

Пролекарство ингибитора NS5B HCV полимеразы, способ его получения и применения

Область техники

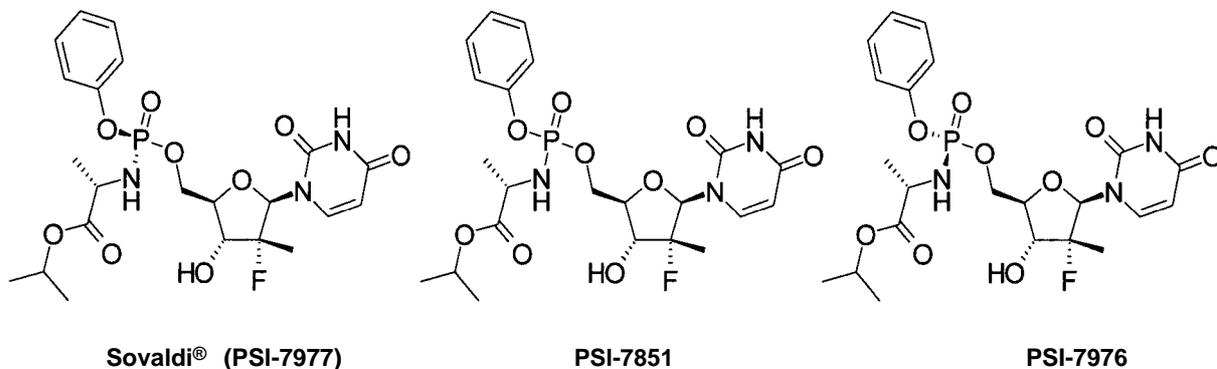
Настоящее изобретение относится к химиотерапевтическим средствам и их применению для лечения вирусных и раковых заболеваний. Эти соединения являются пролекарствами ингибиторами NS5B HCV полимеразы и предназначены для лечения гепатита С у млекопитающих.

Предшествующий уровень техники

Гепатит С, вызываемый вирусом гепатита С (ВГС), является одним из наиболее распространенных заболеваний печени и широко распространен по всему миру. На основе ежегодных докладов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) более 130-150 миллионов человек инфицированы ВГС, и более 700 тысяч лиц умирают от ВГС [WHO. Hepatitis C. WHO fact sheet № 164. Updated July 2016, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>]. ВГС демонстрирует высокое генетическое разнообразие и характеризуется региональными вариациями генотипов (gT) ВГС. Генотип 1 (gT1) является наиболее распространенным во всем мире (83,4 миллиона человек, что составляет 46,2% всех случаев инфицированных ВГС, приблизительно одна треть из которых находится в Восточной Азии). Следующим наиболее распространенным является генотип 3 (gT3). Этим генотипом инфицированы во всем мире 54,3 миллиона человек (30,1%). Генотипы 2, 4, 6 составляют 22,5% всех случаев инфицированных ВГС человек, а генотип 5 (gT5) составляет оставшиеся <1%. В то время как генотипы 1 и 3 доминируют в большинстве стран независимо от экономического статуса, наибольшие доли генотипов 4 и 5 находятся в странах с низким уровнем дохода [Messina, J. P. et al. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology* 2015, 61(1), 77-87.].

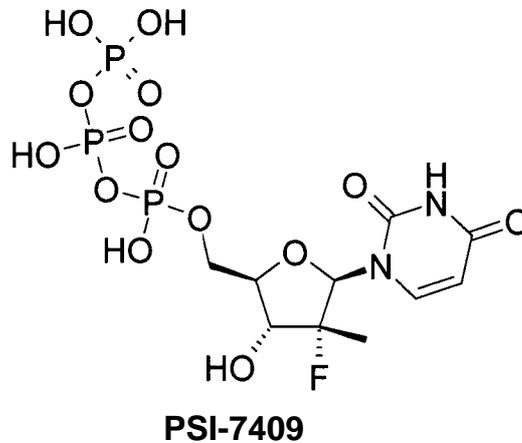
Значительный прогресс в лечении гепатита С был достигнут в последние годы, который связан в первую очередь с открытием Софосбувира (Sofosbuvir, Sovaldi®, PSI-7977, GS-7977), который является пролекарством ингибитором нуклеозида NS5B HCV и Sp-изомером пролекарства PSI-7851 [Sofia, M. J. et al. Discovery of a p-D-20-Deoxy-20-fluoro-2-O-β-C-methyluridine Sovaldi Nucleotide Prodrug (PSI-7977) for the Treatment of Hepatitis C

Virus. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 7202-7218. Sofia, M. J. et al. Nucleoside phosphoramidate prodrugs. Патент US 7964580 (2011), Патент US 8334270 (2012). Патент RU 2478104 (2013)],

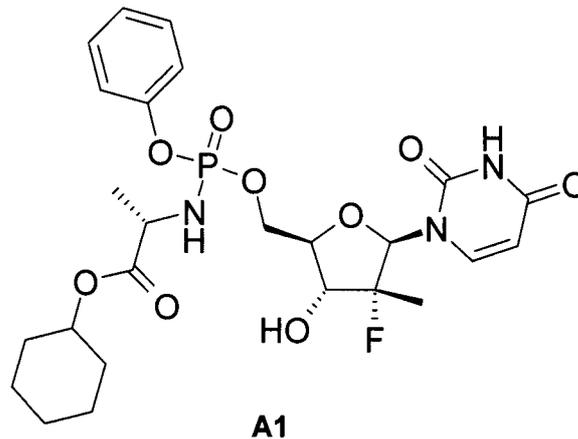


Sovaldi® в настоящее время широко используется для комбинированного лечения гепатита С, в том числе совместно с ингибиторами NS5A HCV. Sovaldi® стал первым нуклеотидом, одобренным обоими регулирующими органами FDA и ЕС для комбинированного лечения больных гепатитом С, инфицированных различными генотипами (gT) вируса гепатита С. В клинических испытаниях он показал высокую эффективность против шести генотипов HCV (gT1-gT6) [I.M. Jacobson et al. Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options. *Engl. J. Med.* 2013, 368, 1867-1877. E. Lewirz et al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *Engl. J. Med.* 2013, 368, 1878-1887].

PSI-7851 и его стереоизомеры PSI-7976 и PSI-7977 метаболизируют до трифосфата PSI-7409, который и является ингибитором NS5B HCV полимеразы [E. Murakami et al. Mechanism of activation of PSI-7851 and its diastereoisomer PSI-7977. *J. Biol. Chem.* 2010, 285(45), 34337-34347],



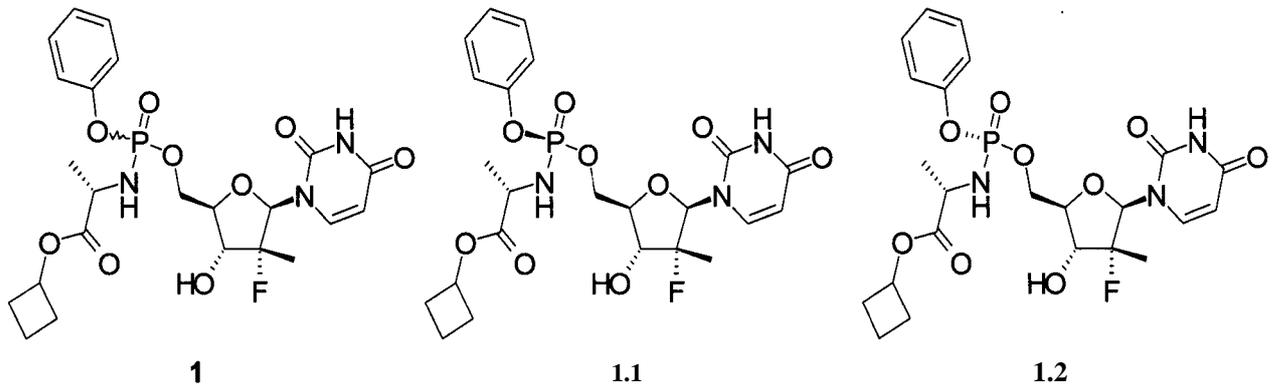
Известны и другие аналоги Sovaldi® [Патент US 8334270 (2012). M. J. Sofia et al. Discovery of a p-D-20-Deoxy-20-r-fluoro-20-p-C-methyluridine Nucleotide Prodrug (PSI-7977) for the Treatment of Hepatitis C Virus. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 7202-7218.], в том числе циклогексил (8)-2-[[[(2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2H-пиримидин-1-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метил-тетрагидрофуран-2-илметокси]-фенокси-фосфориламино]-пропионат формулы A 1, который, как и PSI-7851 и его фосфорные стереоизомеры PSI-7976 и PSI-7977 (Sovaldi®), также метаболизируют до трифосфата PSI-7409,



Несмотря на прогресс, достигнутый в последние годы в терапии гепатита С, остается актуальной задача поиска новых пролекарств ингибитора NS5B ВГС с улучшенными свойствами.

Раскрытие изобретения

Авторы неожиданно обнаружили, что неизвестное ранее соединение общей формулы **1** и его фосфорный стереоизомер формулы **1.1** или формулы **1.2** (*S*_p-стереоизомер формулы **1.1** или *R*_p-стереоизомер формулы **1.2**) являются эффективными пролекарствами ингибитора NS5B HCV полимеразы, представляющими интерес в качестве противовирусного средства, в том числе для лечения гепатита С,



Ниже приведены определения различных терминов, используемых для описания данного изобретения. Эти определения применимы к терминам, как они использованы в данном описании и формуле изобретения, если иным не ограничены в конкретных случаях либо по отдельности, либо как часть большей группы.

Термин «кристаллическая форма» означает структуру вещества, характеризующуюся упаковкой образующих ее молекул в один из видов кристаллической решетки.

Термин «поликристаллическая форма» означает структуру вещества, имеющую поликристаллическое строение, т.е. состоящую из множества мелких монокристаллов, т.е. кристаллитов определенной кристаллической формы.

Термин «активный компонент» (лекарственное вещество) относится к физиологически активному веществу синтетического или иного (биотехнологического, растительного, животного, бактерицидного и так далее) происхождения, обладающему фармакологической активностью, которое является активным ингредиентом фармацевтической композиции.

Термин «лекарственный препарат» означает вещество (или смесь веществ в виде фармацевтической композиции) в виде таблеток, капсул, инъекций, мазей и др. готовых форм, предназначенное для восстановления, исправления или изменения физиологических функций у человека и животных, а также для лечения и профилактики болезней, диагностики, анестезии, контрацепции, косметологии и прочего.

Термин «терапевтический коктейль» представляет одновременно администрируемую комбинацию двух и более лекарственных препаратов, обладающих различным механизмом фармакологического действия и направленных на различные биомишени, участвующие в патогенезе заболевания.

Термин «фармацевтическая композиция» обозначает композицию, включающую в себя соединение формулы 1 и, по крайней мере, один из компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых наполнителей, растворителей, разбавителей, носителей, вспомогательных, распределяющих и воспринимающих средств, средств доставки, таких как консерванты, стабилизаторы, наполнители, измельчители, увлажнители, эмульгаторы, суспендирующие агенты, загустители, подсластители, отдушки, ароматизаторы, антибактериальные агенты, фунгициды, лубриканты, регуляторы пролонгированной доставки, выбор и соотношение которых зависит от природы и способа назначения и дозировки. Примерами суспендирующих агентов являются этоксилированный изостеариловый спирт, полиоксиэтилен, сорбитол и сорбитовый эфир, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также смеси этих веществ. Защита от действия микроорганизмов может быть обеспечена с помощью разнообразных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, таких как парабены, хлорбутанол, сорбиновая кислота и подобные им соединения. Композиция может включать также изотонические агенты, например, сахара, хлористый натрий и им подобные. Пролонгированное действие композиции может быть обеспечено с помощью агентов, замедляющих абсорбцию активного начала, например, моностеарат алюминия и желатин. Примерами подходящих носителей, растворителей, разбавителей и средств доставки являются вода, этанол, полиспирты, а также их смеси, растительные масла (такие, как оливковое масло) и инъекционные органические сложные эфиры (такие, как этилолеат). Примерами наполнителей являются лактоза, молочный сахар, цитрат натрия, карбонат

кальция , фосфат кальция и им подобные . Примерами измельчителей и распределяющих средств являются крахмал , альгиновая кислота и ее соли , силикаты . Примерами лубрикантов являются стеарат магния , лаурилсульфат натрия , тальк , а также полиэтиленгликоль с высоким молекулярным весом . Фармацевтическая композиция для перорального , сублингвального , трансдермального , внутримышечного , внутривенного , подкожного , местного или ректального введения активного компонента , одного или в комбинации с другим активным компонентом , может быть введена животным и людям в стандартной форме введения , в виде смеси с традиционными фармацевтическими носителями . Пригодные стандартные формы введения включают пероральные формы , такие как таблетки , желатиновые капсулы , пилюли , порошки , гранулы , жевательные резинки и пероральные растворы или суспензии , сублингвальные и трансбуккальные формы введения , аэрозоли , имплантаты , местные , трансдермальные , подкожные , внутримышечные , внутривенные , интраназальные или внутриглазные формы введения и ректальные формы введения .

Термин «инертный наполнитель » , используемый в данном описании , относится к соединению , которое используют для получения фармацевтической композиции , и , как правило , безопасному , нетоксичному и ни биологически , ни иным образом нежелательному , и включает в себя вспомогательные вещества , которые являются приемлемыми для применения в ветеринарии , а также фармакологически приемлемыми для человеческого использования . Соединения по данному изобретению могут быть введены отдельно , но обычно их будут вводить в смеси с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами , разбавителями или носителями , выбранными с учетом предполагаемого пути введения и стандартно фармацевтической практики .

Термин «терапевтически эффективное количество » , используемый здесь , означает количество субстанции , пролекарства или лекарства , необходимое для уменьшения симптомов заболевания у субъекта . Доза субстанции , пролекарства или лекарства будет соответствовать индивидуальным требованиям в каждом конкретном случае . Эта доза может варьироваться в широких пределах в зависимости от многочисленных факторов , таких как тяжесть заболевания , подлежащего лечению , возраста и общего состояния здоровья пациента , других лекарственных средств , с помощью которых пациент проходит лечение , способа и формы введения и опыта лечащего врача . Для перорального введения

суточная доза составляет приблизительно от 0,01 до 10 г, включая все значения между ними, в день в монотерапии и/или в комбинированной терапии. Предпочтительная суточная доза составляет примерно от 0,1 до 7 г в день. Как правило, лечение начинают с большой начальной «нагрузочной дозы», чтобы быстро уменьшить или устранить вирус, сопровождающей убывающую дозу до уровня, достаточного для предотвращения всплеска инфекции.

Термин «субъект» означает млекопитающее, которое включает, но не ограничивается ими, крупный рогатый скот, свиней, овец, кур, индеек, буйволов, лам, страусов, собак, кошек и человека, предпочтительно субъектом является человек. Предполагается, что в способе лечения субъекта может быть пролекарство общей формулы 1, его стереоизомер, изотопно-обогащенный аналог, его фармацевтически приемлемая соль, гидрат, сольват, кристаллическая и полиморфная форма, либо в сочетании их с другим соединением, в том числе с ингибитором NS5A HCV.

Предметом данного изобретения являются циклобутил (5)-2-[[[(2i?,3i?,4i?,5/?)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2Н-пиримидин-1-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метил-тетрагидрофуран-2-илметокси]-фенокси-фосфориламино]-пропаноат общей формулы 1, его фосфорные стереоизомеры (Sp-стереоизомер формулы 1.1 или Rp-стереоизомер формулы 1.2), их изотопно-обогащенный аналог, кристаллическая и поликристаллическая форма.

Предметом данного изобретения являются пролекарство ингибитора NS5B HCV полимеразы, представляющее собой соединение общей формулы 1, его фосфорный стереоизомер (Sp-стереоизомер формулы 1.1 или Rp-стереоизомер формулы 1.2), их изотопно-обогащенный аналог, кристаллическая и поликристаллическая форма в качестве лекарственного препарата для лечения гепатита С у человека или теплокровного животного, нуждающегося в этом.

Предпочтительным пролекарством является циклобутил (S)-2-[(S)-[(2R,3R,4R,5R)-5-(3,4-дигидро-2,4-диоксо-2Я-пиримидин-1-ил)-3-гидрокси-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-илметокси]-фенокси-фосфориламино]-пропаноат (1.1), его изотопно-обогащенный аналог, кристаллическая и поликристаллическая форма.

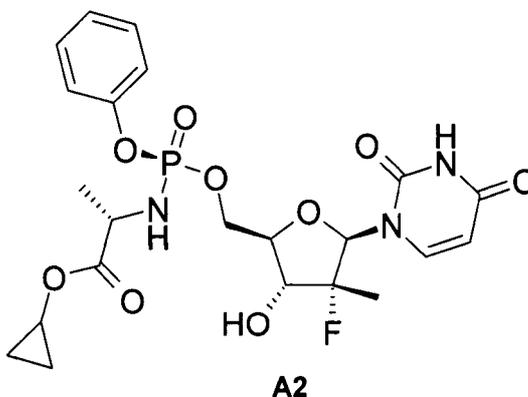
Неожиданно новое пролекарство общей формулы 1, его фосфорные стереоизомеры, их изотопно-обогащенные аналоги, кристаллические и поликристаллические формы оказались более эффективным пролекарством ингибитором NS5B HCV, чем известные

пролекарства ингибиторы NS5B HCV, в том числе более эффективным, чем Sovaldi® и циклогексильный эфир формулы А 1.

Действительно, Sovaldi® по отношению к генотипу 1b (gT1b) HCV имеет $EC_{50} = 0.045-0.170 \mu\text{M}$ [http://www.hcvdruginfo.ca/downloads/HCV_Sofosbuvir.pdf] и $EC_{90} = 0.59 \mu\text{M}$, а новое пролекарство формулы 1.1 имеет $EC_{50} = 15.0-27.0 \text{ нМ}$ и $EC_{90} = 128.0 \text{ нМ}$ (Таблица 1а), т.е. новое пролекарство формулы 1.1 более чем в три раза активнее, чем Sovaldi®. Время полураспада пролекарства формулы 1.1 в S9 фракции микросом печени человека составляет $Ti_{1/2}^{hS9} = 0,05 \text{ ч}$, а у Sovaldi® соответственно $Ti_{1/2}^{hS9} = 0.54 \text{ ч}$ (Таблица 2), т.е. новое пролекарство формулы 1.1 в 11 раз быстрее метаболизирует в S9 фракции микросом печени человека, чем Sovaldi®. Кроме того, концентрация и $AUC_{24 \text{ ч}}$ трифосфата PSI-7409, образующегося при метаболизме пролекарства формулы 1.1 в печени крыс, составляют $C_{\text{тах}} = 3,224.0 \text{ нг/г}$ и $AUC_{24 \text{ ч}} = 30,487.0 \text{ нг.ч/г}$, в то время как при аналогичном метаболизме Sovaldi® имеет $C_{\text{тах}} = 1,934.0 \text{ нг/г}$ и $AUC_{24 \text{ ч}} = 16,796.0 \text{ нг.ч/г}$ (Таблица 3). Это свидетельствует о том, что новое пролекарство формулы 1.1 почти в 2 раза более эффективно метаболизирует в печени в нужный трифосфат PSI-7409 (лекарство).

Еще большую эффективность новое пролекарство формулы 1.1 имеет по сравнению с известным циклогексильным эфиром формулы А 1, поскольку известно [M. J. Sofia et al. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 7202-7218], что он имеет следующие параметры: $EC_{90} = 250.0 \text{ нМ}$, $Ti_{1/2}^{hS9} = 1,4 \text{ ч}$, $C_{\text{тах}} = 557 \text{ нг/г}$ и $AUC_{244} = 6,484.0 \text{ нг.ч/г}$.

Полученные результаты (эффект) являются неожиданными, поскольку пролекарство формулы 1.1, представляющее собой циклобутиловый эфир, который не только значительно эффективнее своего аналога - циклогексильного эфира формулы А 1, но и активнее другого аналога - циклопропилового эфира формулы А 2 ($EC_{90} = 73.0 \text{ нМ}$, $EC_{90} = 410.0 \text{ нМ}$ в Таблице 1а), который был специально получен изобретателями для большей наглядности неожиданного эффекта,



Неожиданность состоит в том, что в ряду циклоалкиловых эфиров наиболее эффективным оказался циклобутиловый эфир формулы 1.1 с промежуточным размером циклоалкила, а менее эффективными оказались эфиры с большим размером циклоалкила (известный циклогексиловый эфир формулы A 1) и меньшим размером циклоалкила (специально полученный изобретателями циклопропиловый эфир формулы A 2).

Приведенные выше данные убедительно подтверждают новизну изобретения и его изобретательский уровень (эффективность).

Предметом настоящего изобретения является лекарственный препарат, обладающий свойствами ингибитора NS5B HCV полимеразы, представляющий собой соединение общей формулы 1, его стереоизомер, изотопно-обогащенный аналог, кристаллическая и поликристаллическая форма, в терапевтически эффективном количестве, для лечения гепатита С у человека или теплокровного животного, нуждающегося в этом.

Предметом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция в терапевтически эффективном количестве для лечения вируса гепатита С у млекопитающих, содержащая пролекарство общей формулы 1, его стереоизомер, изотопно-обогащенный аналог, кристаллическая или поликристаллическая форма, необязательно в комбинации с фармацевтически приемлемым наполнителем, носителем, добавкой, разбавителем.

Пролекарство общей формулы 1, его стереоизомер, изотопно-обогащенный аналог, кристаллическая или поликристаллическая форма могут быть приготовлены в виде самых разнообразных перорально вводимых лекарственных форм и носителей, пероральное введение может быть в форме таблеток, таблеток с покрытием, твердых и мягких желатиновых капсул, растворов, эмульсий, сиропа или суспензии. Соединения по

настоящему изобретению являются эффективными при введении в виде суппозитория . Наиболее удобным способом введения обычно является пероральный с использованием обычной суточной схемы приема лекарственных доз, который можно регулировать в зависимости от тяжести заболевания и реакции пациента на противовирусное и противоопухолевое лекарство .

Пролекарство общей формулы 1, его стереоизомер , изотопно -обогащенный аналог , кристаллическая или поликристаллическая форма вместе с одним или несколькими обычными эксципиентами , носителями или разбавителями могут быть представлены в форме фармацевтических композиций и их единичных доз. Фармацевтические композиции и стандартные лекарственные формы могут состоять из обычных ингредиентов в обычных пропорциях с или без дополнительных активных соединений и лекарственных форм . Фармацевтическая композиция может содержать любое соответствующее эффективное количество активного ингредиента , соразмерное с назначенной суточной дозой . Фармацевтические композиции могут быть использованы в виде твердых веществ , таких как таблетки или заполненные капсулы , в виде полутвердых порошков , препаратов с замедленным высвобождением или жидкостей , таких как суспензии , эмульсии или заполненные капсулы для перорального применения ; или в форме суппозитория для ректального или вагинального введения . Типичный препарат будет содержать примерно от 5% вес. до 95% вес. активного соединения или соединения . Термин «препарат » или «лекарственная форма » предназначен для включения как твердых , так и жидких композиций активного соединения , и специалисту в данной области техники будет понятно , что активный ингредиент может существовать в виде различных препаратов в зависимости от требуемой дозы и фармакокинетических параметров .

Препараты в твердой форме включают порошки , таблетки , пилюли , капсулы , суппозитории и диспергируемые гранулы . Твердый носитель может представлять собой одно или несколько веществ , которые могут также действовать как разбавители , корригенты , солюбилизаторы , смазывающие вещества , суспендирующие агенты , связующие вещества , консерванты , дезинтегрирующие таблетки агенты или инкапсулирующий материал . В порошках носитель обычно представляет собой тонкоизмельченное твердое вещество , которое представляет собой смесь с тонкоизмельченным активным компонентом . В таблетках активный компонент обычно смешивают с носителем , имеющим необходимую

связывающую способность, в подходящих пропорциях и спрессовывают в желаемую форму желаемого размера. Подходящие носители включают, но не ограничиваются ими, карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар, лактозу, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлозу, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, легкоплавкий воск, масло какао и тому подобное. Препараты в твердой форме могут содержать в дополнение к активному компоненту красители, ароматизаторы, стабилизаторы, буферы, искусственные и природные подсластители, диспергаторы, загустители, солюбилизующие агенты и тому подобное.

Жидкие составы также пригодны для перорального введения. Жидкие лекарственные формы представляют собой эмульсии, сиропы, эликсиры и водные суспензии. Они включают твердые формы препаратов, которые предназначены для превращения в жидкие препараты непосредственно перед использованием. Эмульсии могут быть приготовлены в растворах, например, в водных растворах пропиленгликоля или могут содержать эмульгаторы, такие как лецитин, моноолеат сорбита или гуммиарабик. Водные суспензии могут быть приготовлены диспергированием тонкоизмельченного активного компонента в воде с вязкими материалами, такими как природные или синтетические камеди, смолы, метилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза и другими хорошо известными суспендирующими агентами.

Пролекарство общей формулы 1, его стереоизомер, изотопно-обогащенный аналог, кристаллическая или поликристаллическая форма могут быть приготовлены для введения в виде суппозитория. Низкоплавкий воск, такой как смесь глицеридов жирных кислот или масло какао, сначала расплавляют и активный компонент гомогенно диспергируют, например, перемешиванием. Расплавленную гомогенную смесь затем выливают в формы удобного размера, дают остыть и затвердеть.

Пролекарство общей формулы 1, его стереоизомер, изотопно-обогащенный аналог, кристаллическая или поликристаллическая форма могут быть приготовлены для вагинального введения. Применение суппозитория, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спреев, содержащих в дополнение к активному ингредиенту такие носители, которые известны в данной области техники, будет уместно.

Предметом настоящего изобретения является использование пролекарства общей формулы 1, его стереоизомера, изотопно-обогащенного аналога, кристаллической или

поликристаллической формы в производстве лекарственного средства для лечения вируса гепатита С. Предполагается, что пролекарство, представленное общей формулой 1, его стереоизомер, изотопно-обогащенный аналог, кристаллическая или поликристаллическая форма, используемые в производстве лекарственного средства для лечения любого противовирусного заболевания, описанного здесь, могут представлять собой любое из соединений общей формулы 1, выбранное из:

циклобутил (5)-2- $\{[(2R,3R,4R,5R)$ -5-(3,4-дигидро-2,4-диоксо-2[^] пиримидин-1-ил)-3-гидрокси-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-илметокси]-фенокси-фосфориламино}-пропаноата (1),

циклобутил (5)-2- $\{(S)$ - $[(2R,3R,4R,5R)$ -5-(3,4-дигидро-2,4-диоксо-2[^] пиримидин-1-ил)-3-гидрокси-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-илметокси]-фенокси-фосфориламино}-пропаноата (1.1),

и циклобутил (S)-2- $\{(R)$ - $[(2R,3R,4R,5R)$ -5-(3,4-дигидро-2,4-диоксо-2[^] пиримидин-1-ил)-3-гидрокси-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-илметокси]-фенокси-фосфориламино}-пропаноата (1.2),

их изотопно-обогащенного аналога, кристаллической или поликристаллической формы либо по отдельности, либо в сочетании с другим соединением по настоящему изобретению.

Предметом настоящего изобретения является способ комбинированного лечения и/или профилактики субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества пролекарства, представленного общей формулой 1, его стереоизомера, изотопно-обогащенного аналога, кристаллической или поликристаллической формы и терапевтически эффективного количества другого противовирусного или противоракового агента; в котором используют параллельное или альтернативное введение агентов. Понятно, что время между последовательным введением агентов может находиться в диапазоне между 1-24 ч, который включает в себя любой поддиапазон между ними.

Примеры «других противовирусных агентов» включают в себя, но не ограничиваются ими: ингибиторы HCV NS3 протеазы [US 20140296136, US 8,987,195, US 7973040, US 2012214783], ингибиторы NS4 HCV [EP1497282], ингибиторы NS3/NS4 HCV [EP 2364984], ингибиторы NS5A HCV [C. Wang et al. Hepatitis C virus RNA elimination and

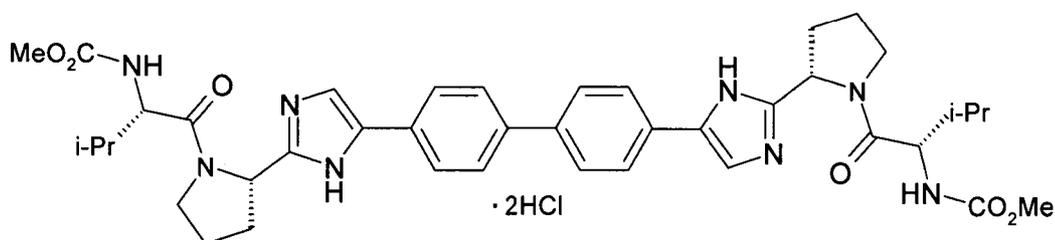
development of resistance in replicon cells treated with BMS-790052. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56, 1350-1358. <https://en.wikipedia.org/wiki/Daclatasvir>; A.V. Ivachtchenko et al. Discovery of Novel Highly Potent Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor (AV4025). *J. Med. Chem.* 2014, 57, 7716-7730; Pat. Appl. US 14/845,333); агонисты Толл-подобных рецепторов (WO 2015023958, WO 2012097012); и другие ингибиторы (WO 2014106019, WO 2014033176, WO 2014033170, WO 2014033167, WO 2013006394, US 20090163545].

Более предпочтительной является фармацевтическая противовирусная композиция, которая вместе с новым пролекарством общей формулы **1** или его стереоизомером формулы **1.1**, изотопно-обогащенным аналогом, кристаллической или поликристаллической формой дополнительно включает в себя противовирусное или противораковое лекарственное средство в терапевтически эффективном количестве.

Более предпочтительной является фармацевтическая противовирусная композиция, которая вместе с новым пролекарством общей формулы **1** или его стереоизомером формулы **1.1**, изотопно-обогащенным аналогом, кристаллической или поликристаллической формой дополнительно содержит терапевтически эффективное количество ингибитора NS5A HCV, выбранного из группы, включающей:

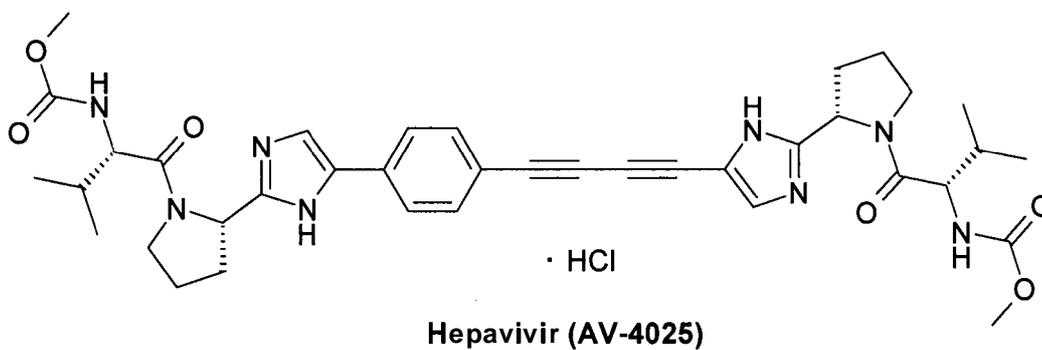
Даклатасвир (Daclatasvir) (Daklinza, BMS790052) [Belema, M. et al. Discovery and Development of Hepatitis C Virus NS5A Replication Complex Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 1643-1672. Bachand, C. et al. Hepatitis C virus inhibitors. Patent WO 2008/021927, 2008. Bachand, C. et al. Hepatitis C virus inhibitors. Patent WO 2008/021928, 2008. Bachand, C. et al. Hepatitis C virus inhibitors. Patent WO 2008/021936, 2008.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Public_assessment_report/human/003768/WC500172849.pdf]

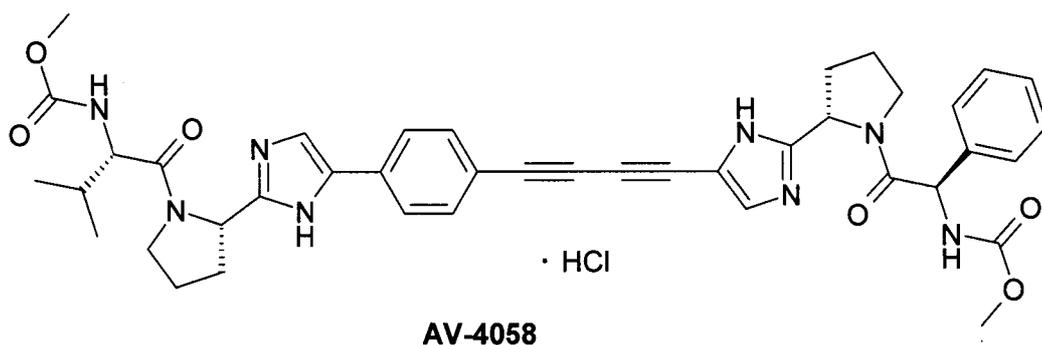
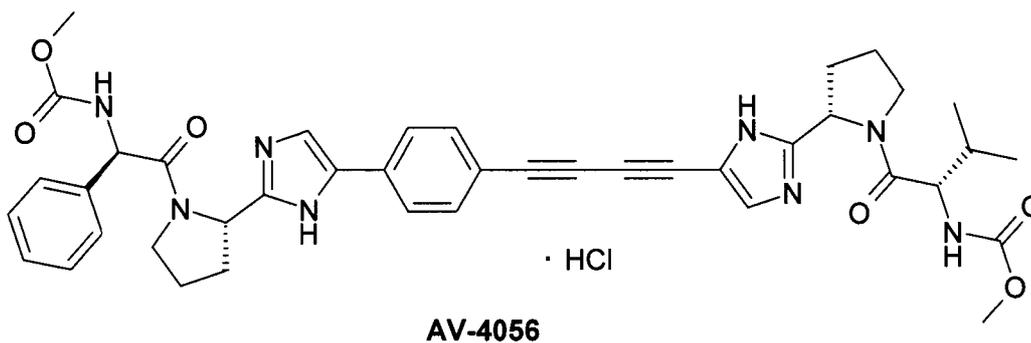


Daclatasvir (BMS-790052)

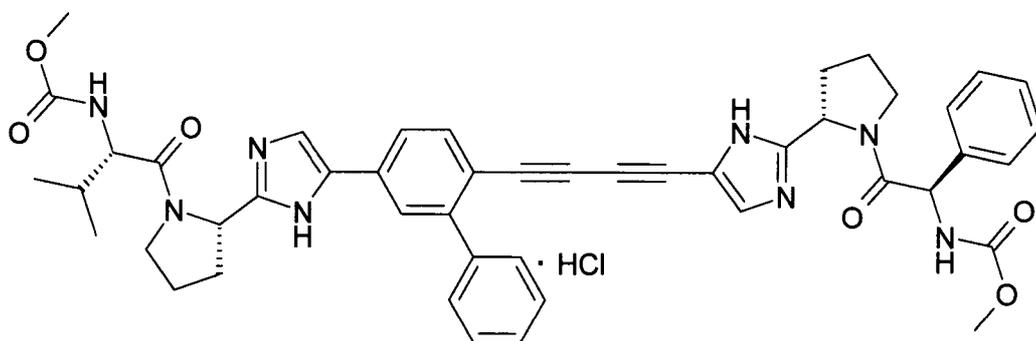
Гепавивир (Hepavivir) (AV-4025) [Ivachtchenko, A. V. et al. Discovery of Novel Highly Potent Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor (AV4025). *J Med. Chem.* 2014, 57, 7716-7730. Patent WO 2012/074437, 2012. Patent US 9428491, 2016.]



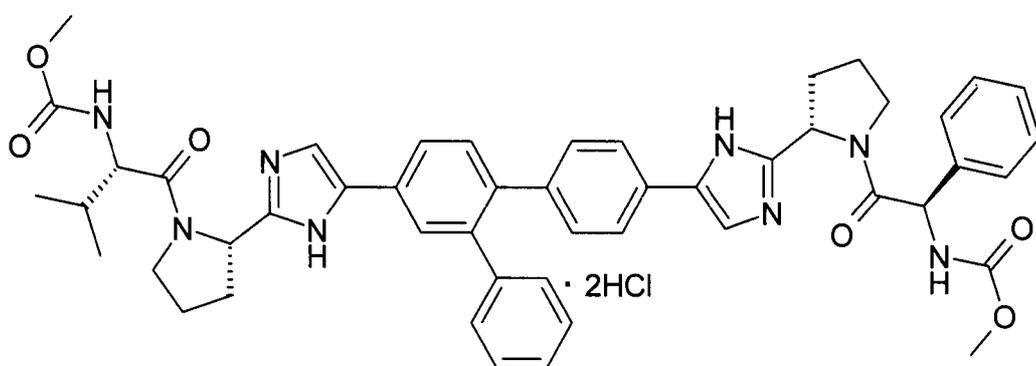
AV-4056 и AV-4058 [US 9428491.]



AV-4067 и AV-4084 [Pat. Appl. US 14/845,333.]

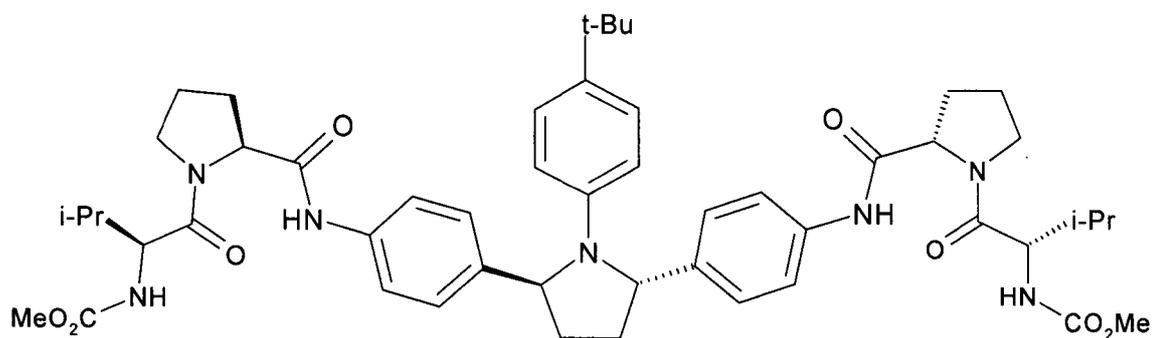


AV-4067



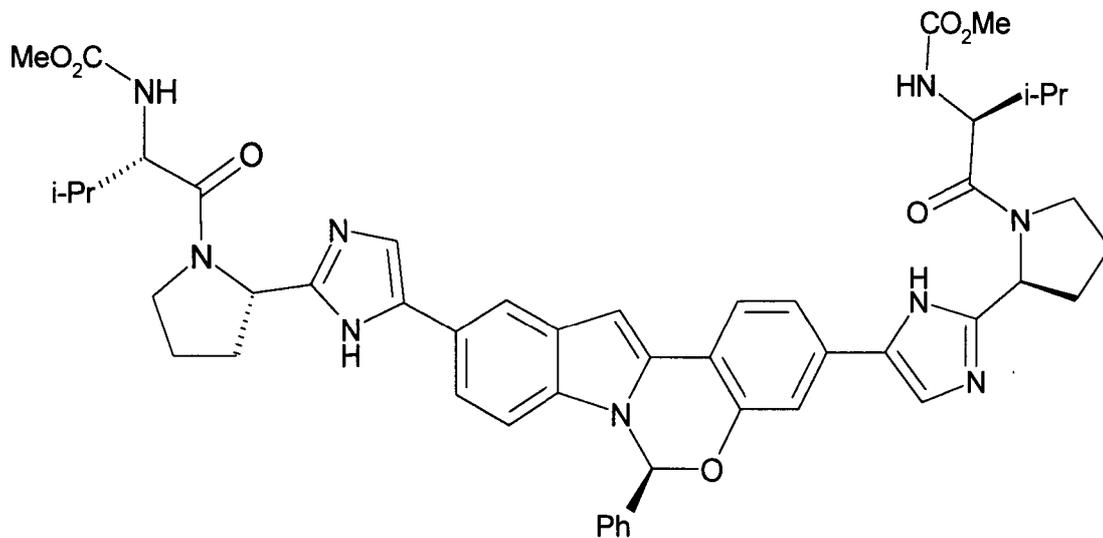
AV-4084

Омбитасвир (Ombitasvir) (ABT-267) [Gardelli, C. et al. Phosphoramidate Prodrugs of 20-C-Methylcytidine for Therapy of Hepatitis C Virus Infection. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 2047-2057. Patent WO 2010/144646, 2010.]



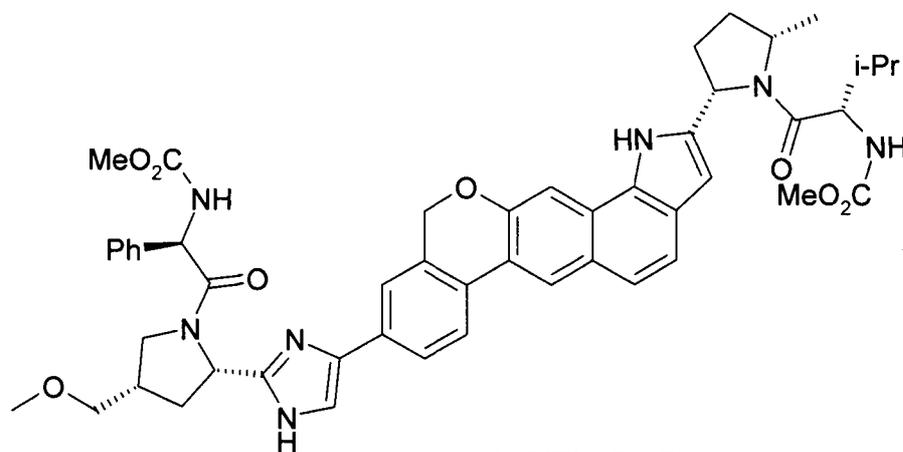
Ombitasvir (ABT-267)

Элбасвир (Elbasvir) (MK-8742), [Coburn, C. A. et al. *ChemMedChem.* 2013, 8, 1930-1940. Patent WO 2012/040923, 2012. Patent WO 2012/041014, 2012]



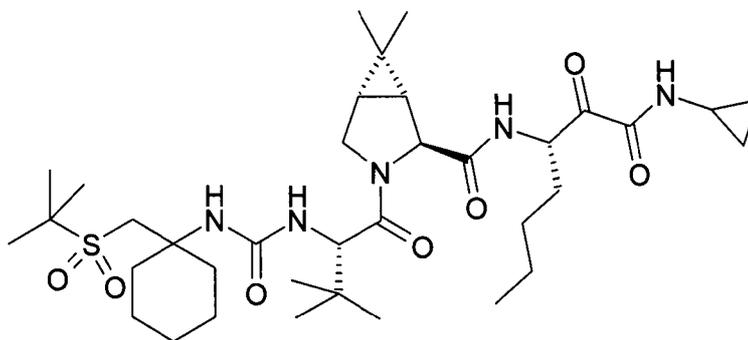
Elbasvir (MK-8742)

Велпатасвир (Velpatasvir) (VEL, GS-5816), [Patent WO 2015/1 10048, 2015.
<http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfdadocs/nda/2016/2083410orig1s000PharmR.pdf>.
http://www.gilead.com/~media/files/pdfs/medicines/liver-disease/epclusa/epclusa_pi.pdf]



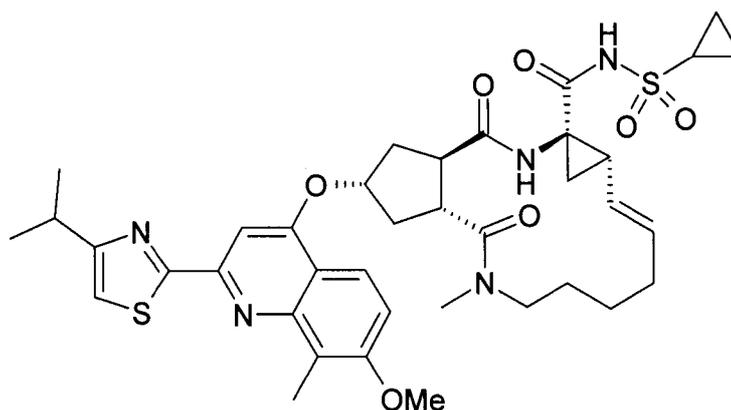
Velpatasvir (VEL, GS-5816)

Ингибитор неструктурированного белка 3 ВГС (NS3 HCV) Нарлапревир (Narlaprevir, SCH 900518) [Arasappan A. et al. Discovery of Narlaprevir (SCH 900518): A Potent, Second Generation HCV NS3 Serine Protease Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2010, 1 (2), 64-69]



Narlaprevir (SCH 900518)

и ингибитор неструктурированного белка NS3/NS4 ВГС (NS3/4A HCV) Симепревир (Simeprevir, Olysio) [<https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-simeprevir-141027-pi.docx>]



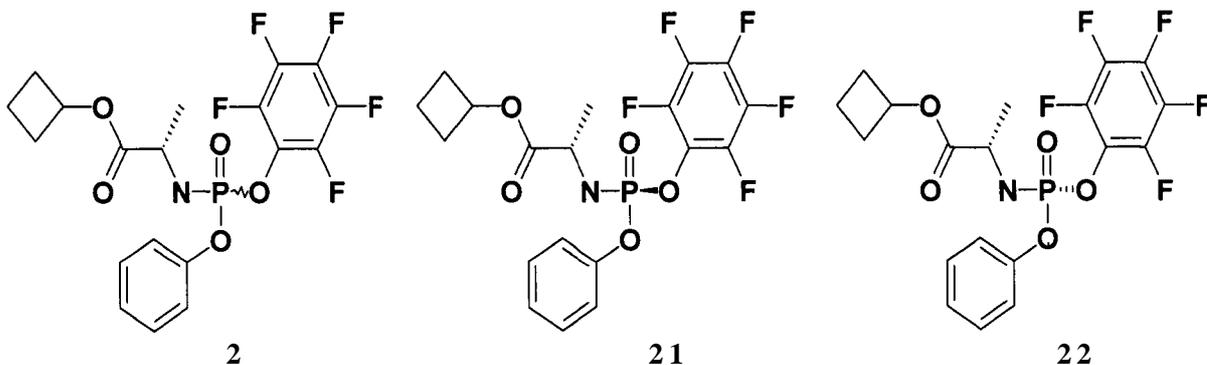
Simeprevir (Olysio)

Предметом настоящего изобретения является способ комбинированного лечения вирусных и раковых заболеваний у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает в себя последовательное или одновременное введение терапевтически эффективного количества пролекарства, представленного общей формулой **1**, его стереоизомера, изотопно-обогащенного аналога, кристаллической или поликристаллической формы и другого противовирусного или противоракового средства. Понятно, что время между отдельным введением препаратов может находиться в любом диапазоне.

Предполагается, что другой противовирусный агент представляет собой, но не ограничивается: интерферон-альфа, интерферон-бета, пегилированный интерферон-альфа, рибавирин, левовирин, вирамидин, другой нуклеозидный HCV полимеразный ингибитор,

нуклеозидный HCV полимеразный ингибитор, HCV протеазный ингибитор, HCV хеликазный ингибитор или HCV ингибитор слияния, ингибитор полимеразы ДНК HBV и ингибитор ВИЧ-1 обратной транскриптазы (RT). Когда пролекарство или его производное или соль вводят в комбинации с другим противовирусным или противораковым агентом, активность может быть увеличена по сравнению с исходным пролекарством. Когда лечение комбинированное, то введение препаратов может быть одновременным или последовательным по отношению к пролекарству, представленному общей формулой 1. Понятие «одновременное введение», используемое здесь, таким образом, включает в себя введение агентов в то же время или в разное время. Прием двух или более агентов в то же время может быть достигнут с помощью одной препаративной формы, содержащей два или более активных ингредиентов, или, по существу, одновременного введения двух или более лекарственных форм с одним активным агентом. Следует понимать, что ссылки здесь на лечение распространяются и на профилактику. Кроме того, термин «лечение» вирусной инфекции, как он использован здесь, включает также лечение или профилактику заболевания или состояния, связанного с опосредованной вирусной инфекцией, или их клинических симптомов.

Настоящее изобретение представляет собой способ получения пролекарства общей формулы 1, его стереоизомера, изотопно-обогащенного аналога, кристаллической или поликристаллической формы, включающий использование неизвестного ранее циклобутил (5)-2-(пентафторфенилокси-фенокси-фосфориламино)-пропионата формулы 2 или его стереоизомеров циклобутил (S)-2-((S)-пентафторфенилокси-фенокси-фосфориламино)-пропионата формулы 2.1 и циклобутил (S)-2-((R)-пентафторфенилокси-фенокси-фосфориламино)-пропионата формулы 2.2, которые также являются предметом данного изобретения,



Авторы неожиданно обнаружили, что новое пролекарство общей формулы 1 и его фосфорные стереоизомеры (*S*p-стереоизомер формулы 1.1 и *R*p-стереоизомер формулы 1.2) являются более эффективными пролекарствами ингибиторами NS5B HCV, в том числе более эффективными, чем известные Sovaldi® и циклогексиловый эфир формулы А 1, а также неизвестный ранее циклопропиловый эфир (препарат сравнения) формулы А 2.

Действительно, Sovaldi® по отношению к генотипу 1b (gT1b) HCV имеет $EC_{50} = 45-170$ нМ и $EC_{ад} = 590$ нМ, циклогексиловый эфир формулы А 1 имеет $EC_{90} = 250.0$ нМ, а циклопропиловый эфир формулы А 2 имеет $EC_{90} = 73.0$ нМ и $EC_{ад} = 410.0$ нМ (Таблица 1). Новое пролекарство формулы 1.1 имеет $EC_{50} = 15.0-27.0$ нМ и $EC_{90} = 128.0$ нМ (Таблица 1а), т.е. новое пролекарство формулы 1.1 более чем в три раза активнее, чем Sovaldi®, в два раза активнее, чем соединение формулы А 1, и более чем в три раза активнее, чем соединение формулы А 2.

Время полураспада пролекарства формулы 1.1 в S9 фракции микросом печени человека составляет $T_{1/2}^{hS9} = 0,05$ ч, у Sovaldi® соответственно $T_{1/2}^{hS9} = 0.54$ ч, а у циклогексилового эфира формулы А 1 $T_{1/2}^{hS9} = 1,4$ ч, (Таблица 2), т.е. новое пролекарство формулы 1.1 в 11 раз быстрее метаболизирует в S9 фракции микросом печени человека, чем Sovaldi® и в 28 раз быстрее, чем циклогексиловый эфир формулы А 1. Кроме того, концентрация и $AUC_{24 ч}$ трифосфата PSI-7409, образующегося при метаболизме пролекарства формулы 1.1 в печени крыс, составляют $C_{тах} = 3,224.0$ нг/г и $AUC_{24 ч} = 30,487.0$ нг.ч/г, в то время как при аналогичном метаболизме Sovaldi® имеет $C_{тах} = 1,934.0$ нг/г и $AUC_{24 ч} = 16,796.0$ нг.ч/г, а циклогексиловый эфир формулы А 1 имеет $C_{тах} = 557$ нг/г и $AUC_{24 ч} = 6,484.0$ нг.ч/г (Таблица 3). Это свидетельствует о том, что новое пролекарство формулы 1.1 почти в 2 раза более эффективно метаболизирует в печени в нужный трифосфат PSI-7409 (лекарство), чем Sovaldi®, и в 4,7 раза более эффективно метаболизирует, чем циклогексиловый эфир формулы А 1.

Полученные результаты (эффект) являются неожиданными, поскольку пролекарство формулы 1.1, представляющее собой циклобутиловый эфир, который не только значительно эффективнее своего аналога - циклогексилового эфира формулы А 1, но и еще активнее другого аналога - циклопропилового эфира формулы А 2 ($EC_{90} = 73.0$ нМ, $EC_{ад} = 410.0$ нМ в

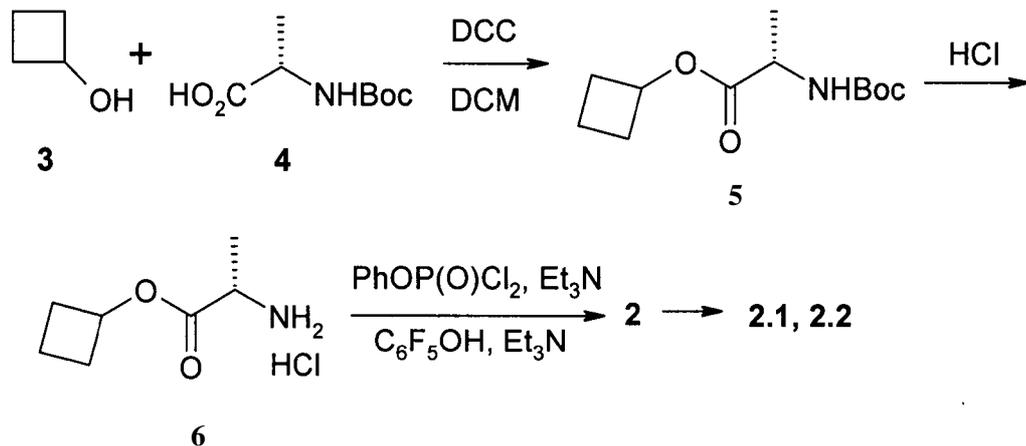
Таблице 1а), который был специально получен изобретателями для большей наглядности неожиданного эффекта.

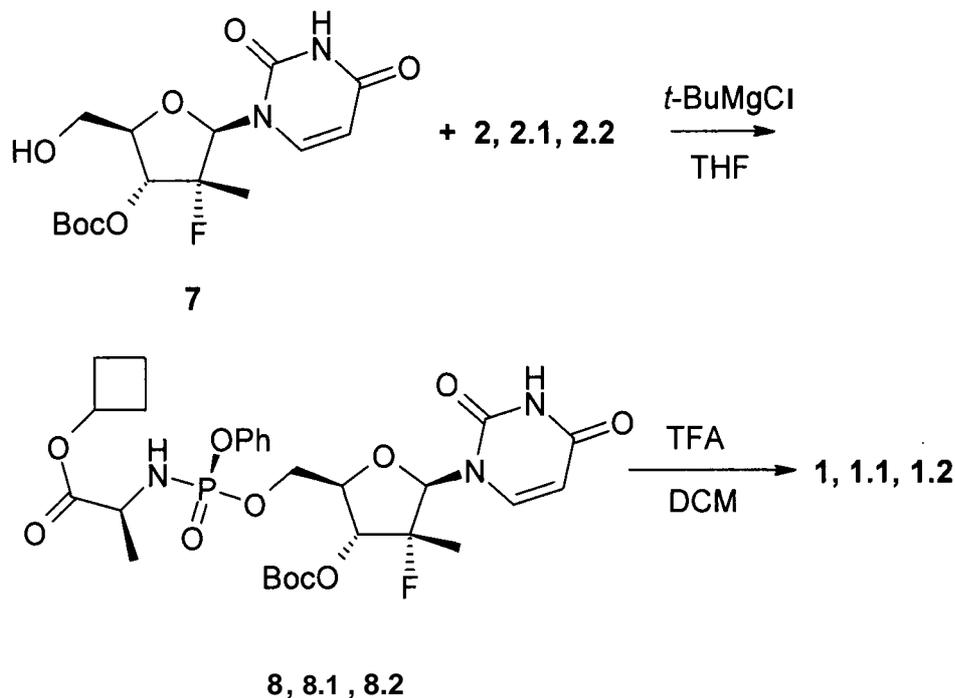
Лучший вариант осуществления изобретения

Настоящее изобретение далее будет описано в связи с определенными вариантами осуществления, которые не предназначены для ограничения его объема. Напротив, настоящее изобретение охватывает все альтернативы, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в объем формулы изобретения. Таким образом, следующие примеры, которые включают в себя конкретные варианты, иллюстрируют, но не ограничивают настоящее изобретение.

Пример 1. Протокол синтеза пролекарства циклобутил (5)-2-[[2i?,3i?,4i?,5i?)-5-(3,4-дигидро-2,4-диоксо-2^h пиримидин-1-ил)-3-гидрокси-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-илметокси]-фенокси-фосфориламино]-пропаноата общей формулы 1 и его стереоизомеров формул 1.1 и 1.2 (Схема 1).

Схема 1





К раствору *N*-Boc-L-аланина (**4**: 15,5 г, 81,9 ммоль) в 300 мл дихлорметана при 0 °С добавляют DCC (16,9 г, 81,9 ммоль) и через 5 мин циклобутанол (**3**: 5,6 г, 78,0 ммоль) и DMAP (2,0 г, 16,4 ммоль). Смесь оставляют перемешиваться на ночь при комнатной температуре, упаривают в вакууме и остаток обрабатывают 300 мл этилацетата. Осадок отфильтровывают и промывают этилацетатом. Фильтрат промывают 5 % раствором лимонной кислоты (2 x 100 мл), насыщенным раствором NaHCO₃ (2 x 100 мл), рассолом, сушат над Na₂SO₄ и упаривают в вакууме. Получают 19,6 г (98 %) (5)-циклобутил 2-(трет-бутоксикарбониламино)-пропаноат (**5**) в виде белого порошка. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 7.22 (d, *J* = 7.2 Hz, 0.85H), 6.87 (m, 0.15H), 4.89 (p, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.94 (m, 1H), 2.26 (m, 2H), 1.98 (m, 2H), 1.74 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.38 (s, 7.5H), 1.34 (brs, 1.5H), 1.22 (d, *J* = 7.2Hz, 3H).

К раствору соединения формулы **5** (19,6 г, 80,6 ммоль) в 50 мл диоксана добавляют 230 мл 3М HCl в диоксане, смесь оставляют перемешиваться на ночь и затем упаривают в вакууме. Остаток обрабатывают 400 мл эфира и оставляют перемешиваться на ночь. Осадок отфильтровывают, промывают эфиром и сушат в вакууме. Получают 14,1 г (97 %) (5)-циклобутил 2-амино-пропаноат гидрохлорид (**6**) в виде белого порошка. ¹H ЯМР (400 МГц,

дмсо $-d_6$) δ 8.56 (brs, 3H), 5.00 (p, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.02 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 2.31 (m, 2H), 2.07 (m, 2H), 1.78 (m, 1H), 1.62 (m, 1H), 1.41 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H).

К раствору соединения формулы 6 (14,4 г, 80,2 ммоль) в 214 мл дихлорметана добавляют фенилдихлорфосфат (16,9 г, 80,2 ммоль). Смесь охлаждают до $-75-70$ °C и по каплям добавляют раствор триэтиламина (16,2 г, 160,4 ммоль) в 16 мл дихлорметана, поддерживая температуру $-75-70$ °C. Смесь перемешивают при -70 °C в течение 30 мин и затем нагревают до -20 °C. Добавляют раствор пентафторфенола (14,6 г, 79,4 ммоль) в 105 мл дихлорметана при $-20-10$ °C, затем по каплям раствор триэтиламина (8,1 г, 80,2 ммоль) в 8 мл дихлорметана и смесь оставляют перемешиваться на ночь при комнатной температуре. Смесь упаривают в вакууме, добавляют 500 мл этилацетата и 500 мл воды, органический слой отделяют, промывают 5 % раствором NaHCO_3 , рассолом, сушат над Na_2SO_4 и упаривают в вакууме. К остатку добавляют 200 мл смеси гексан /этилацетат 6:1 и оставляют перемешиваться на ночь. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают 50 мл смеси гексан /этилацетат 6:1 и сушат на воздухе. Получают 16,7 г циклобутил (5)-2-((перфторфеноксид)феноксид)фосфориламинопропаноат (2).

Полученный продукт формулы 2 перекристаллизовывают из 500 мл смеси гексан /этилацетат 4:1 и получают 13,8 г (37 %) циклобутил (5)-2-((5)-(перфторфеноксид)феноксид)фосфориламинопропаноат (2.1) в виде белого рыхлого порошка. ^1H ЯМР (300 МГц, дмсо $-d_6$) δ 7.42 (m, 2H), 7.24 (m, 3H), 6.87 (dd, $J_1 = 14.1$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz, 1H), 4.87 (p, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.94 (m, 1H), 2.23 (m, 2H), 1.94 (m, 2H), 1.71 (m, 1H), 1.58 (m, 1H), 1.27 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H). Маточный раствор от промывки смесью гексан /этилацетат 6:1 при перекристаллизации соединения формулы 2.1 упаривают в вакууме и трижды перекристаллизовывают из гексана. Получают циклобутил (S)-2-((R)-((перфторфеноксид)феноксид)фосфориламинопропаноат (2.2) в виде белого рыхлого порошка. ^1H ЯМР (300 МГц, дмсо $-d_6$) δ 7.42 (m, 2H), 7.26 (m, 3H), 6.85 (dd, $J_1 = 13.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz, 1H), 4.88 (p, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.95 (m, 1H), 2.24 (m, 2H), 1.93 (m, 2H), 1.72 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H).

К раствору трет-бутил (2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-2-(гидроксиметил)-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-3-ил карбоната (7: 5 г, 13,9 ммоль) в 165 мл ТГФ добавляют 1M раствор трет-бутилмагния хлорида в ТГФ (31,3 мл, 31,3 ммоль) под аргоном при 0 °C и смесь перемешивают в течение 30 мин при комнатной

температуре . Затем при помощи шприца добавляют раствор соединения формулы **2.1** (7,8 г, 16,7 ммоль) в 30 мл ТГФ при 0-5 °С и смесь перемешивают под аргоном в течение суток . К смеси добавляют 10 мл метанола и упаривают в вакууме . Остаток растворяют в 500 мл этилацетата , промывают 5 % раствором лимонной кислоты , 5 % раствором NaHCO_3 , сушат над Na_2SO_4 и упаривают в вакууме . Остаток хроматографируют на силикагеле (элюент гексан /этилацетат 1:2). Получают 5,89 г (66 %) циклобутил (5)-2-((5)-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*L*)-3-(*трет*-бутоксикарбонилокси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил)-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксифосфориламино)пропаноат (**8.1**) в виде бесцветной застывшей пены . LC-MS (ESI) 642 (M + H)⁺.

Аналогично получают циклобутил (5)-2-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*i*?)-3-(*трет*-бутоксикарбонилокси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил)-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксифосфориламино)пропаноат (**8**). Выход 52 % . LC-MS (ESI) 642 (M + H)⁺, исходя из полупродуктов формул 7 и 2, и циклобутил (5)-2-(((2*R*,3[^],4*L*,5*L*)-3-(*трет*-бутоксикарбонилокси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил)-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксифосфориламино)пропаноат (**8.2**). Выход 59 % . LC-MS (ESI) 642 (M + H)⁺, исходя из полупродуктов формул 7 и 2.2.

К раствору соединения формулы **8.1** (4,45 г, 6,9 ммоль) в 60 мл дихлорметана при 0 °С добавляют 60 мл трифторуксусной кислоты , смесь перемешивают в течение 15 ч при комнатной температуре , упаривают в вакууме , растворяют в 250 мл DCM, промывают 300 мл 5 % NaHCO_3 , сушат над Na_2SO_4 и упаривают в вакууме . Перекристаллизовывают из смеси этилацетата с метил-*трет*-бутиловым эфиром (1:1). Получают 2,7 г (71 %) циклобутил (5)-2-((5)-(((2*R*,3[^],4*L*,5*L*)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2*H*)-ил)-3-гидрокси-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксифосфориламино)пропаноат (**1.1**) в виде белого поликристаллического вещества . LC-MS (ESI) 542 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц , ДМСО-*d*₆) δ 11.51 (brs, 1H), 7.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.38 (m, 2H), 7.23 (m, 2H), 7.19 (m, 1H), 6.03 (m, 2H), 5.84 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 5.55 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J*₂ = 1.2 Hz, 1H), 4.85 (p, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.27 (m, 1H), 4.01 (m, 1H), 3.83 (m, 2H), 2.23 (m, 2H), 1.95 (m, 2H), 1.71 (m, 1H), 1.56 (m, 1H), 1.25 (d, *J* = 22.8 Hz, 3H), 1.23 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

Перекристаллизация пролекарства формулы **1.1** из различных растворителей приводит к получению поликристаллических или кристаллической форм . При перекристаллизации из смеси этилацетата с метил-*трет*-бутиловым эфиром (1:1), этанола ,

этилацетата и смеси уксусной кислоты с водой получают пролекарство формулы **1.1** в поликристаллических формах, включающих в основном ромбическую фазу с параметрами элементарной ячейки $a = 28.1056(8)$ Å, $b = 16.8998(4)$ Å, $c = 5.25380(12)$ Å и моноклинную фазу с параметрами элементарной ячейки $a = 16.2770(6)$ Å, $b = 16.9117(8)$ Å, $c = 5.20429(15)$ Å, $\beta = 117.822(2)^\circ$.

При перекристаллизации пролекарства формулы **1.1** из смеси диметилсульфоксида с водой получают вещество в белой кристаллической форме, состоящей из ромбической фазы с параметрами элементарной ячейки $a = 28.1056(8)$ Å, $b = 16.8998(4)$ Å, $c = 5.25380(12)$ Å.

Растворимость кристаллической и поликристаллических форм после перекристаллизации из различных растворителей при pH = 2 и pH = 7 близка и составляет 0,18 - 0,25 мг/мл. Исключение составляет поликристаллический образец, полученный при перекристаллизации из диметилсульфоксида, растворимость которого несколько выше и имеет значение 0,63 - 0,67 мг/мл (Таблица 1).

Таблица 1. Кинетическая растворимость поликристаллических и кристаллической форм пролекарства формулы **1.1** при длине волны 260 нм

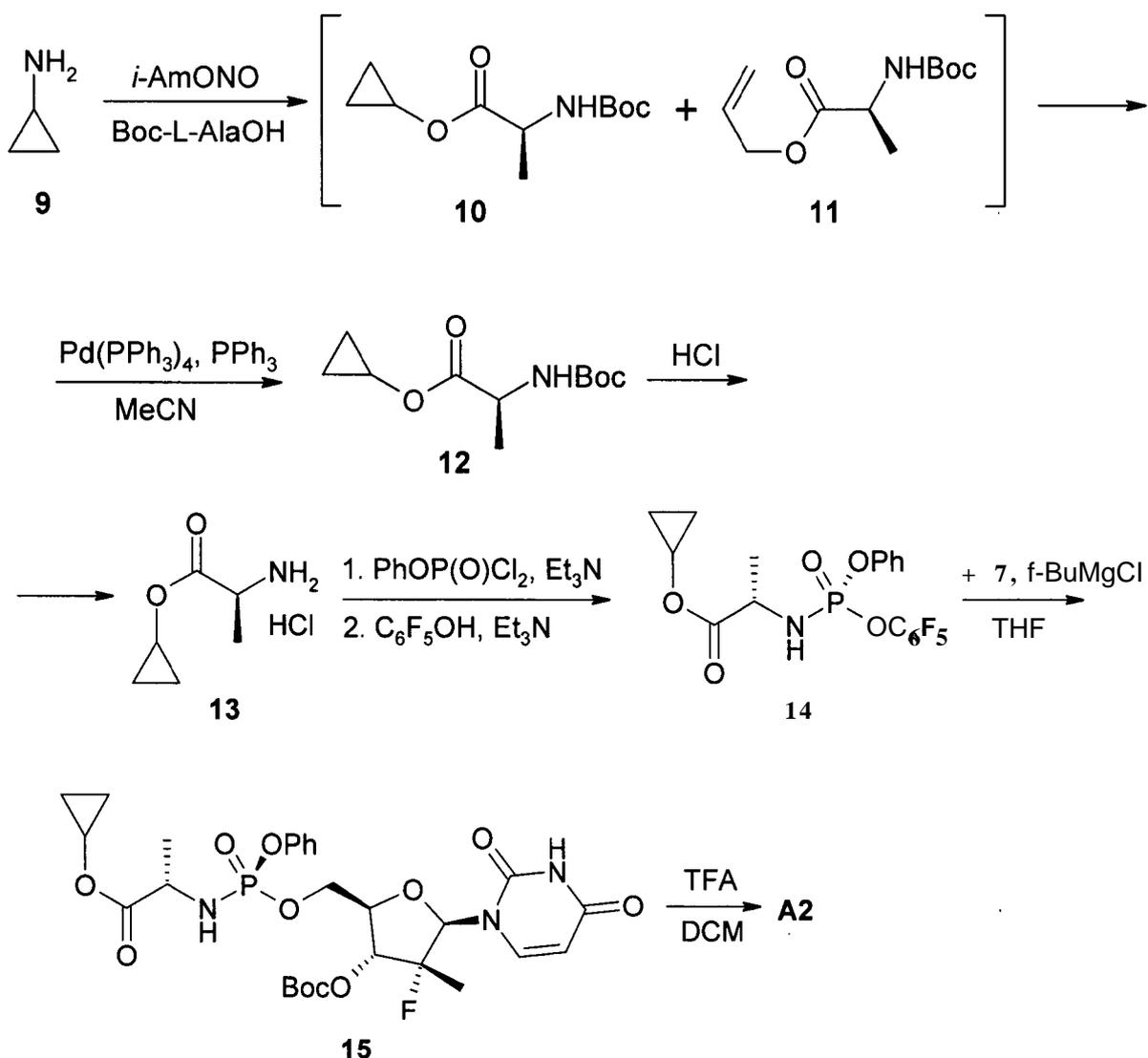
Пролекарство 1.1 перекристаллизовано из	Форма пролекарства 1.1	Растворимость, мг/мл			
		при pH = 2		при pH = 7	
		значение	SD	значение	SD
Смеси этилацетата с метил- <i>трет</i> - бутиловым эфиром	поликристалл	0.25	0.00	0.24	0.001
Этанола	поликристалл	0.20	0.00	0.20	0.003
Этилацетата	поликристалл	0.22	0.00	0.22	0.002
Уксусной кислоты	поликристалл	0.63	0.009	0.67	0.041
Диметилсульфоксида	кристалл	0.18	0.00	0.18	0.003

Аналогично получают циклобутил (S)-2-(((2*i*?,3*i*?,4/?5*i*?)5-(2,4-^нОКСо-3,4-дигидропиримидин -1(2//)-ил)-3-гидрокси -4-метил -4-фтор -тетрагидрофуран -2-ил)метокси)-(феноксид)-фосфориламино)-пропаноат (**1**) с выходом 58%. LC-MS (ESI) 542 (M+H)⁺ и циклобутил (5)-2-((Л)-((2Л,3Л,4Л,5Л)-5-(2,4-диоксо -3,4-дигидропиримидин -1(2*H*)-ил)-3-гидрокси -4-метил -4-фтор -тетрагидрофуран -2-ил)метокси)-(феноксид)-фосфориламино)-пропаноат (**1.2**) с выходом 64%. LC-MS (ESI) 542 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (300

МГц, ДМСО- d_6) δ 11.53 (brs, 1H), 7.56 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.38 (m, 2H), 7.19 (m, 3H), 6.08 (m, 2H), 5.91 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 5.57 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.85 (p, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.27 (m, 1H), 4.05 (m, 1H), 3.79 (m, 2H), 2.23 (m, 2H), 1.94 (m, 2H), 1.70 (m, 1H), 1.56 (m, 1H), 1.24 (d, $J = 23.4$ Hz, 3H), 1.21 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H).

Пример 2. Протокол синтеза пролекарства циклопропил (5)-2-((5)-(((2i?,3i?,4i?,5i?)-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2//)-ил)-3-гидрокси-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-ил)метокси)-(фенокси)-фосфориламино)-пропаноат формулы А2 (Схема 2).

Схема 2



Циклопропиламин (9: 4,06 мл, 58,8 ммоль) и Вос-L- аланин (22,2 г, 58,8 ммоль) растворяют в 250 мл хлороформа и при охлаждении льдом прибавляют изоамил нитрит (7,9 мл, 58,8 ммоль). Смесь перемешивают 16 ч, не убирая охлаждения, упаривают досуха и хроматографируют на силикагеле (элюент этилацетат:гексан 1:8). Получают 7,68 г (57 %) смеси циклопропилового эфира формулы **10** и аллилового эфира формулы **11**, соотношение 1:4 (по данным ^1H ЯМР). Полученную смесь эфиров формул **10** и **11** растворяют в 120 мл ацетонитрила и под аргоном добавляют трифенилфосфин (446 мг, 1,7 ммоль) и $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (984 мг, 0,85 ммоль), раствор охлаждают льдом и добавляют раствор пирролидина (2,49 г, 35 ммоль) в 30 мл ацетонитрила. Смесь перемешивают под аргоном при 0-4 °С в течение 16 ч, затем упаривают досуха и хроматографируют на силикагеле (элюент этилацетат :гексан 1:8). Получают 1,38 г (5)-циклопропил 2-(*трет*-бутоксикарбониламино)пропаноат (**12**). ^1H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 5,04 (уш. с, Ш), 4,26 (м, 1H), 4,19 (м, Ш), 1,46 (с, 9H), 1,37 (д, $J = 7,2$ Гц, 3H), 0,74 (м, 4H).

К раствору соединения формулы **12** (3,5 г, 15,3 ммоль) в 10 мл диоксана добавляют 20 мл 3M раствора HCl в диоксане. Смесь перемешивают 2 ч при комнатной температуре, затем упаривают досуха. Получают (5)-циклопропил 2-амино-пропаноат гидрохлорид (**13**) с количественным выходом (2,53 г). ^1H ЯМР (DMCO - d_6 , 300 МГц) δ 8,65 (уш. с, 3H), 4,19 (м, 1H), 3,99 (к, $J = 6,9$ Гц, Ш), 1,39 (д, $J = 6,9$ Гц, 3H), 0,73 (м, 4H).

К охлажденному до -70 °С раствору соединения формулы **13** (2,53 г, 15,3 ммоль) и фенилдихлорфосфата (3,23 г, 15,3 ммоль) в 50 мл дихлорметана добавляют по каплям раствор триэтиламина (4,26 мл, 30,6 ммоль) в 10 мл дихлорметана. Затем охлаждение убирают и дают реакционной смеси нагреться до -10 °С, после чего прикапывают отдельно приготовленную смесь пентафторфенола (2,82 г, 15,3 ммоль) и триэтиламина (2,13 мл, 15,3 ммоль) в 15 мл дихлорметана. По окончании прибавления реакционную массу перемешивают 12 ч при комнатной температуре, после чего упаривают и остаток обрабатывают 50 мл бензола. Осадок отфильтровывают и промывают 15 мл бензола. Фильтрат промывают насыщенным раствором гидрокарбоната натрия, сушат над сульфатом натрия и упаривают. К остатку прибавляют смесь этилацетат:гексан 1:4 из расчета 8 мл на 1 г вещества и интенсивно перемешивают в течение 16 ч. Осадок отфильтровывают и перекристаллизовывают из смеси этилацетат :гексан 1:4. Получают 1,02 г (14 %) (S)-циклопропил 2-((5)-(перфторфенокси)-(фенокси)-фосфориламино)-пропаноата (**14**). LC-MS

(ESI) 452 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (CDC1₃, 300 МГц) δ 7,38 (м, 2H), 7,26 (м, 3H), 4,17 (м, 1H), 3,96 (м, 1H), 1,46 (д, J = 7,2 Гц, 3H), 0,74 (м, 4H).

К раствору трет-бутил (2R, 3R,4R,5/?)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2#)-ил)-2-(гидроксиметил)-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-3-ил карбоната (**7**: 820 мг, 1,85 ммоль) в 25 мл сухого ТГФ при охлаждении льдом прикапывают 1M раствор *t*-BuMgCl в ТГФ (4 мл, 0,4 ммоль). Охлаждение убирают и реакционную массу перемешивают полчаса при комнатной температуре. Затем снова охлаждают льдом и прикапывают раствор соединения формулы **14** (1,02 г, 2,18 ммоль) в ТГФ. Реакционную массу перемешивают 12 ч при комнатной температуре, после чего обрабатывают насыщенным раствором хлорида аммония. Органическую фазу отделяют, водную экстрагируют дихлорметаном. Объединенные экстракты сушат над сульфатом натрия и фильтруют. Получают 1,16 г (5)-циклопропил 2-((S)-(((2L,3R,4R,5L)-3-(трет-бутоксикарбонилокси)-5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2[^])-ил)-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-ил)метокси)-(феноксид)-фосфориламино)-пропаноата (**15**), который использовали в следующей стадии без дополнительной очистки. LC-MS (ESI) 628 (M+H)⁺.

К раствору соединения формулы **15** (1,16 г, 1,85 ммоль) в 20 мл дихлорметана при охлаждении льдом добавляют 20 мл трифторуксусной кислоты. Реакционную массу перемешивают 3 ч, после чего концентрируют в вакууме. Остаток растворяют в дихлорметане, добавляют воду и нейтрализуют гидрокарбонатом натрия. Органический слой отделяют, сушат над сульфатом натрия и упаривают досуха. Остаток хроматографируют на силикагеле (хлороформ:метанол), а затем прекристаллизовывают из смеси этилацетат:МТБЭ. Получают 505 мг (5)-циклопропил 2-((S)-(((2i?,3i?,4i?,5i?)5-(2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)-3-гидрокси-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-ил)метокси)-(феноксид)-фосфориламино)-пропаноата формулы **A2**. (52%). LC-MS (ESI) 528 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 400 МГц) δ 11,24 (уш. с, 1H), 7,56 (д, J = 8,1 Гц, 1H), 7,38 (м, 2H), 7,20 (м, 3H), 6,05 (м, 2H), 5,86 (м, 1H), 5,54 (д, J = 8,1 Гц, 1H), 4,36 (м, 1H), 4,23 (м, 1H), 4,02 (м, 2H), 3,82 (м, 2H), 1,25 (д, J = 22,2 Гц, 3H), 1,21 (д, J = 6,6 Гц, 3H), 0,66 (м, 2H), 0,57 (м, 2H).

Пример 3. Получение фармацевтической композиции в виде таблетки .

Крахмал (500 мг), молотую лактозу (800 мг), тальк (200 мг) и 1500 мг пролекарства формулы 1.1 смешивали друг с другом и прессовали в бар. Полученный брусок измельчали в гранулы и просеивали через сито, чтобы собрать гранулы размером 14-16 меш. Полученные таким образом гранулы были сформированы в таблетки подходящей формы весом 400 или 800 мг каждая .

Пример 4. Получение фармацевтической композиции в виде капсул .

Пролекарство формулы 1.1 тщательно смешивали с порошком лактозы в соотношении 1:1. Полученную порошкообразную смесь упаковывали в желатиновые капсулы подходящего размера по 200 мг или 400 мг в каждой капсуле .

Пример 5. Получение фармацевтической композиции в форме композиций для внутримышечных, внутрибрюшинных или подкожных инъекций .

Смешивали 500 мг пролекарства формулы 1.1, 300 мл хлорбутанола, 2 мл пропиленгликоля и 100 мл воды для инъекций. Полученный раствор фильтровали, помещали в ампулы по 5 мл и запечатывали .

Пример 6. Определение анти-HCV активности и цитотоксичности пролекарств формул 1.1, A2 и Sovaldi®.

Для определения противовирусной активности тестируемых композиций, включающих пролекарства, использовалась клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека Huh7, стабильно трансфицированная репликоном вируса гепатита С (HCV). По 50 мкл клеточной суспензии в полной культуральной среде (DMEM IX, Cellgro; кат. # 10-013-CV) переносили в 96-луночные плашки с итоговой плотностью 7500 клеток на лунку. Серийное разведение тестируемых пролекарств готовили из свежеприготовленного 200-кратного исходного раствора в ДМСО с 11 концентрационными точками с шагом разведения 3 от 20 нМ в полной среде и использовали в качестве 2-кратных растворов. Не менее чем через 4 часа после посадки клеток добавляли по 50 мкл растворов серийных разведений пролекарств. Конечная концентрация пролекарств составляла от 10 нМ до 0.1 пМ, а ДМСО - 0.5%. Плашку с клетками инкубировали в течение 3 дней при 37 °С в

увлажненной атмосфере 5% CO₂. После инкубации среда была удалена переворачиванием плашки с аккуратным встряхиванием. Клетки фиксировали 100 мкл 1:1 раствора ацетон :метанол в течение 1 минуты, промывали 3 раза фосфатным буфером (PBS) и затем блокировали 150 мкл /лунку 10% бычьей фетальной сывороткой (FBS) в PBS в течение часа при комнатной температуре. Далее клетки промывали 3 раза PBS и инкубировали в течение 2 часов при 37 °C с 100 мкл /лунку антителами к неструктурному белку 5B (NS5B) HCV (Affinity BioReagents; кат. # MA 1-080, исходный раствор (1 мг/мл) разводили 1:4000 в 10% FBS-PBS). Клетки промывались 3 раза PBS проявлялись 100 мкл /лунку раствора OPD (на 1 плашку : 1 таблетка OPD, растворённая в 12 мл цитрат /фосфатного буфера с добавлением 5 мкл 30% H₂O₂) в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали 100 мкл /лунку 2N H₂SO₄, после чего измеряли OD₄₉₀ с помощью мультифункционального ридера Victor³ V 1420 (Perkin Elmer). Значения EC₅₀ тестируемых пролекарств определяли построением кривой активности в программе GraphPad Prism. Новое пролекарство формулы **1.1** по отношению к генотипу 1b (gT1b) HCV имеет EC₅₀ = 15.0-27.0 нМ и EC₉₀ = 128.0 нМ, Sovaldi[®] имеет EC₅₀ = 45-170 нМ и EC₉₀ = 590 нМ, циклогексильный эфир формулы **A 1** имеет EC₉₀ = 250.0 нМ, а циклопропиловый эфир формулы **A 2** имеет EC₅₀ = 73.0 нМ и EC₉₀ = 410.0 нМ (Таблица 1а), т.е. новое пролекарство формулы **1.1** более чем в три раза активнее, чем Sovaldi[®], в два раза активнее, чем соединение формулы **A 1**, и более чем в три раза активнее, чем соединение формулы **A 2**.

Таблица 1а. Ингибирующая активность пролекарств формул **1.1**, **A1**, **A 2** и Sovaldi[®] по отношению к gT1b NS5B HCV

Пролекарство	10% FBS		
	EC ₅₀ , нМ	EC ₉₀ , нМ	CC ₉₀ , μМ
1.1	15.0-27.0	128.0	>100
Sovaldi [®]	45.0-170.0	520.0**	>100**
A1		250.0**	
A 2	73.0	410.0	

по данным *http://www.hcvdruginfo.ca/HCV_Sofosbuvir.pdf;
** M . J. Sofia et al. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 7202-7218.

Цитотоксичность тестируемых композиций, включающих пролекарства, определялась параллельно на той же клеточной линии Huh7 с помощью набора ATPLite (Perkin-Elmer, Boston, USA) в соответствии с инструкцией производителя: По 50 мкл клеточной суспензии в полной культуральной среде (DMEM IX, Cellgro; кат. # 10-013-CV) переносили в 96-луночные плашки с чёрными стенками и прозрачным дном с итоговой плотностью 7500 клеток на лунку. Через 18 часов после посадки клеток добавляли по 50 мкл растворов серийных разведений соединений. Плашку с клетками инкубировали в течение 4 дней при 37 °С в увлажненной атмосфере 5% CO₂. Далее клетки промывали 2 раза 200 мкл/лунку PBS и лизировали добавлением 50 мкл/лунку лизирующего буфера (все реактивы из набора ATPLite). После помешивания в течение 5 минут на шейкере добавляли 50 мкл/лунку субстрата. После дополнительной 5-минутной инкубации плашку хранили 10 минут в темноте и считывали люминесценцию в лунках с помощью мультифункционального ридера Victor³ V 1420 (Perkin Elmer). Значения CC₅₀ тестируемых соединений определяли построением кривой цитотоксичности в программе GraphPad Prism. В частности, для нового пролекарства формулы 1.1 найдены значения цитотоксичности CC₅₀ > 100 мкМ (Таблица 1a) и терапевтического окна (терапевтический индекс TI = EC₅₀/CC₅₀) TI > 6,000.0.

Пример 7. Определение кинетической растворимости веществ.

Принцип метода. Изучаемое вещество растворяют в ДМСО до концентрации 10 мМ, затем вносят в водный растворитель (фосфатный буфер, вода, универсальные буферы с различными рН) до концентрации 200 мкМ. Полученный раствор инкубируют в течение часа при комнатной температуре на шейкере в 96-луночной фильтровальной плашке (Millipore's MultiScreen Solubility Filter Plate), после этого осадок отфильтровывают под вакуумом. Спектр поглощения вещества регистрируют на спектрофотометре в диапазоне 240-400 нм с шагом 10 нм. Для количественных расчетов растворимости используют калибровочную кривую стандартных растворов (0 - 200 мкМ) с содержанием 40% ацетонитрила. Диапазон определяемых концентраций 3-200 мкМ. Тестирование проводится в дубликатах.

Приготовление калибровочных стандартов. Калибровочные стандарты готовили из 50-кратных сток-растворов в ДМСО с последующим разбавлением их в буфере с 40%

содержанием ацетонитрила, который добавлялся чтобы обеспечить полную растворимость тестируемого соединения в калибровочном образце. 6 стандартных образцов с концентрациями 0, 3,125, 12,5, 50, 100 и 200 мкМ были приготовлены в лунках 96-луночного UV-планшета путем добавления 4 мкл соответствующих 50х сток-растворов в ДМСО к 196 мкл буфера с 40% содержанием ацетонитрила. При этом концентрация ДМСО во всех точках оставалась постоянной и была равна 2% (v/v).

Для построения калибровочных кривых сняли оптический спектр UV-планшета в диапазоне длин волн от 250 нм до 400 нм с шагом 10 нм. Из полученных спектров для каждого соединения были выбраны длины волн, отвечающие следующим критериям:

- При минимальной концентрации вещества $OD > 0.1$ (AU)
- При максимальной концентрации вещества $OD < 2.0$

Калибровочная кривая была построена для каждого соединения по зависимости OD при выбранной длине волны от концентрации.

Определение кинетической растворимости соединений. Растворимость определяли в фильтровальном планшете MultiScreen Solubility (Millipore Corp.) следующим образом:

- В лунку фильтровального планшета MultiScreen Solubility добавили 196 мкл буфера (без ацетонитрила) и 4 мкл ЮММ вещества в ДМСО либо 4 мкл ДМСО (для холостого образца). Планшет инкубировали в течение часа на шейкере (400 об/мин) при комнатной температуре.
- После инкубации растворы отфильтровали через фильтровальный планшет с помощью вакуума (10" Hg) в полипропиленовый планшет с U-образным дном.
- Из планшета с U-образным дном перенесли 120 мкл/лунку фильтрата в новый UV-планшет, после чего добавили туда 80 мкл/лунку ацетонитрила.
- Измерили оптическую плотность полученных растворов при выбранной ранее длине волны для каждого соединения.

Расчеты. Финальная концентрация вещества в фильтрате рассчитывалась по формуле:

$$C_{\text{фильтрат}} = (OD_{\lambda}^{\text{Filtrate}} - OD_{\lambda}^{\text{Blank}}) / \text{Slope} \times 1,67,$$

где:

$OD_{\lambda}^{\text{Filtrate}}$ - оптическая плотность фильтрата при выбранной длине волны,

$OD_{\lambda}^{\text{Blank}}$ - OD холостого образца,

Slope - тангенс угла наклона калибровочной прямой ,

1.67 - коэффициент разбавления фильтрата ацетонитрилом .

Полученные результаты представлены в Таблице 1.

Пример 8. Порошковые рентгенофазовые исследования образцов пролекарств .

Все дифрактограммы зарегистрированы на дифрактометре Bruker D8 Advance Vario, оснащенном рентгеновской трубкой с медным анодом и Ge(I 11)-монохроматором (SiCo ^) и позиционно -чувствительным детектором LynxEye, в установках на просвет . Интервал съёмки составил $3-90^{\circ} 2\theta$ для образца s5 и $5.7-90^{\circ} 2\theta$ для остальных образцов , шаг $0.01^{\circ} 2\theta$. Анализ проводили в программе Bruker Topas5 [Bruker TOPAS 5 User Manual. — Karlsruhe, Germany : Bruker AXS GmbH, 2015.].

Образцы , полученные перекристаллизацией соединения формулы **1.1** из смеси этилацетата с метил -*трет*-бутиловым эфиром (1:1), этанола , этилацетата и смеси уксусной кислоты с водой , имеют поликристаллическую форму . Порошковые рентгенофазовые исследования этих образцов имеют одинаковый качественный фазовый состав и незначительно различаются соотношением фаз. Образцы содержат ромбическую фазу с параметрами элементарной ячейки $a = 28.1056(8) \text{ \AA}$, $b = 16.8998(4) \text{ \AA}$, $c = 5.25380(12) \text{ \AA}$. Анализ систематических погасаний позволяет предположить пространственную группу $P2_12_12_1$. Объем элементарной ячейки $2495.45(11) \text{ \AA}^3$ соответствует заявленному составу и $Z' = 1$. Образцы содержат также моноклинную фазу с параметрами элементарной ячейки $a = 16.2770(6) \text{ \AA}$, $b = 16.9117(8) \text{ \AA}$, $c = 5.20429(15) \text{ \AA}$, $\beta = 117.822(2)^{\circ}$. Систематические погасания позволяют предположить пространственную группу $P2_1$. Объем элементарной ячейки $1266.98(9) \text{ \AA}^3$ соответствует заявленному составу и $Z' = 1$. Оценка соотношения фаз, основанная на сравнении интегральных интенсивностей пиков , предсказывает содержание моноклинной фазы от 30 до 50%.

Образец , полученный перекристаллизацией соединения формулы **1.1** из смеси диметилсульфоксида с водой , представляет собой белое вещество кристаллической формы . Образец этой формы по данным порошковых рентгенофазовых исследований однофазен и состоит из ромбической фазы с параметрами элементарной ячейки $a = 28.1056(8) \text{ \AA}$, $b = 16.8998(4) \text{ \AA}$, $c = 5.25380(12) \text{ \AA}$. Анализ систематических погасаний позволяет предположить пространственную группу $P2_12_12_1$. Объем элементарной ячейки $2495.45(11) \text{ \AA}^3$

A^3 соответствует заявленному составу и $Z' = 1$.

Пример 9. Определение стабильности в биологических средах композиций, включающих пролекарство формулы 1.1.

Исходные композиции, включающие пролекарство формулы 1.1 (тестируемое соединение), были приготовлены с концентрацией 10 мМ в ДМСО, из которых затем готовили 100-кратные рабочие растворы с концентрацией 100 мкМ в смеси ацетонитрил : вода с объемным отношением 1:1.

а) Стабильность в S9 фракции. Реакционная смесь была приготовлена в 0,1 М калия фосфатном буфере (рН 7,4 BD Gentest) в общем финальном объеме 250 мкл и содержала 1 мМ NADPH-тетранатриевую соль (AppliChem), 7 мМ глюкозо-6-фосфат натриевую соль (Sigma), 1,5 У/мл глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу (Sigma), 3,3 мМ $MgCl_2$ (Sigma), 5 мМ уридин-5-дифосфат-глюкуроновой кислоты тринатриевую соль (УДФГК, Sigma) и 1 мкМ тестируемого соединения (указаны финальные концентрации). Метаболическая реакция была инициирована путем добавления суспензии S9 фракции печени человека (BD Gentest), финальная концентрация белка составляла 1 мг/мл. Реакционная смесь инкубировалась при 37 °С на шейкере (Vortemp56) с перемешиванием при 400 об/мин. Через определенные промежутки времени (0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 ч) проводился отбор проб в объеме 30 мкл, реакция останавливалась путем добавления к отобранной пробе 180 мкл холодного ацетонитрила, содержащего внутренний стандарт. Осаждение белков проводилось на льду в течение 15 мин. После чего образцы центрифугировались, и в течение 10 мин при 3000 об/мин. 150 мкл супернатанта отбиралось для анализа. Инкубация проводилась в двух повторах, каждая проба измерялась дважды.

б) Стабильность в искусственном желудочном и кишечном соках. Тестируемую композицию, включающую пролекарство формулы 1.1 в конечной концентрации 1 мкМ инкубировали в искусственном желудочном соке (0,2% NaCl в 0,7% v/v HCl) и искусственном кишечном соке (0,05М KH_2PO_4 , рН б) 6,75). Инкубацию проводили в шейкере-инкубаторе (Vortemp56) при 37 °С и перемешивании при 300 об/мин. Через определенные промежутки времени (0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 ч) проводился отбор проб в объеме 30 мкл, реакция останавливалась путем добавления к отобранной пробе 180 мкл холодного ацетонитрила, содержащего внутренний стандарт. После чего образцы

центрифугировались , и в течение 10 мин при 3000 об/мин . 150 мкл супернатанта отбиралось для анализа . Инкубация проводилась в двух повторах , каждая проба измерялась дважды .

в) Стабильность в плазме крови . Тестируемое соединение в конечной концентрации 1 мкМ инкубировали в пулированной плазме крови человека .(Innovative Research). Инкубацию проводили в шейкере -инкубаторе (Vortemp56) при 37 °С и перемешивании при 300 об/мин . Через определенные промежутки времени (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 8, 24 ч) проводился отбор проб в объеме 30 мкл , реакция останавливалась путем добавления к отобранной пробе 180 мкл холодного ацетонитрила , содержащего внутренний стандарт . После чего образцы центрифугировались , и в течение 10 мин при 3000 об/мин . 150 мкл супернатанта отбиралось для анализа . Инкубация проводилась в двух повторах , каждая проба измерялась дважды .

Анализ проб . Анализ проб проводился методом ВЭЖХ -М С/М С, разработанным для каждого тестируемого пролекарства , с использованием хроматографической системы 1290 Infinity II (Agilent Technologies), сопряженной с tandemным масс -спектрометром QTRAP5500 (А В Sciex). При разработке условий масс -спектрометрического детектирования растворы тестируемых соединений в смеси ацетонитрил -вода 1:1 с концентрацией 100 нг/мл анализировали путем прямого ввода в масс -спектрометр при помощи шприцевого насоса при ионизации электрораспылением в режиме регистрации положительных ионов . При сканировании в режиме полного ионного тока (MS1) определяли молекулярный ион для каждого соединения , основные ионы -продукты регистрировали в режиме MS2. Далее была проведена оптимизация М С/М С метода в режиме MRM для достижения максимальной чувствительности . При количественной обработке хроматограмм использовали наиболее интенсивный MRM-переход для аналита и внутреннего стандарта . Хроматографическое разделение проводили на колонке YMC Triart C 18, 50x2.мм, 1,9 мкм в градиентном режиме элюирования в подвижной фазе состава 0,1% муравьиная кислота в воде - 0.1% муравьиная кислота в ацетонитриле . В качестве внутреннего стандарта использовали толбутамид (Fluka).

Вычисления . По кинетике убыли тестируемого пролекарства в противовирусной композиции в процессе инкубации в биологической среде рассчитывали время полураспада ($T_{1/2}$). Для расчетов использовали нормированные на сигнал внутреннего стандарта значения площадей хроматографических пиков веществ в опытных образцах . По линейной

зависимости лог-нормированных площадей хроматографических пиков от времени рассчитывали константу скорости элиминации (k - наклон линейного участка). Далее рассчитывали время полураспада: $T_{1/2} = 0.693 / k$. В частности, было найдено (Таблица 2), что пролекарство формулы **1.1**, соединение формулы **A 1** и Sovaldi® имеют сопоставимую стабильность в человеческом желудочный соке ($T_{1/2}^{SGF} = 12.7 - 17$ ч), в человеческом кишечном соке ($T_{1/2}^{SIF} > 20$ ч) и в человеческой плазме ($T_{1/2}^{HPL} > 24$ ч). В то же время пролекарство формулы **1.1** более быстро метаболизирует в S9 фракции микросом печени человека и имеет время полураспада $T_{1/2}^{HS9} = 0.05$ ч, в то время как его прототип Sovaldi® имеет $T_{1/2}^{HS9} = 0.57$ ч, а циклогексильный эфир формулы **A 1** имеет $T_{1/2}^{HS9} = 1.4$ ч (Таблица 2), т.е. пролекарство формулы **1.1** в 11 раз быстрее метаболизирует в S9 фракции микросом печени человека, чем Sovaldi® и в 28 раз быстрее, чем соединение формулы **A 1**.

Таблица 2. Стабильность и активность противовирусных композиций, включающих новое пролекарство формулы **1.1** и Sovaldi®

ID	$T_{1/2}$ (ч)			
	SGF	SIF	human plasma	human S9
1.1	12.7	>24	>24	0.05
Sovaldi®	22.0*	>24*	>24*	0.57*
A1	17*	>20*	>24*	1,4*
*по данным M. J. Sofia et al. <i>J. Med. Chem.</i> 2010, 53, 7202–7218.				

Пример **10**. Изучение фармакокинетики (PK) композиций, включающих пролекарство формулы **1.1** и Sovaldi®, в печени крыс.

Приготовления композиций, включающих пролекарство формулы 1.1 и Sovaldi®, для введения крысам. Исследуемую композицию вводили в дозе 50 мг/кг. Для этого готовили композиции с концентрацией пролекарства формулы **1.1** или Sovaldi® 5,0 мг/мл в 0,5% р-ре гидроксипропил-метил целлюлозе (HPMC) с добавкой 5% этанола следующим образом: к навеске пролекарства формулы **1.1** или Sovaldi® добавляли необходимое количество HPMC и на сухую перетирали в ступке, затем постепенно порционно добавляли необходимое количество 5%-го этанола в дистиллированной воде, тщательно перемешивали до получения суспензии, пригодной для внутривентрикулярного введения.

Введение композиций , включающих пролекарство формулы 1.1 и Sovaldi[®], животным . Получение образцов плазмы крови и печени . Исследование проводилось на лабораторных крысах линии Sprague Dawley. Крыс разделили на группы соответственно выбранным временным точкам (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 и 24 ч) по 6 животных в группе . Животных взвешивали , рассчитывали объем вводимых композиций , включающих пролекарство формулы 1.1 или Sovaldi[®], для каждого животного из расчета 10 мл/кг. Введение композиций , включающих пролекарство формулы 1.1 или Sovaldi[®], проводили внутривентрикулярно через зонд . Между введениями животным одной временной точки делали промежутки , достаточные для взятия образца печени и крови . Через необходимый промежуток времени после введения крысу эвтаназировали ингаляцией CO₂. Немедленно после эвтаназии животное как можно быстрее вскрывали , отрезали верхнюю долю печени и сразу бросали ее в жидкий азот . Замороженный фрагмент печени помещали в промаркированную охлажденную в жидком азоте пробирку . До завершения эксперимента образцы хранили в жидком азоте , затем перемещали в низкотемпературный морозильник на -80 °С .

Пробоподготовка . Навеску печени массой около 1 г перетирали в ступке при охлаждении жидким азотом , полученный порошок заливали трехкратным объемом метанола с 70% метанола с ЭДТА и гомогенизировали с помощью гомогенизатора Omni Bead Ruptor 24 на скорости 6.3 м/сек по 45 сек 2 раза с интервалом 10 сек . К 360 мкл полученного гомогената добавляли 40 мкл десятикратного стандартного раствора , содержащего PSI-7409 и H027-4261 (или метанола в случае экспериментальных проб) , и 100 мкл раствора внутреннего стандарта (5-бромуридин трифосфата) с концентрацией 25т нг/мл. После перемешивания и центрифугирования 400 мкл супернатанта разбавляли 400 мкл раствора 1% муравьиной кислотой в смеси метанол - вода (1:1). Проводили твердофазную экстракцию на картриджах Waters Oasis WAX, элюировали 800 мкл 5% раствора аммиака в метаноле , элюат упаривали и перерастворяли в 200 мкл метанола .

Условия ВЭЖХ -МС/МС анализа . Анализ проводили методом ВЭЖХ -МС/МС с помощью ВЭЖХ системы Agilent 1290 Infinity II, соединенной с масс-спектрометром А В Sciex QTrap 5500. Разделение проводили на колонке Thermo Hypercarb (50x3мм, 5 мкм) , в качестве подвижной фазы А (ПФА) использовали раствор 25 мМ ацетата аммония с добавкой 0.5% аммиака , в качестве подвижной фазы Б (ПФБ) - раствор 25 мМ ацетата

аммония в смеси вода-изопропанол -ацетонитрил (1:1:3) с добавкой 0.5% аммиака .
Разделение проводили в градиентном режиме : 0-0.3 мин - 5% ПФБ ; 3-3.4 мин - 50% ПФБ ;
3.6-4.5 мин - 5% ПФБ , Регистрацию PSI-7409 и H 027-4261 проводили в MRM режиме по
ионным переходам 499/159 и 410/150 соответственно .

Фармакокинетический анализ . Фармакокинетический анализ данных «концентрация
в печени - время» выполнялся модельно -независимым методом с помощью программы
Phoenix™ WinNonlin® 6.3 (Pharsight Corp.) и программы GraphPad Prizm. Рассчитывались
следующие фармакокинетические параметры : максимальная концентрация в печени ($C_{T_{ax}}$) и
время ее достижения ($T_{T_{ax}}$), период полувыведения ($T_{1/2}$), площадь под ФК кривой (AUC_{0-t} ,
AUCo-inf). Полученные данные представлены в Таблице 3. Как видно из Таблицы 3,
концентрация и $AUC_{24 ч}$ трифосфата PSI-7409, образующегося при метаболизме
пролекарства формулы 1.1 в печени крыс , составляют $C_{T_{ax}} = 3,224.0$ нг/г и $AUC_{24 ч} =$
30,487.0 нг.ч/г, в то время как при аналогичном метаболизме Sovaldi® имеет $C_{T_{ax}} = 1,934.0$
нг/г и $AUC_{24 ч} = 16,796.0$ нг.ч/г, а циклогексильный эфир формулы А 1 имеет $C_{T_{ax}} = 557$ нг/г
и $AUC_{24 ч} = 6,484.0$ нг.ч/г (Таблица 3). Это свидетельствует о том , что новое пролекарство
формулы 1.1 почти в 2 раза более эффективно метаболизирует в печени в нужный
трифосфат PSI-7409 (лекарство), чем Sovaldi®, и в 4,7 раза более эффективно
метаболизирует , чем циклогексильный эфир формулы А 1.

Таблица 3. PK параметры трифосфата PSI-7409 в печени крыс после перорального введения пролекарства формулы 1.1 и Sovaldi® в дозе 50 мг/кг

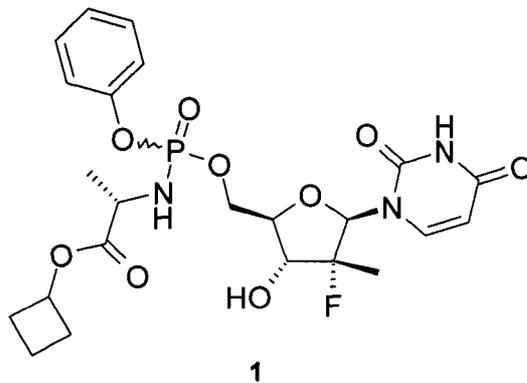
Параметры PK	Обработка результатов PK с использованием программы		По данным M. J. Sofia et al. <i>J. Med. Chem.</i> 2010, 53, 7202–7218.	
	Phoenix™ WinNonlin® 6.3	GraphPad Prizm		
	Пролекарство 1.1		Sovaldi®	Пролекарство A1
$T_{1/2}$, ч	7.2	5.5		
T_{max} , ч	8.0	4.0	4.0	2.0
C_{max} , нг/г	3,224.0	3,102.0	1,934	557.0
C_{24} ч, нг/г	320.0			
AUC_{24} ч, нг·ч/г	30,487.0	30,444.0	16,796.0	6,487.0
AUC_{0-inf} , нг·ч/г	33,823.0		18,080.0	8,831.0

Промышленная применимость

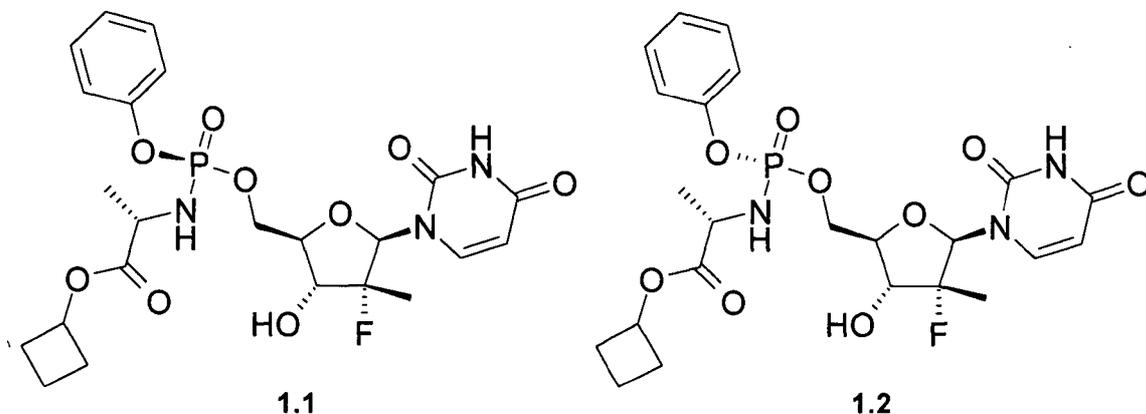
Изобретение может быть использовано в медицине и ветеринарии .

Формула изобретения

1. Циклобутил (5)-2-[[$(2R,3R,4R,5R)$ -5-(2,4-диоксо-3,4-дигидро-2H-пиримидин-1-ил)-4-фтор-3-гидрокси-4-метил-тетрагидрофуран-2-илметокси]-фенокси-фосфориламино]-пропаноат общей формулы **1**, его стереоизомер, изотопно-обогащенный аналог, кристаллическая или поликристаллическая форма,

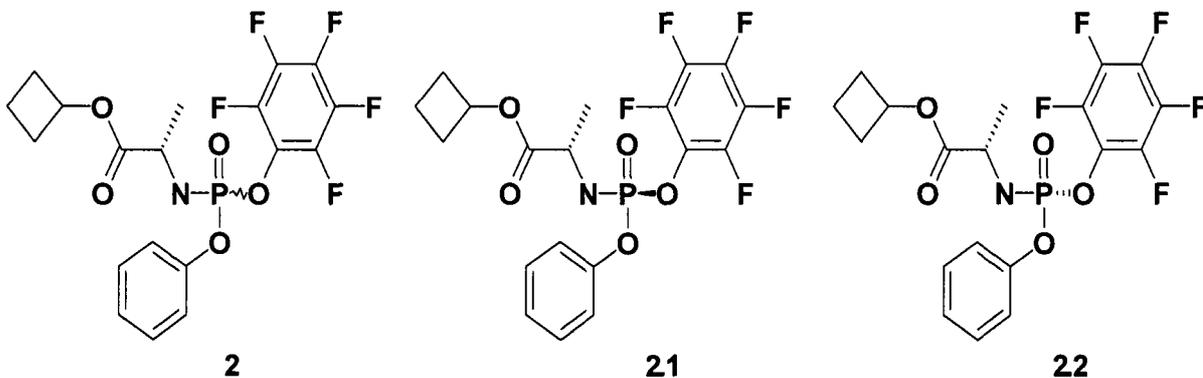


2. Соединение по п. 1, представляющее собой циклобутил (5)-2-[(S)-[($2R,3R,4R,5R$)-5-(3,4-дигидро-2,4-диоксо-2H-пиримидин-1-ил)-3-гидрокси-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-илметокси]-фенокси-фосфориламино]-пропаноат формулы **1.1** или циклобутил (S)-2-[(R)-[($2R,3R,4R,5R$)-5-(3,4-дигидро-2,4-диоксо-2H-пиримидин-1-ил)-3-гидрокси-4-метил-4-фтор-тетрагидрофуран-2-илметокси]-фенокси-фосфориламино]-пропаноат формулы **1.2**, их изотопно-обогащенный аналог, кристаллическая или поликристаллическая форма,



3. Лекарственный препарат, обладающий свойствами ингибитора NS5B HCV полимеразы, представляющий собой соединение по п. 1, для лечения гепатита С у человека или теплокровного животного, нуждающегося в этом.

4. Способ получения соединения по п.п. 1, 2, включающий использование циклобутил (*S*)-2-(пентафторфенилокси-фенокси-фосфориламино)-пропионата формулы 2 или его стереоизомера - циклобутил (5)-2-((5)-пентафторфенилокси-фенокси-фосфориламино)-пропионата формулы 2.1 или циклобутил (*S*)-2-((*R*)-пентафторфенилокси-фенокси-фосфориламино)-пропионата формулы 2.2,



5. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п.1 в терапевтически эффективном количестве и фармацевтически приемлемый носитель.

6. Фармацевтическая композиция по п. 5 для лечения вируса гепатита С.

7. Способ лечения субъекта, инфицированного вирусом, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п.п. 5 или 6 или соединения или его стереоизомера по п.1 или их изотопно-обогащенного аналога, кристаллической или поликристаллической формы.

8. Способ лечения по п.7 инфекции, вызванной вирусом гепатита С, у субъекта, нуждающегося в таком лечении.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2017/000210

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C07H 19/10</i> (2006.01) <i>A61K31/7072</i> (2006.01) <i>A61K 31/675</i> (2006.01) <i>C07F 9/22</i> (2006.01) <i>A61K 31/664</i> (2006.01) <i>A61P 31/20</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) B65G 15/00, 15/08, 15/30, 15/32, 15/42 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSearch (RUPTO internal), USPTO, PAJ, Es @cenet, DWPI, EAPATIS, PATENTSCOPE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/121634 A (PHARMASSET, INC.) 09.10.2008	1-8
A	US 2010/0016251 A1 (PHARMASSET, INC.) 21.01.2010	1-8
A	RU 2567854 C1 (IVAGDENKO ALEKSANDR VASILEVICH et al.) 10.11.2015	1-8
II Further documents are listed in the continuation of Box C. D See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 October 2017 (11.10.2017)	Date of mailing of the international search report 12 October 2017 (12.10.2017)	
Name and mailing address of the ISA/ Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.	

<p>А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ</p> <p style="text-align: center;"> <i>C07H 19/10 (2006.01)</i> <i>C07F 9/22 (2006.01)</i> <i>A 61K 31/7072 (2006.01)</i> <i>A 61K 31/664 (2006.01)</i> <i>A 61K 31/675 (2006.01)</i> <i>A 61P 31/20 (2006.01)</i> </p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>														
<p>В. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p style="text-align: center;">C 07H 19/10, C 07F 9/22, A 61K 31/7072, 31/664, A 61K 31/675, A 61P 31/20</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p style="text-align: center;">PatSearch (RUPTO internal), USPTO, PAJ, Esp@cenet, DWPI, EAPATIS, PATENTSCOPE</p>														
<p>С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ :</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Категория *</th> <th style="width: 70%;">Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th style="width: 20%;">Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>WO 2008/121634 A (PHARMASSET, INC.) 09.10.2008</td> <td style="text-align: center;">1-8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>US 2010/001625 1 A1 (PHARMASSET, INC.) 21.01.2010</td> <td style="text-align: center;">1-8</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>RU 2567854 C1 (ИВАГДЕНКО АЛЕКСАНДР ВАСИЛЬЕВИЧ и др.) 10.11.2015</td> <td style="text-align: center;">1-8</td> </tr> </tbody> </table>			Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	A	WO 2008/121634 A (PHARMASSET, INC.) 09.10.2008	1-8	A	US 2010/001625 1 A1 (PHARMASSET, INC.) 21.01.2010	1-8	A	RU 2567854 C1 (ИВАГДЕНКО АЛЕКСАНДР ВАСИЛЬЕВИЧ и др.) 10.11.2015	1-8
Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №												
A	WO 2008/121634 A (PHARMASSET, INC.) 09.10.2008	1-8												
A	US 2010/001625 1 A1 (PHARMASSET, INC.) 21.01.2010	1-8												
A	RU 2567854 C1 (ИВАГДЕНКО АЛЕКСАНДР ВАСИЛЬЕВИЧ и др.) 10.11.2015	1-8												
<p>Ω последующие документы указаны в продолжении графы С. <input type="checkbox"/> данные о патентах -аналогах указаны в приложении</p>														
*	Особые категории ссылочных документов :	"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной												
"А"	документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	поддачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение												
"Е"	более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским												
"L"	документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности												
"O"	документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.	"γ" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же												
"P"	документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	"&" документ, являющийся патенте м-аналогом												
Дата действительного завершения международного поиска		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске												
11 октября 2017 (11.10.2017)		12 октября 2017 (12.10.2017)												
Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП -3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37		Уполномоченное лицо: Полякова С.Л. Телефон № 8 499 240 25 91												