	0,535 нг/мл (0,43 нМ)
MD051-3	0,156 нг/мл (0,45 нМ)	0,535 нг/мл (0,406 нМ)	0,535 нг/мл (0,406 нМ)

Результаты свидетельствуют о том, что противовирусная активность соединений пропорциональна количеству кислотных/анионных групп.

Пример 3. Модификация скорости клиренса вируса в легком и носовых раковинах.

Оценивали воздействие репрезентативных соединений формулы (I) на скорость клиренса вируса в легком и носовых раковинах мышей. MD021 (СНТСА(Z)2-L-Asp) тестировали в качестве репрезентативного соединения формулы (I). Занамивир и PBS использовали в качестве контролей.

20 мышам на группу вводили интраназально под анестезией 2 мкг MD021, 2 мкг занамивира или PBS в дни -1, +1, +2, +3, +4 и +5 и инфицировали сублетальной дозой 50 БОЕ вируса гриппа PR8 в день 0. Мышей взвешивали каждый день. Пять мышей на группу введения соединения умерщвляли в дни 1, 3, 5 и 7 после инфицирования, и их легкие и носовые раковины собирали. Легкие анализировали для определения вирусной нагрузки. Носовые раковины хранили при -80°C до анализа.

Все введения соединений, инфицирование и умерщвление мышей осуществляли в пределах 2-часового окна через 24 ч после вмешательства днем ранее. Мышам не вводили соединения в день умерщвления. Распределение введений соединений, инфицирования и сбора органов суммированы на фиг. 10.

Результаты подробно изложены в табл. 6 и на фиг. 11-14. Во все точки времени легочная вирусная нагрузка (выраженная в  $\log_{10}$ ) у мышей, которым вводили MD021, была значительно ниже, чем у мышей, которым вводили PBS. В Дни 3 и 7 после инфицирования легочная вирусная нагрузка у мышей, которым вводили MD021, также была значительно ниже, чем у мышей, которым вводили занамивир. Результаты оценивали, применяя однофакторный анализ ANOVA (дисперсионный анализ) с апостериорными сравнениями с использованием критерия Тьюки для данных в дни 1, 3 и 5 и критерия Манна-Уитни для данных в день 7. Порог анализа составлял  $10^{1,07}$ . Отрицательным образцам присваивали значение  $10^1$ . Мыши, не получавшие лечения (введение PBS-контроля), не доживали до дня 7, несмотря на низкую дозу введенного вируса.

Потерю массу тела оценивали для групп мышей, которых не умерщвляли до дня 7 после инфицирования. Результаты свидетельствуют о том, что минимальная потеря массы тела после введения MD021 значительно меньше потери массы тела, наблюдаемой при введении занамивира в более поздние точки времени.

Таблица 6  
 Модификация скоростей клиренса вируса в легких и носовых раковинах

	Индивидуальные титры		
	MD021	Занамивир	PBS
День 1	1,00	2,73	2,56
	2,52	3,07	1,82
	2,08	2,66	3,71
	1,00	2,96	3,01
	1,00	1,57	3,79
День 3	1,82	4,44	6,12
	2,33	4,66	5,68
	2,51	4,97	5,90
	4,31	4,19	6,12
	2,63	3,16	5,94
День 5	2,85	4,84	5,75
	3,77	3,00	5,84
	3,59	4,97	5,99
	3,82	5,77	6,00
	4,30	5,66	5,34
День 7	3,41	4,70	
	3,18	5,14	
	3,22	3,90	
	3,16	4,64	
	1,00	5,24	
	Средние титры для группы		
	MD021	Занамивир	PBS
День 1	1,52	2,60	2,98
День 3	2,72	4,28	5,95
День 5	3,67	4,85	5,98
День 7	2,79	4,72	

Статистический анализ кривых потери массы тела методом 2-факторного ANOVA с множественными измерениями показал высокосignificantное различие кривых введения соединений ( $p < 0,0001$ ). Следует обратить внимание на то, что 2-факторный ANOVA с повторными измерениями был полным только для данных, полученных вплоть до дня 5 после инфицирования, так как PBS-группа не имела полных данных в дни 6 и 7 из-за преждевременной смерти. Апостериорные сравнения с поправкой Бонферрони выявили, что занамивир и MD021 оба значительно отличались от PBS в дни 3, 4 и 5 ( $p < 0,001$ ). Такой же анализ, выполненный по полным кривым потери массы тела для MD021 и занамивира, выявил лишь статистически значимое различие двух кривых потери массы тела в целом ( $p = 0,0443$ ), причем апостериорные сравнения с поправкой Бонферрони показали, что значимые различия имели место в день 6 ( $p < 0,01$ ) и день 7 ( $p < 0,001$ ).

Результаты свидетельствуют о том, что многодневные введения 2 мкг соединения MD021 были способны значительно снижать легочную вирусную нагрузку по сравнению с мышами, которым аналогичным образом вводили PBS в дни 1, 3 и 5 после инфицирования, а также 2 мкг занамивира в дни 3 и 7 после инфицирования. Значительное снижение вирусной нагрузки сопровождалось меньшей потерей массы у мышей и, как ожидалось, равнялось значительному снижению тяжести заболевания. Минимальная потеря массы при использовании MD021 на всем протяжении лечения заболевания было поразительной и значительно лучшей, чем при использовании занамивира в более поздние точки времени.

Хотя мышам вводили дозу вируса PR8, которая в нормальных обстоятельствах является сублетальной, все мыши, получавшие PBS-контроль, теряли массу тела и погибали до дня 7 после инфицирования. Случаи неожиданной преждевременной смерти могут быть связаны с пагубным эффектом ежедневного анестезирования и интраназального введения 50 мкл жидкости. Однако в группах, получавших лечение MD021 и занамивиром, лечение перевешивало любые пагубные эффекты.

Пример 4. Скрининговый анализ CPE.

Скрининговые анализы CPE (цитопатический эффект) проводили для репрезентативных соединений формулы (I) в соответствии с общей методикой анализа CPE, изложенной выше. Результаты подробно представлены в табл. 7 и 8. Конкретные противовирусные скрининги *in vitro* проводили также в от-

ношении ряда вирусных штаммов, включающих грипп А H7N9 A/Anhui/1/2003 (табл. 9), грипп А H5N1 Hong Kong/213/2003 (табл. 10), грипп А H3N2 Perth/16/2009 (табл. 11), грипп А H7N9 A/Anhui/1/2003 (табл. 12), грипп А H1N1 California 07/2009 (табл. 13), грипп А H5N1 Duck/MN/1525/81 (табл. 14), грипп А H5N1 Thailand/16/2004 (табл. 15), вирус гриппа А H1N1, A/Mississippi/3/2001 H275Y, устойчивый к осельтамивиру (табл. 16), вирус гриппа А H5N1 Duck/MN/1525/81 (табл. 17), вирус гриппа В, В/Brisbane/60/2008 (табл. 18), вирус гриппа В, В/Florida/4/2006 (табл. 19) и А/Sydney/250/99 (H1N1) (табл. 20).

Данные по противогриппозной активности показывают, что чем больше кислотных групп в соединениях формулы (I), тем выше противовирусная активность.

Противогриппозную активность репрезентативных соединений формулы (I) дополнительно оценивали в последующих анализах СРЕ (табл. 38) и при отличающихся вирусных титрах (табл. 39).

Пример 5. Противовирусная активность против устойчивых к осельтамивиру штаммов вируса гриппа.

Противовирусную активность против устойчивых к осельтамивиру штаммов вируса гриппа оценивали для репрезентативных соединений формулы (I). Регистрировали ингибирование размера бляшек и числа бляшек. Осельтамивир использовали в качестве контроля. Результаты подробно представлены в табл. 21.

Пример 6. Анализ снижения образования вирусных бляшек.

Репрезентативные соединения формулы (I) оценивали в отношении снижения образования вирусных бляшек против каждого из вируса H1N1 CA/07/2009 и вируса H1N1 A/PR/8. Занамивир использовали в качестве контроля. Результаты подробно представлены соответственно в табл. 22 и 23.

Пример 7. Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I).

Эффективность *in vivo* репрезентативных соединений формулы (I) оценивали у мышей против ряда вирусных инфекций.

В табл. 24 подробно представлено выживание мышей после инфицирования одним из следующих вирусов: А/California/04/2009 (H1N1), А/Victoria/3/75 (H3N2), А/Mississippi/3/01 H275Y, устойчивый к осельтамивиру вирус (H1N1), А/Duck/MN/1525/81 (H5N1) или В/Sichuan/379/99 (грипп В), и однократного введения соединений, причем репрезентативные соединения формулы (I) вводили в разных дозировках.

В табл. 25 подробно представлено выживание мышей после интраназального инфицирования вирусом А/PR/8 (500 БОЕ/мышь) и однократного введения соединений, причем репрезентативные соединения формулы (I) вводили в разных дозировках и в разное время.

В табл. 26 подробно представлено влияние однократного интраназального введения репрезентативных соединений формулы (I) в разных дозировках после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа А/California/04/2009 (H1N1pdm). Занамивир использовали в качестве контроля, и физиологический раствор использовали в качестве плацебо.

В табл. 27 подробно представлено влияние однократного интраназального введения репрезентативных соединений формулы (I) в разных дозировках через 48 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа А/PR/8 (H1N1). Занамивир использовали в качестве контроля, и физиологический раствор использовали в качестве плацебо.

В табл. 28 подробно представлено влияние однократного интраназального введения репрезентативных соединений формулы (I) через 48 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа А/PR/8 (H1N1). Занамивир использовали в качестве контроля, и физиологический раствор использовали в качестве плацебо.

В табл. 29 подробно представлено влияние однократного интраназального введения репрезентативных соединений формулы (I) в разных дозировках через 48 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа А/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь). Занамивир использовали в качестве контроля, и физиологический раствор использовали в качестве плацебо.

В табл. 30 подробно представлено влияние однократного интраназального введения репрезентативных соединений формулы (I) в разных дозировках через 60 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа А/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь). Занамивир использовали в качестве контроля, и физиологический раствор использовали в качестве плацебо.

В табл. 31 подробно представлено влияние однократного интраназального введения репрезентативных соединений формулы (I) через 60 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа А/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь). Занамивир использовали в качестве контроля, и физиологический раствор использовали в качестве плацебо.

В табл. 32 подробно представлено влияние однократного интраназального введения репрезентативных соединений формулы (I) через 72 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа А/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь).

В табл. 33 подробно изложено влияние однократного интраназального лечения репрезентативными соединениями формулы (I) через 72 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызван-

ной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь).

В табл. 34 подробно представлено влияние на мышей однократного введения репрезентативных соединений формулы (I) интраперитонеально за 1 ч до летального заражения мышей вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь).

В табл. 35 подробно представлено влияние введения репрезентативных соединений формулы (I) интраперитонеально через 4 ч после инфицирования (20 мкг/мышь/сутки×5 суток) на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь).

Результаты, представленные в табл. 34 и 35, свидетельствуют о том, что соединения формулы (I) могут быть использованы в системном лечении инфекции.

В табл. 36 подробно представлено влияние введения репрезентативных соединений формулы (I) интраназально через 60 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь).

В табл. 37 подробно представлено влияние введения репрезентативных соединений формулы (I) интраназально через 60 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь).

В табл. 38 подробно представлено влияние введения репрезентативных соединений формулы (I) интраперитонеально за 1 ч до летального заражения мышей вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь).

Результаты тестов *in vitro* и *in vivo* демонстрируют, что соединения формулы (I) являются эффективными против целого ряда штаммов гриппа, включающих грипп А, В, птичий грипп и устойчивые к лекарственным средствам штаммы. Кроме того, результаты демонстрируют, что соединения формулы (I) не проявляют цитотоксичность.

Что касается исследований на мышах, было установлено, что инфицированные мыши обычно теряли меньше массы тела и/или быстрее выздоравливали при введении соединений формулы (I) по сравнению с физиологическим раствором в качестве плацебо и/или контролем (т.е. занамивиром). Более того, было установлено, что соединения формулы (I) были эффективными после введения в носовую полость мышей в течение периода времени более чем 11 дней.

Данные по эффективности *in vivo* свидетельствуют о том, что соединения формулы (I) по меньшей мере в 75 раз (в массовой дозировке) или >400 раз (в молярной дозировке) более активны, чем контрольный занамивир.

Что касается данных по эффективности *in vivo* для мышей, инфицированных вирусом гриппа А PR8 (500 БОЕ/мышь), на основе сравнения по времени интраназального введения репрезентативных соединений по изобретению через 48, 60 или 72 ч после инфицирования приводили к выживанию большинства мышей и максимальной потере массы тела <15% (лишь у трех мышей потеря массы тела составила 20-25%).

Что касается данных по эффективности *in vivo* для мышей, инфицированных вирусом гриппа A/PR/8 (500 БОЕ/мышь), интраперитонеальные введения репрезентативных соединений по изобретению приводили к выживанию всех мышей, и это свидетельствует о том, что соединения по изобретению могут быть использованы для системного лечения инфекции.

Два репрезентативных соединения формулы (I), MD185 и MD317, были протестированы в анализе hERG IC<sub>50</sub> (hERG-CHO, автоматизированный пэтч-кламп). В обоих случаях результаты показали, что эти два соединения безопасны в том, что касается кардиотоксичности. Кроме того, MD185 и MD317 были протестированы в скрининге Kinom (полный набор киназ и их продуктов, находящихся внутри клеток данного организма); значительного взаимодействия между соединениями и киназами при 100 нМ не было выявлено.

Таблица 7

## Скрининговый анализ СРЕ

Соединение №	М.м.	ЕС <sub>50</sub> CA/07/2009		ЕС <sub>50</sub> Duck/MN/1525/81		ЕС <sub>50</sub> Perth/16/2009		ЕС <sub>50</sub> Florida/4/2006	
		нг/мл	нМ	нг/мл	нМ	нг/мл	нМ	нг/мл	нМ
MD015	1166	7	6	0,4	0,34	7,8	6,7	2,5	2,1
MD016	1166	9	7,7	0,6	0,51	3,3	2,8	8,2	7
MD021	1243	24	19,3	0,3	0,24	4,6	3,7	0,38	0,3
MD051	1318	10	7,58	0,7	0,53	26	19,7	1,5	1,13
MD206	1187	2	1,68	0,7	0,59	7,3	6,1	>10000	>8,4мкМ
MD082	1110	7	6,3	0,4	0,36	8,4	7,5	15	13,5
MD102	1274	10	7,85	>10000	>7,8мкМ	>10000	>7,8мкМ	>10000	>7,8мкМ
MD112	1246	>2000	>1,6мкМ	0,7	0,56	>10000	>8мкМ	6,5	5,2
MD123	974	8	8,2	0,7	0,72	>10000	>10 мкМ	0,96	0,98
MD214	1340	7	5,22	0,2	0,15	>10000	>7,4мкМ	2,5	1,86
MD154	1485	9	6,06	<0,13	<0,087	<0,13	<0,087	<0,13	<0,087
MD219	1712	5	2,92	0,5	0,29	>10000	>5,8мкМ	1,7	0,99
MD242	1215	8	6,58	0,84	0,7	4,2	3,46	0,71	0,58
MD185	1852	6	3,2	<0,13	<0,07	<0,13	<0,07	<0,13	<0,07
MD191	1457	9	6,1	<0,13	<0,089	<0,13	<0,089	0,32	0,21

\*CC<sub>50</sub> > 10000 нг/мл. Линия клеток MDCK.

М.м. - молекулярная масса;

CC<sub>50</sub> - полуМаксимальная цитотоксическая концентрация;ЕС<sub>50</sub> - полуМаксимальная эффективная концентрация.

Код соединения	Описание структуры	Молекулярная масса
MD015	PK1 PYR(Z) <sub>2</sub>	1166
MD016	PK2 PYR(Z) <sub>2</sub>	1166
MD021	СНТСА(Z) <sub>2</sub> -L-Asp	1243
MD051	PK2 ТСА(Z) <sub>2</sub> -L-Asp-L-Asp	1318
MD206	СНТСА(Z <sub>b</sub> ) <sub>2</sub> -L-Asp	1187
MD082	PK1 Сукцинил-SO <sub>3</sub> H-(Z) <sub>2</sub>	1110
MD102	СНТСА(Z <sub>2b</sub> ) <sub>2</sub> (L-Asp) <sub>2</sub>	1274
MD112	СНТСА(Z <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (L-Asp) <sub>2</sub>	1246
MD123	C <sub>8</sub> (Z <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> субериновая кислота	974
MD214	PK1 PYR(Z <sub>b</sub> ) <sub>2</sub> (D-Asp) <sub>2</sub>	1340
MD154	СНТСА(Z <sub>0</sub> ) <sub>2</sub> -L-Asp(NHCH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H) <sub>2</sub>	1485
MD219	PK2 PYR(Z <sub>b</sub> ) <sub>2</sub> [(D-Asp)(NHCH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub>	1712
MD242	СНТСА(Z <sub>p</sub> ) <sub>2</sub> -L-Asp	1215
MD185	PK2 PYR(Z <sub>n</sub> ) <sub>2</sub> [D-Asp(NHCH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H) <sub>2</sub> ] <sub>2</sub>	1852
MD191	СНТСА(Z <sub>h</sub> ) <sub>2</sub> -D-Asp(NHCH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H) <sub>2</sub>	1457

Таблица 8

Активность против вируса гриппа, полученная из анализа СРЕ\* (ЕС<sub>50</sub> нМ)

Вирус гриппа	MD185 (М.м.1852)	MD314 (М.м.1982)	MD345 (М.м.2201)	MD348 (М.м.1982)	MD021 (М.м.1243)	Занамивир (М.м.332)
A/Sydney/250/99	0,29	0,077	0,052	0,058	0,186	>198
A/Solomon Island/3/06	0,29	0,03	0,043	0,016	0,144	>44
A/Townsville/74/2011	0,74	0,09	0,041	0,06	0,40	>15
A/Mississippi/03/01 WT	0,89	0,09	0,24	0,27	0,43	>66
A/Mississippi/03/01H274Y	0,89	0,09	0,24	0,27	0,43	>66
A/Perth/261/2009	0,49	0,36	0,32	0,35	0,57	6,6
A/Victoria/170/2012	2,7	1,0	0,53	0,83	2,0	>596
A/Sydney/5/97	2,7	0,41	0,83	1,26	2,0	>>24
A/Victoria/503/06	6,5	4,4	2,2	4,5	4,0	>198
B/Townsville/2/2011	1,7	0,38	0,24	0,28	0,95	>1789

\*CC<sub>50</sub> > 600 нг/мл. Клеточная линия MDCK.

\*\* Значения представляют собой средние значения по меньшей мере из трех определений.

Таблица 9

## Противовирусный скрининг in vitro (вирус гриппа А Н7N9, А/Anhui/1/2003)

Соединение №	Название анализа лекарственного средства	EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	EC <sub>90</sub> (мкг/мл)	CC <sub>50</sub> (мкг/мл)	*SI <sub>50</sub>	**SI <sub>90</sub>
MD051	Снижение выхода вируса/Нейтральный красный (Токсичность)		0,0031	> 1,0		> 312
MD051	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	< 0,00032		> 1,0	> 3100	
MD154	Снижение выхода вируса/Нейтральный красный (Токсичность)		0,01	> 1,0		> 100
MD154	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	< 0,00032		> 1,0	> 3100	
MD185	Снижение выхода вируса/Нейтральный красный (Токсичность)		0,00185	> 1,0		> 540
MD185	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	< 0,00032		> 1,0	> 3100	
Рибавирин	Снижение выхода вируса/Нейтральный красный (Токсичность)		8,25	> 1000		> 121
Рибавирин	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	24		> 1000	> 42	

\*SI<sub>50</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>;\*\*SI<sub>90</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>90</sub>;EC<sub>90</sub> - 90%-ная эффективная концентрация;

SI - индекс селективности.

Таблица 10

## Противовирусный скрининг in vitro (вирус гриппа А Н5N1, Hong Kong/213/2003)

Соединение №	Название анализа лекарственного средства	EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	EC <sub>90</sub> (мкг/мл)	CC <sub>50</sub> (мкг/мл)	*SI <sub>50</sub>	**SI <sub>90</sub>
MD051	Снижение выхода вируса/Нейтральный красный (Токсичность)		< 0,00032	> 1,0		> 3100
MD051	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	< 0,00032		> 1,0	> 3100	
MD154	Снижение выхода вируса/Нейтральный красный (Токсичность)		< 0,00032	> 1,0		> 3100
MD154	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	< 0,00032		> 1,0	> 3100	
MD185	Снижение выхода вируса/Нейтральный красный (Токсичность)		< 0,00032	> 1,0		> 3100
MD185	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	< 0,00032		> 1,0	> 3100	
Рибавирин	Снижение выхода вируса/Нейтральный красный (Токсичность)		14,68	> 1000		> 68
Рибавирин	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	17		> 1000	> 59	

\*SI<sub>50</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>;\*\*SI<sub>90</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>90</sub>.

Таблица 11

## Противовирусный скрининг in vitro (вирус гриппа А Н3N2, Perth/16/2009)

Соединение №	Название анализа лекарственного средства	EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	EC <sub>90</sub> (мкг/мл)	CC <sub>50</sub> (мкг/мл)	*SI <sub>50</sub>	**SI <sub>90</sub>
MD185	Визуальный (Снижение выхода вируса/ Нейтральный красный)		0,00086	>0,32		>370
MD185	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,0001		>0,32	>3200	
MD317	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,00173	>0,32		>180
MD317	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,00032		>0,32	>1000	
MD345	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,00485	>0,32		>66
MD345	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,00054		>0,32	>590	
MD349	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,00115	>0,32		>280
MD349	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,0006		>0,32	>530	
MD352	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,00208	>0,32		>150
MD352	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,00038		>0,32	>840	
Рибавирин	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		4,4	>320		>73
Рибавирин	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	5		>320	>64	

\*SI<sub>50</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>;\*\*SI<sub>90</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>90</sub>.

Таблица 12

## Противовирусный скрининг in vitro (вирус гриппа А Н7N9, А/Anhui/1/2003)

Соединение №	Название анализа лекарственного средства	EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	EC <sub>90</sub> (мкг/мл)	CC <sub>50</sub> (мкг/мл)	*SI <sub>50</sub>	**SI <sub>90</sub>
MD185	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		<0,0006	>2,0		>3333
MD185	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,001		>2,0	>2000	
MD317	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,01	>2,0		>200
MD317	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,015		>2,0	>130	
MD345	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,01	>2,0		>200
MD345	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,025		>2,0	>80	
MD349	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		<0,0006	>2,0		>3333
MD349	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,0042		>2,0	>480	
MD352	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		<0,0006	>2,0		>3333
MD352	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,00063		>2,0	>3200	
Рибавирин	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		2,20	>320		>267
Рибавирин	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	6,4		>320	>50	

\*SI<sub>50</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>;\*\*SI<sub>90</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>90</sub>.

Таблица 13

Противовирусный скрининг in vitro (вирус гриппа А H1N1, California/07/2009)

Соединение №	Название анализа лекарственного средства	EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	EC <sub>90</sub> (мкг/мл)	CC <sub>50</sub> (мкг/мл)	*SI <sub>50</sub>	**SI <sub>90</sub>
MD185	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,00026	>0,32		>1230
MD185	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,00015		>0,32	>2100	
MD317	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,0017	>0,32		>190
MD317	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,0009		>0,32	>360	
MD345	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,0047	>0,32		>68
MD345	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,00077		>0,32	>420	
MD349	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,0046	>0,32		>70
MD349	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,0007		>0,32	>460	
MD352	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,0041	>0,32		>78
MD352	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,00025		>0,32	>1300	
Рибавирин	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		2,3	>320		>140
Рибавирин	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	2,5		>320	>130	

\*SI<sub>50</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>;\*\*SI<sub>90</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>90</sub>.

Таблица 14

Противовирусный скрининг in vitro (вирус гриппа А H5N1, Duck/MN/1525/81)

Соединение №	Название анализа лекарственного средства	EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	EC <sub>90</sub> (мкг/мл)	CC <sub>50</sub> (мкг/мл)	*SI <sub>50</sub>	**SI <sub>90</sub>
MD185	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,00153	>0,32		>210
MD185	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,00033		>0,32	>970	
MD317	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,00096	>0,32		>330
MD317	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,00099		>0,32	>320	
MD345	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,0065	>0,32		>49
MD345	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,0018		>0,32	>180	
MD349	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,00835	>0,32		>38
MD349	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,00085		>0,32	>380	
MD352	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,0077	>0,32		>42
MD352	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,00094		>0,32	>340	
Рибавирин	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		2,3	>320		>140
Рибавирин	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	6,5		>320	>49	

\*SI<sub>50</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>;\*\*SI<sub>90</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>90</sub>.

Таблица 15

Противовирусный скрининг in vitro (вирус гриппа А H5N1, Thailand/16/2004)

Соединение №	Название анализа лекарственного средства	EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	EC <sub>90</sub> (мкг/мл)	CC <sub>50</sub> (мкг/мл)	*SI <sub>50</sub>	**SI <sub>90</sub>
MD185	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,012	>2,0		>170
MD185	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,0045		>2,0	>440	
MD317	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,010	>2,0		>200
MD317	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,0076		>2,0	>260	
MD345	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,005	>2,0		>400
MD345	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,0069		>2,0	>290	
MD349	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,010	>2,0		>200
MD349	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,0055		>2,0	>360	
MD352	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		0,002	>2,0		>1000
MD352	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	0,0037		>2,0	>540	
Рибавирин	Визуальный (Снижение выхода вируса/Нейтральный красный)		2,79	>320		>120
Рибавирин	Нейтральный красный (Цитопатический эффект/Токсичность)	3,7		>320	>86	

\*SI<sub>50</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>;\*\*SI<sub>90</sub> = CC<sub>50</sub>/EC<sub>90</sub>.



Таблица 20

Противовирусный скрининг in vitro (A/Sydney/250/99)

Соединение	EC <sub>50</sub> (нг/мл)	EC <sub>50</sub> (нМ)
MD012		
СНТСА(Z) <sub>2</sub> (S <sub>6</sub> ) (М.М. 1534)	0,06	0,039
MD021		
СНТСА(Z) <sub>2</sub> -L-Asp (М.М. 1243)	0,03	0,024
Занамивир (М.м. 332)	7,38	22,228

Таблица 21

Противовирусная активность против устойчивых к осельтамивиру штаммов вируса гриппа.  
Ингибирование размера бляшек и числа бляшек репрезентативными соединениями формулы (I)

Вирус	Подтип		MD021		MD051		MD155		MD185		Осельтамивир	
			Размер	Число	Размер	Число	Размер	Число	Размер	Число	Размер	Число
A/Fukui	H3N2	WT	0,1-1,0 <sup>a</sup>	1-10	0,1-10	0,1-1	0,1-1,0	0,1-10 <sup>b</sup>	0,1-1,0	1	10-100	≥1000
A/Fukui	H3N2	E119V	0,1	0,1-1	0,1	0,1-1	0,1	0,1-1	0,1	0,1-1	100	≥10,000
A/Perth	pH1N1	WT	1	10-100	0,1-1,0	1-10	0,1-1,0	1-10	1	1-10	10	100
A/Perth	pH1N1	H275Y	0,1-1,0	10-100	0,1-1,0	1-10	0,1-1,0	1-10	0,1-1,0	1-100 <sup>b</sup>	100-1000	≥10,000
B/Perth	B	WT	1	1-10	1	1-10	0,1-1,0	1-10	1,0-10	1-10	100-1000	1,000
B/Perth	B	D197E	1	1-100	0,1-1,0	1-10 <sup>b</sup>	1,0-10	1-10	0,1-10	1-100	1000	≥10,000

<sup>a</sup> Диапазон приведен, когда IC<sub>50</sub> находится между двумя концентрациями лекарственного средства.

<sup>b</sup> Диапазон, наблюдаемый с повторами, может охватывать более чем одно log<sub>10</sub> разведение.

WT - дикого типа.

Таблица 22

Анализ снижения образования вирусных бляшек (вирус SA/07/2009 H1N1)

Соединение	М.м.	EC <sub>50</sub>	
		нг/мл	нМ
MD185	1852	0,095	0,05140
MD317	1318	0,068	0,05168
MD343	1597	0,012	0,00749
MD344	2057	0,021	0,01038
MD345	2201	0,017	0,00797
Занамивир	332	1,969	5,933

Таблица 23

Анализ снижения образования вирусных бляшек (вирус A/PR/8 H1N1)

Соединение	М.м.	EC <sub>50</sub>
		нМ
MD185	1852	4,256
MD344	2057	1,471
MD342	2208	1,276
MD345	2201	1,719
MD348	1982	1,919
MD051	1318	1,744
MD343	1597	1,273
MD317	1318	3,303
Занамивир	332	10150

Таблица 24

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I). Оставшиеся в живых мыши/общее количество после инфицирования вирусом и однократного введения соединений в разных дозировках

Вирус, которым инфицировали мышей	MD021			MD154			MD185			Занамивир		Плацебо
	мкг/мышь	10	2	50	10	2	50	10	2	150	50	
A/California/04/2009 (H1N1)	8/10	3/10	5/10	10/10	10/10	4/10	10/10	9/10	4/10	2/10		0/20
A/Victoria/3/75 (H3N2)	10/10	5/10	6/10	10/10	4/10	1/10	10/10	8/10	3/10	8/10	3/10	0/20
A/Mississippi/3/01 H275Y, устойчивый к осельтамивиру										1/10		0/20
вирус (H1N1)	10/10	10/10	7/10	10/10	10/10	9/9	10/10	10/10	9/10	8/10		0/20
A/Duck/MN/1525/81 (H5N1)	7/10	8/10	2/10	10/10	9/10	6/10	10/10	8/10	7/10	7/10		3/20
B/Sichuan/379/99 (Грипп В)	8/10	8/10	7/10	10/10	10/10	9/10	9/10	9/10	8/10	9/10		1/20

Примечание: соединения вводили однократно интраназально за 24 ч до инфицирования; мышей инфицировали интраназально, и период наблюдения составлял 21 день.

Таблица 25

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I). Оставшиеся в живых мыши/общее количество после инфицирования вирусом и однократного введения соединений в разных дозировках и в разное время. Мышей инфицировали интраназально вирусом A/PR/8 (500 БОЕ/мышь) и им вводили интраназально репрезентативные соединения формулы (I)

	MD185	MD342	MD343	MD344	MD345	MD348	Занамивир	Плацебо
0,25мкг/мышь за 24 ч до инфицирования	4/5	5/5	4/5	4/5	5/5	4/5	0/5	0/5
0,5мкг/мышь за 24 ч до инфицирования	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5
2мкг/мышь за 5 дней до инфицирования	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5		0/5	0/5
5мкг/мышь за 7 дней до инфицирования	5/5		5/5	5/5	5/5		0/5	0/5
5мкг/мышь за 9 дней до инфицирования	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5
5мкг/мышь за 11 дней до инфицирования	4/5	5/5	4/5	2/5	5/5	5/5	0/5	0/5

Таблица 26

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I). Влияние однократного интраназального введения MD 185 и занамивира при введении после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/California/04/2009 (H1N1pdm)

Соединение	мкг/мышь	Время введения (часы) <sup>a</sup>	Оставшиеся в живых/Общее количество	День смерти в среднем <sup>b</sup> ±SD
MD185	250	24	4/10	8,2 ± 1,2***
MD185	50	24	1/10	7,3 ± 0,5***
MD185	10	24	0/10	6,3 ± 0,9
Занамивир	250	24	0/9 <sup>c</sup>	6,7 ± 0,7
Плацебо		24	1/13 <sup>c</sup>	5,6 ± 0,9
MD185	250	48	5/9***	6,5 ± 1,0
MD185	50	48	3/10	7,7 ± 1,0
MD185	10	48	1/10	7,6 ± 0,9*
Занамивир	250	48	0/10	6,6 ± 0,8
Плацебо		48	0/15	6,6 ± 0,6

<sup>a</sup> Относительно инфицирования вирусом.

<sup>b</sup> Средняя величина для мышей, которые умерли в течение 21-дневного периода наблюдения.

<sup>c</sup> Изначальная численность группы составляла 10 мышей, получавших лекарственные средства, и 15 мышей, получавших плацебо. Четверо животных были исключены, поскольку у них отсутствовали признаки инфекции (отсутствовала потеря массы тела).

\* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001 по сравнению с плацебо.

SD - стандартное отклонение.

Таблица 27

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I). Влияние однократного интраназального введения MD185, MD317, занамивира или физиологического раствора через 48 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1)

Соединение	мкг/мышь	Время введения (часы) <sup>a</sup>	Оставшиеся в живых/ Общее количество		Максимальная потеря массы тела у мышей <sup>b</sup>
MD185	40	48	5/5		< 10% 4/5; 12% 1/5
MD317	40	48	4/5		< 10% 2/5; 20% 2/5
Занамивир	40	48	0/5		
Плацебо	Физиологический раствор	48	0/5		
MD185	100	48	5/5		< 10% 4/5; 17% 1/5
MD317	100	48	5/5		< 10% 3/5; 15% 1/5; 20% 1/5
Занамивир	100	48	0/5		
Плацебо	Физиологический раствор	48	0/5		

<sup>a</sup> Относительно инфицирования вирусом.

<sup>b</sup> В течение 21-дневного периода наблюдения.

Таблица 28

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I).

Влияние однократного интраназального введения MD185, MD345, MD348, занамивира или физиологического раствора через 48 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1)

Соединение	мкг/мышь	Время введения (часы) <sup>a</sup>	Оставшиеся в живых/ Общее количество		Максимальная потеря массы тела у мышей <sup>b</sup>
MD185	40	48	5/5		≤5% 1/5; ≤10% 1/5; ≤15% 3/5
MD345	40	48	5/5		≤10% 4/5; ≤15% 1/5
MD348	40	48	5/5		≤5% 1/5; ≤15% 3/5; <25% 1/5
Занамивир	40	48	0/5 <sup>c</sup>		
Плацебо	Физиологический раствор	48	0/5 <sup>d</sup>		

<sup>a</sup> Относительно инфицирования вирусом.

<sup>b</sup> В течение 21-дневного периода наблюдения.

<sup>c</sup> День смерти в среднем: день 6,9.

<sup>d</sup> День смерти в среднем: день 6,6.

Таблица 29

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I).

Влияние однократного интраназального введения MD185, MD348, занамивира или физиологического раствора через 48 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь)

Соединение	мкг/мышь	Время введения (часы) <sup>a</sup>	Оставшиеся в живых/ Общее количество		Максимальная потеря массы тела у мышей <sup>b</sup>
MD185	40	48	4/5		10% 1/5; <15% 1/5; 15% 2/5
MD348	40	48	5/5		≤10% 3/5; 15% 1/5; 25% 1/5
Занамивир	40	48	0/5		
Плацебо	Физиологический раствор	48	0/5		

<sup>a</sup> Относительно инфицирования вирусом.

<sup>b</sup> В течение 21-дневного периода наблюдения.

Таблица 30

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I). Влияние однократного интраназального введения MD185, занамивира или физиологического раствора через 60 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь)

Соединение	мкг/мышь	Время введения (часы) <sup>a</sup>	Оставшиеся в живых/ Общее количество		Максимальная потеря массы тела у мышей <sup>b</sup>
MD185	40	60	5/5		≤10% 3/5; 12% 1/5; 15% 1/5
MD185	200	60	5/5		<10% 2/5; 12% 2/5; 15% 1/5
Занамивир	200	60	4/5 <sup>c</sup>		10% 1/5; 15% 1/5; ≥20% 2/5
Плацебо	Физиологический раствор	60	0/5 <sup>d</sup>		

<sup>a</sup> Относительно инфицирования вирусом.

<sup>b</sup> В течение 21-дневного периода наблюдения.

<sup>c</sup> День смерти в среднем: день 8.

<sup>d</sup> День смерти в среднем: день 6,6.

Таблица 31

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I). Влияние однократного интраназального введения MD185, MD317, MD345, занамивира или физиологического раствора через 60 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь)

Соединение	мкг/мышь	Время введения (часы) <sup>a</sup>	Оставшиеся в живых/ Общее количество	Максимальная потеря массы тела у мышей <sup>b</sup>	День смерти в среднем
MD185	40	60	2/5	20% 1/5; 24% 1/5	День 7,3
MD317	40	60	2/5	20% 1/5; 24% 1/5	День 7,0
MD345	40	60	5/5	18% 4/5; 20% 1/5	
Занамивир	2000	60	0/5		День 6,6
Занамивир	40	60	0/5		День 5,2
Плацебо	Физиологический раствор	60	0/5		День 5,2

<sup>a</sup> Относительно инфицирования вирусом.

<sup>b</sup> В течение 21-дневного периода наблюдения.

Таблица 32

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I). Влияние однократного интраназального введения MD185, занамивира или физиологического раствора через 72 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь)

Соединение	мкг/мышь	Время введения (часы) <sup>a</sup>	Оставшиеся в живых/ Общее количество	Максимальная потеря массы тела у мышей <sup>b</sup>	День смерти в среднем
MD185	40	72	3/5	≤5% 1/5; <15% 1/5; <20% 1/5	День 7,25
MD185	200	72	4/5	<10% 1/5; <15% 2/5; 20% 1/5	День 7,5
Занамивир	40	72	0/5		День 5,8
Занамивир	200	72	0/5		День 6,2
Плацебо	Физиологический раствор	72	0/5		День 5

<sup>a</sup> Относительно инфицирования вирусом.

<sup>b</sup> В течение 21-дневного периода наблюдения.

Таблица 33

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I). Влияние однократного интраназального введения MD185, MD345, занамивира или физиологического раствора через 72 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь)

Соединение	мкг/мышь	Время введения (часы) <sup>a</sup>	Оставшиеся в живых/ Общее количество	Максимальная потеря массы тела у мышей <sup>b</sup>	День смерти в среднем
MD185	40	72	6/10	20% 2/10; 15% 1/10; 12% 2/10; 10% 1/10	День 7,25
MD345	40	72	7/10	25% 1/10; 18% 1/10; 15% 3/10; 12% 2/10	День 7,0
Занамивир	40	72	0/5		День 6,6
Плацебо	Физиологический раствор	72	0/5		День 6,6

<sup>a</sup> Относительно инфицирования вирусом.

<sup>b</sup> В течение 21-дневного периода наблюдения.

Таблица 34

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I). Влияние на мышей однократного интраперитонеального введения MD185, MD317, занамивира или физиологического раствора за 1 ч до заражения вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь)

Соединение	мкг/мышь	Время введения (часы) <sup>a</sup>	Оставшиеся в живых/ Общее количество	Максимальная потеря массы тела у мышей <sup>b</sup>
MD185	20	-1	5/5	15% 3/5; 18% 1/5; 20% 1/5
MD317	20	-1	4/5	15% 3/5; 24% 1/5
Занамивир	20	-1	0/5 <sup>c</sup>	
Плацебо	Физиологический раствор	-1	0/5 <sup>d</sup>	

<sup>a</sup> Относительно инфицирования вирусом.

<sup>b</sup> В течение 21-дневного периода наблюдения.

<sup>c</sup> День смерти в среднем: день 7.

<sup>d</sup> День смерти в среднем: день 7.

Таблица 35

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I). Влияние интраперитонеального введения 20 мкг/мышь/день×5 дней MD185, MD317, занамивира или физиологического раствора через 4 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь)

Соединение	мкг/мышь/день × 5	Время введения (часы) <sup>a</sup>	Оставшиеся в живых/ Общее количество	Максимальная потеря массы тела у мышей <sup>b</sup>
MD185	20 × 5	4	5/5	≤10
Занамивир	20 × 5	4	0/5 <sup>c</sup>	
Плацебо	Физиологический раствор × 5	4	0/5 <sup>d</sup>	

<sup>a</sup> Относительно инфицирования вирусом.

<sup>b</sup> В течение 21-дневного периода наблюдения.

<sup>c</sup> День смерти в среднем: день 7,5.

<sup>d</sup> День смерти в среднем: день 7,5.

Таблица 36

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I).  
Влияние однократного интраназального введения MD185, MD317, занамивира или физиологического раствора через 60 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь)

Соединение	мкг/мышь	Время лечения (часы)	Оставшиеся в живых/ Общее количество	Максимальная потеря массы тела у мышей <sup>b</sup>		День смерти в среднем
				10% 4/5;	20% 1/5	
MD185	40	60	5/5	10% 4/5;	20% 1/5	
MD317	40	60	5/5	10% 3/5;	24% 2/5	
Занамивир	2000	60	3/5	15% 1/5	24% 2/5	День 8,5
Занамивир	40	60	0/5			День 7
Физиологический раствор	Нет данных	60	0/5			День 7

<sup>a</sup> Относительно инфицирования вирусом.

<sup>b</sup> В течение 21-дневного периода наблюдения.

Таблица 37

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I).  
Влияние однократного интраназального введения MD345, MD356, MD357, MD358, MD359, занамивира или физиологического раствора через 60 ч после инфицирования на выживание мышей с инфекцией, вызванной вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1) (500 БОЕ/мышь)

Соединение	мкг/мышь	Время введения (часы) <sup>a</sup>	Оставшиеся в живых/ Общее количество	Максимальная потеря массы тела у мышей <sup>b</sup>			День смерти в среднем
				5% 1/5	<15% 3/5	25% 1/5	
MD345	40	60	1/5				День 7
MD356	40	60	5/5	<10% 1/5	<15% 3/5	25% 1/5	
MD357	40	60	4/5	<15% 3/5	20% 1/5		День 7
MD358	40	60	5/5	<10% 2/5	15% 3/5		
MD359	40	60	4/5	<10% 1/5	17% 2/5	20% 1/5	День 7
Занамивир	40	60	0/5				День 6
Физиологический раствор	Нет данных	60	0/5				День 6

<sup>a</sup> Относительно инфицирования вирусом.

<sup>b</sup> В течение 21-дневного периода наблюдения.

Таблица 38

Данные по эффективности у мышей *in vivo* для репрезентативных соединений формулы (I).  
Влияние однократного интраперитонеального введения MD345, MD373, занамивира или физиологического раствора за 1 ч до летального заражения вирусом гриппа A/PR/8 (H1N1)

Соединение	Время введения (часы) <sup>a</sup>	Оставшиеся в живых/ Общее количество	Максимальная потеря массы тела у мышей <sup>b</sup>			
			10% 1/5	12% 1/5	18% 1/5	22% 2/5
MD345	-1	5/5	10% 1/5	12% 1/5	18% 1/5	22% 2/5
MD372	-1	5/5	10% 1/5	12% 1/5	20% 1/5	23% 2/5
Занамивир	-1	0/5 <sup>c</sup>				
Физиологический раствор	-1	0/5 <sup>d</sup>				

<sup>a</sup> Относительно инфицирования вирусом.

<sup>b</sup> В течение 14-дневного периода наблюдения.

<sup>c</sup> День смерти в среднем: день 7.

<sup>d</sup> День смерти в среднем: день 5.

Таблица 39

Активность против вируса гриппа в анализе CPE для репрезентативных соединений формулы (I) (EC<sub>50</sub> нг/мл/нМ)

Вирус гриппа	MD185	MD356	MD357	MD358	MD359	MD371	MD021
A/Sydney/250/99	0,18/0,097	0,01/0,0054	0,02/0,0108	0,27/0,139	0,16/0,074	Нет данных	0,27/0,217
A/Soloman Island/3/06	0,06/0,032	0,03/0,016	0,04/0,021	0,09/0,046	0,05/0,023	Нет данных	0,06/0,048
A/Townsville/74/2011	<0,03/<0,016	0,03/0,016	0,03/0,016	0,03/0,0154	0,01/0,0046	Нет данных	0,03/0,024
A/Mississippi/03/01/WT	0,08/0,043	0,06/0,032	0,06/0,032	0,185/0,095	0,06/0,0278	0,06/0,035	0,06/0,048
A/Mississippi/03/01/H274Y	0,18/0,097	0,06/0,032	0,133/0,086	0,03/0,0154	0,06/0,0278	0,02/0,0116	0,06/0,048
A/Perth/261/2009	0,09/0,048	Нет данных	Нет данных	0,0065/0,0033	0,03/0,0139	0,009/0,0052	0,03/0,024
A/Victoria/170/2012	0,27/0,145	0,27/0,145	1,20/0,647	Нет данных	Нет данных	0,27/0,157	0,27/0,217
A/Sydney/5/97	0,13/0,070	0,06/0,032	0,18/0,097	0,09/0,046	0,16/0,074	Нет данных	0,27/0,217
B/Townsville/2/2011	5,07/2,73	0,28/0,151	2,5/1,348	2,5/1,28	2,5/1,158	Нет данных	2,5/2,01

Таблица 40

Активность против вируса гриппа в анализе CPE для репрезентативных соединений формулы (I) при разных титрах вирусов (EC<sub>50</sub> нг/мл/нМ)

Вирус гриппа	MD185	MD356	MD358	MD359	MD371	MD345	MD021
A/Townsville/74/2011 (1 x 10 <sup>5</sup> /мл)	<0,03/<0,016	0,03/0,016	0,03/0,0154	0,01/0,0046	Нет данных	0,03/0,0136	0,03/0,024
A/Townsville/74/2011 (5 x 10 <sup>5</sup> /мл)	66/35,6	0,8/0,43	48/24,7	66/30,5	66/38,6	158/71,7	Отсутствие ингибирования при 197

Пример 8. Токсикология ADME (всасывание, распределение, метаболизм и экскреция) для репрезентативных соединений формулы (I).

Два соединения формулы (I), MD185 и MD317, тестировали в анализе hERG IC<sub>50</sub> (hERG-CHO, автоматизированный пэтч-кламп). Значение IC<sub>50</sub> MD185 не поддавалось вычислению. Кривая зависимости концентрация-ответ для MD317 показала менее чем 25%-ный эффект при наивысшей концентрации дос-

товерного тестирования, т.е.  $IC_{50} > 100$  нМ.

Результаты показали, что MD185 и MD317 были безопасными в том, что касается кардиотоксичности.

Пример 9. Определение профиля KINOME для репрезентативных соединений формулы (I).

Два соединения формулы (I), MD185 и MD317, тестировали согласно нижеследующему протоколу анализа на киназы.

Для большинства анализов киназа-меченые штаммы бактериофага T7 выращивали параллельно в 24-луночных блоках в *E. coli*, выделенных из штамма BL21. *E. coli* выращивали до log-фазы и инфицировали фазой T7 из замороженного запаса (множественность инфицирования = 0,4) и инкубировали при встряхивании при 32°C до лизиса (90-150 мин). Лизаты центрифугировали (6000×g) и фильтровали (0,2 мкМ) для удаления клеточного дебриса. Оставшиеся киназы продуцировали в клетках HEK-293 и затем метили ДНК для детекции методом кПЦР (количественная полимеразная реакция). Покрытые стрептавидином магнитные шарики обрабатывали биотинилированными лигандами, имеющими небольшую молекулу, в течение 30 мин при комнатной температуре для создания аффинных смол для анализа киназ. Шарики с лигандами блокировали избытком биотина и промывали буфером для блокирования (SeaBlock(ierce), 1% BSA, 0,05% Tween20, 1 мМ DTT (дигитотрейтол)) для удаления несвязанного лиганда и для снижения неспецифического связывания фага. Реакции связывания оценивали путем объединения киназ, аффинных шариков и тестируемых соединений в 1× буфере для связывания (20% SeaBlock, 0,17×PBS, 0,05% Tween20, 6 мМ DTT). Тестируемые соединения подготавливали в виде 40х исходных растворов в 100% DMSO и напрямую разбавляли в анализ. Все реакции осуществляли в полипропиленовых 384-луночных планшетах в конечном объеме 0,04 мл. Анализируемые планшеты инкубировали при комнатной температуре при встряхивании в течение 1 ч, и аффинные шарики промывали буфером (1×PBS, 0,05% Tween 20). Шарики затем ресуспендировали в буфере для элюирования (1×PBS, 0,05% Tween 20, 0,5 мкМ небитинилированного аффинного лиганда) и инкубировали при комнатной температуре при встряхивании в течение 30 мин. Концентрацию киназ в элюатах измеряли методом кПЦР.

Значительное взаимодействие между соединениями и киназами при 100 нМ отсутствовало. Результаты суммированы в табл. 41.

Таблица 41

Таблица индексов селективности

Наименование соединения	Тип индекса селективности	Количество совпадений	Количество немутантных киназ	Скрининговая концентрация (нМ)	Индекс селективности
MD185	S(35)	0	395	100	0
MD185	S(10)	0	395	100	0
MD185	S(1)	0	395	100	0
MD317	S(35)	0	395	100	0
MD317	S(10)	0	395	100	0
MD317	S(1)	0	395	100	0

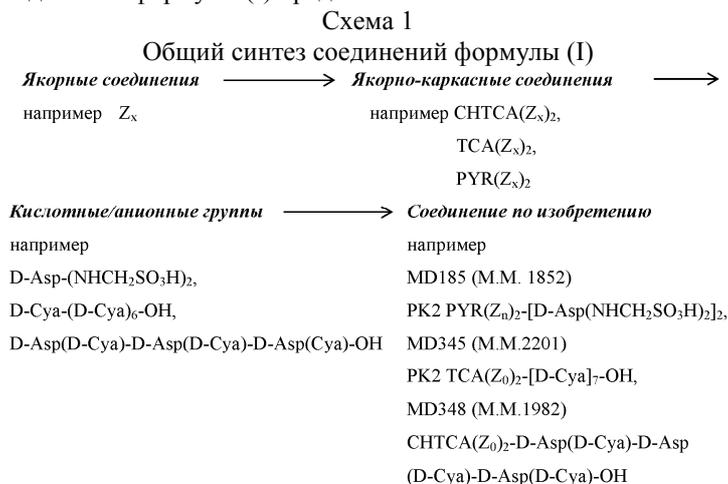
Получение репрезентативных соединений по изобретению.

Для удобства многие химические группировки приведены с использованием общепринятых сокращений, в том числе, но без ограничения, метил (Me), этил (Et), н-пропил (nPr), изопропил (iPr), н-бутил (nBu), трет-бутил (tBu), н-гексил (nHex), циклогексил (cHex), фенил (Ph), метокси (MeO), этокси (EtO), триметилсилил (TMS), трет-бутилоксикарбонил (Boc) и ацетил (Ac).

Для удобства многие химические соединения приведены с использованием общепринятых сокращений, в том числе, но без ограничения, метанол (MeOH), этанол (EtOH), диэтиловый эфир (Et<sub>2</sub>O), этилацетат (EtOAc), триэтиламин (TEA), дихлорметан (метилхлорид, DCM, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), трифторуксусная кислота (TFA), трифторэтанол (TFE), диметилформамид (DMF), сульфат натрия (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), тетрагидрофуран (THF), мета-хлорпероксибензойная кислота (mCPBA), натриевая соль гексаметилдисилазана (NaHMDS), гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуруния (HATU), гексафторфосфат O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-бис-(тетраметил)уруния (HBTU), диметилсульфоксид (DMSO), сульфат магния (MgSO<sub>4</sub>), гидрокарбонат натрия (NaHCO<sub>3</sub>), трет-бутанол (t-BuOH), гидрохлоридная соль 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDCI·HCl), фторид тетра-н-бутиламмония (TBAF), N,N-диизопропилэтиламин (DIPEA), трет-бутилдиметилсилил (TBDMS), 1-гидроксибензотриазол (HOBT), транс-дихлор-бис-(трифенилфосфин)палладий(II) (PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), тетракис(трифенилфосфин)палладий(0) (Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>), трис-(дибензилиден)ацетон)дипалладий(0) (Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>), тетрафторборат три-трет-бутилфосфония (t-Bu<sub>3</sub>PH·BF<sub>4</sub>), 4,5-бис-(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантин (Xantphos), трифенилфосфин (PPh<sub>3</sub>), диизопропилазодикарбоксилат (DIAD), хлорхромат пиридиния (PCC), борандиметилсульфид (BMS), изопропоксид титана (TiOiPr<sub>4</sub>), триацетоксиборгидрид натрия (NaBH(OAc)<sub>3</sub>), цианоборгидрид натрия (NaBH<sub>3</sub>(CN)), боргидрид натрия (NaBH<sub>4</sub>), хлорид аммония (NH<sub>4</sub>Cl), хлороформ (CHCl<sub>3</sub>),

диоксид марганца ( $MnO_2$ ), карбонат калия ( $K_2CO_3$ ), 1,2-дихлорэтан (DCE), азид натрия ( $NaN_3$ ), нитрит натрия ( $NaNO_2$ ), ди-трет-бутилдикарбонат ( $Boc_2O$ ) и S-ацетамидометил (Acм).

Общий синтез соединений формулы (I) представлен на схеме 1 ниже.



Пример 10. Получение N-Вос-1,9-диаминононана.

1,9-Диаминононан (1 г, 6,329 ммоль) растворяли в смеси 50 мл этанола и 50 мл воды, затем добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (1,38 г, 6,329 ммоль) при к.т. Всю эту смесь перемешивали при к.т. в течение 16 ч с получением белой суспензии. Эту суспензию фильтровали. После сушки на воздухе твердое вещество представляло собой ди-Вос-1,9-диаминононан в количестве 488 мг (1,36 ммоль, выход 21,53%). Фильтрат экстрагировали дихлорметаном (150 мл, 100 мл). Водный слой, содержащий непрореагировавший 1,9-диаминононан (289 мг, 1,83 ммоль) рециклизовали в следующую партию получения. Органические экстракты объединяли и промывали 50 мл воды, затем перемешивали с 10 г безводного  $Na_2SO_4$  при к.т. в течение ночи. Органическую суспензию фильтровали. Фильтрат упаривали в вакууме досуха с получением N-Вос-1,9-диаминононана 809 мг (выход 49,5%) в виде бесцветного твердого вещества. МС (масс-спектр) 295(M+1).

Пример 11. Получение якорного соединения  $Zn'$ .

Синтез подробно представлен на схеме 2, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений и обозначения стадий синтеза относятся к схеме 2.

Стадия А). Силовую кислоту (1) (5 г, 16,18 ммоль) и смолу Dowex 50×8( $H^+$ ) (10 г) перемешивали в безводном метаноле (400 мл) при 60-62°C в течение 48 ч. Смесь фильтровали. Фильтрат упаривали в вакууме досуха с получением соединения (2) в виде белого твердого вещества 4,5 г (13,25 ммоль, выход 82,5%). МС 338 (M+1).

Стадия В). Соединение (2) (4 г, 11,87 ммоль) перемешивали с уксусным ангидридом (40 мл, d 1,08, М.м. 102,29, 423 ммоль) и серной кислотой (2 мл). Смесь затем перемешивали при 32-35°C в течение 72 ч в масляной бане. Реакционную смесь добавляли по каплям в перемешиваемую смесь  $Na_2CO_3$  (51 г) в воде (280 мл) и этилацетата (14 мл) в ледяной бане. После этого смесь перемешивали в течение еще 1,5 ч в ледяной бане, затем экстрагировали этилацетатом (400 мл, 270 мл). Этилацетатные экстракты объединяли и промывали 10%-ным раствором  $NaHCO_3$  (270 мл×2), насыщенным раствором  $NaCl$  (270 мл×2) и сушили над безводным  $Na_2SO_4$  в течение ночи. Фильтровали и фильтрат упаривали в вакууме досуха с получением соединения (3) (4,78 г, 11,57 ммоль, выход 97,5%). МС 414 (M+1). Масляный остаток превращался в не совсем белое твердое вещество после хранения в эксикаторе над  $P_2O_5$  в течение 3 суток.

Стадия С). Соединение (3) (3,47 г, 8,4 ммоль) растворяли в трет-БуОН (25 мл). В этот раствор добавляли азидотриметилсилан (1,81 мл, 13,63 ммоль). Всю эту смесь перемешивали при 80-82°C под аргоном в течение 24 ч. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (100 мл), затем перемешивали с 0,9 г  $NaNO_2$  в 25 мл воды и доводили до pH 2 добавлением 5н. HCl в течение периода времени 1 ч при комнатной температуре. Двухфазную смесь разделяли, водный слой экстрагировали этилацетатом (50 мл). Органические экстракты объединяли и промывали последовательно водой (25 мл×2), 6%-ным раствором  $NaHCO_3$  (25 мл), водой (25 мл×3), затем сушили над  $Na_2SO_4$ . Фильтрат упаривали в вакууме досуха с получением соединения (4) (3,17 г, 6,95 ммоль, выход 82,7%) в виде маслянистого вещества. МС 457 (M+1), 479 (M+Na), 925 (2M+Na).

Стадия D). Соединение (4) (3,15 г, 6,91 ммоль) растворяли в метаноле (100 мл) и толуоле (70 мл). Этот раствор помещали под вакуум для удаления воздуха (кислорода), затем заполняли аргоном. В эту смесь добавляли Pd/C (10%) (616 мг), затем помещали под вакуум для удаления аргона, который затем заменяли водородом ( $H_2$ ). Гидрирование проводили при комнатной температуре в течение 2 ч и катализатор затем отфильтровывали. Фильтрат упаривали в вакууме досуха с получением соединения (5) (2,82 г, 6,55 ммоль, выход 94,7%) в виде не совсем белого твердого вещества. МС 431 (M+1).

Стадия Е). Соединение (5) (2,80 г, 6,51 ммоль) растворяли в безводном ацетонитриле (15 мл). В этот раствор добавляли N,N'-ди-Вос-1Н-пирозол-1-карбодиимид [Bis(Вос)РСН] (3,03 г, 9,76 ммоль). Всю эту смесь перемешивали под аргоном при комнатной температуре в течение 40 ч. Реакционную смесь упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в этилацетате (4 мл), затем разбавляли гексаном (4 мл), наносили на флэш-хроматографическую колонку, промывали гексаном (150 мл), затем растворителем (этилацетат:гексан 1:1) (150 мл) и в заключение элюировали растворителем (этилацетат:гексан 1:1). После вакуумного упаривания собранных фракций получили продукт соединения (6) (3,23 г, 4,8 ммоль, выход 73,7%) в виде белого твердого вещества. МС 673 (M+1).

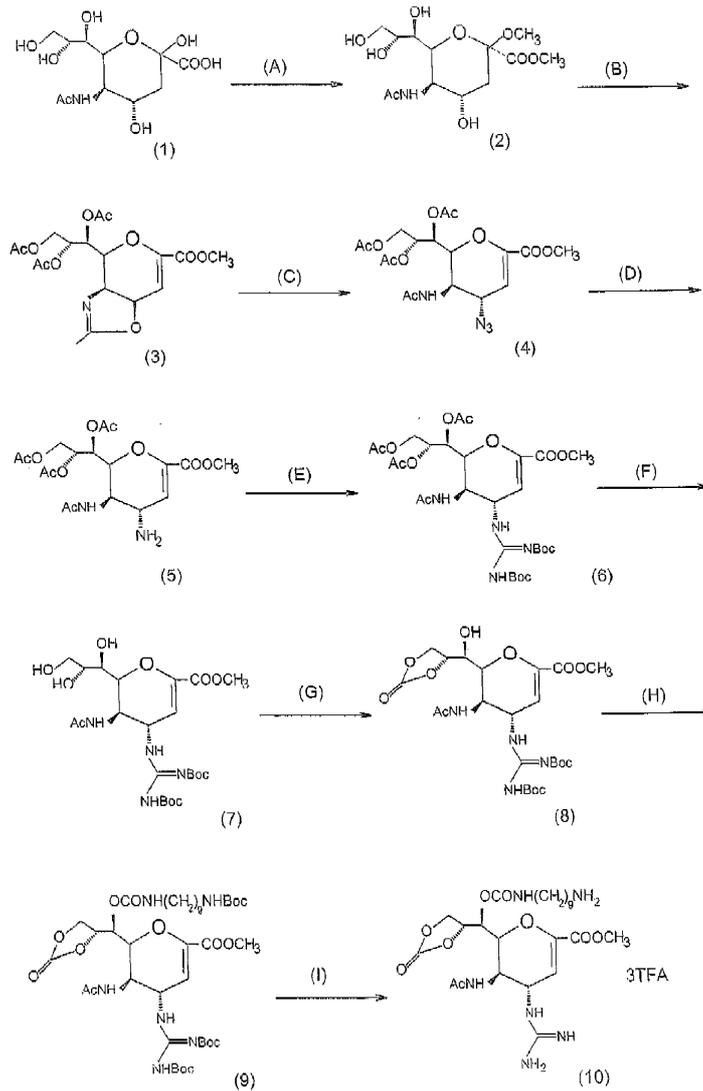
Стадия F). Соединение (6) (2,8715 г, 4,273 ммоль) растворяли в безводном метаноле (22 мл). В этот раствор добавляли NaOCH<sub>3</sub> (4,9134 мг, 0,2136 ммоль) под аргоном. Всю эту смесь перемешивали под аргоном при к.т. в течение 2,5 ч, затем доводили до pH 6,5 с использованием смолы Dowex50×8(H<sup>+</sup>), которую затем отфильтровывали. Фильтрат упаривали в вакууме досуха с получением соединения (7) (2,2024 г, 4,0337 ммоль, выход 94,4%) в виде белого твердого вещества. МС 547 (M+1).

Стадия G). Соединение (7) (2 г, 3,66 ммоль) растворяли в безводном ацетонитриле. В этот раствор добавляли 1,1'-карбонилдидиазол (714 мг, 4,403 ммоль). Всю эту смесь перемешивали под аргоном при 20-30°C в течение 18 ч. Смесь упаривали в вакууме досуха, затем остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии, сначала промывали гексаном (150 мл), затем проявляли растворителем (этилацетат:гексан 2:1). Фракции со значением R<sub>f</sub> 0,5 (этилацетат:гексан 2:1) объединяли и упаривали в вакууме досуха с получением соединения (8) (1,35 г, 2,36 ммоль, выход 64,5%) в виде белого твердого вещества. МС 573 (M+1).

Стадия H). Соединение (8) (1,3 г, 2,27 ммоль) растворяли в безводном пиридине (12,5 мл). В этот раствор добавляли пара-нитрофенилхлорформиат (503,3 мг, 2,497 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (808,5 мг, 6,62 ммоль). Всю эту смесь перемешивали при 30°C под аргоном в течение 7 ч. В эту реакционную смесь добавляли раствор N-Вос-1,9-диаминононана (690 мг, 2,67 ммоль) и 4-диметиламинопиридина (166 мг, 1,36 ммоль) в безводном пиридине (4 мл). Реакционную смесь перемешивали под аргоном при 30°C в течение 16 ч, затем упаривали в вакууме для удаления пиридина. Остаток распределяли между этилацетатом (300 мл) и водой (50 мл), содержащей 2,45 мл 5н. HCl, промывали последовательно водой (50 мл×2), 2%-ным раствором NaHCO<sub>3</sub> (50 мл×6) и водой (50 мл×2), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и фильтровали. Фильтрат упаривали в вакууме досуха с получением 2,25 г маслянистого вещества. Его подвергали колоночной флэш-хроматографии (этилацетат:гексан 1,5:1 в качестве элюента). Фракции (со значением R<sub>f</sub> 0,27 ТСХ, этилацетат:гексан 1,5:1 в качестве проявляющего растворителя) объединяли и упаривали в вакууме досуха с получением соединения (9) (1,057 г, 1,234 ммоль, выход 54,4%) в виде белого твердого вещества. МС 857(M+1), 879(M+Na). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (млн<sup>-1</sup>) 11.42 (1H, s, гуанидин NHВос), 8.25 (1H, d, NH-4), 7.95 (1H, d, AcNH), 7.16 (1H, t, OCONH), 6.75 (1H, t, нонил NHВос), 5.80 (1H, s, H-3), 4.92 (2H, m, H-7, H-8), 4.75 (1H, m, H-4), 4.31-4.62 (4H, m, H-5, H-6, H-9, H-9'), 3.74 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 2.90 (4H, m, NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>NH), 1.86 (3H, s, NHCOCH<sub>3</sub>), 1.49 (9H, s, Вос), 1.38 (18H, s, Вос), 1.2-1.6 (14H, m, NHCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>2</sub>NH).

Стадия I). Соединение (9) (1 г, 1,168 ммоль) растворяли в смеси трифторуксусной кислоты (TFA) (36 мл) и метилфенилового эфира (анизола) (3,9 мл) в дихлорметане (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (36 мл). Всю эту смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч и 40 мин, затем ее упаривали в вакууме при 35°C в течение 2 ч. Остаток перемешивали в гексане (100 мл) при к.т. в течение ночи, гексан сливали и добавляли свежий гексан (60 мл), перемешивание продолжали в течение 4 ч при к.т. Гексан затем удаляли. Остаток растворяли в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл) и упаривали досуха при 35-40°C. Остаток растворяли в воде (25 мл). Водный раствор подвергали сублимационной сушке с получением соединения (10) (1,026 г, 1,143 ммоль, выход 97,8%) в виде белой пены TFA<sub>3</sub>Z<sub>n</sub>' соли. МС 557 (M+1) [М.м. Z<sub>n</sub>' = 556, М.м. TFA<sub>3</sub>Z<sub>n</sub>' = 898].

Схема 2  
Получение якорного соединения Zn'



Пример 12. Получение якорно-каркасных соединений  $\text{PYR}(\text{Zn}')_2$ .

Синтез подробно представлен на схеме 3, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений относятся к схеме 3.

В раствор пиромеллитового диангидрида (11) (27,25 мг, 0,125 ммоль) в безводном DMF (2 мл) добавляли  $\text{Zn}'$  (10) (224,5 мг, 0,25 ммоль) и диизопропилэтиламин (DIPEA) (130,64 мкл, 0,75 ммоль) при комнатной температуре. Всю эту реакционную смесь перемешивали под аргоном при 25°C в течение 36 ч, затем обрабатывали смесью диэтиловый эфир:петролейный эфир 1:1 (100 мл). Осадок отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром и сушили на воздухе с получением не совсем белого твердого вещества (197 мг), которое затем подвергали разделению и очистке методом ВЭЖХ.

Аналитическая ВЭЖХ: репл градиент.

Колонка: колонка Gemini C18 100A 5 мкм 150×3,00 мм. Длина волны: 220/280 нм. Скорость потока: 0,7 мл/мин. Растворитель А = 0,1%-ная трифторуксусная кислота; растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Температура: 30°C. Градиент: 0-50% В, 15 мин. Время удерживания: РК1PYR( $\text{Zn}'$ )<sub>2</sub> (12) в течение 14,35 мин; РК2PYR( $\text{Zn}'$ )<sub>2</sub> (13) в течение 14,53 мин.

Препаративная ВЭЖХ.

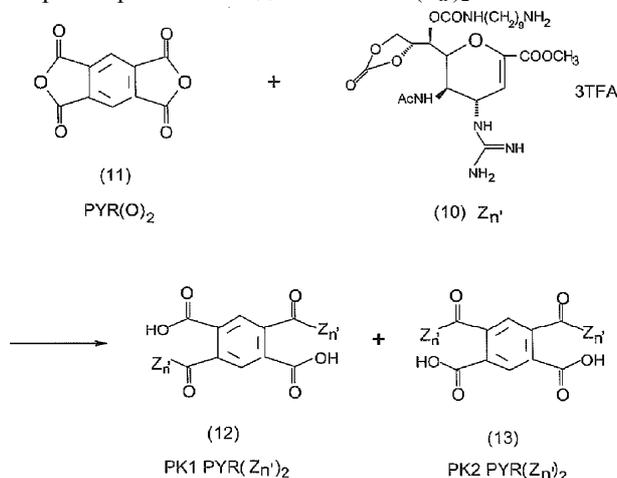
Колонка: колонка Water Xterra C18 prep MS 19×50 мм, 5 мкм. Длина волны: 220/280 нм. Скорость потока: 8 мл/мин. Растворитель А = 0,1%-ная трифторуксусная кислота, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Температура: 30°C. Градиент: 10-100% В, 80 мин. Чистые фракции РК1PYR( $\text{Zn}'$ )<sub>2</sub> и РК2PYR( $\text{Zn}'$ )<sub>2</sub> (13) собирали и подвергали сублимационной сушке по отдельности с получением 49 мг РК1PYR( $\text{Zn}'$ )<sub>2</sub> (12) и 42 мг РК2PYR( $\text{Zn}'$ )<sub>2</sub> (13) соответственно.

РК1PYR( $\text{Zn}'$ )<sub>2</sub> (12) МС ЭРИ +ve (масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией в режиме регистрации положительных ионов) 10В 1331,5 ион. <sup>1</sup>Н-ЯМР (D<sub>2</sub>O) δ (млн<sup>-1</sup>): 8.00 (2H, s, ароматическая пара Н×2), 6.00 (2H, d, Н-3×2), 5.20-5.50 (4H, m, Н-7×2, Н-8×2), 4.35-4.90 (8H, m, Н-4×2, Н-5×2, Н-

6×2, H-9×2), 4.15 (2H, dd, H-9'×2), 3.80 (6H, s, COOCH<sub>3</sub>×2), 3.25-3.45 (4H, m, OCONHCH<sub>2</sub>×2), 2.90-3.20 (4H, m, NHCH<sub>2</sub>×2), 1.95 (6H, s, CH<sub>3</sub>CO×2), 1.20-1.70 (28H, m, (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>×2).

PK2PYR(Z<sub>n</sub>')<sub>2</sub> (13) МС ЭРИ +ve, 10 В, ион 1331,5 ион. <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O) 5 (млн<sup>-1</sup>) 8.35 (1H, s, ароматический H×1), 7.50 (1H, s, ароматический H×1), 6.00 (2H, d, H-3×2), 5.20-5.50 (4H, m, H-7×2, H-8×2), 4.35-4.90 (8H, m, H-4×2, H-5×2, H-6×2, H-9×2), 4.15 (2H, dd, H-9'×2), 3.80 (6H, s, COOCH<sub>3</sub>×2), 3.25-3.45 (4H, m, OCONHCH<sub>2</sub>×2), 2.90-3.20 (4H, m, NHCH<sub>2</sub>×2), 1.95 (6H, s, CH<sub>3</sub>CO×2), 1.20-1.70 (28H, m, (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>×2).

Схема 3. Получение якорно-каркасных соединений PYR(Z<sub>n</sub>')<sub>2</sub>



Пример 13. Получение кислотной/анионной группы D-Asp(NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H)<sub>2</sub>.

Синтез подробно представлен на схеме 4, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений относятся к схеме 4.

Вос-D-аспарагиновую кислоту (14) (233 мг, 1 ммоль) и НВТУ [гексафторфосфат О-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-бис-(тетраметил)урония] (758 мг, 2 ммоль) растворяли в DMF (10 мл). В этот раствор добавляли DIPEA (диизопропилэтиламин) (349 мкл, 2 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем объединяли с раствором аминотансульфоната натрия (332 мг, 2,5 ммоль) в DMF (3 мл). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь упаривали в вакууме с получением бледно-оранжевого твердого вещества. Его растворяли в воде (20 мл), промывали этилацетатом (20 мл×3), водную фазу упаривали в вакууме для удаления органического растворителя, затем подвергали сублимационной сушке с получением 310 мг неочищенного продукта (15) в виде белого твердого вещества, которое подвергали разделению и очистке методом ВЭЖХ.

Аналитическая ВЭЖХ: репл градиент.

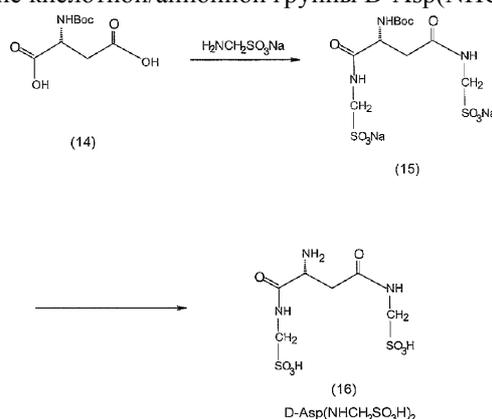
Колонка: колонка Gemini C18 100A 5 мкм 150×30 мм. Длина волны: 220 нм. Скорость потока: 0,7 мл/мин. Растворитель А = 0,1%-ная трифторуксусная кислота, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Температура: 30°C. Градиент: 0-50% В, 15 мин. Время удерживания: соединение (15) в виде свободной кислоты в течение 4,669 мин. МС ЭРИ -ve (масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией в режиме регистрации отрицательных ионов) 418 (M-1), пик растворителя при 1,658 мин, аминотансульфоновая кислота при 2,722 мин, НВТУ вещество при 5,520 мин, моно-Вос-D-Asp-NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H при 5,802 мин.

Препаративная ВЭЖХ.

Колонка: колонка Gemini AXIA C18, 5 мкм 50×21,2 мм. Длина волны: 220 нм. Скорость потока: 8 мл/мин. Растворитель А = 0,1%-ная трифторуксусная кислота, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Температура: 30°C. Градиент: 0-100% В, 100 мин.

Фракции, содержащие соединение (15), собирали и объединяли вместе, затем подвергали сублимационной сушке с получением чистого продукта (15) в виде свободной кислоты. МС ЭРИ -ve 418(M-1). Соединение (15) в виде свободной кислоты (200 мг, 0,477 ммоль) растворяли в трифторуксусной кислоте (10 мл), содержащей анизол (1 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем упаривали в вакууме досуха. Остаток растирали в диэтиловом эфире (20 мл×2), фильтровали. Твердое вещество сушили на воздухе, затем растворяли в воде и подвергали сублимационной сушке с получением 106 мг продукта (16) в виде белого твердого вещества. МС ЭРИ -ve 318 (M-1). Продукт растворяли в воде (10 мл), затем нейтрализовали двумя эквивалентами гидроксида натрия и подвергали сублимационной сушке с получением динатриевой соли соединения (16) в виде белого твердого вещества.

Схема 4  
Получение кислотной/анионной группы D-Asp(NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H)<sub>2</sub>



Пример 14. Получение соединения MD185, PK2PYR(Z<sub>n</sub>)<sub>2</sub>[(D-Asp)(NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>.

Синтез подробно представлен на схеме 5, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений относятся к схеме 5.

В раствор PK2PYR(Z<sub>n</sub>)<sub>2</sub> (13) (30 мг, 22,56 мкмоль) в сухом DMF (5 мл) добавляли HATU [гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-бис-(тетраметил)урония] (17,14 мг, 45,11 мкмоль) и DIPEA (7,9 мкл, 45,31 мкмоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем добавляли динатриевую соль (16) [D-Asp(NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub>] (33 мг, 91,16 мкмоль) в DMF (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч, затем ее подвергли разделению и очистке методом ВЭЖХ.

Аналитическая ВЭЖХ: репл градиент.

Колонка: колонка Gemini C18 100A 5 мкм 150×3,00 мм. Длина волны: 220/280 нм. Скорость потока: 0,7 мл/мин. Растворитель А = 0,1%-ная трифторуксусная кислота, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Температура: 30°C. Градиент: 0-50% В, 15 мин. Время удерживания: продукт (17) в виде свободной кислоты в течение 14,270 мин. МС ЭРИ +ve, +30В 967,5; МС ЭРИ -ve, -25В 965,4.

Остальные пики были следующие: исходное вещество PK2PYR(Z<sub>n</sub>)<sub>2</sub> (13) при 11,7 мин; PK2PYR(Z<sub>n</sub>)<sub>2</sub>-D-Asp(NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H)<sub>2</sub> при 13,6 мин.

Препаративная ВЭЖХ.

Колонка: колонка Water Xterra prep MS C18 19×50 мм, 5 мкм. Длина волны: 220/280 нм. Скорость потока: 8 мл/мин. Растворитель А = 0,1%-ная трифторуксусная кислота, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Температура: 30°C. Градиент: 0-100% В за 100 мин.

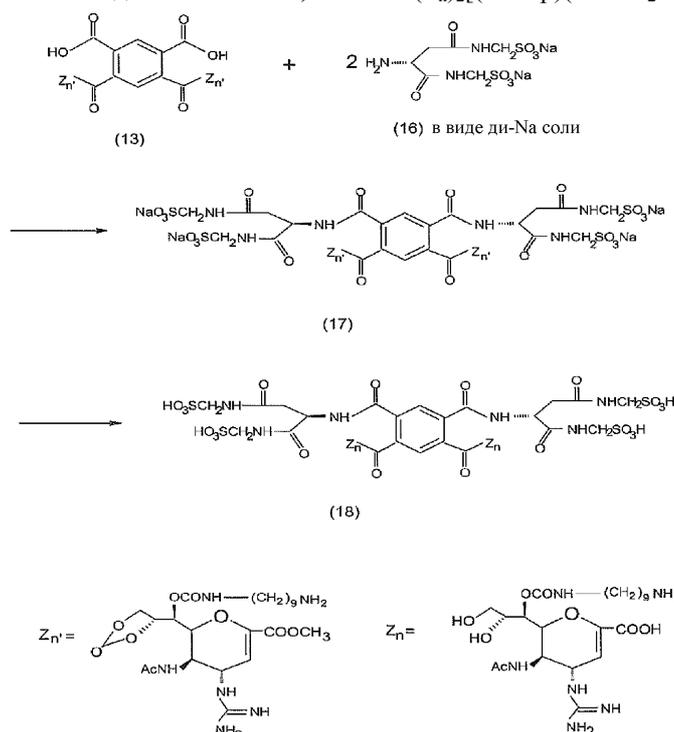
Продукт элюируется в обратном профиле по отношению к аналитической хроматографии на Gemini. Профиль элюирования: 25-35% ацетонитрила. Фракции отбирали и пробирки с чистотой более 90% объединяли, а остальное вещество разделяли на колонке Gemini AXIA.

Продукт (17) подвергли сублимационной сушке с получением белого пушистого порошка. МС ЭРИ -ve -25В 965,4, определена М.м. 1932. Соединение (17) PK2PYR(Z<sub>n</sub>)<sub>2</sub>[D-Asp(NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> (8 мг, 4,14 мкмоль) растворяли в 50%-ном водном растворе метанола (2 мл), затем добавляли триэтиламин (40 мкл, 287,5 мкмоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре. Протекание реакции контролировали аналитической ВЭЖХ для пика при 10,848 мин. Через 2 ч реакционную смесь подкисляли уксусной кислотой (60 мкл, 1049 мкмоль) и разбавляли водой до 10 мл. Раствор очищали на колонке Kinetex. Чистые фракции объединяли и подвергли сублимационной сушке с получением 6 мг продукта (18) PK2PYR(Z<sub>n</sub>)<sub>2</sub>[D-Asp(NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H)<sub>2</sub>]<sub>2</sub> в виде белого порошка.

ВЭЖХ время удерживания 10,695 мин. МС ЭРИ -ve -30В 925,6.

Для того чтобы удалить остаток TFA, присутствующий в соединении, чистое вещество растворяли в 60 мл 4 мМ HCl и подвергли сублимационной сушке, затем растворяли в 60 мл 1 мМ HCl и подвергли сублимационной сушке, и в заключение подвергли сублимационной сушке с удалением 60 мл воды. Выход 5,6 мг соединения (18), MD185, М.м. 1852.

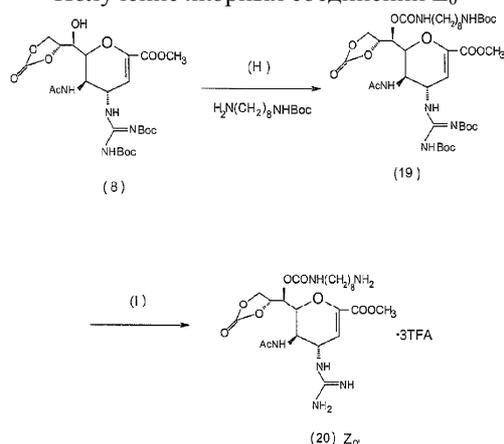
## Схема 5

Получение соединения MD185, PK2PYR(Z<sub>n</sub>)<sub>2</sub>[(D-Asp)(NHCH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>23</sub>Пример 15. Получение якорных соединений Z<sub>0</sub>.

Синтез подробно представлен на схеме 6, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений и обозначения стадий синтеза относятся к схеме 6.

Согласно методикам (H) и (I), описанным в примере 11, в результате реакции соединения (8) с паранитрофенилхлорформиатом и затем с N-Вос-1,8-диаминооктаном и после хроматографии получили соединение (19) в виде белого твердого вещества. МС 843 (M+1). Соединение (19) обрабатывали трифторуксусной кислотой (TFA) и после обработки получили соединение (20) Z<sub>0</sub> в форме TFA<sub>3</sub>Z<sub>0</sub> соли в виде белой пены. МС 543 (M+1) [М.м. Z<sub>0</sub> = 542, М.м. TFA<sub>3</sub>Z<sub>0</sub> = 884].

## Схема 6

Получение якорных соединений Z<sub>0</sub>'Пример 16. Получение якорно-каркасных соединений PK1 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub> и PK2 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>.

Синтез подробно представлен на схеме 7, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений относятся к схеме 7.

В раствор TCA (21) (3,085 мг, 17,52 мкмоль) в DMF (309 мкл) добавляли NATU (13,32 мг, 35,03 мкмоль) и DIPEA (6,5 мкл, 37,32 мкмоль). Всю эту смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем добавляли по каплям раствор Z<sub>0</sub>' (20) (30,97 мг, 35,03 мкмоль) и DIPEA (18,44 мкл, 105,9 мкмоль) в DMF (600 мкл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь подвергали разделению и очистке методом ВЭЖХ.

Аналитическая ВЭЖХ: репл градиент.

Колонка: Phenomenex C18 5 мкл 110A 150×3 мм. Длина волны: 220/280 нм. Скорость потока: 0,7 мл/мин. Растворитель А = 0,1%-ная трифторуксусная кислота, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил.

Температура: 30°C. Градиент: 100-50% В за 15 мин. Время удерживания: РК1 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub> (22) 11,100 мин и РК2 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub> (23) 11,156 мин.

РК1 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub> (22): <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O) δ млн<sup>-1</sup> 2.5 млн<sup>-1</sup> (АВ симметричный dd, 4H, C<sub>a</sub>H<sub>2</sub>=C<sub>b</sub>H<sub>2</sub>) подтверждает симметричную структуру этого соединения. МС 1225,4 (М.м. 1224).

РК2 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub> (23): <sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O) δ млн<sup>-1</sup> 2.35-2.75 млн<sup>-1</sup> (асимметрический, dd, 4H, (C<sub>a</sub>H<sub>2</sub> ≠ C<sub>b</sub>H<sub>2</sub>)) подтверждает асимметрическую структуру этого соединения. МС 1225,4 (М.м. 1224).

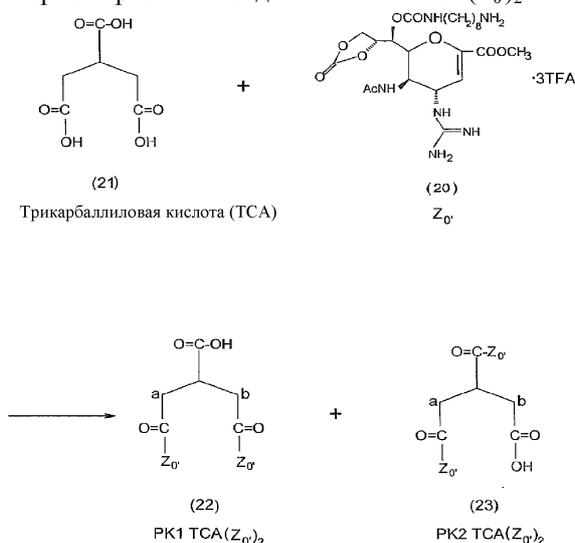
Препаративная ВЭЖХ.

Раствор подкисляли небольшим количеством 1 М уксусной кислоты и разбавляли водой до 25 мл. Раствор фильтровали через шприцевый фильтр 0,45 мкм и впрыскивали в колонку Water Xterra prep MS C18 19×50 мм при 20-80% буфера А. Скорость потока 8 мл/мин, градиент 0-100% В за 100 мин, длина волны 210/280 нм. Мертвый объем профиля элюирования DMF/DIPEA/НАТУ РК1 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub> и РК2 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub> дополнительно очищали и разделяли на колонке Phenomenex Gemini 5 мкм C18 110A Axia 50×21,2 мм в 0,1% TFA буфере.

Соотношение РК1/РК2 равно примерно 1:2, оба МС ЭРИ +30В 1225,4.

Схема 7

Получение якорно-каркасных соединений РК1 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub> и РК2 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>



Пример 17. Получение кислотной/анионной группы [D-Cys-SO<sub>3</sub>H]<sub>7</sub>OH.

Синтез подробно представлен на схеме 5, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений относятся к схеме 8.

Как подробно представлено на схеме 8, для получения [D-Cys-SH]<sub>7</sub>OH (33) применяли твердофазный синтез, затем осуществляли окисление полицистеина (33) с получением [D-CysSO<sub>3</sub>H]<sub>7</sub>OH (34).

Fmoc-D-Cys(Trt)-OH (24) (2,93 г, 5 ммоль) растворяли в сухом дихлорметане (DCM) (35 мл) в пробирке Falcon на 50 мл, затем добавляли 2-хлортритилхлоридную смолу (25) (5 г), энергично встряхивали и добавляли диизопропилэтиламин (DIPEA) (3,5 мл, 20 ммоль). Через 5 мин добавляли еще одну порцию DIPEA (1,3 мл, 7,5 ммоль). Всю эту смесь встряхивали дополнительно в течение 4 ч. Чтобы блокировать оставшиеся реакционноспособные 2-хлортритилхлоридные группы, добавляли метанол (4 мл). Смесь встряхивали в течение еще 30 мин. Смолу промывали последовательно DMF (20 мл×3), DCM (20 мл×3) и метанолом (20 мл×3), затем сушили в вакууме в течение ночи. На выходе получили нагрузку 0,57 мМ/г (26).

Для удаления Fmoc-группы со смолы смолу (26) предварительно пропитывали DCM (35 мл), затем добавляли 50%-ный пиперидин в DMF (30 мл). Всю эту смесь помещали на ротатор на 30 мин. Эту процедуру повторяли со свежим раствором 50%-ного пиперидина в DMF (30 мл) в течение 60 мин. Смолу затем промывали последовательно DMF (20 мл×2), DCM (20 мл×2) и DMF (20 мл×3). Имела место положительная нингидриновая реакция. Смолу (27) была готова для связывания.

В раствор Fmoc-D-Cys(Trt)-OH (24) (1758 мг, 3 ммоль) в DMF (6 мл) добавляли НВТУ [гексафторфосфат O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-бис-(тетраметил)урония] (1140 мг, 3 ммоль) и DIPEA (523 мкл, 3 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем добавляли смолу (27) (2,5 г, 0,57 мМ/г, 1,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч. Нингидриновый тест был отрицательным, и смесь промывали DMF (20 мл×3), затем обрабатывали 5% уксусным ангидридом, 1% DIPEA в DMF (20 мл) в течение 30 мин. Смолу (28) затем промывали DMF (20 мл×3), DCM (20 мл×3) и метанолом (20 мл×3). Смолу (28) предварительно пропитывали DCM и добавляли раствор 30% пиперидина/N-метилпирролидона в DMF (20 мл). Всю смесь помещали на ротатор на 30 мин, затем эту процедуру повторяли со свежим раствором 30% пиперидина и N-метилпирролидона в течение еще 60

мин, после чего промывали DMF (20 мл×2), DCM (20 мл×2) и DMF (20 мл×2) с получением смолы (29).

Смолу (29) далее связывали в течение 24 ч с (24) (1758 мг, 3 ммоль) в DMF (6 мл), предварительно активированным в течение 10 мин с использованием HBTU (1140 мг, 3 ммоль) и DIPEA (523 мкл, 3 ммоль), после обработки получали смолу (30). Половину этой смолы затем подвергали следующей процедуре: защитные группы удаляли пиперидином/метилпирролидоном, снова связывали с (24), предварительно активированным с использованием HBTU/DIPEA, и повторяли эту процедуру 4 раза с получением смолы (31).

Смолу (31) промывали DCM (20 мл×5), затем помещали в пробирку Falcon на 50 мл, добавляли 40%-ную уксусную кислоту в DCM (35 мл) и на ротаторе при комнатной температуре встряхивали в течение 6 ч. Суспензию смолы фильтровали и фильтрат упаривали в вакууме до бледно-желтой пены. Остаток промывали водой (100 мл×3), затем сушили с получением белого твердого вещества (32) [D-Cys(Trt)]<sub>7</sub>-OH.

Соединение (32) перемешивали в растворе из TFA (20 мл), триизопропилсилана (1 мл) и воды (0,5 мл) в течение 3 ч. Полученную суспензию фильтровали. Фильтрат упаривали до маслянистого вещества, которое затем растирали с диэтиловым эфиром (20 мл×4) с получением белого твердого вещества. Его перемешивали в 50%-ном водном растворе ацетонитрила (100 мл). Вещество обрабатывали ультразвуком до образования белой суспензии, которую подвергали сублимационной сушке с получением неочищенного продукта (33) [D-Cys-SH]<sub>7</sub>-OH (380 мг).

Аналитическая ВЭЖХ.

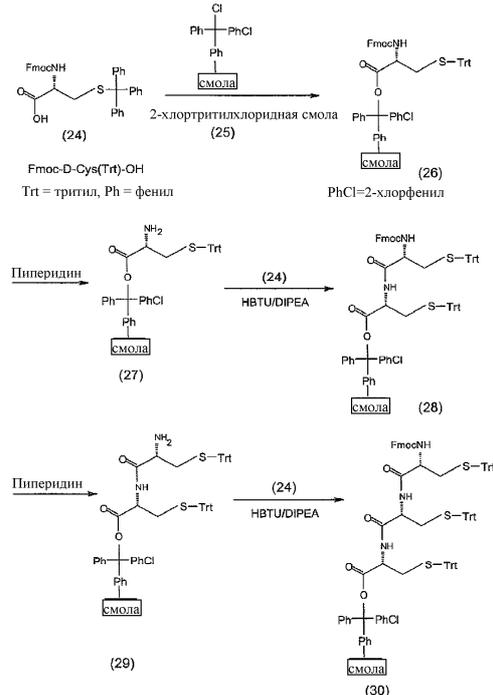
Колонка: Phenomenex Gemini 5 мкм C18 110A 150×3,00 мм. Растворитель А = 0,1%-ная трифторуксусная кислота; растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Скорость потока: 0,7 мл/мин. Длина волны: 210/280 нм. Температура: 30°C. Градиент: 0-50% В за 15 мин. Время удерживания: 9,356 мин.

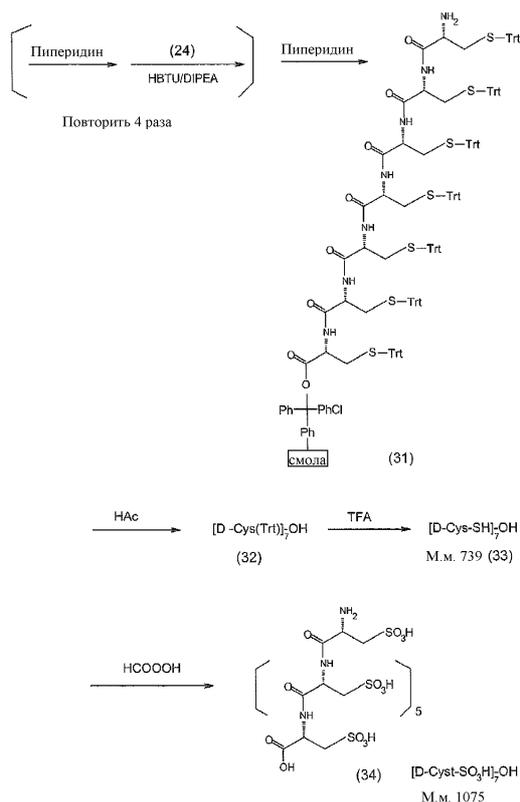
МС конус +25 В, основной пик 740 конус -25 В, основной пик 738, определена М.м. соединения (33) [D-Cys-SH]<sub>7</sub>-OH, равная 739.

Соединение (33) (10 мг, 13,53 мкмоль) добавляли в раствор надмуравьиной кислоты (1 мл), предварительно охлажденный в бане лед-соль. Всю эту смесь перемешивали в ледяной бане в течение 1 ч, затем разбавляли 100 мл холодной воды и подвергали сублимационной сушке с получением бледно-желтой пены (34). Это вещество очищали на колонке Phenomenex Kinetex 5 мкм XB-C18 100A с использованием изократической 0,1% TFA в качестве элюента с получением соединения (34) [D-Cyst-SO<sub>3</sub>H]<sub>7</sub>-OH, М.м. 1075, МС конус +50 В 1076 (M+1) в виде бесцветного порошка.

Надмуравьиную кислоту получали путем смешивания муравьиной кислоты (8,74 мл), воды (0,96 мл) и 30%-ной перекиси водорода (1 мл) и выдерживания этой смеси при комнатной температуре в течение 30 мин в закрытой колбе. Эта перекись водорода должна быть свежеприготовленной перед использованием.

Схема 8  
Получение кислотной/анионной группы [D-Cyst-SO<sub>3</sub>H]<sub>7</sub>OH





Пример 18. Получение соединения MD345, PK2 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>-[D-Cyst-SO<sub>3</sub>H]<sub>7</sub>-OH.

Синтез подробно представлен на схеме 9, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений относятся к схеме 9.

В раствор PK2 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub> (23) (4 мг, 3,268 мкмоль) в безводном DMF (2 мл) добавляли HATU (1,242 мг, 3,268 мкмоль) и 2% DIPEA в DMF (30 мкл, 3,44 мкмоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем объединяли с раствором соединения (34), [D-Cyst-SO<sub>3</sub>H]<sub>7</sub>-OH (7,03 мг, 6,54 мкмоль) и DIPEA (9,11 мкл, 52,32 мкмоль) в DMF (3 мл). Всю эту реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь разбавляли до 15 мл смесью вода/метанол 1/1, затем подвергали разделению и очистке методом ВЭЖХ.

Препаративная ВЭЖХ.

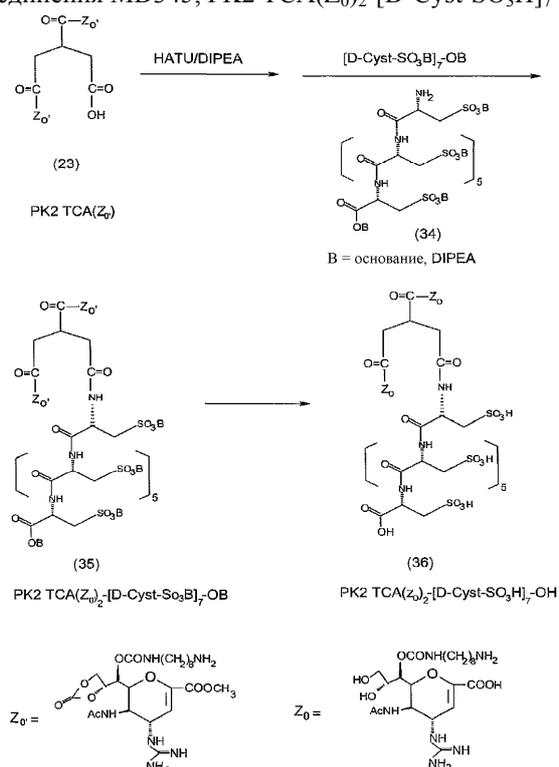
Колонка: Phenomenex Kinetex 5 мкм XB-C18 50×21,2 мм. Длина волны: 220/280 нм. Скорость потока: 8 мл/мин. Растворитель А = 0,1%-ная трифлуоруксусная кислота (TFA), растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Температура: 30°C. Градиент: 0-100% В, 80 мин. Фракции, содержащие соединение (35) в виде свободной кислоты (В=Н), объединяли и подвергали сублимационной сушке с получением 4 мг соединения (35) в форме свободной кислоты (В=Н) в виде белого порошка. МС ЭРИ +ve конус 35 В 1142,1 2+ ион.

Соединение (35) в виде свободной кислоты (В=Н), PK2 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>-[D-Cyst-SO<sub>3</sub>H]<sub>7</sub>-OH (4 мг, 1,754 мкмоль), растворяли в 50%-ном водном растворе метанола (800 мкл), содержащем триэтиламин (ТЕА) (20 мкл, 146 мкмоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре и контролировали методом ВЭЖХ. Смесь обрабатывали через 3 ч. Раствор очищали на колонке Kinetex. Чистые фракции с временем удерживания 11,254 мин объединяли и подвергали сублимационной сушке с получением 2 мг соединения (36) в виде белого порошка. МС ЭРИ +ve конус 40 В 1102,2 2+ ион.

Для удаления остатка TFA, присутствующего в соединении, соединение (36) растворяли в 4 мМ HCl (30 мл) и подвергали сублимационной сушке. Затем его растворяли в 1 мМ HCl (30 мл) и подвергали сублимационной сушке. В заключение его подвергали сублимационной сушке от воды (30 мл) с получением 1,1 мг продукта (36), MD345 PK2 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>-[D-Cyst-SO<sub>3</sub>H]<sub>7</sub>-OH, М.м. 2201 [МС 2202 (M+1)].

## Схема 9

Получение соединения MD345, PK2 TCA(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>-[D-Cyst-SO<sub>3</sub>H]<sub>7</sub>-OH, М.м. 2201



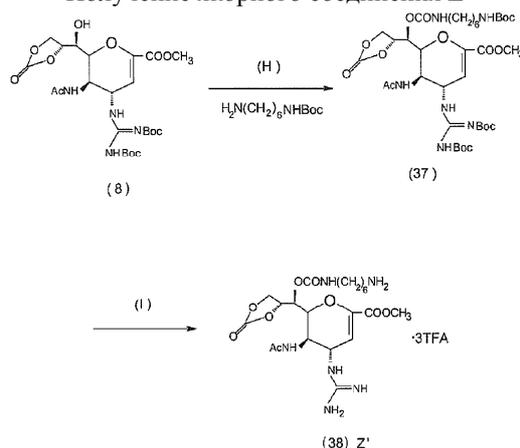
Пример 19. Получение якорного соединения Z'.

Синтез подробно представлен на схеме 10, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений и обозначения стадий синтеза относятся к схеме 10.

Согласно методикам (H) и (I), описанным в примере 11, проводили реакцию соединения (8) с паранитрофенилхлорформиатом, затем с N-Бос-1,6-диаминогексаном, после чего осуществляли хроматографию с получением соединения (37) в виде белого твердого вещества, МС 815 (M+1). Соединение (37) обрабатывали трифторуксусной кислотой (TFA) и анизолом с получением после обработки соединения (38) Z' в форме TFA-соли белого цвета. МС 515 (M+1). [М.м. Z' = 514, TFA<sub>3</sub>Z' = 856].

## Схема 10

Получение якорного соединения Z'



Пример 20. Получение якорно-каркасного соединения СНТСА(Z')<sub>2</sub>.

Синтез подробно представлен на схеме 11, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений относятся к схеме 11.

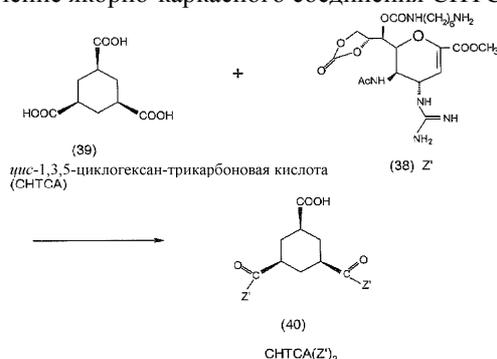
В раствор СНТСА (39) (4,4 мг, 20 мкмоль) в DMF (300 мкл) добавляли HATU (15,2 мг, 40 мкмоль) и DIPEA (7,4 мкл, 42,4 мкмоль). Всю эту смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем добавляли по каплям раствор Z' (38) (34,24 мг, 40 мкмоль) и DIPEA (21,06 мкл, 120,9 мкмоль) в DMF (700 мкл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь разбавляли 1 М НАс (50 мкл) и водой (25 мл). Эту смесь фильтровали через шприцевый фильтр 0,45 мкм. Фильтрат подвергали разделению и очистке методом ВЭЖХ.

Колонка: Water Xterra prep MS C18 19×50 мм. Длина волны: 210/280 нм. Скорость потока: 8 мл/мин.

Растворитель А = 0,1% TFA, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Температура: 30°C. Градиент: 0-100% В за 100 мин. Мертвый объем профиля элюирования DMF/DIPEA/HATU.

Фракции, содержащие соединение (40), дополнительно очищали на колонке Phenomenex Gemini 5 мкм С18 110А AXIA 50×21,2 мм в 0,1%TFA буфере. Фракцию подвергали сублимационной сушке с получением 15 мг соединения (40) СНТСА(Z')<sub>2</sub> в виде белой пены. МС ЭРИ +ve, +30 В, 1209; определена М.м. 1208.

Схема 11  
Получение якорно-каркасного соединения СНТСА(Z')<sub>2</sub>



Пример 20. Получение якорного соединения S<sub>6</sub>.

Синтез подробно представлен на схеме 12, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений и обозначения стадий синтеза относятся к схеме 12.

Стадия А). Соединение (1) перемешивали в безводном метаноле (100 мл) при комнатной температуре в течение 48 ч и смесь фильтровали. Фильтрат упаривали в вакууме досуха с получением соединения (41) (1,25 г, 6,037 ммоль, выход 93%) в виде белого твердого вещества. МС 324 (M+1).

Стадия В). Соединение (41) (1,95 г, 6,037 ммоль) перемешивали в ацетилхлориде (20 мл, 281 ммоль) при комнатной температуре в течение 3 суток, затем упаривали в вакууме досуха с получением соединения (42) (3,06 г, 6,01 ммоль, выход 99%). МС 510,5 (M+1).

Стадия С). Остаток (42) (3,06 г, 6,01 ммоль) перемешивали в дихлорметане (DCM) (35 мл), затем добавляли KSAc (3,57 г, 31,26 ммоль). Реакционную смесь перемешивали под аргоном при комнатной температуре в течение 40 ч, разбавляли дихлорметаном (50 мл), затем распределяли между дихлорметаном и водой (50 мл). Органический слой промывали 5%-ным раствором NaCl (22 мл×2) и сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в течение ночи и фильтровали. Фильтрат упаривали досуха с получением соединения (43) (2,93 г, 5,34 ммоль, выход 88,8%) в виде не совсем белой пены. МС 550 (M+1).

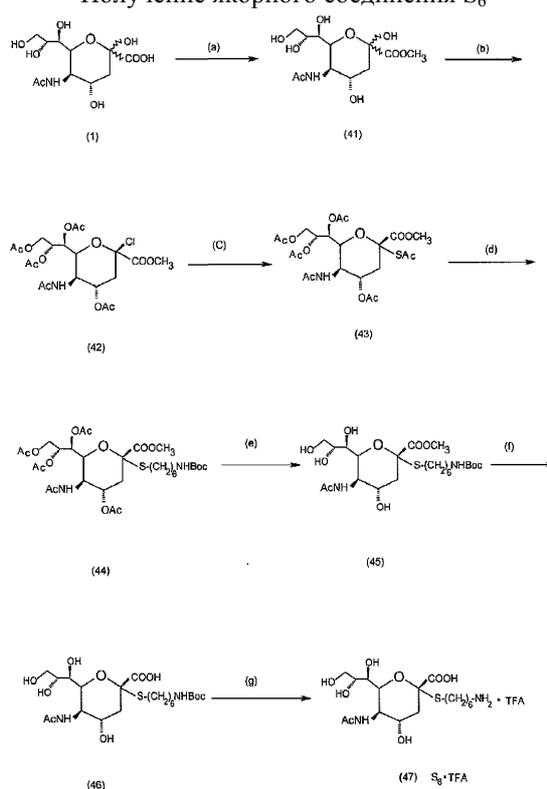
Стадия D). Соединение (43) (200 мг, 0,364 ммоль) и Вос-аминогексанбромид (107,4 мг, 0,385 ммоль) перемешивали в DMF (2 мл), в который добавляли диэтиламин (0,81 мл, 7,83 ммоль). Всю эту смесь перемешивали под аргоном при 25°C в течение 2,5 ч. Реакционную смесь распределяли между этилацетатом (EA) (80 мл) и насыщенным раствором NaCl. Органический слой промывали насыщенным раствором NaCl (15 мл×3) и водой (10 мл×3). Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и фильтрат упаривали в вакууме досуха. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (толуол:ацетон = 2:1). Фракции, содержащие соединение (44), объединяли и упаривали в вакууме досуха с получением соединения (44) (98 мг, 0,139 ммоль, выход 38%) в виде белой пены. МС 706 (M+1).

Стадия Е). Соединение (44) (95 мг, 0,135 ммоль) растворяли в безводном метаноле (1 мл). В этот раствор добавляли метоксид натрия (0,16 мг, 6,94 ммоль) под аргоном, реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 ч, затем с использованием смолы Dowex50×8(H<sup>+</sup>) доводили до pH 6,0-6,5 и фильтровали. Фильтрат упаривали в вакууме досуха с получением соединения (45) (71 мг, 0,132 ммоль, выход 97,9%) в виде белой пены. МС 538 (M+1).

Стадия F). Соединение (45) (60 мг, 0,109 ммоль) перемешивали под аргоном в 0,2н. NaOH (2 мл, 0,4 ммоль) при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Раствор доводили до pH 3-4 с использованием смолы Dowex50×8(H<sup>+</sup>) и фильтровали. Фильтрат подвергали сублимационной сушке с получением соединения (46) (56 мг, 0,107 ммоль, выход 98%) в виде белой пены. МС 524 (M+1).

Стадия G). Соединение (46) (50 мг, 0,0956 ммоль) растворяли в смеси трифторуксусной кислоты (TFA) (2 мл, 25,96 ммоль) и метилфенилового эфира (анизола) (0,2 мл, 1,84 ммоль) в дихлорметане (2 мл). Всю эту смесь перемешивали при 25°C в течение 2,5 ч, затем ее упаривали в вакууме при 35°C в течение 2ч. Остаток промывали в гексане (10 мл×2) при комнатной температуре в течение ночи и гексан декантировали. Остаток перемешивали в диэтиловом эфире (10 мл×2) при комнатной температуре, затем диэтиловый эфир удаляли. Остаток растворяли в воде (1 мл) и подвергали сублимационной сушке с получением соединения (47) в форме S<sub>6</sub>·TFA соли в виде белой пены (51 мг, 0,0949 ммоль, выход 99%). МС 424(M+1) [М.м. S<sub>6</sub> = 423, М.м. S<sub>6</sub>·TFA соли = 537].

Схема 12  
Получение якорного соединения S<sub>6</sub>



Пример 21. Получение соединения MD012 (референсное соединение), СНТСА(Z)<sub>2</sub>(S<sub>6</sub>).

Синтез подробно представлен на схеме 13, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений и обозначения стадий синтеза относятся к схеме 13.

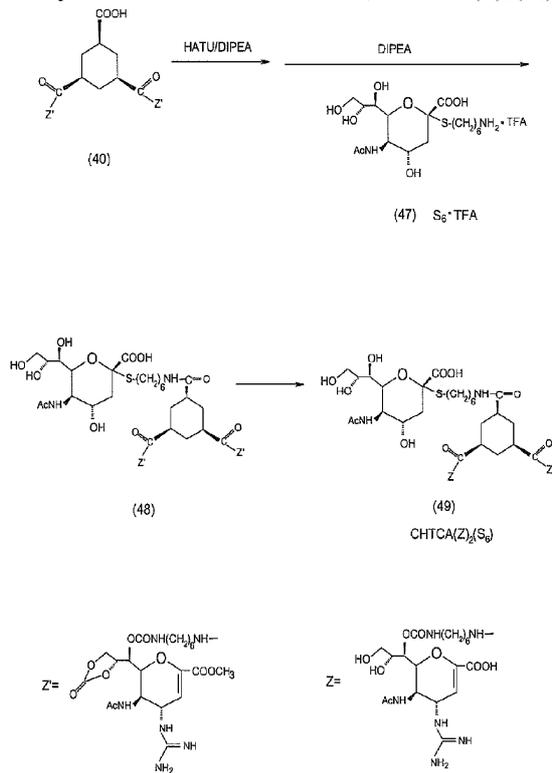
В раствор СНТСА(Z')<sub>2</sub> (40) (4 мг, 3,3 мкмоль) в DMF (100 мкл) добавляли НАТУ (1,254 мг, 3,3 мкмоль) и DIPEA (0,6 мкл, 3,44 мкмоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем добавляли раствор S<sub>6</sub>·TFA соли (47) (1,8 мг, 3,35 мкмоль) и DIPEA (1,20 мкл, 6,89 мкмоль) в DMF (100 мкл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученную смесь разбавляли 1 М НAc (5 мкл) и водой (2 мл), затем ее фильтровали через шприцевой фильтр 0,45 мкм. Фильтрат подвергали разделению и очистке методом ВЭЖХ.

Колонка: Phenomenex Gemini AXIA 5 мкм, C18 110A 50×21,2 мм. Длина волны: 210/280 нм. Скорость потока: 8 мл/мин. Растворитель А = 0,1% трифторуксусная кислота в воде Milli-Q, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Градиент: 0-100% В, 100 мин, линейный. Температура: 30°C.

Фракции, содержащие соединение (48), собирали и подвергали сублимационной сушке с получением 2,4 мг соединения (48) СНТСА(Z')<sub>2</sub>(S<sub>6</sub>) в виде белой пены. МС ЭРИ +30 В 1615; определена М.м. 1614.

Соединение (48) (2,4 мг, 1,486 мкмоль) перемешивали в 50%-ном водном растворе метанола (90 мкл), содержащем триэтиламин (6,6 мкл), при комнатной температуре в течение 5 ч, затем упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в воде (100 мкл) и подвергали сублимационной сушке с получением продукта (49) СНТСА(Z)<sub>2</sub>(S<sub>6</sub>) (2 мг, 1,303 мкмоль, выход 87,7%) в виде белой пены. МС ЭРИ, +30 В, 1535,7; определена М.м. 1534,7.

Схема 13  
Получение соединения MD012, СНТСА(Z)<sub>2</sub>(S<sub>6</sub>)



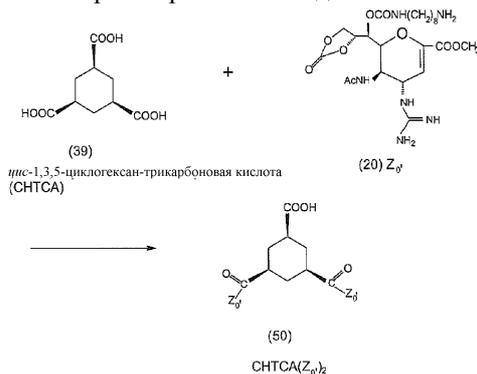
Пример 22. Получение якорно-каркасного соединения СНТСА(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>.

Синтез подробно представлен на схеме 14, приведенной ниже.

Указанные ниже ссылочные номера соединений относятся к схеме 14.

Получение якорного соединения (20) Z<sub>0</sub> подробно описано в примере 15. Якорно-каркасное соединение (50) СНТСА(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub> было получено по методике, подробно описанной в примере 20. Якорно-каркасное соединение (50) СНТСА(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub> было получено в виде белого твердого вещества. МС ЭРИ +ve, +30 В, 1265; определена М.м. 1264.

Схема 14  
Получение якорно-каркасного соединения СНТСА(Z<sub>0</sub>)<sub>2</sub>



Пример 23. Получение кислотной/анионной группы D-Asp(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)-D-Asp(D-Cya)-ОН.

Синтез подробно представлен на схеме 15, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений от (А) до (I) и обозначения стадий синтеза относятся к схеме 15.

Вос-D-цистеин(Асм)метилловый эфир [Вос-D-Cys(Асм)-ОМе] (1,532 г, 5 ммоль) растворяли в трифторуксусной кислоте (ТФА) (10 мл), содержащей анизол (1 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакционную смесь затем упаривали в вакууме для удаления ТФА с получением маслянистого вещества, которое растирали с диэтиловым эфиром (100 мл×2), затем растворяли в 20%-ном водном растворе ацетонитрила (100 мл) и подвергали сублимационной сушке в течение 72 ч с получением 1,60 г соединения ТФА-D-Cys(Асм)-ОМе. Методом ВЭЖХ/МС была определена М.м. 206,35 (в форме свободного основания).

Фмос-D-аспарагиновая-α-кислота-β-О-трет-бутиловый эфир.

[Фмос-D-Asp-Обут] (1,646 г, 4 ммоль) активировали НВТУ (М.м. 379,25) (1,517 г, 4 ммоль) и DIPEA

(М.м. 129,25) (0,517 г, 4 ммоль) в DMF (20 мл) при комнатной температуре в течение 10 мин, затем объединяли с раствором TFA·D-Cys(Acm)-OMe (1,47 г, 4,2 ммоль) и DIPEA (0,542 г, 4,2 ммоль) в DMF (10 мл). Всю эту реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. Реакцию контролировали методом ВЭЖХ. Смесь упаривали в вакууме для удаления DMF. Затем к остатку добавляли воду (5×70 мл), чтобы смыть остаточный DMF и D-Cys(Acm)OMe, с получением не совсем белого твердого вещества, которое затем сушили в вакууме с получением соединения (A), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-O-But, в виде белого твердого вещества. Методом ВЭЖХ/МС была определена М.м. 599,7.

Соединение (A) (1,2 г, 2 ммоль) обрабатывали 20%-ным пиперидином в ацетонитриле (20 мл) в течение 30 мин при комнатной температуре, затем фильтровали. Фильтрат упаривали в вакууме с получением соединения (B), D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OBut. Методом ВЭЖХ/МС была определена М.м. 377,4.

Соединение (A) (599,7 мг, 1 ммоль) обрабатывали TFA (6 мл) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем его упаривали в вакууме досуха. Остаток растирали в диэтиловом эфире (50 мл×3), затем растворяли в 30%-ном водном растворе ацетонитрила (100 мл) и подвергали сублимационной сушке с получением соединения (C), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OH, в виде белого твердого вещества. Методом ВЭЖХ/МС была определена М.м. 542,7.

Соединение (C), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OH, (434 мг, 0,8 ммоль) активировали HBTU (303,4 мг, 0,8 ммоль) и DIPEA (103,4 мг, 0,8 ммоль) в DMF (8 мл) при комнатной температуре в течение 10 мин, затем добавляли соединение (B), D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OBut, (9332 мг, 0,88 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. DMF упаривали в вакууме, остаточный DMF удаляли путем промывки белого твердого вещества водой. Затем это белое твердое вещество сушили в вакууме в течение 24 ч с получением соединения (D), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OBut, в виде белого твердого вещества. Методом ВЭЖХ/МС была определена М.м. 902,19. Соединение (D) обрабатывали TFA (16 мл) при комнатной температуре в течение 1 ч для удаления трет-бутилового эфира. TFA выпаривали в вакууме досуха. Остаток промывали водой для удаления остаточной TFA и твердое вещество сушили в вакууме в течение 72 ч с получением Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OH. Методом ВЭЖХ/МС была определена М.м. 846.

Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OH (423 мг, 0,5 ммоль) активировали HBTU (189,5 мг, 0,5 ммоль) и DIPEA (64,63 мг, 0,5 ммоль) в DMF (5 мл) при комнатной температуре в течение 10 мин, затем добавляли соединение (B), D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OBut (317 мг, 0,84 ммоль). Всю эту смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Завершение реакции проверяли методом ВЭЖХ и DMF удаляли в вакууме. Полученное твердое вещество тщательно промывали холодной водой, затем сушили в вакууме в течение 48 ч с получением соединения (E), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OBut, М.м. 1206, которое дополнительно очищали методом ВЭЖХ.

Анализ методом аналитической ВЭЖХ показал, что это вещество имеет чистоту 70%. Вещество растворяли в смеси 50% метанола/вода и фильтровали через фильтр 0,2 мкм для препаративной ВЭЖХ.

Препаративная ВЭЖХ.

Колонка: Waters Xterra C18 5 мкм 19×50 мм, партиями по 40 мг. Длина волны: 220/280 нм. Скорость потока: 8 мл/мин. Растворитель А = 0,1%-ная трифторуксусная кислота, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Градиент: 10-100% В, 100 мин. Температура: 30°C.

Соединение (E), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OBut, затем обрабатывали TFA (10 мл) в течение 1 ч при комнатной температуре и упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 40%-ном водном растворе ацетонитрила (100 мл) и подвергали сублимационной сушке с получением соединения (F), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OH, в виде белого твердого вещества. Методом ВЭЖХ/МС была определена М.м. 1150,27.

Соединение (F), Fmoc-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OMe]-OH, (200 мг, 0,1738 ммоль) обрабатывали 20%-ным пиперидином в ацетонитриле (10 мл) в течение 30 мин при перемешивании при комнатной температуре и затем фильтровали. Фильтрат упаривали в вакууме. Остаток перемешивали в смеси 50% воды/метанол (20 мл), содержащей триэтиламин (500 мкл), при комнатной температуре в течение 6 ч, и завершение реакции контролировали методом ВЭЖХ. Эту смесь упаривали в вакууме досуха с получением соединения (G), D-Asp[D-Cys(Acm)-OH]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OH]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OH]-OH. Методом ВЭЖХ/МС была определена М.м. 885,9.

Анализ методом аналитической ВЭЖХ показал чистоту 50%.

Соединение (G) дополнительно очищали препаративной ВЭЖХ.

Колонка: Phenomenex Gemini Axia 110A 5 мкм 50×21,2 мм C18 ВЭЖХ. Длина волны: 210/280 нм. Скорость потока: 8 мл/мин. Растворитель А = 0,1% TFA, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Градиент: 0-100% В, 100 мин. Температура: 30°C.

Образец (100 мг) растворяли в 10%-ном водном растворе метанола, обрабатывали ультразвуком и фильтровали через фильтр 0,2 мкм. Порции по 20 мг впрыскивали в колонку с градиентным режимом.

Фракции контролировали аналитической ОФ-ВЭЖХ (обращенно-фазовая ВЭЖХ) с использованием колонки Phenomenex Gemini C18 5 мкм. Скорость потока 0,7 мл/мин. Длина волны 210/280 нм. Градиент 0-50% В 15 мин. Растворитель А = 0,1% TFA, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил.

Фракции с чистотой по данным МС более 90% собирали и подвергали сублимационной сушке с получением очищенного соединения (G).

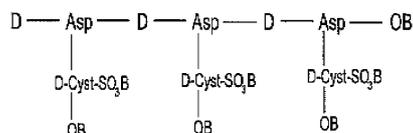
Соединение (G), D-Asp[D-Cys(Acm)-OH]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OH]-D-Asp[D-Cys(Acm)-OH]-OH, (21,8 мг, 0,0246 ммоль) растворяли в TFA (10 мл), содержащей анизол (200 мкл), затем добавляли трифторметансульфонат серебра (504 мг, 1,96 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем ее упаривали в вакууме досуха. Остаток растирали в диэтиловом эфире (40 мл×2), эфирную промывку декантировали. Остаток перемешивали в 1 М уксусной кислоте (20 мл), содержащей дитиотрейтол (403 мг, 2,62 ммоль) при 25°C в течение 3 ч. Суспензию центрифугировали в пробирках Falcon на 50 мл в течение 10 мин при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость тщательно собирали, затем очищали методом ВЭЖХ и подвергали сублимационной сушке с получением соединения (H), D-Asp(D-Cys-SH,-OH)-D-Asp(D-Cys-SH,-OH)-D-Asp(D-Cys-SH,-OH)-OH. Методом ВЭЖХ/МС была определена М.м. 672,3.

Смесь 95% муравьиной кислоты (7,36 мл), 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,8 мл) и H<sub>2</sub>O (0,368 мл) оставляли стоять при комнатной температуре в течение 30 мин, затем перемешивали при -5°C в ледяной бане. В эту смесь добавляли соединение (H) (8 мг, 0,0119 ммоль) и перемешивали в течение 1 ч, затем в вакууме в течение 10 мин. Оставшийся раствор затем разбавляли водой до 200 мл и подвергали сублимационной сушке с получением 9,5 мг соединения (I), D-Asp[D-Cys-SO<sub>3</sub>H,-OH]-D-Asp[D-Cys-SO<sub>3</sub>H,-OH]-D-Asp[D-Cys-SO<sub>3</sub>H,-OH]-OH, в виде белого твердого вещества. Методом ВЭЖХ/МС была определена М.м. 816,78.

Это соединение очищали десольватацией в следующих условиях.

Колонка: Phenomenex Gemini Axia 110A 5 мкм 50×21,2 мм C18 ВЭЖХ. Длина волны: 210/280 нм. Скорость потока: 8 мл/мин. Растворитель А = 0,1% TFA, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Градиент: 0-100% В, 100 мин. Температура: 30°C. Соединение (I) элюируется вблизи мертвого объема.

Это вещество затем подвергали сублимационной сушке с получением чистого соединения (I) в виде белого порошка. Соединение (I) нейтрализовали триэтиламином (ТЕА) до образования ТЕА-соли (51), указанной ниже



В = основание, такое как ТЕА

(51)

\* НВТУ: гексафторфосфат О-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-бис-(тетраметилен)урония М.м. 379,24,

TFA: трифторуксусная кислота М.м. 114,02,

DIPEA: диизопропилэтиламин М.м. 129,25,

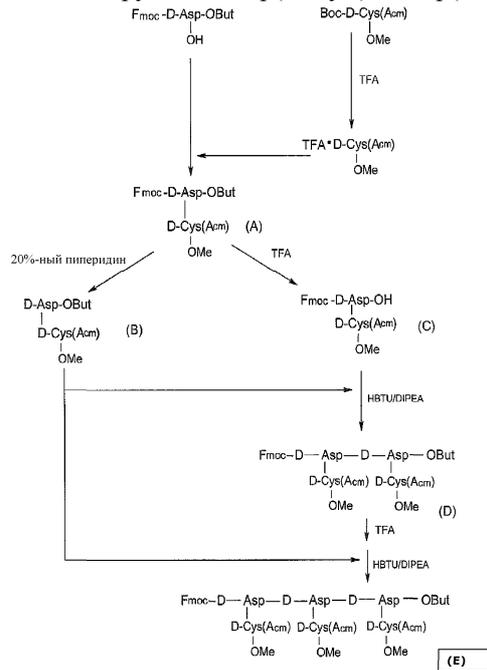
ТЕА: Триэтиламин М.м. 101,19,

Асм: S-ацетамидометил в качестве защитной группы для тио,

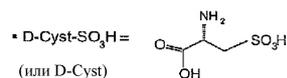
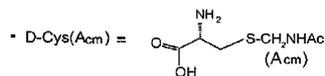
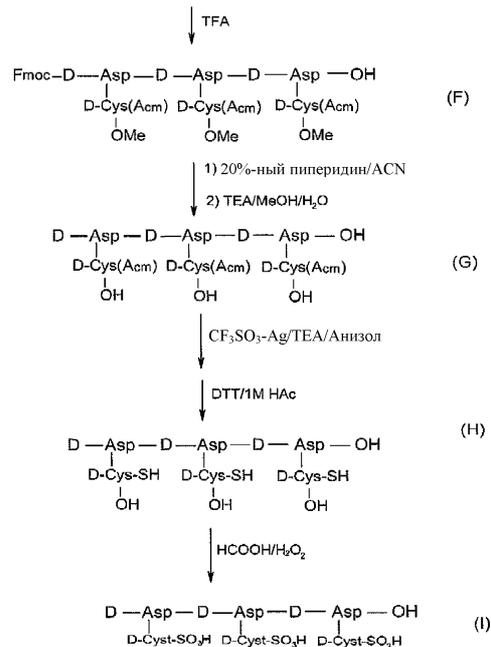
OBu: трет-бутиловый эфир.

## Схема 15

Получение кислотной/анионной группы D-Asp(D-Cyst)-D-Asp(D-Cyst)-D-Asp(D-Cyst)-OH



Соединение (E).



Пример 24. Получение соединения MD348, СНТСА( $Z_0$ )<sub>2</sub>-[D-Asp(D-Cyst)-D-Asp(D-Cyst)-D-Asp(D-Cyst)]-OH.

Синтез подробно представлен на схеме 16, приведенной ниже. Указанные ниже ссылочные номера соединений относятся к схеме 16.

Соединение (50), СНТСА( $Z_0$ )<sub>2</sub> из примера 22 (10,744 мг, 8,5 мкмоль) перемешивали с НАТУ (3,23 мг, 8,5 мкмоль) и DIPEA (1,496 мкл, 8,56 мкмоль) в DMF (5 мл) при комнатной температуре в течение 10 мин, затем эту смесь объединяли с соединением (51), D-Asp(D-Cys-SO<sub>3</sub>B<sub>2</sub>-OB)-D-Asp(D-Cys-SO<sub>3</sub>B<sub>2</sub>-OB)-D-Asp(D-Cys-SO<sub>3</sub>B<sub>2</sub>-OB)-OB из примера 23 (13,2 мг, 8,67 мкмоль) в DMF (5 мл). Всю эту смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Полученную смесь контролировали аналитической

ВЭЖХ/МС, при времени удерживания 12,903 мин. Пик 1 44%. МС ЭРИ +ve, +20 В, 1032,3 2+ ион, ЭРИ -ve, -40 В, 1030,7 2+ион, определена М.м. 2062 в виде соединения (52) без основания, то есть СНТСА(ZO)<sub>2</sub>[D-Asp(D-Суа-SO<sub>3</sub>H,-ОН)-D-Asp(D-Суа-SO<sub>3</sub>H,-ОН)-D-Asp(D-Сyst-SO<sub>3</sub>H,-ОН)]-ОН.

Аналитическая ВЭЖХ.

Колонка: Phenomenex Kinetex EVO 5 мкм C18 100А 150×4,6 мм. Длина волны: 210/280 нм. Скорость потока: 0,7 мл/мин. Растворитель А = 0,1% ТФА, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Градиент: 0-50% В, 15 мин, линейный. Температура: 30°С.

Полученную смесь подкисляли лимонной кислотой, разбавляли до 20 мл водой и фильтровали через фильтр 0,2 мкм, затем подвергали препаративной ВЭЖХ для разделения и очистки.

Препаративная ВЭЖХ.

Колонка: Phenomenex Gemini AXIA 5 мкм C18 110А 50×21,2 мм. Длина волны: 210/280 нм. Скорость потока: 8 мл/мин. Растворитель А = 0,1% ТФА, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Градиент: 0-100% В, 100 мин, линейный. Температура: 30°С.

Основной пик с временем удерживания 31,087 мин представлял собой продукт (52). Фракции, содержащие продукт, собирали и снова очищали методом ВЭЖХ следующим образом: колонка: Phenomenex Kinetex×В 5 мкм C18 100А 50×21,2 мм. Длина волны: 210/280 нм. Скорость потока: 8 мл/мин. Растворитель А = 0,1% ТФА, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Градиент: 5%-100% В, 80 мин, линейный. Температура: 30°С.

Очищенное соединение (52) с временем удерживания 19,597 мин было полностью отделено от исходного вещества с временем удерживания 21,714 мин.

Соединение (52) (3,5 мг, 1,697 мкмоль) растворяли в смеси 50% метанола/вода (5 мл), содержащей триэтиламин (ТЕА) (18 мкл, 129 мкмоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. ВЭЖХ показала, что реакция не завершилась, поэтому добавляли дополнительно 11 мкл ТЕА. Смесь перемешивали в течение еще 60 мин, после чего ВЭЖХ показала, что реакция прошла до конца. Реакционный раствор затем нейтрализовали до рН 6 1 М уксусной кислотой. Раствор затем разбавляли до 20 мл водой. Смесь подвергали ВЭЖХ.

Аналитическая ВЭЖХ.

Колонка: Phenomenex Kinetex Evo 5 мкм C18 100А 150×3 мм. Длина волны: 210/280 нм. Скорость потока: 0,7 мл/мин. Растворитель А = буфер 20 мМ NaHPO<sub>4</sub> рН 7,0, растворитель В = буфер 10 мМ NaHPO<sub>4</sub> рН 7,0 + 50% ацетонитрил. Градиент: 0-100% В, 30 мин, линейный. Температура: 30°С.

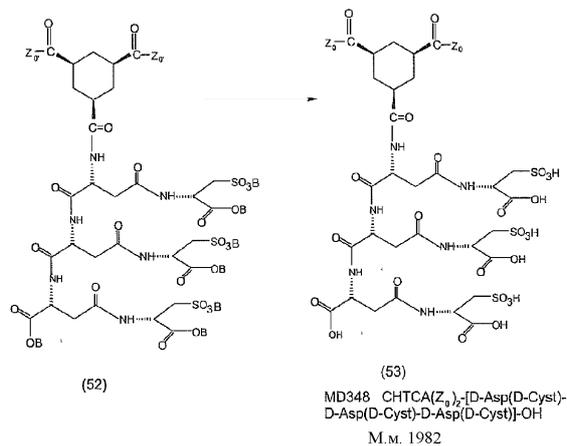
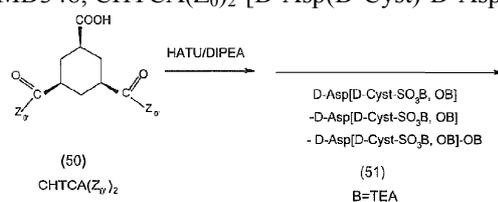
Препаративная ВЭЖХ.

Колонка: Phenomenex Kinetex ХВ 5 мкм C18 100А 50×21,2 мм. Длина волны: 210/280 нм. Скорость потока: 8 мл/мин. Растворитель А = 0,1% ТФА, растворитель В = 100%-ный ацетонитрил. Градиент: 0-100% В, 80 мин, линейный. Температура: 30°С.

Продукт (53) элюировался при времени удерживания 16,431 мин.

Чистые фракции объединяли и подвергали сублимационной сушке, используя HCl обмен для удаления остаточной ТФА. После сублимационной сушки получили продукт (53) СНТСА(ZO)<sub>2</sub>[D-Asp(D-Суа)-D-Asp(D-Суа)-D-Asp(D-Суа)]-ОН с чистотой >99% в виде белого твердого вещества. МС ЭРИ конус -20 В, 990,5 2+ион; определена М.м. 1982.

## Схема 16

Получение соединения MD348,  $\text{CHTCA}(\text{Z}_0)_2$ -[D-Asp(D-Cyst)-D-Asp(D-Cyst)-D-Asp(D-Cyst)]-OH

## Ссылки.

- 1) WHO: influenza (seasonal). 2009, accessed at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en>.
- 2) Metersky ML, Masterton RG, Lode H, File TM Jr, Babinchak T: Epidemiology, microbiology, and treatment considerations for bacterial pneumonia

complicating influenza. *Int J Infect Dis.*, 2012 16:e 321-331.

- 3) Hale BG, Albrecht RA, Garcia-Sastre A: Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future Microbiol.* 2010, 5:23-41.
- 4) Palese P, Shaw ML: orthomyxoviridae: the viruses and their replication, *In Fields Virology*, 5 edition. Edited by: Knipe DM, Howley PM, Philadelphia, PA: Lippincott Williams 2007:1647- '689.
- 5) Salomon R. *et al.*: The influenza virus enigma. *Cell.* 136 (3), 402-410 (2009).
- 6) Gao R. *et al.*: Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N. Engl. J. Med.* 368 (2Q): 1888-1897 (2013).
- 7) Imal M. *et al.* Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*, 486 (7403): 420-428 (2012).
- 8) Herfst S. *et al.*: Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*, 336 (6088):1534-1541 (2012).
- 9) Russell C A, *et al.*: The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host. *Science*, 336 (6088): 1541-1547 (2012).
- 10) Hu Y, *et al.*: Association between adverse clinical outcome in human diseases caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergences of antiviral resistance. *Lancet*, 381 (9885): 2273-2279 (2013).
- 11) Baz M, *et al.*: Emergence of Oseltainivir-resistant pandemic H1N1 virus during prophylaxis. *N. Engl. J Med.*, 361 (23): 2296-2297 (2009).
- 12) Hayden F.: Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? *Clinical Infectious Diseases*, 48:S3-13 (2009).
- 13) Das K, *et al.*: Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol.17, №5, 530-538 (2010).
- 14) Hayden F.: Newer influenza antivirals, biotherapeutics and combinations. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7 (Suppl. 1), 63-75 (2012).
- 15) Wathen M W, *et al.*: Antivirals in seasonal and pandemic influenza-future perspectives. *Influenza and Other Respiratory Virus*, 7 (Suppl. 1), 76-80 (2012).
- 16) Novel antiviral therapies for influenza and other respiratory viruses: Bench to Bedside. The 4<sup>th</sup> ISIRV-AVG Conference, 2-4 June 2015, University of Texas at Austin USA.
- 17) Chen, W. *et al.* A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces

cell death. *Nat. Med.* 7, 1306-1312 (2001).

18) Rebel, J.J. & Wiley, D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry; the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531-569 (2000).

19) Wu, W.W. & Pante, N. The directionality of the nuclear transport of the influenza A genome is driven by selective exposure of nuclear localization sequences on nucleoprotein. *Viol. J.*, 6, 68 (2009).

20) Ulmanen I., Broni, B.A. & Krug, R.M. The role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m<sup>7</sup>GpppHM) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7355-7359 (1981).

21) Plotch, S.J., Bouloy, M., Uhran, I. & Krug, R.M. A unique cap(m<sup>7</sup>GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell*, 23, 847-858 (1981).

22) Hagen, M., Chung, T.D.Y., Butcher, A. & Krystal, M. Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *J. Virol.*, 68, 1509-1515 (1994).

23) Shimizu, K., Iguchi, A., Gornyou, R. & Ono, Y. Influenza virus inhibits cleavage of the HSP70 pre-mRNAs at the polyadenylation site. *Virology*, 254, 213-219 (1999).

24) Nemeroff, M.E., Barabino, S.M., Li, Y., Keller, W. & Krug, R.M. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol. Cell* 1, 991-1000 (1998).

25) Newcomb, L.L. *et al.* Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J. Virol.*, 83, 29-36 (2009).

26) Neumann, G., Hughes, M.T. & Kawaoka, Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.*, 19, 6751-6758 (2000).

27) Nayak, D.P., Hui, E.K. & Barman, S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res*, 106, 147-165 (2004).

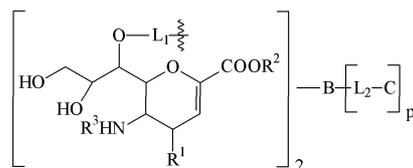
28) Rennie P., Bowell P. *et al.*: Low pH intranasal sprays inactivate influenza viruses *in vitro* and protect ferrets against influenza infection. *Respiratory Research*, 8, 37 (2007).

- 29) Anderson I, Proctor DF: Measurement of nasal mucociliary clearance. *Eur. J. Respir. Dis.*, 64, 37-40 (1983).
- 30) Lande E.A. *et al.*: A comparative study of the effect of Citric acid, Capsaicin and, Resiniferatoxin on the cough challenge in Guinea-pig and man. *Pulmonary Pharmacology*, 6, 171-175 (1993).
- 31) Tanaka, M. *et al.*: Mechanisms of Capsaicin- and Citric-acid-induced cough reflexes in Guinea Pig. *J. Pharmacol. Sci.*, 99, 77-82 (2005).
- 32) Erik De Clercq, Toward improved anti-HIV chemotherapy, therapeutic strategies for intervention with HIV infections. *Med. Chem.*, vol. 38, №14, P.2491 (1995).
- 33) Abed Y *et al.*: Generation and Characterization of recombinant influenza A (H1N1) virus harboring amantadine resistance mutation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 556-559 (2005).
- 34) Bright R. *et al.*: Adamantane resistance around influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA*, 8: 891-894 (2006).
- 35) Bright R. *et al.*: Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*, 9492: 1175-1181 (2005).
- 36) Nelson M. *et al.*: The origin and global emergence of adamantane resistant A (H3N2) influenza virus. *Virology*, 388: 270-278 (2009).
- 37) Von Itzstein *et al.*: Rational Design of Potent Sialidase-based Inhibitors of Influenza Virus Replication. *Nature*, 363, 418-423 (1993).
- 38) Klumpp, K.: Recent Advances in the Discovery and Development of Anti-influenza Drugs. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 14, 1153-1168 (2004).
- 39) Wang, G.: Recent Advances in the Discovery and Development of Anti-influenza Drugs. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 12, 845-861 (2002).
- 40) Abdel-Magid, A. F. *et al.*: Synthesis of Influenza Neuraminidase Inhibitors. *Curr. Opin. Drug Discuss. Dev.*, 4, 776-791 (2001).
- 41) Wang, G. T. *et al.*: Design, Synthesis, and Structure Analysis of Influenza Neuraminidase Inhibitors Containing Pyrrolidine Cores. *J. Med. Chem.*, 44, 1192-1201 (2001)
- 42) Babu, Y.S. *et al.*: Discovery of a Novel, Highly Potent, Orally Active, and Selective Influenza Neuraminidase Inhibitor through Structure-based Drug Design. *J. Med. Chem.*, 43, 3482-3486 (2000).

- 43) Chand, P. et al.: Syntheses and Neuraminidase Inhibitory Activity of Multisubstituted Cyclopentane Amide Derivatives. *J. Med. Chem.*, 47, 1919-1929 (2004).
- 44) Honda, T. et al.: Synthesis and Anti-influenza Evaluation of Polyvalent Sialidase Inhibitors bearing 4-Guandino-Neu5Ac2en derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 1929-1932 (2002).
- 45) Honda, T. et al.: Synthesis and Anti-influenza Virus Activity of 7-O-Alkylated derivatives Related to Zanamivir. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 1925-1928 (2002).
- 46) Del Mar C. et al.: Neuraminidase Inhibitors for influenza complications. *Lancet* 384, 1260 (2014).
- 47) Jefferson T. et al.: Neuraminidase Inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 4:CD008965 (2014).
- 48) Nguyen-Van-Tam J S. et al.: Antivirals for influenza where now for clinical practice and pandemic preparedness? *Lancet*, 384: 386-387 (2014).
- 49) Reece, P.A. et al.: *PCT Int Appl.* W098/21243 (1998). CA1998, 12928172.
- 50) Watson, K.G.; et al.: Highly potent and long-acting trimeric and tetrameric inhibitors of influenza virus neuraminidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 1589 (2004).
- 51) Demaine, D.A. et al.: Dimeric compounds and their use as anti-viral agents. W003/040138. *Chem. Abstr.*, 138:354175 (2003).
- 52) Macdonald, S.J.F. et al.: Potent and long-acting dimeric inhibitors of influenza virus neuraminidase are effective at a one-weekly dosing regimen. *Antimicrob. Agents and Chemoth.*, 48, 4542 (2004).
- 53) Macdonald, S.J.F.; et al.: Dimer zanamivir conjugates with various linking group are potent, long-lasting inhibitors of influenza neuraminidase including H5N1 Avian influenza. *J. Med. Chem.*, 48, 2964 (2005).
- 54) Fraser B.H. et al.: Synthesis of 1,4-triazole linked zanamivir dimers as highly potent inhibitors of influenza A and B. *Med. Chem. Commun.*, 4, 383 (2013).
- 55) Watanabe W. et al. *J. of Virological Methods*, 48, 257 (1994).

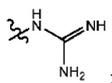
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

### 1. Соединение формулы (I)



(I)

или его фармацевтически приемлемые соль, сложный эфир или стереоизомер, где R<sup>1</sup> представляет собой



R<sup>2</sup> представляет собой H;

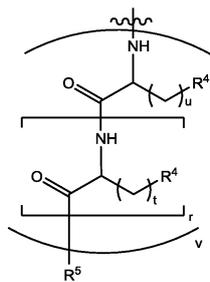
R<sup>3</sup> представляет собой -C(O)-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил;

L<sub>1</sub> представляет собой двухвалентный линкер, выбранный из -C(O)-NH- или -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-NH-; x означает целое число от 0 до 10 или 12;

B представляет собой многовалентную группу, выбранную из группы, состоящей из циклогексан-1,3,5-трикарбонила, пропан-1,2,3-трикарбонила и бензол-1,2,4,5-тетракарбонила;

L<sub>2</sub> представляет собой связь;

C представляет собой анионную группу формулы (VIII)



(VIII),

где  $R^4$  в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{C(O)-NH-CH}_2\text{SO}_3\text{H}$  и  $-\text{C(O)-NH-CH(COOH)-CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ;

$R^5$  выбран из  $-\text{OH}$  или  $-\text{NHCH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ;

$u$  означает целое число от 0 до 3;

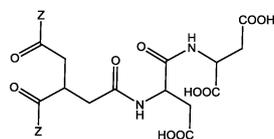
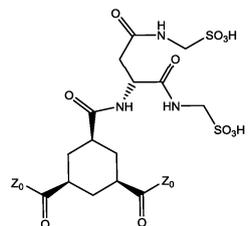
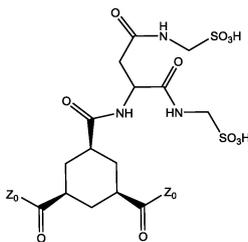
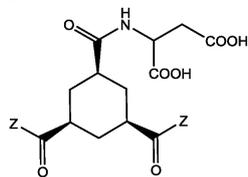
$t$  означает целое число от 0 до 3;

$r$  означает целое число от 0 до 6;

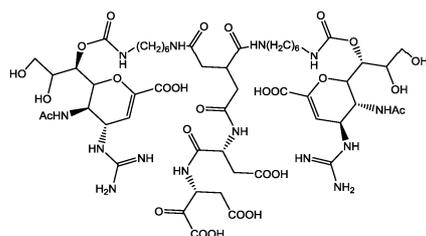
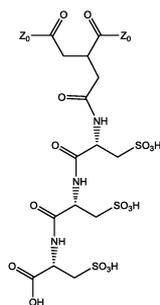
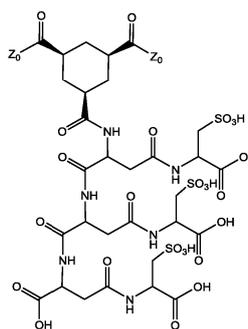
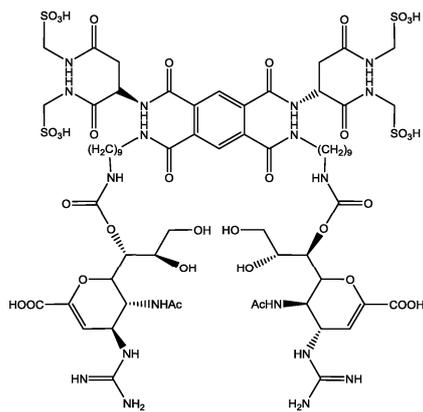
$v$  означает целое число от 1 до 12 и

$p$  равен 1 или 2.

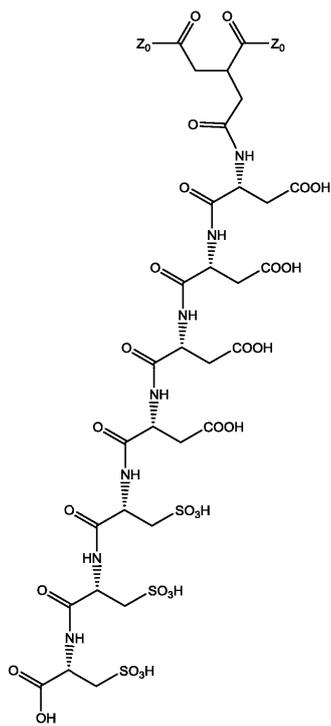
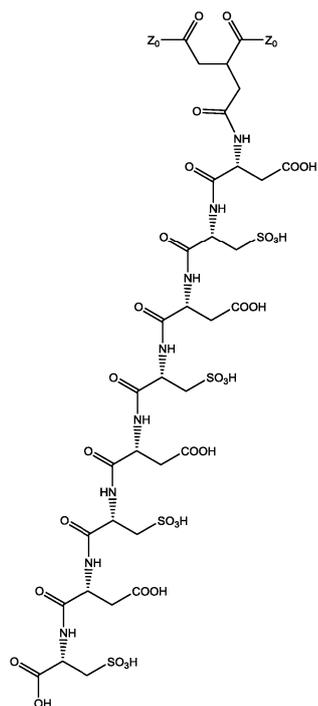
2. Соединение по п.1, выбранное из группы, состоящей из:



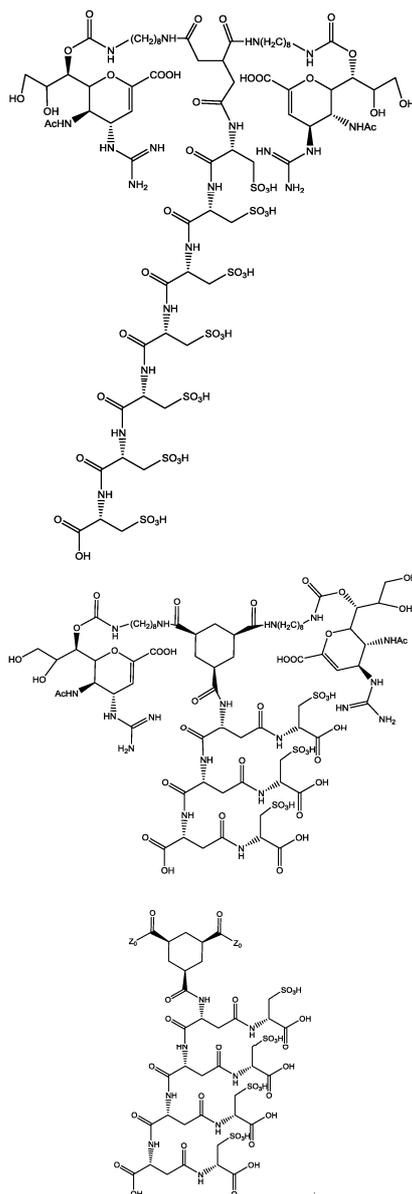
033921



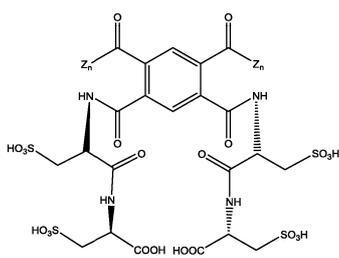
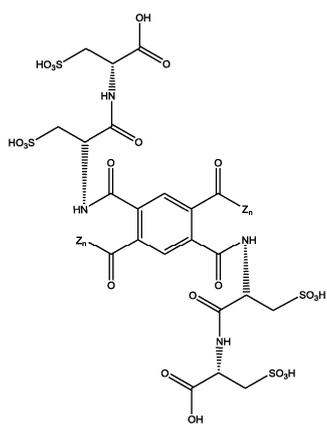
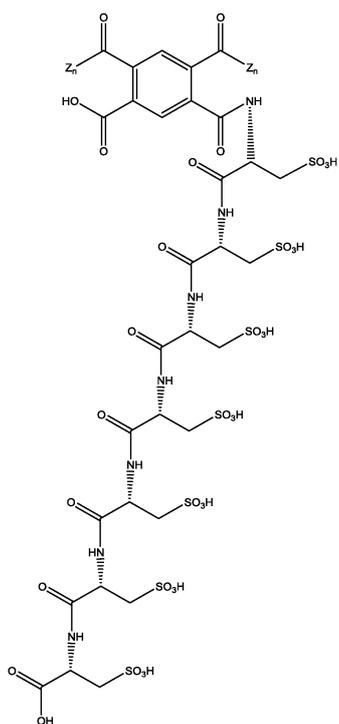
033921



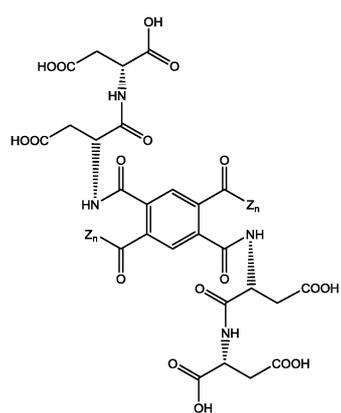
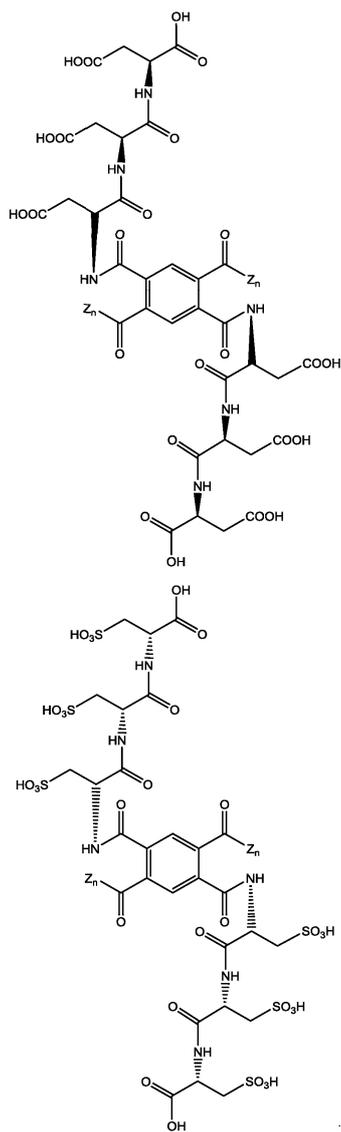
033921



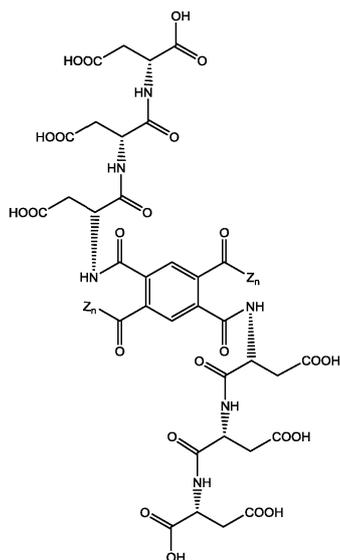
033921



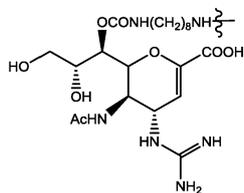
033921



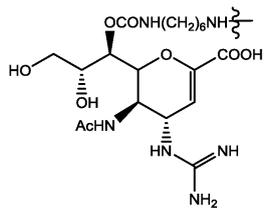
033921



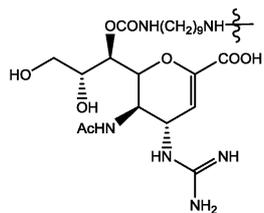
где  $Z_0$  представляет собой



$Z$  представляет собой

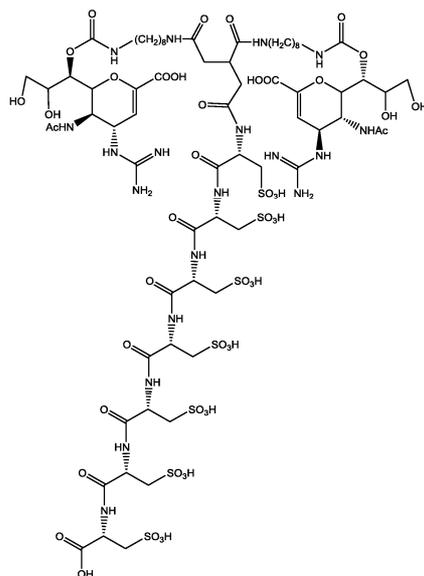


и  $Z_n$  представляет собой



или его фармацевтически приемлемые соль, сложный эфир или стереоизомер.

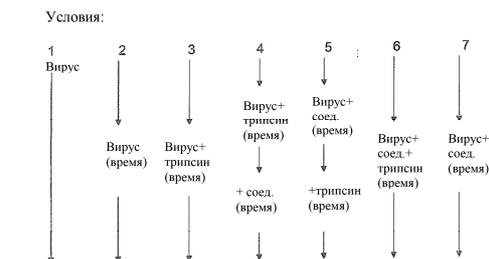
3. Соединение по п.1, которое представляет собой



или его фармацевтически приемлемые соль, сложный эфир или стереоизомер.

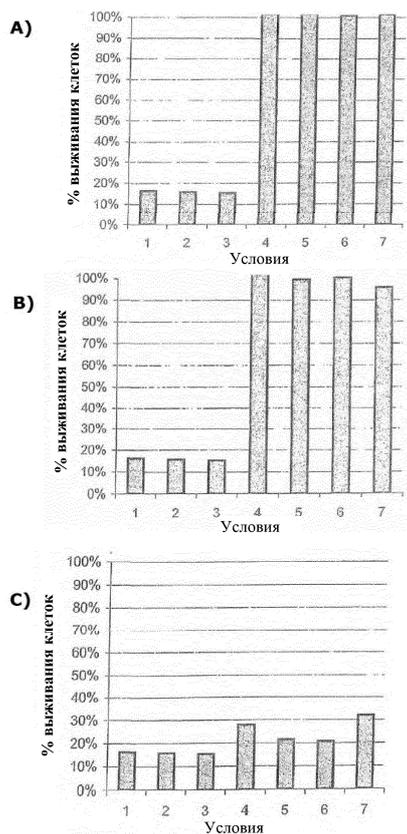
4. Применение соединения по любому из пп.1-3 в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения инфекции, вызываемой вирусом гриппа, выбранным из гриппа А, гриппа В, птичьего гриппа или устойчивого к лекарственным средствам штамма гриппа.

5. Применение по п.4, где инфекция представляет собой инфекцию дыхательных путей или системную инфекцию.

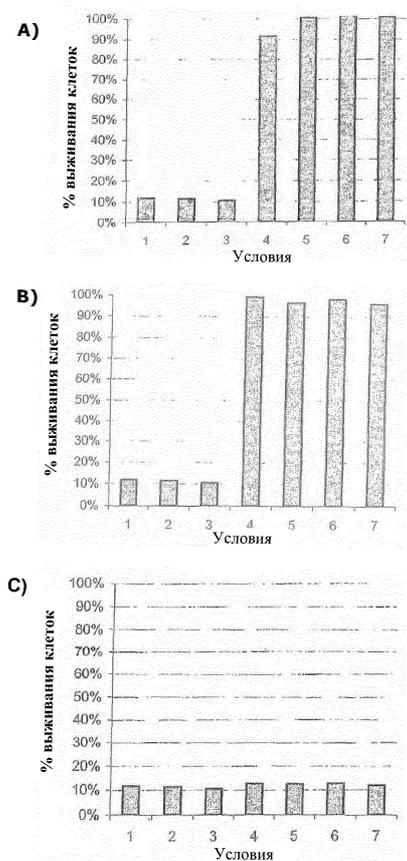


- Перенос 46 мкл на клетки, инкубирование при 37°C  
 - Удаление вируса, промывка 1x PBS  
 - Добавление среды для анализа, инкубирование при 37°C 72 ч

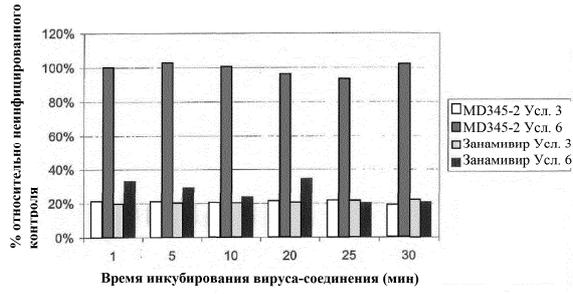
Фиг. 1



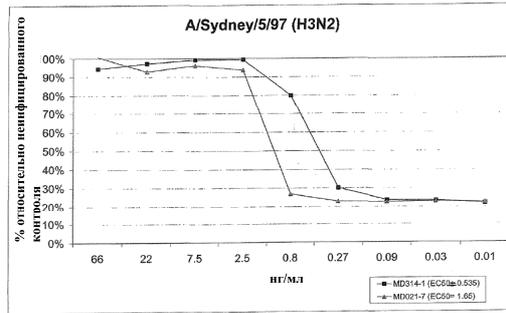
Фиг. 2



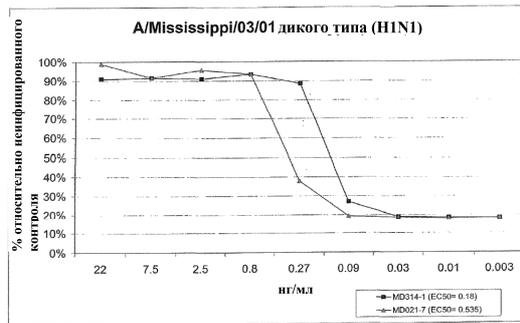
Фиг. 3



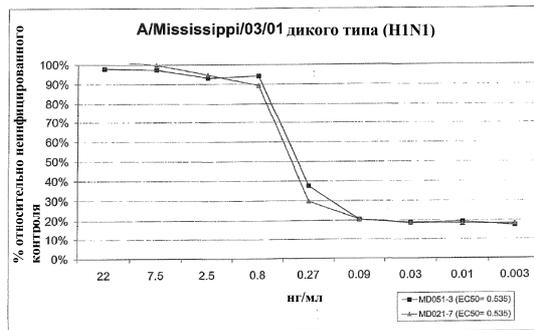
Фиг. 4



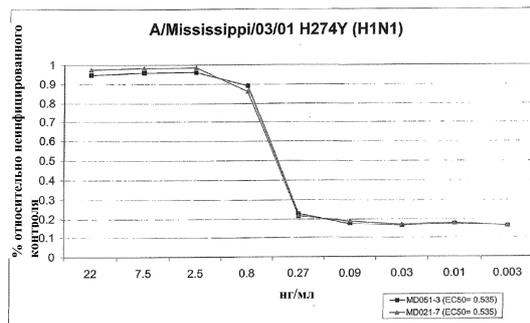
Фиг. 5



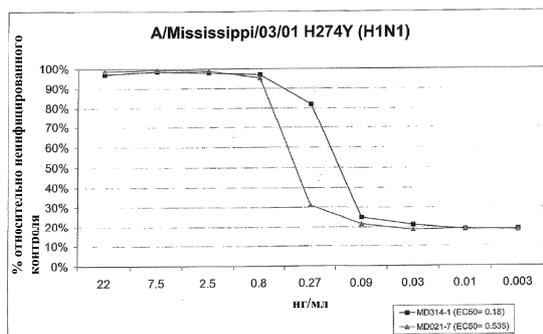
Фиг. 6



Фиг. 7



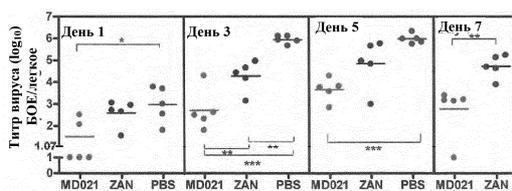
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

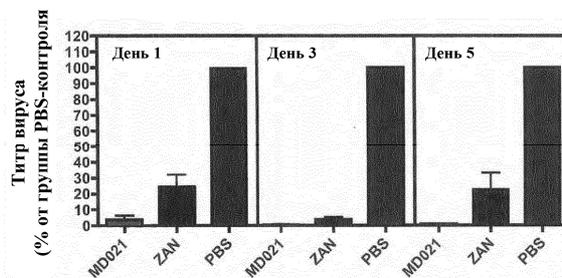


ZAN = занамивир

Фиг. 11

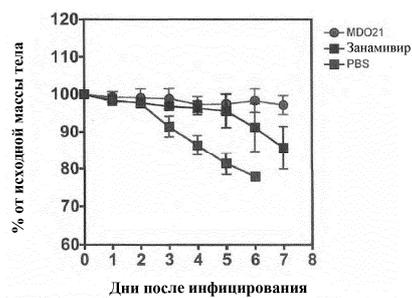


Фиг. 12

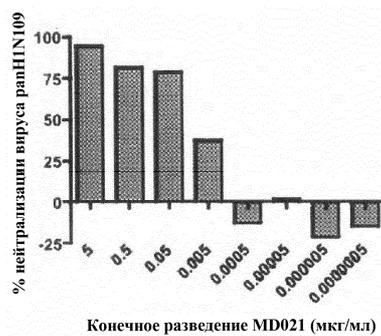


Фиг. 13

033921



Фиг. 14



Фиг. 15



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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