

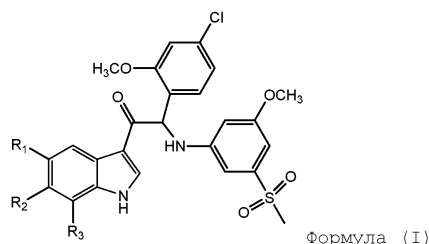
(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034978**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.04.14**(21) Номер заявки  
**201792429**(22) Дата подачи заявки  
**2016.05.04**(51) Int. Cl. **C07D 471/08** (2006.01)  
**C07D 487/08** (2006.01)  
**C07D 209/04** (2006.01)  
**C07D 513/08** (2006.01)(54) **ПРОИЗВОДНЫЕ МОНО- ИЛИ ДИЗАМЕЩЕННЫХ ИНДОЛОВ В КАЧЕСТВЕ  
ИНГИБИТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСОВ ДЕНГЕ**(31) **15166900.9; 16163342.5**(56) **WO-A1-2013045516**(32) **2015.05.08; 2016.03.31**(33) **EP**(43) **2018.02.28**(86) **PCT/EP2016/059975**(87) **WO 2016/180696 2016.11.17**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЯНССЕН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US); КАТОЛИКЕ  
УНИВЕРСИТЕЙТ ЛЕВЕН (BE)**(72) Изобретатель:  
**Кестелейн Барт Рудольф Романи  
(BE), Бонфанти Жан-Франсуа  
(FR), Йонкерс Тим Хьюго Мария,  
Рабуассон Пьер Жан-Мари Бернар,  
Бардио Дороте Алис Мари-Эв,  
Маршан Арно Дидье М (BE)**(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Изобретение относится к соединениям моно- или дизамещенных индолов формулы (I), способам предупреждения или лечения вирусной инфекции денге посредством применения указанных соединений, а также относится к указанным соединениям для применения в качестве лекарственного средства, более предпочтительно для применения в качестве лекарственного средства для лечения или предупреждения вирусной инфекции денге. Изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям или комбинированным препаратам на основе соединений, к композициям или препаратам для применения в качестве лекарственного средства, более предпочтительно для предупреждения или лечения вирусной инфекции денге. Изобретение также относится к способам получения таких соединений.

**B1****034978****034978****B1**

Изобретение относится к соединениям моно- или дизамещенных индолов, к применению указанных соединений в качестве лекарственного средства, более предпочтительно для применения в качестве лекарственного средства для лечения или предупреждения вирусной инфекции денге. Изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям или комбинированным препаратам на основе соединений, к композициям или препаратам для применения в качестве лекарственного средства, более предпочтительно для предупреждения или лечения вирусной инфекции денге.

#### **Предпосылки изобретения**

Флавивирусы, которые переносятся комарами или клещами, являются причиной опасных для жизни инфекций у человека, таких как энцефалит и геморрагическая лихорадка. Известны четыре различных, но тесно связанных серотипа флавивируса, вызывающего денге, так называемые DENV-1, -2, -3 и -4. Денге характерна для большинства тропических и субтропических регионов всего мира, преимущественно в городских и полугородских районах. Согласно Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2,5 миллиарда людей, из которых 1 миллиард детей, подвержены риску инфицирования DENV (ВОЗ, 2002). По оценкам, ежегодно во всем мире происходит от 50 до 100 миллионов случаев лихорадки денге [DF], полмиллиона случаев заболевания денге в тяжелой форме (т.е. геморрагической лихорадкой денге [DHF] и синдромом шока денге [DSS]) и более чем 20000 смертей. DHF стала основной причиной госпитализации и смерти среди детей в эндемических регионах. В целом денге является наиболее распространенной причиной заболевания, вызванного арбовирусами. Благодаря недавним крупным вспышкам в странах, расположенных в Латинской Америке, Юго-Восточной Азии и Западной части Тихого Океана (в том числе в Бразилии, Пуэрто-Рико, Венесуэле, Камбодже, Индонезии, Вьетнаме, Таиланде), количество случаев денге сильно возросло за последние годы. Число случаев денге не только увеличивается по мере распространения заболевания в новых районах, но и вспышки имеют склонность становиться более тяжелыми.

Для предупреждения и/или контроля заболевания, ассоциированного с вирусной инфекцией денге, в настоящее время единственными доступными способами являются стратегии, направленные на уничтожение комаров с целью контроля переносчика инфекции. Хотя и имеет место прогресс в разработке вакцин против денге, существует много трудностей. Они включают существование явления, называемого зависимым от антитела усилением (ADE). Выздоровление от инфекции, вызванной одним серотипом, обеспечивает пожизненный иммунитет против данного серотипа, однако придает лишь частичную и временную защиту против последующей инфекции, вызванной одним из трех остальных серотипов. При последующем инфицировании другим серотипом уже существующие гетерологичные антитела формируют комплексы с вновь инфицирующим серотипом вируса денге, однако не нейтрализуют патоген. Вместе с тем предполагают, что облегчается вход вируса в клетки, что приводит к неконтролируемой репликации вируса и повышению пика титров вирусов. Как при первичной, так и при вторичной инфекциях повышение титров вируса ассоциировано с заболеванием денге в более тяжелой форме. Одной из причин того, что дети более подвержены заболеванию денге в тяжелой форме, чем взрослые, может быть факт того, что материнские антитела могут легко передаваться младенцам при грудном вскармливании.

В местах с двумя или несколькими серотипами, которые циркулируют одновременно, также называемыми регионами с повышенной эндемичностью, риск заболевания денге в тяжелой форме значительно выше из-за повышенного риска перенести вторичную, более тяжелую инфекцию. Более того, в условиях повышенной эндемичности вероятность появления более вирулентных штаммов является повышенной, что в свою очередь повышает вероятность геморрагической лихорадки денге (DHF) или синдрома шока денге.

Комары, которые переносят возбудителей денге, в том числе *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus* (желтолихорадочный комар), движутся на север земного шара. Согласно Центрам по контролю и профилактике заболеваний (CDC) Соединенных Штатов (США) оба вида комаров в настоящее время являются повсеместными в южном Техасе. Распространение на север комаров, переносящих возбудителей денге, не ограничено распространением в США, но наблюдается также и в Европе.

Недавно (декабрь 2015 года), вакцина против вируса денге, полученная Sanofi Pasteur, была впервые одобрена в Мексике. Вакцина также была одобрена в Бразилии, Филиппинах и Сальвадоре. Регуляционное тестирование продолжается в других странах, где денге является приоритетом общественного здравоохранения. Тем не менее, вакцина оставляет широкие возможности для улучшения в связи с ограниченной эффективностью, особенно против DENV-1 и -2, низкой эффективностью у субъектов, ранее не обработанных флавивирусами, и длительной схемой приема препарата.

Несмотря на эти недостатки, вакцина представляет собой кардинальную перемену в эндемической ситуации, поскольку она предоставляет защиту большей части населения, но вероятно не младенцам, которые больше всех страдают от денге. Кроме того, схема приема препарата и очень ограниченная эффективность у субъектов, ранее не обработанных флавивирусами, делает ее непригодной и нецелесообразной/нерентабельной для путешественников из не эндемических областей в денге-эндемические области. Упомянутые выше недостатки вакцин против вируса денге являются причиной, почему существует потребность в противовирусном средстве от возбудителя денге для преинфекционной профилактики.

Более того, в настоящее время отсутствуют конкретные противовирусные лекарственные средства для лечения или предупреждения инфекции, вызванной вирусом лихорадки денге. Очевидно, что все еще существует большая неудовлетворенная потребность медицины в терапевтических средствах для предупреждения или лечения вирусных инфекций у животных, более конкретно у людей, а особенно для вирусных инфекций, вызванных флавивирусами, более конкретно вирусом денге. Чрезвычайно необходимыми являются соединения с хорошей противовирусной активностью, которые не имеют побочных эффектов или имеют низкие уровни побочных эффектов, характеризуются широким спектром активности против множества серотипов вируса денге, низкой токсичностью и/или подходящими фармакокинетическими или динамическими свойствами.

В настоящем изобретении представлены соединения, являющиеся производными моно- или диметил-индолов, которые проявляют высокую активность против всех четырех (4) серотипов вируса денге. Также соединения в соответствии с настоящим изобретением обладают хорошим фармакокинетическим профилем и, неожиданно, данные конкретные соединения проявляют улучшенную хиральную стабильность.

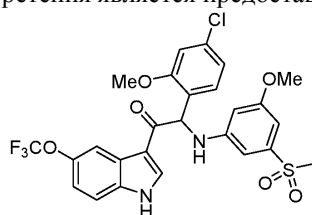
### Краткое описание изобретения

Изобретение основано на неожиданном обнаружении того, что по меньшей мере одна из вышеупомянутых проблем может быть решена с помощью представленных соединений по изобретению.

В изобретении представлено соединение, которое, как было показано, обладает высокой противовирусной активностью против всех четырех (4) серотипов, известных на сегодняшний день. Более того, в изобретении продемонстрировано, что это соединение эффективно ингибирует пролиферацию вируса денге (DENV). Следовательно, это соединение является сильнодействующим соединением, которое можно применять при лечении и/или предупреждении вирусных инфекций у животных, млекопитающих и людей, более конкретно для лечения и/или предупреждения инфекций, вызванных вирусами денге.

Более того, настоящее изобретение относится к применению такого соединения в качестве лекарственных препаратов и к его применению для изготовления лекарственных препаратов для лечения и/или предупреждения вирусных инфекций, в частности вызванных вирусами, принадлежащими к семейству вирусов денге, у животных или млекопитающих, в частности у людей. Настоящее изобретение также относится к способам получения такого соединения и к фармацевтическим композициям, включающим его в эффективном количестве.

Одним аспектом настоящего изобретения является предоставление соединения формулы (I)



его стереоизомерной формы, фармацевтически приемлемой соли. Частью настоящего изобретения также является фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его стереоизомерную форму или фармацевтически приемлемую соль вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

Фармацевтически приемлемые соли соединения формулы (I) включают его соли присоединения кислоты и основные соли. Подходящие соли присоединения кислоты образуются из кислот, которые образуют нетоксичные соли. Подходящие основные соли образуются из оснований, которые образуют нетоксичные соли.

Соединение по настоящему изобретению можно вводить в виде кристаллических или аморфных продуктов. Они могут быть получены, например, в виде твердой прессованной массы, порошков или пленок посредством таких способов, как осаждение, кристаллизация, сублимационная сушка, сушка распылением или сушка выпариванием. Их можно вводить отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими соединениями по настоящему изобретению, или в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами. Как правило, их будут вводить в виде состава в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями. Термин "наполнитель" используется в данном документе для описания любого ингредиента, отличного от соединения (соединений) по настоящему изобретению. Выбор наполнителя в большой степени зависит от таких факторов, как конкретный способ введения, влияние наполнителя на растворимость и стабильность, а также природа лекарственной формы.

Соединения по настоящему изобретению или любая их подгруппа могут быть составлены в различные фармацевтические формы для целей введения. В качестве подходящих композиций могут быть упомянуты все композиции, обычно применяемые для системно вводимых лекарственных средств. Для получения фармацевтических композиций по настоящему изобретению эффективное количество конкретного соединения, необязательно в форме соли присоединения, в качестве активного ингредиента объединяют в однородную смесь с фармацевтически приемлемым носителем, при этом носитель может прини-

мать широкое разнообразие форм в зависимости от формы препарата, требующегося для введения. Эти фармацевтические композиции желателно представлены в виде единичной лекарственной формы, подходящей, например, для перорального или ректального введения. Например, при получении композиций в пероральной лекарственной форме может использоваться любая из общепринятых фармацевтических сред, такая как, например, вода, гликоли, масла, спирты и т.п. в случае пероральных жидких препаратов, таких как суспензии, сиропы, настойки, эмульсии и растворы; или твердых носителей, таких как крахмалы, сахара, каолин, разбавители, смазывающие средства, связующие средства, разрыхлители и т.п. в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток. Благодаря своей простоте введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее предпочтительные пероральные единичные лекарственные формы, в случае которых очевидно используются твердые фармацевтические носители. Также включены препараты в твердой форме, которые можно преобразовать непосредственно перед применением в жидкие формы.

Особенно предпочтительным является составление вышеупомянутых фармацевтических композиций в виде единичной лекарственной формы для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, используемая в данном документе, относится к физически отдельным единицам, подходящим в качестве единичных доз, при этом каждая единица содержит предвременно установленное количество активного ингредиента, рассчитанное для получения необходимого терапевтического эффекта, в сочетании с требующимся фармацевтическим носителем. Примерами таких единичных лекарственных форм являются таблетки (в том числе делимые или покрытые оболочкой таблетки), капсулы, пилюли, пакетики с порошком, пластинки, суппозитории, растворы или суспензии для инъекций и т.п., а также их отдельные множества.

Специалисты в области лечения инфекционных заболеваний смогут определить эффективное количество, исходя из результатов тестов, представленных в данном документе ниже. В целом, предполагается, что эффективное суточное количество будет составлять от 0,01 до 50 мг/кг веса тела, более предпочтительно от 0,1 до 10 мг/кг веса тела. Может оказаться целесообразным вводить требуемую дозу в виде двух, трех, четырех или более частей дозы с соответствующими интервалами на протяжении дня. Указанные части дозы можно составлять в виде единичных лекарственных форм, например содержащих от 1 до 1000 мг и, в частности, от 5 до 200 мг активного ингредиента на единичную лекарственную форму.

Точная дозировка и частота введения зависят от конкретного применяемого соединения формулы (I), конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, подлежащего лечению, возраста, веса и общего физического состояния конкретного пациента, а также другого медикаментозного лечения, которое может получать индивидуум, что хорошо известно специалистам в данной области. Более того, очевидно, что эффективное количество может быть снижено или увеличено в зависимости от реакции подвергаемого лечению субъекта и/или в зависимости от оценки врача, назначающего соединение по настоящему изобретению. Таким образом, вышеупомянутые диапазоны эффективного количества являются лишь рекомендациями и не предназначены для ограничения в той или иной мере объема или применения настоящего изобретения.

Подразумевается, что настоящее раскрытие также включает в себя любые изотопы атомов, присутствующие в соединениях по настоящему изобретению. Например, изотопы водорода включают тритий и дейтерий, а изотопы углерода включают в себя C-13 и C-14.

Соединения, применяемые в настоящем изобретении, могут также существовать в стереохимически изомерной форме, охватывая все возможные соединения, составленные из одних и тех же атомов, связанных с помощью такой же последовательности связей, однако имеющие разные пространственные структуры, которые не являются взаимозаменяемыми. Если не упомянуто или не указано иное, то химическое обозначение соединений охватывает смесь всех возможных стереохимически изомерных форм, которыми могут обладать указанные соединения.

Указанная смесь может содержать все диастереомеры и/или энантиомеры с основной молекулярной структурой указанного соединения. Подразумевается, что все стереохимически изомерные формы соединений, применяемые по настоящему изобретению либо в чистом виде, либо в смеси друг с другом, предназначены для включения в объем настоящего изобретения, в том числе любые рацемические смеси или рацематы.

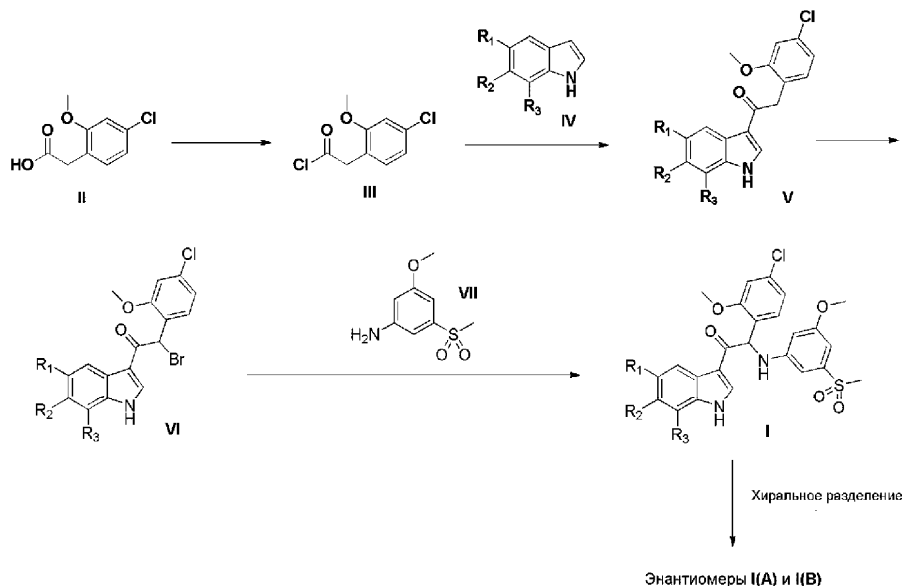
Чистые стереоизомерные формы упомянутых в настоящем документе соединений и промежуточных соединений определяются как изомеры, по сути не содержащие других энантиомерных или диастереомерных форм одной и той же основной молекулярной структуры указанных соединений или промежуточных продуктов. В частности, термин "стереоизомерно чистый" относится к соединениям или промежуточным соединениям, характеризующимся стереоизомерным избытком от по меньшей мере 80% (т.е. минимум 90% одного изомера и максимум 10% других возможных изомеров) до стереоизомерного избытка 100% (т.е. 100% одного изомера и отсутствие другого), более конкретно, к соединениям или промежуточным соединениям, характеризующимся стереоизомерным избытком от 90 до 100%, еще более конкретно, характеризующимся стереоизомерным избытком от 94 до 100%, и наиболее конкретно, характеризующимся стереоизомерным избытком от 97 до 100%. Термины "энантиомерно чистый" и "диастереомерно чистый" следует понимать подобным образом, но в таком случае в отношении соответственно энантиомерного избытка и диастереомерного избытка смеси, представляющей интерес.

Чистые стереоизомерные формы соединений и промежуточных соединений, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, можно получить при применении процедур, известных из уровня техники. Например, энантимеры можно разделять друг от друга с помощью селективной кристаллизации их диастереомерных солей с оптически активными кислотами или основаниями. Их примерами являются винная кислота, дибензоилвинная кислота, дитолуоилвинная кислота и камфорсульфоная кислота. В качестве альтернативы энантимеры можно разделять с помощью хроматографических методик с применением хиральных неподвижных фаз. Указанные чистые стереохимически изомерные формы можно также получить из соответствующих чистых стереохимически изомерных форм соответствующих исходных веществ при условии, что реакция протекает стереоспецифически. Предпочтительно, если требуется определенный стереоизомер, указанное соединение будет синтезировано с помощью стереоспецифических способов получения. В данных способах преимущественно применяют энантимерно чистые исходные вещества.

Общие подходы синтеза.

Синтез соединения формулы I можно осуществлять как изложено на схеме 1. 2-(4-Хлор-2-метоксифенил)уксусная кислота (II) может быть превращена в соответствующий 2-(4-хлор-2-метоксифенил)ацетилхлорид (III) с применением реактива для хлорирования, такого как, например, тионилхлорид. Реакцию Фриделя-Крафтса хлорангидрида III с замещенным индолом общей формулы IV можно осуществлять с применением реактива, представляющего собой кислоту Льюиса, например такого как  $\text{Et}_2\text{AlCl}$  или  $\text{TiCl}_4$ , в подходящем растворителе, например таком как  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  или 1,2-дихлорэтан, и при подходящих условиях реакции, которые, как правило (но не исключительно), включают охлаждение, с получением 3-ацилированного индола общей формулы V. Введение анилинового фрагмента в альфа-положение по отношению к карбонильному фрагменту соединения общей формулы V можно осуществлять с помощью последовательности реакций, которая включает, например, бромирование V реактивом, например, таким как трибромид фенилтриметиламмоний, в подходящем растворителе, например, таком как THF, с получением соединений общей формулы VI, и последующее приведение в реакцию соединений общей формулы VI 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилина (VII) в подходящем растворителе, например, таком как  $\text{CH}_3\text{CN}$ , и, как правило, с применением основания, например, такого как TEA или DIPEA, с получением соединений общей формулы I в виде рацемических смесей. Хиральное разделение соединений общей формулы I можно осуществлять с помощью, например, хиральной хроматографии для получения энантимеров A и B общей формулы I.

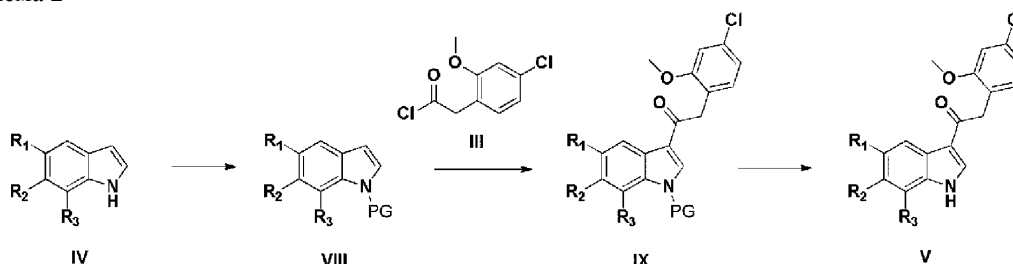
Схема 1



В некоторых случаях синтез промежуточного соединения общей формулы V по методу синтеза Фриделя-Крафтса зависит от наличия защитной группы (PG) при индол-N на стадии реакции Фриделя-Крафтса, как указано на схеме 2. С этой целью замещенный индол общей формулы IV может быть сначала превращен в N-защищенное промежуточное соединение общей формулы VIII, например, такое как N-тозилированное промежуточное соединение общей формулы VIII (PG=Ts) с применением реагента, например, такого как тозилхлорид, в присутствии основания, например, такого как гидрид натрия. Реакцию Фриделя-Крафтса замещенного индола общей формулы IV с хлорангидридом III можно осуществлять с применением реактива, представляющего собой кислоту Льюиса, например, такого как  $\text{Et}_2\text{AlCl}$  или  $\text{TiCl}_4$ , в подходящем растворителе, например, таком как  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  или 1,2-дихлорэтан, и при подходящих условиях реакции, которые, как правило (но не исключительно), включают охлаждение, с получением 3-ацилированного N-защищенного индола общей формулы IX. Удаление защитной группы PG индол-

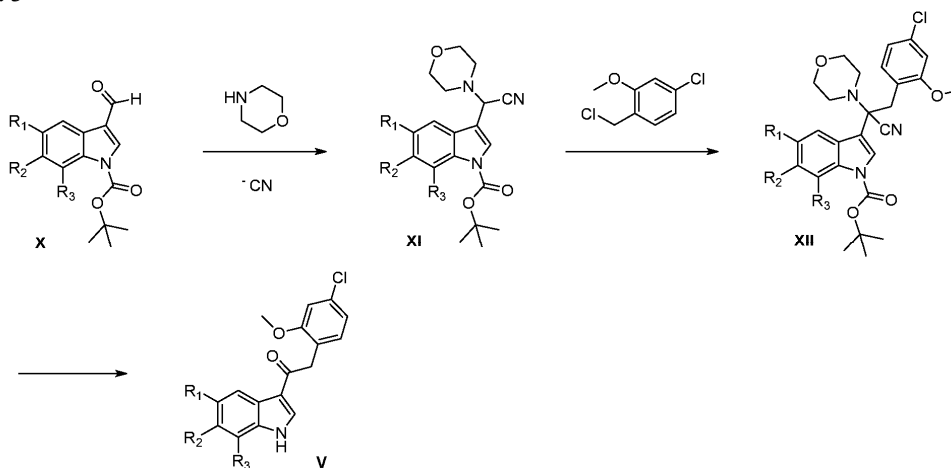
N промежуточного соединения общей формулы IX может быть осуществлено с помощью реактива, например, такого как LiOH (для PG=Ts), в смеси растворителей, например, такой как THF/вода, и при подходящей температуре реакции с получением 3-ацилированного индола общей формулы V.

Схема 2



В качестве альтернативного подхода промежуточное соединение общей формулы V также можно получить как изложено на схеме 3. N-Вос-защищенный замещенный индол-3-карбальдегид общей формулы X можно превратить в соответствующее промежуточное соединение по типу соединения из реакции Штрекера общей формулы XI посредством проведения реакции с морфолином в присутствии реагентов, таких как, например, цианид натрия и бисульфит натрия, и в подходящем растворителе, таком как, например, смесь воды и смешиваемого с водой органического растворителя, такого как, например, диоксан. Алкилирование соединения общей формулы XI 4-хлор-2-метоксибензилхлоридом можно осуществлять в присутствии основания, такого как, например, гексаметилдисилазан калия, и в подходящем растворителе, таком как, например, DMF, с получением соединения общей формулы XII. Воздействие на соединение общей формулы XII подходящего водного кислотного гидролитического условия, такого как, например, обработка водным раствором хлористоводородной кислоты при повышенной температуре, дает промежуточное соединение общей формулы V.

Схема 3



### Примеры

#### Способы LC/MS.

Измерения в ходе осуществления высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) проводили с помощью насоса для LC, детектора на диодной матрице (DAD) или УФ-детектора и колонки, как описано в соответствующих способах. При необходимости использовали дополнительные детекторы (см. приведенную ниже таблицу способов).

Поток из колонки направляли в масс-спектрометр (МС), который был оснащен источником ионизации при атмосферном давлении. В компетенции специалиста в данной области техники находится установка настраиваемых параметров (например, диапазона сканирования, времени выдержки и т.п.) с целью получения ионов, позволяющих определить номинальный моноизотопный молекулярный вес (MW) соединения. Сбор данных проводили с помощью соответствующего программного обеспечения.

Соединение описывали по его экспериментальному времени удерживания ( $R_t$ ) и ионам. Если не указано иное, то в таблице данных указанный молекулярный ион представляет собой  $[M+H]^+$  (протонированную молекулу) и/или  $[M-H]^-$  (депротонированную молекулу). В случае, если соединение не было непосредственно способно к ионизации, указывают тип аддукта (т.е.  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+HCOO]^-$  и т.д.). Для молекул со сложными изотопными распределениями (Br, Cl) описанное значение является таким значением, которое получено для наименьшей массы изотопа. Все результаты получали с экспериментальными погрешностями, которые обычно связаны с применяемым способом.

Далее в данном документе "SQD" означает одиночный квадрупольный детектор, "MSD" означает масс-селективный детектор, "RT" означает комнатную температуру, "БЕН" означает мостиковый гибрид этилсилиоксана/диоксида кремния, "DAD" означает детектор на диодной матрице, "HSS" означает диок-

сид кремния повышенной прочности.

Коды способов LCMS (поток выражен в мл/мин; температура колонки (Т) в °С; время анализа в минутах)

Код способа	Прибор	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Поток ----- Т колонки	Время анализа (мин.)
LC-A	Waters: Acquity® UPLC® - DAD-SQD	Waters: BEH C18 (1,7 мкм, 2,1×50 мм)	A: 10 мМ CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> в 95% H <sub>2</sub> O+5% CH <sub>3</sub> CN B: CH <sub>3</sub> CN	От 95% А до 5% А за 1,3 мин, удерживание в течение 0,7 мин	0,8 мл/мин ----- 55°C	2
LC-B	Waters: Acquity® UPLC® - DAD-SQD	Waters: HSS T3 (1,8 мкм, 2,1×100 мм)	A: 10 мМ CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> в 95% H <sub>2</sub> O+5% CH <sub>3</sub> CN B: CH <sub>3</sub> CN	От 100% А до 5% А за 2,10 мин., до 0% А за 0,90 мин., до 5% А за 0,5 мин.	0,7 мл/мин ----- 55°C	3,5
LC-C	Waters: Acquity® UPLC® - DAD- Quattro Micro™	Waters: BEH C18 (1,7 мкм, 2,1×100 мм)	A: 95% 7 мМ CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> / 5% CH <sub>3</sub> CN, B: CH <sub>3</sub> CN	84,2% А в течение 0,49 мин до 10,5% А через 2,18 мин, удерживание в течение 1,94 мин, снова до 84,2% А через 0,73 мин, удерживание в течение 0,73 мин.	0,343 мл/мин ----- 40°C	6,2
LC-D	Waters: Acquity® UPLC® - DAD- Acquity® TQ детектор	Waters: BEH C18 (1,7 мкм, 2,1×50 мм)	A: 10 мМ CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> (доведено до pH 10) B: CH <sub>3</sub> CN	От 50% А до 10% А за 3,5 мин., удерживание в течение 1,5 мин.	0,5 мл/мин ----- 40°C	5

#### Способы SFC-MS.

Измерения в ходе SFC проводили с применением аналитической системы хроматографии (SFC) со сверхкритической подвижной фазой, укомплектованной насосом для двухкомпонентных смесей для доставки диоксида углерода (CO<sub>2</sub>) и модификатора, автоматическим дозатором, термостатом для колонок, детектором на диодной матрице, оснащенный проточной кюветой для работы под высоким давлением, выдерживающим значения до 400 бар. При оснащении масс-спектрометром (MS) поток из колонки направляли в (MS). В компетенции специалиста в данной области техники находится установка настраиваемых параметров (например, диапазона сканирования, времени выдержки и т.п.) с целью получения ионов, позволяющих определить номинальный моноизотопный молекулярный вес (MW) соединения. Сбор данных проводили с помощью соответствующего программного обеспечения.

Аналитические способы SFC-MS (скорость потока выражена в мл/мин; температура колонки (Т) в °С; противодавление (BPR) в барах).

Код способа	Колонка	Подвижная фаза	Градиент	Поток ----- Т колонки	Время анализа ----- ВРР
SFC-A	WHELK-01 (S,S) 5 мкм 250×4,6 мм Regis	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH	50% В с удержанием 7 мин.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-B	Колонка Daicel Chiralpak® IC-H (5 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH	40% В с удержанием 7 мин.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-C	WHELK-01 (S,S) 5 мкм 250×4,6 мм Regis	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH	60% В с удержанием 9 мин.	3 ----- 35	9 ----- 100
SFC-D	Колонка Daicel Chiralpak® IA-H (5 мкм, 250×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH	50% В с удержанием 7 мин.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-E	Колонка Daicel Chiralpak® AS3 (3,0 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: EtOH +0,2% iPrNH <sub>2</sub> +3% H <sub>2</sub> O	10% - 50% В за 6 мин., удерживание 3,5 мин.	2,5 ----- 40	9,5 ----- 110
SFC-F	Колонка Daicel Chiralpak® AD-H (5,0 мкм, 150×4,6 мм)	A: CO <sub>2</sub> B: iPrOH +0,3% iPrNH <sub>2</sub>	30% В с удержанием 7 мин.	3 ----- 35	7 ----- 100

Точки плавления.

Значения представляют собой либо максимальные значения, либо диапазоны точек плавления, и их получают с экспериментальными погрешностями, которые обычно связаны с данным аналитическим способом.

DSC823e (обозначен как DSC).

Для ряда соединений точки плавления определяли с помощью DSC823e (Mettler-Toledo). Точки плавления измеряли при градиенте температуры 10°C/мин. Максимальная температура составляла 300°C.

Углы оптического вращения.

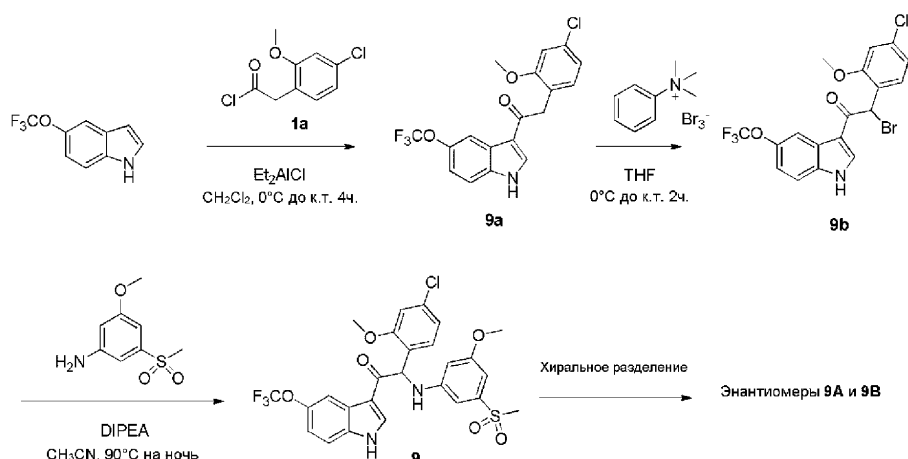
Углы оптического вращения измеряли на поляриметре Perkin-Elmer 341 с натриевой лампой и обозначали следующим образом:  $[\alpha]^T$  ( $\lambda$ , с г/100 мл, растворитель, T°C).

$$[\alpha]_{\lambda}^T = (100\alpha)/(l \times c),$$

где  $l$  означает длину пробега в дм, а  $c$  означает концентрацию в г/100 мл для образца при температуре  $T$  (°C) и длине волны  $\lambda$  (в нм). Если используемая длина волны света составляет 589 нм (D-линия натрия), то вместо этого можно использовать символ D. Всегда следует приводить знак направления вращения (+ или -). В случае применения данного уравнения концентрацию и растворитель всегда приводят в круглых скобках после угла вращения. Угол вращения указывают в градусах, а единицы концентрации не приводят (принято, что они представлены в г/100 мл).

Пример. Синтез 2-(4-хлор-2-метоксифенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона (соединение 9) и хиральное разделение на энантиомеры 9A и 9B





Синтез промежуточного соединения 9а.

Раствор 5-(трифторметокси)-1H-индола [CAS 262593-63-5] (3 г, 14,9 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 мл) охлаждали до 0°C в атмосфере N<sub>2</sub>. Добавляли по каплям 1M раствор диэтилалюминия хлорида в гексане (22,4 мл, 22,4 ммоль) и полученную в результате смесь выдерживали при 0°C в течение 15 мин. Добавляли по каплям раствор 2-(4-хлор-2-метоксифенил)ацетилхлорида 1а (4,57 г, 20,9 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 мл). Перемешивание продолжали при 0°C в течение 1 ч и реакционную смесь затем перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь выливали в перемешиваемый раствор льда/соли Рошеля. После того как лед растаял, смесь фильтровали через Dicalite® и осадок на фильтре несколько раз промывали THF. Фильтраты объединяли. Слои разделяли и органический слой промывали солевым раствором, высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Остаток растирали в порошок с CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 мл). Полученный осадок отфильтровывали и высушивали под вакуумом при 50°C с получением 2-(4-хлор-2-метоксифенил)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона 9а (4,39 г).

Синтез промежуточного соединения 9b.

Перемешиваемый раствор 2-(4-хлор-2-метоксифенил)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона 9а (4,39 г, 11,4 ммоль) в THF (200 мл) охлаждали до 0°C.

Добавляли по каплям раствор трибромида фенилтриметиламмония [CAS 4207-56-1] (4,73 г, 12,6 ммоль) в THF (100 мл). Полученную в результате суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Твердые вещества удаляли посредством фильтрации и промывали THF. Объединенные фильтраты выпаривали при пониженном давлении. Остаток смешивали с EtOAc (30 мл). Твердые вещества выделяли посредством фильтрации, промывали небольшим количеством EtOAc и высушивали под вакуумом при 50°C с получением 2-бром-2-(4-хлор-2-метоксифенил)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона 9b (5,0 г) в виде белого твердого вещества, который применяли без дополнительной очистки на следующей стадии.

Синтез соединения 9 и хиральное разделение энантимеров 9А и 9В.

Смесь 2-бром-2-(4-хлор-2-метоксифенил)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона 9b (2,5 г, 5,40 ммоль), 3-метокси-5-(метилсульфонил)анилина [CAS 62606-02-4] (1,49 г, 7,38 ммоль) и диизопропилэтиламина (931 мкл, 5,40 ммоль) в CH<sub>3</sub>CN (100 мл) перемешивали в течение ночи при 90°C. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 мл), промывали 1н. HCl (100 мл) и водой (100 мл), высушивали над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии (неподвижная фаза: силикагель Grace Reveleris® 120 г, подвижная фаза: EtOAc:EtOH (3:1)/гептан, градиент от 0/100 до 50/50). Требуемые фракции объединяли и выпаривали при пониженном давлении. Остаток осаждали из EtOAc (10 мл) при перемешивании. Твердые вещества выделяли посредством фильтрации и промывали небольшим количеством EtOAc с получением 2-(4-хлор-2-метоксифенил)-2-((3-метокси-5-(метилсульфонил)фенил)амино)-1-(5-(трифторметокси)-1H-индол-3-ил)этанона (соединение 9, 477 мг) в виде рацемической смеси. Фильтрат выпаривали при пониженном давлении и остаток поглощали EtOAc (5 мл). После перемешивания в течение ночи твердые вещества выделяли посредством фильтрации и промывали EtOAc с получением второго выхода соединения 9 (216 мг).

Хиральное разделение энантимеров соединения 9 (663 мг) осуществляли посредством хирального разделения с использованием нормальной фазы (неподвижная фаза: AS 20 мкм, подвижная фаза: 100% метанол). Фракции, содержащие продукт, объединяли и выпаривали с получением энантиомера 9А в качестве первого элюированного продукта и энантиомера 9В в качестве второго элюированного продукта. Энантиомер 9А перемешивали в H<sub>2</sub>O (2 мл) и MeOH (3 мл) при 40°C. Твердые вещества отфильтровывали, промывали H<sub>2</sub>O/MeOH 1/1 (3×) и высушивали под вакуумом при 45°C с получением энантиомера 9А (151 мг). Энантиомер 9В дополнительно очищали посредством флеш-хроматографии на силикагеле (не-

подвижная фаза: силикагель Grace Reveleris® 12 г, подвижная фаза: гептан/EtOAc/EtOH от 100/0/0 до 40/45/15). Требуемые фракции объединяли, выпаривали при пониженном давлении и выпаривали совместно с EtOAc. Остаток перемешивали в MeOH (5 мл) и осаждали посредством медленного добавления H<sub>2</sub>O (4 мл). Твердые вещества отфильтровывали, промывали H<sub>2</sub>O/MeOH 1/1 (3×) и высушивали под вакуумом при 50°C с получением энантиомера 9В (132 мг).

Соединение 9.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 3,09 (s, 3H) 3,73 (s, 3H) 3,99 (s, 3H) 6,26 (d, J=7,9 Гц, 1H) 6,57-6,62 (m, 2H) 6,91 (t, J=1,9 Гц, 1H) 6,98 (dd, J=8,4, 2,0 Гц, 1H) 7,07 (d, J=7,9 Гц, 1H) 7,13 (d, J=2,0 Гц, 1H) 7,22 (dd, J=8,6, 2,2 Гц, 1H) 7,36 (d, J=8,4 Гц, 1H) 7,59 (d, J=8,8 Гц, 1H) 8,06 (d, J=0,9 Гц, 1H) 8,55 (s, 1H) 12,28 (br s, 1H).

LC/MS (способ LC-A): R<sub>t</sub> 1,31 мин, MH<sup>+</sup> 583.

Энантиомер 9А. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 3,09 (s, 3H) 3,73 (s, 3H) 3,99 (s, 3H) 6,26 (d, J=7,9 Гц, 1H) 6,55-6,62 (m, 2H) 6,91 (t, J=1,5 Гц, 1H) 6,98 (dd, J=8,4, 2,0 Гц, 1H) 7,07 (d, J=7,9 Гц, 1H) 7,13 (d, J=2,0 Гц, 1H) 7,21 (dd, J=8,8, 1,8 Гц, 1H) 7,36 (d, J=8,4 Гц, 1H) 7,59 (d, J=8,8 Гц, 1H) 8,07 (d, J=0,9 Гц, 1H) 8,55 (s, 1H) 12,29 (br s, 1H) LC/MS (способ LC-A): R<sub>t</sub> 1,20 мин, MH<sup>+</sup> 583.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +130,3° (с 0,555, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-E): R<sub>t</sub> 3,10 мин, MH<sup>+</sup> 583, хиральная чистота 100%.

Энантиомер 9В.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 3,09 (s, 3H) 3,73 (s, 3H) 3,99 (s, 3H) 6,26 (d, J=7,9 Гц, 1H) 6,56-6,62 (m, 2H) 6,92 (t, J=2,0 Гц, 1H) 6,98 (dd, J=8,1, 2,0 Гц, 1H) 7,07 (d, J=7,9 Гц, 1H) 7,13 (d, J=2,0 Гц, 1H) 7,22 (dd, J=8,8, 1,8 Гц, 1H) 7,36 (d, J=8,4 Гц, 1H) 7,59 (d, J=8,8 Гц, 1H) 8,07 (d, J=0,9 Гц, 1H) 8,55 (s, 1H) 12,30 (br s, 1H).

LC/MS (способ LC-A): R<sub>t</sub> 1,20 мин, MH<sup>+</sup> 583.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -133,2° (с 0,5, DMF).

Хиральная SFC (способ SFC-E): R<sub>t</sub> 3,50 мин, MH<sup>+</sup> 583, хиральная чистота 100%.

#### Противовирусная активность соединений по изобретению

Анализ противовирусной активности в отношении DENV-2.

Тестировали противовирусную активность соединения по настоящему изобретению против штамма 16681 DENV-2, который метили усиленным зеленым флуоресцентным белком (eGFP, табл. 1). Среда для культивирования состояла из минимальной поддерживающей среды, дополненной 2% термически инактивированной фетальной телячьей сыворотки, 0,04% гентамицина (50 мг/мл) и 2 мМ L-глутамина. Клетки Vero, полученные из ECACC, суспендировали в среде для культивирования и добавляли по 25 мкл в 384-луночные планшеты (2500 клеток/луночка), которые уже содержали противовирусные соединения. Как правило, эти планшеты содержали 5-кратное серийное разбавление, состоящее из 9 стадий разбавления тестируемого соединения при 200-кратной конечной концентрации в 100% DMSO (200 нл). Кроме того, концентрацию каждого соединения тестировали в четырех повторностях (диапазон конечной концентрации: 25 мкМ - 0,000064 мкМ или 2,5 мкМ - 0,000064 мкМ для наиболее активных соединений). В результате каждый планшет содержал лунки, которые принимали в качестве контролей с вирусом (содержащих клетки и вирус без соединения), контролей с клетками (содержащих клетки без вируса и соединения) и контролей со средой (содержащих среду без клеток, вируса и соединений). В лунки, которые принимали в качестве контролей со средой, добавляли 25 мкл среды для культивирования вместо клеток Vero. После того как клетки добавляли в планшеты, планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, что позволило клеткам равномерно распространиться в лунках. Далее планшеты инкубировали в полностью увлажненном инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) до следующего дня. Затем штамм 16681 DENV-2, меченый eGFP, добавляли при множественности инфекции (MOI), равной 0,5. Следовательно, 15 мкл вирусной суспензии добавляли во все лунки, содержащие тестируемое соединение, и во все лунки, которые принимали в качестве контроля с вирусом. Одновременно добавляли 15 мкл среды для культивирования к контролю со средой и контролям с клетками. Далее планшеты инкубировали в течение 3 дней в полностью увлажненном инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). В день проведения считывания измеряли флуоресценцию eGFP с применением автоматизированного флуоресцентного микроскопа при 488 нм (голубой лазер). Применяя служебную систему LIMS, рассчитывали кривые зависимости ингибирования от дозы для каждого соединения и определяли полумаксимальную эффективную концентрацию (EC<sub>50</sub>). Следовательно, рассчитывали процент ингибирования (I) для каждой тестируемой концентрации с применением следующей формулы:

$$I=100 \times (S_T - S_{CC}) / (S_{VC} - S_{CC}),$$

S<sub>T</sub>, S<sub>CC</sub> и S<sub>VC</sub> представляют собой уровень сигнала eGFP в лунках с тестируемыми соединениями, контролями с клетками и контролями с вирусом соответственно. EC<sub>50</sub> представляет собой концентрацию соединения, при которой репликация вируса ингибируется на 50%, что измерено с помощью 50% уменьшения интенсивности флуоресценции eGFP по сравнению с контролем с вирусом. Рассчитывали EC<sub>50</sub> с применением линейной интерполяции.

Одновременно оценивали токсичность соединения на тех же планшетах. После считывания сигнала

eGFP во все лунки 384-луночных планшетов добавляли 40 мкл ATPlite, красителя, показывающего жизнеспособность клеток. ATP присутствует во всех метаболически активных клетках, и когда клетки подвергаются некрозу или апоптозу, его уровень резко снижается. Система анализа ATPlite основана на выработке света, вызванного реакцией ATP с добавленной люциферазой и D-люциферинном. Планшеты инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем планшеты измеряли на ViewLux. Также определяли полумаксимальную цитотоксическую концентрацию (CC<sub>50</sub>), определенную как концентрация, необходимая для уменьшения люминесцентного сигнала на 50% по сравнению с лунками контроля с клетками. В результате определяли индекс избирательности (SI) для соединений, который рассчитывали, как указано ниже

$$SI = CC_{50} / EC_{50}$$

Таблица 1. EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> и SI для соединения по настоящему изобретению в анализе противовирусной активности в отношении DENV-2

№ соединения	EC <sub>50</sub> (мкМ)	N	CC <sub>50</sub> (мкМ)	N	SI	N
9	0,000074	6	3,1	8	>39100	6
9A	0,000067	9	2,9	9	>37500	9
9B	0,0038	5	6,2	6	1480	5

N - количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения.

Анализ с количественной ПЦР с обратной транскриптазой (RT-qPCR) в отношении квадвалентной вакцины. Протокол А.

Тестировали противовирусную активность соединения по настоящему изобретению против штамма TC974#666 DENV-1 (NCPV; табл. 6), штамма 16681 DENV-2 (табл. 7), штамма H87 DENV-3 (NCPV; табл. 8) и штаммов H241 DENV-4 (NCPV; табл. 9A) и SG/06K2270DK1/2005 DENV-4 (EDEN; табл. 9B) в анализе с RT-qPCR. Следовательно, клетки Vero инфицировали либо штаммом DENV-1, либо -2, или -3, или -4, в присутствии или при отсутствии тестируемых соединений. На 3-й день после инфицирования клетки лизировали и клеточные лизаты применяли для получения кДНК как для вируса-мишени (3'UTR DENV; табл. 2), так и эталонного гена клетки (β-актин, табл. 2). Впоследствии осуществляли дуплексную ПЦР в режиме реального времени на приборе Lightcycler480. Генерируемый уровень Cp является обратно пропорциональным по отношению к количеству экспрессируемой РНК этих мишеней. Ингибирование репликации DENV с помощью тестируемого соединения привело к сдвигу Cp для гена 3'UTR. С другой стороны, если тестируемое соединение является токсичным по отношению к клеткам, то будет наблюдаться похожий эффект и в отношении экспрессии β-актина. Для вычисления EC<sub>50</sub> применяют сравнительный способ ΔΔCp, который основан на относительной генной экспрессии гена-мишени (3'UTR), нормализованного конститутивным геном клетки (β-актином).

Таблица 2. Праймеры и зонды, применяемые для количественной RT-PCR в реальном времени

Праймер/зонд	Мишень	Последовательность <sup>a, b</sup>
F3utr258	DENV 3'-UTR	5'-CGGTTAGAGGAGACCCCTC-3'
R3utr425	DENV 3'-UTR	5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTC-3'
P3utr343	DENV 3'-UTR	<b>FAM</b> -5'-AAGGACTAG- <b>ZEN</b> -AGGTTAGAGGAGACCCCCC-3'- <b>IABkFQ</b>
Factin743	β-актин	5'-GGCCAGGTCATCACCAT-3'
Ractin876	β-актин	5'-ATGTCCACGTCACACTTCATG-3'
Pactin773	β-актин	<b>HEX</b> -5'-TTCCGCTGC- <b>ZEN</b> -CCTGAGGCTCTC-3'- <b>IABkFQ</b>

<sup>a</sup> Элементы репортерных красителей (FAM, HEX) и гасителей люминесценции (ZEN и IABkFQ) выделены жирным и курсивом.

<sup>b</sup> Выбирали нуклеотидную последовательность праймеров и зондов из консервативной области в 3'UTR области генома вируса денге на основании выравнивания 300 нуклеотидных последовательностей четырех серотипов вируса денге, депонированных в Genbank (Gong et al., 2013, Methods Mol. Biol., Chapter 16).

Среда для культивирования состояла из минимальной поддерживающей среды, дополненной 2% термически инактивированной фетальной телячьей сыворотки, 0,04% гентамицина (50 мг/мл) и 2 мМ L-глутамин. Клетки Vero, полученные из ECACC, суспендировали в среде для культивирования и добавляли по 75 мкл/лунка в 96-луночные планшеты (10000 клеток/лунка), которые уже содержали противовирусные соединения. Как правило, эти планшеты содержали 5-кратное серийное разбавление, состоя-

шее из 9 стадий разбавления тестируемого соединения в 200-кратной конечной концентрации в 100% DMSO (500 нл; диапазон конечной концентрации: 25 - 0,000064 мкМ или 2,5 - 0,000064 мкМ для наиболее активных соединений). Кроме того, каждый планшет содержал лунки, которые принимали в качестве контролей с вирусом (содержащих клетки и вирус без соединения) и контролей с клетками (содержащих клетки без вируса и соединения). После добавления клеток в планшеты планшеты инкубировали в полностью увлажненном инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) до следующего дня. Серотипы 1, 2, 3 и 4 вируса денге разводили с целью получения Ср ~22-24 в анализе. Следовательно, 25 мкл вирусной суспензии добавляли во все лунки, содержащие тестируемое соединение, и во все лунки, которые принимали в качестве контролей с вирусом. Одновременно к клеточным контролям добавляли 25 мкл среды для культивирования. Далее планшеты инкубировали в течение 3 дней в полностью увлажненном инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Через 3 дня удаляли надосадочную жидкость из лунок и дважды промывали клетки ледяным PBS (~100 мкл). Сгустки клеток в 96-луночных планшетах хранили при -80°C в течение по меньшей мере 1 дня. Далее экстрагировали РНК с применением набора для лизирования Cells-to-CT™ согласно инструкциям изготовителя (Life Technologies). Клеточные лизаты можно хранить при -80°C или сразу же применять на стадии с обратной транскрипцией.

При подготовке к стадии с обратной транскрипцией получали смесь А (табл. 3А) и распределяли по 7,57 мкл/лунка в 96-луночном планшете. После добавления 5 мкл клеточных лизатов осуществляли пятиминутную стадию денатурации при 75°C (табл. 3В). Позже добавляли 7,43 мкл смеси В (табл. 3С) и инициировали стадию обратной транскрипции (табл. 3D) для образования кДНК.

В результате получали смесь С (табл. 4А) - смесь для RT-qPCR - и распределяли по 22,02 мкл/лунка в 96-луночных планшетах для qPCR LightCycler, куда добавляли 3 мкл кДНК и осуществляли qPCR на LightCycler 480 согласно условиям в табл. 4В.

Кривые зависимости от дозы для каждого соединения рассчитывали с применением программного обеспечения LightCycler и служебной системы LIMS и определяли полумаксимальную эффективную концентрацию (EC<sub>50</sub>) и полумаксимальную цитотоксическую концентрацию (CC<sub>50</sub>).

Таблица 3. Синтез кДНК с применением смеси А, денатурации, смеси В и обратной транскрипции

А) Смесь А

Планшеты	8			
Образцы	828			Об. реакционной смеси (мкл)
Элемент смеси	Концентрация			Объем (мкл)
	Единица измерения	Исходная	Конечная	
Milli-Q H <sub>2</sub> O				7,27
R3utr425	мкМ	20	0,27	0,15
Ractin876	мкМ	20	0,27	0,15
Объем смеси/лунка (мкл)				7,57
Клеточные лизаты				5,00

В) Стадия денатурации

Стадия	Температура	Время
Денатурация	75°C	5'
Удержание	4°C	удержание

С) Смесь В

Образцы	864				
Элемент смеси	Концентрация			Объем (мкл)	
	Единица измерения	Исходная	Конечная	1 образец	х образцов
Буфер 2 Expand HIFI	X	10,00	1,00	2,00	1728,0
MgCl <sub>2</sub>	мм	25,00	3,50	2,80	2419,2
dNTP	мм	10,00	1,00	2,00	1728,0
Ингибитор РНК-азы	У/мкл	40,00	1,00	0,50	432,0
Expand RT	У/мкл	50,00	0,33	0,13	112,3
Общий объем смеси (мкл)				7,43	

## D) Протокол синтеза кДНК

Стадия	Температура	Время
Обратная транскрипция	42°C	30'
Денатурация	99°C	5'
Удержание	4°C	удержание

Таблица 4. Смесь для qPCR и протокол А Смесь С

Образцы	833			Об. реакционной смеси (мкл)	25
Элемент смеси	Концентрация			Объем (мкл)	
	Единица измерения	Исходная	Конечная	1 образец	х образцов
H <sub>2</sub> O для PCR от Roche				7,74	6447,42
Смесь Roche 2xMM	X	2	1	12,50	10412,50
F3utr258	мкМ	20	0,3	0,38	316,54
R3utr425	мкМ	20	0,3	0,38	316,54
P3utr343	мкМ	20	0,1	0,13	108,29
Factin743	мкМ	20	0,3	0,38	316,54
Ractin876	мкМ	20	0,3	0,38	316,54
Pactin773	мкМ	20	0,1	0,13	108,29
Объем смеси/пробирку (мкл)				22,02	
кДНК				3,00	

## B) Протокол qPCR3

Стадия	Температура	Время	Скорость изменения	
Предварительная инкуб./денат.	95°C	10 мин	4,4	
Денатурация	95°C	10 с	4,4	40 циклов
Отжиг	58°C	1 мин	2,2	
Элонгация	72°C	1 с	4,4	
Охлаждение	40°C	10 с	1,5	

Анализ с количественной PCR с обратной транскриптазой (RT-qPCR) в отношении квадвалентной вакцины. Протокол В.

Тестировали противовирусную активность соединения по настоящему изобретению против штамма Djibouti DENV-1 (D1/H/IMTSSA/98/606; табл. 6), штамма NGC DENV-2 (табл. 7), штамма H87 DENV-3 (табл. 8) и штамма SG/06K2270DK1/2005 DENV-4 (табл. 9B) в анализе с RT-qPCR. Клетки Vero-B или Vero-M ( $5 \times 10^4$ ) высевали в 96-луночные планшеты. Спустя один день среду для культивирования клеток заменяли 100 мкл среды для количественного определения, содержащей 2х, 3х или 5х серийное разведение соединения (диапазон концентрации: 50 - 0,00038 мкг/мл, 50 - 0,0076 мкг/мл и 50 - 0,00013 мкг/мл соответственно) и 100 мкл инокулята вируса денге (DENV). После 2-часового инкубационного периода 3 раза промывали клеточный монослой средой для количественного определения с удалением остаточного не адсорбированного вируса и дополнительно инкубировали в течение либо 4 дней (DENV-2 NGC) или 7 дней (штамм Djibouti D1/H/IMTSSA/98/606 DENV-1, прототип, представляющий собой штамм H87 DENV-3, штамм H241 DENV-4 и штамм EDEN DENV-4) в присутствии ингибитора. Собирали надосадочную жидкость и определяли РНК-нагрузку с помощью количественной RT-PCR в режиме реального времени. 50% эффективную концентрацию ( $EC_{50}$ ), которую определяют как концентрацию соединения, которая необходима для ингибирования репликации вирусной РНК на 50%, определяли с применением логарифмической интерполяции.

РНК выделяли из 100 мкл (или в некоторых случаях 150 мкл) надосадочной жидкости с помощью набора NucleoSpin 96 Virus (Filter Service, Дюрен, Германия) как описано производителем. Последовательности праймеров TaqMan (прямой праймер для DENV, обратный праймер для DENV; табл. 5) и зондов TaqMan (зонд для DENV, табл. 5) выбирали из неструктурного гена 3 (NS3) или NS5 соответствующих флавивирусов с применением программного обеспечения Primer Express (версия 2.0; Applied Biosystems, Ленник, Бельгия). Зонд TaqMan флуоресцентно метили с помощью 6-карбоксихлороэсцина (FAM) на 5'-конце в качестве репортерного красителя и связывающегося с малой бороздкой ДНК вещества (MGB) на 3'-конце в качестве гасителя люминесценции (табл. 5). Проводили одноэтапную количественную RT-PCR в общем объеме 25 мкл с содержанием 13,9375 мкл  $H_2O$ , 6,25 мкл мастер-микса (Eurogentec, Серен, Бельгия), 0,375 мкл прямого праймера, 0,375 мкл обратного праймера, 1 мкл зонда, 0,0625 мкл обратной транскриптазы (Eurogentec) и 3 мкл образца. Проводили RT-PCR с применением ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Бранчберг, Нью-Джерси, США) и с применением следующих условий: 30 мин при 48°C и 10 мин при 95°C с последующими 40 циклами 15 с при 95°C и 1 мин при 60°C. Данные анализировали с применением программного обеспечения ABI PRISM 7500 SDS (версия 1.3.1; Applied Biosystems). Для полного количественного анализа составляли стандартные кривые с применением 10-кратного разведения полученной матрицы с известными концентрациями.

Таблица 5. Праймеры и зонды, применяемые для количественной RT-PCR в реальном времени

Праймер/зонд	Последовательность (5'–3') <sup>a</sup>	Источник <sup>b</sup>	Мишень
Прямой праймер для DENV	TCGGAGCCGGAGTTTACAAA (SEQ ID N.1)	DENV 2 NGC	NS3
Обратный праймер для DENV	TCTTAACGTCCGCCCATGAT (SEQ ID N.2)		
Зонд DENV	<b>FAM</b> -ATTCCACACAATGTGGCAT- <b>MGB</b> (SEQ ID N.3)		
DenS	GGATAGACCAGAGATCCTGCTGT (SEQ ID N.4)	DENV-1, -3, -4	NS5
DenAS1-3	CATTCCATTTTCTGGCGTTC (SEQ ID N.5)	DENV-1, -3	
DenAS4	CAATCCATCTTGGCGGCTC (SEQ ID N.6)	DENV-4	
Зонд DEN_1-3	<b>FAM</b> -CAGCATCATTCAGGCACAG- <b>MGB</b> (SEQ ID N.7)	DENV-1, -3	
Зонд DEN_4	<b>FAM</b> -CAACATCAATCCAGGCACAG- <b>MGB</b> (SEQ ID N.8)	DENV-4	

<sup>a</sup> Элементы репортерного красителя (FAM) и гасителя люминесценции (MGB/TAMRA) выделены жирным и курсивом.

<sup>b</sup> Нуклеотидную последовательность и положение праймеров и зондов в геноме выводили из нуклеотидной последовательности NGC DENV 2 (номер доступа в GenBank M29095; Irie et al., 1989), штамма Djibouti D1/Н/IMTSSA/98/606 серотипа 1 вируса денге (номер доступа в Genbank AF298808), прототипа, представляющего собой штамм H87 серотипа 3 вируса денге (с93130), штамма H241 серотипа 4 вируса денге (нет доступных последовательностей), штамма EDEN серотипа 4 вируса денге (нет доступных последовательностей).

#### Цитотоксический анализ.

Оценивали потенциальные цитотоксические эффекты соединений в неинфицированных покоящихся клетках Vero-B или Vero-M. Клетки высевали при  $5 \times 10^4$  клеток/лунка в 96-луночный планшет при двух-, трех- или пятикратных серийных разведениях (в диапазоне 50 - 0,0038 мкг/мл, 50 - 0,0076 мкг/мл и 50 - 0,0013 мкг/мл соответственно) соединения и инкубировали в течение от 4 до 7 дней. Отбирали среду для культивирования и 100 мкл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбокситоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолия/феназинметосульфата (MTS/PMS; Promega, Лейден, Нидерланды) в PBS добавляли в каждую лунку. После 2-часового инкубационного периода при 37°C определяли плотность клеток при 498 нм. Рассчитывали цитотоксическую активность с применением следующей формулы:

$$\% \text{ жизнеспособных клеток} = 100 \times (\text{OD}_{\text{соединение}} / \text{OD}_{\text{CC}}),$$

где  $\text{OD}_{\text{соединение}}$  и  $\text{OD}_{\text{CC}}$  соответствуют оптической плотности при 498 нм неинфицированных культур клеток, обработанных с помощью соединения, и неинфицированных, необработанных культур клеток соответственно. 50% цитотоксическую концентрацию (т.е. концентрацию, которая уменьшает общее количество клеток на 50%;  $\text{CC}_{50}$ ) рассчитывали с применением линейной интерполяции.

Таблица 6.  $\text{EC}_{50}$ ,  $\text{CC}_{50}$  и SI для соединений против серотипа 1 в анализах RT-qPCR

№ соединения	Протокол А						Протокол В						
	RT-qPCR TC974#666 серотипа 1						RT-qPCR Djibouti серотипа 1						
	$\text{EC}_{50}$ (мкМ)	N	$\text{CC}_{50}$ (мкМ)	N	SI	N	$\text{EC}_{50}$ (мкМ)	N	$\text{CC}_{50}$ (мкМ)	N	SI	N	
9A	0,00011	4	1,7	5	13300	9	.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	3

N - количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения; Н. О. - не определено.

Таблица 7.  $\text{EC}_{50}$ ,  $\text{CC}_{50}$  и SI для соединений против серотипа 2 в анализах RT-qPCR

№ соединения	Протокол А						Протокол В					
	RT-qPCR 16681 серотипа 2						RT-qPCR NGC-Tongalike серотипа 2					
	$\text{EC}_{50}$ (мкМ)	N	$\text{CC}_{50}$ (мкМ)	N	SI	N	$\text{EC}_{50}$ (мкМ)	N	$\text{CC}_{50}$ (мкМ)	N	SI	N
9A	0,000057	3	2,2	4	31700	3	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.

N - количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения; Н. О. - не определено.

лено.

Таблица 8. EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> и SI для соединений против серотипа 3 в анализах RT-qPCR

№ соединение	Протокол А						Протокол В					
	RT-qPCR H87 серотипа 3						RT-qPCR H87 серотипа 3					
	EC <sub>50</sub> (мкМ)	N	CC <sub>50</sub> (мкМ)	N	SI	N	EC <sub>50</sub> (мкМ)	N	CC <sub>50</sub> (мкМ)	N	SI	N
9A	0,0021	3	1,6	1	474	1	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.	Н. О.

N - количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения. Н.О. - не определено.

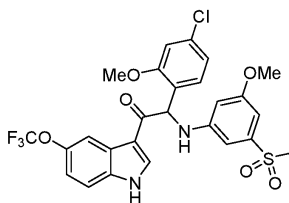
Таблица 9. EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> и SI для соединений против серотипа 4 в анализах RT-qPCR

№ соединение	Протокол А					
	RT-qPCR H241 серотипа 4					
	EC <sub>50</sub> (мкМ)	N	CC <sub>50</sub> (мкМ)	N	SI	N
9A	0,012	5	1,5	5	121	5

N - количество независимых экспериментов, в которых тестировали соединения.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение или его стереоизомерная форма или фармацевтически приемлемая соль, где указанное соединение представляет собой



2. Фармацевтическая композиция для лечения вирусной инфекции денге, содержащая соединение по п.1, или его стереоизомерную форму или фармацевтически приемлемую соль вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями, разбавителями или носителями.

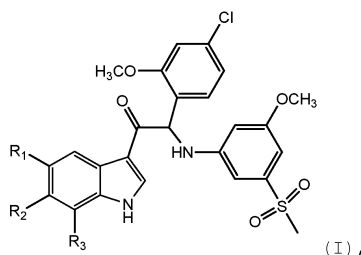
3. Применение соединения по п.1 или его стереоизомерной формы или фармацевтически приемлемой соли в качестве лекарственного препарата для лечения вирусной инфекции денге.

4. Применение фармацевтической композиции по п.2 в качестве лекарственного препарата для лечения вирусной инфекции денге.

5. Применение соединения по п.1 или его стереоизомерной формы или фармацевтически приемлемой соли для лечения вирусной инфекции денге.

6. Применение фармацевтической композиции по п.2 для лечения вирусной инфекции денге.

7. Применение соединения, представленного следующей структурной формулой (I):



его стереоизомерной формы или фармацевтически приемлемой соли, где R<sub>1</sub> представляет собой OCF<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> представляет собой H и R<sub>3</sub> представляет собой H, для ингибирования репликации вируса(вирусов) денге в биологическом образце или у пациента.

8. Применение соединения по п.7, дополнительно предусматривающее применение дополнительного терапевтического средства, где указанное дополнительное терапевтическое средство выбрано из противовирусного средства, или вакцины против вируса денге, или их обоих.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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