

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037372

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.22

(21) Номер заявки
201692506

(22) Дата подачи заявки
2012.08.01

(51) Int. Cl. *C07D 471/04* (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/444 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(54) ИНГИБИТОРЫ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСОВ ГРИППА

(31) 61/513,793

(32) 2011.08.01

(33) US

(43) 2017.06.30

(62) 201500265; 2012.08.01

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ВЕРТЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)

(72) Изобретатель:

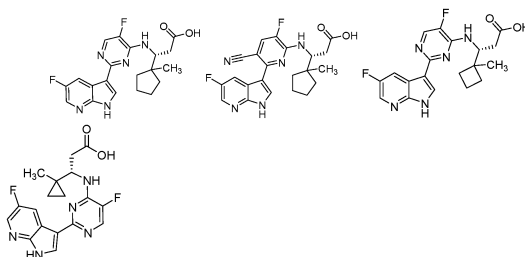
Чарифсон Пол С., Кларк Майкл П.,
Бандарадже Упул К., Бетил Рэнди С.,
Бойд Майкл Дж., Дейвис Иоана, Дэн
Хунбо, Даффи Джон П. (US), Фармер
Люк Дж. (CA), Гао Хуай, Гу Вэньсинь,
Кеннеди Джозеф М., Ледфорд Брайан,
Ледебур Марк В., Мальте Франсуа,
Перола Эмануэле, Ван Тяньшэн (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2010148197
RU-C2-2418800

(57) Настоящее изобретение относится к следующим соединениям:



или их фармацевтически приемлемым солям. Фармацевтическая композиция для лечения гриппа, ингибирующая репликацию вирусов гриппа или снижающая количество вирусов гриппа, содержащая эффективное количество упомянутых выше соединений или их фармацевтически приемлемых солей, и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель являются объектом настоящего изобретения. Заявленные соединения обеспечивают ингибирование репликации вирусов гриппа и уменьшение их количества в биологическом образце, который представляет собой клеточную культуру или ее экстракт; биопат, полученный от млекопитающего, или его экстракт; кровь, слюну, мочу, фекалии, сперму или слезную жидкость.

B1

037372

037372

B1

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 61/513793, поданной 01 августа 2011 года, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Уровень техники, к которому относится изобретение

Грипп распространяется по миру в виде сезонных эпидемий, что приводит к сотням тысяч смертей ежегодно, миллионам в годы пандемий. Например, в 20 столетии произошло три пандемии гриппа, и они привели к смерти десятков миллионов людей, причем каждая из этих пандемий вызывалась появлением нового штамма вируса у человека. Часто эти новые штаммы являются результатом распространения существующего вируса гриппа человеку от других видов животных.

Вирус гриппа в основном передается от индивидуума к индивидууму через крупные, нагруженные вирусом капли, которые образуются, когда инфицированные индивидуумы кашляют или чихают; эти крупные капли затем оседают на слизистых поверхностях верхних дыхательных путей восприимчивых индивидуумов, находящихся вблизи (например, приблизительно в пределах 6 футов (1,8 м)) от инфицированных индивидуумов. Передача также может происходить при прямом контакте или непрямом контакте с секретами дыхательных путей, таком как прикасание к поверхностям, зараженным вирусом гриппа, а затем прикасание к глазам, носу или рту. Взрослые могут быть способны распространять грипп другим в течение от 1 суток до возникновения симптомов до приблизительно 5 суток после появления симптомов. Дети младшего возраста и индивидуумы с ослабленной иммунной системой могут быть инфекционными в течение 10 или более суток после появления симптомов.

Вирусы гриппа представляют собой РНК-вирусы семейства Orthomyxoviridae, которое включает пять родов: вирус гриппа А, вирус гриппа В, вирус гриппа С, Isavirus и вирус Thogoto.

Род вируса гриппа А имеет один вид, вирус гриппа А. Дикие водоплавающие птицы являются естественными хозяевами для большого разнообразия вирусов гриппа А. Иногда вирусы передаются другим видам, а затем могут вызывать опустошающие вспышки у домашних птиц или дают начало пандемиями вируса у человека. Вирусы типа А являются наиболее вирулентными патогенами у человека среди трех типов гриппа и вызывают наиболее тяжелое заболевание. Вирус гриппа А может быть подразделен на различные серотипы, исходя из антительного ответа на эти вирусы. Серотипы, которые были подтверждены у человека, упорядоченные по количеству известных смертей в пандемиях у человека, представляют собой H1N1 (который вызвал испанский грипп в 1918 году), H2N2 (который вызвал азиатский грипп в 1957 году), H3N2 (который вызвал гонконгский грипп в 1968 году), H5N1 (пандемическая угроза в сезоне гриппа 2007-08 годов), H7N7 (который имеет необычный зоонозный потенциал), H1N2 (эндемичный у человека и свиней), H9N2, H7N2, H7N3 и H10N7.

Род вирусов гриппа В имеет один вид, вирус гриппа В. Вирус гриппа В инфицирует практически исключительно людей и менее распространен, чем вирус гриппа А. Единственным другим животным, о котором известно, что оно восприимчиво к инфекции вирусом гриппа В, является тюлень. Этот тип вируса мутирует со скоростью, в 2-3 более медленной, чем тип А, и, следовательно, он является менее генетически разнообразным и имеет только один серотип вируса гриппа В. В результате этого отсутствия антигенного разнообразия некоторая степень иммунитета к вирусу В обычно приобретается в раннем возрасте. Однако вирус гриппа В мутирует достаточно, чтобы длительный иммунитет не был возможен. Этот сниженный уровень антигенной нагрузки в комбинации с его ограниченным диапазоном хозяев (ингибирование межвидовой антигенной изменчивости), обеспечивает то, что пандемии вируса гриппа В не возникают.

Род вируса гриппа С имеет один вид, вирус гриппа С, который инфицирует человека и свиней и может вызывать тяжелое заболевание и локальные эпидемии. Однако вирус гриппа С менее распространен, чем другие типы, и по-видимому обычно вызывает мягкое заболевание у детей.

Вирусы гриппа А, В и С имеют очень небольшую структуру. Вирусная частица имеет диаметр 80-120 нм и обычно является приблизительно сферической, хотя могут встречаться нитевидные формы. Необычно для вируса, что его геном не является единым фрагментом нуклеиновой кислоты; вместо этого он содержит семь или восемь фрагментов сегментированной негативной смысловой РНК. Геном вируса А кодирует 11 белков: гемагглютинин (HA), нейраминидазу (NA), нуклеопротеин (NP), M1, M2, NS1, NS2(NEP), PA, PB1, PB1-F2 и PB2.

HA и NA представляют собой большие гликопротеины на наружной стороне вирусных частиц. HA представляет собой лектин, который опосредует связывание вируса с клетками-мишенями и вводит вирусный геном в клетку-мишень, в то время как NA вовлечен в высвобождение вируса-потомка из инфицированных клеток, расщепляя сахара, которые связывают зрелые вирусные частицы. Таким образом, эти белки являются мишенями для противовирусных лекарственных средств. Более того, они являются антигенами, против которых могут быть индуцированы антитела. Вирусы гриппа А подразделяют на подтипы, исходя из антительных ответов на HA и NA, создающих основу для отличий H и N (см. выше), например в H5N1.

Грипп приводит к прямым затратам вследствие утраты производительности и ассоциированного с ним медицинского лечения, а также к косвенным затратам на профилактические меры. В США вирус гриппа ответственен за общие затраты свыше 10 млрд долларов в год, в то время как согласно оценкам последующие пандемии могут вызывать прямые и косвенные затраты, составляющие сотни миллиардов

долларов. Профилактические затраты также высоки. Правительства по всему миру потратили миллиарды долларов США на подготовку и планирование на случай возможной пандемии птичьего гриппа H5N1, причем затраты связаны с приобретением лекарственных средств и вакцин, а также практические отработки на случай чрезвычайной ситуации и стратегии по улучшению пограничного контроля.

Текущие возможности лечения вируса гриппа включают вакцинацию и химиотерапию или химио-профилактику с помощью противовирусных лекарственных средств. Вакцинация против гриппа с помощью вакцины против гриппа часто рекомендуется для групп высокого риска, таких как дети и пожилые люди, или у людей, которые имеют астму, диабет или заболевание сердца. Однако возможно быть вакцинированным и тем не менее заболеть гриппом. Вакцину пересоставляют каждый сезон для нескольких конкретных штаммов вируса, но она может не включать все штаммы, активно инфицирующие людей в мире в данный сезон. Изготовителям требуется приблизительно шесть месяцев для составления и производства миллионов доз, требуемых для борьбы с сезонными эпидемиями; иногда новый или невыявленный штамм становится главным в это время и инфицирует людей, которые были вакцинированы (как например, грипп Фуцзянь H3N2 в сезоне гриппа 2003-2004 года). Также возможно стать инфицированным непосредственно перед вакцинацией и заболеть тем конкретным штаммом, который, как предполагается, вакцина будет предупреждать, поскольку вакцине требуется приблизительно две недели, чтобы стать эффективной.

Кроме того, эффективность этих вакцин против гриппа варьирует. Вследствие высокой частоты мутаций вируса конкретная вакцина против гриппа обычно обеспечивает защиту не более чем на несколько лет. Вакцина, составленная для одного года, может быть неэффективной на следующий год, поскольку вирус гриппа быстро изменяется с течением времени и другие штаммы становятся преобладающими.

Также вследствие отсутствия корректирующих РНК ферментов, РНК-зависимая РНК-полимераза вРНК вируса гриппа вносит однонуклеотидную инсерционную ошибку приблизительно на каждые 10 тысяч нуклеотидов, что приблизительно равно длине вРНК вируса гриппа. Таким образом, практически каждый вновь произведенный вирус гриппа представляет собой мутанта антигенный сдвиг. Разделение генома на отдельные сегменты вРНК позволяет смешение или реассортацию вРНК, если более одной вирусной линии инфицировало единичную клетку. В результате быстрое изменение вирусной генетики вызывает антигенные сдвиги и позволяет вирусу инфицировать новые виды-хозяева и быстро преодолевать защитный иммунитет.

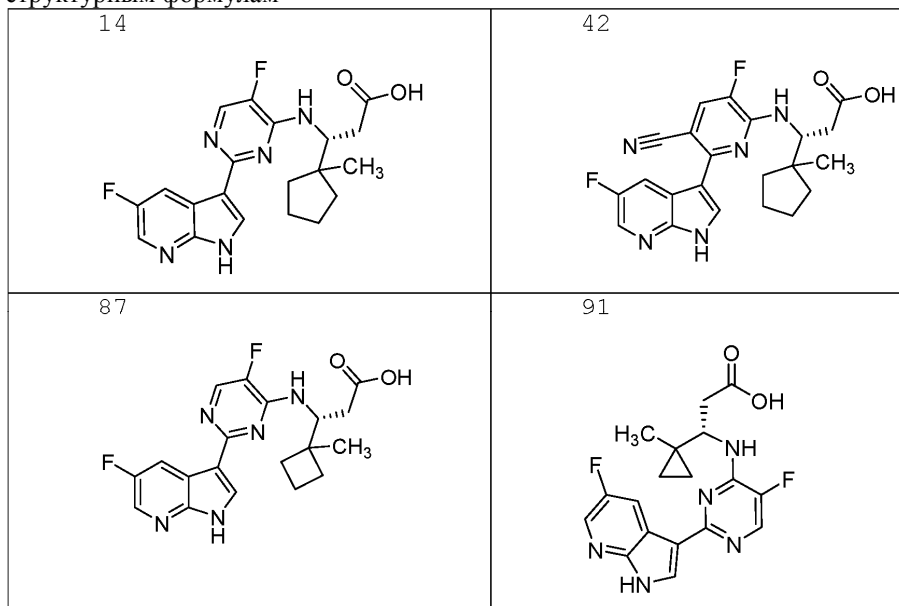
Противовирусные лекарственные средства также можно использовать для лечения гриппа, причем особенно эффективными являются ингибиторы нейраминидазы, однако у вирусов может развиваться устойчивость к стандартным противовирусным лекарственным средствам.

Таким образом, все еще существует потребность в лекарственных средствах для лечения инфекций вирусом гриппа, как, например, в лекарственных средствах с расширенным терапевтическим окном и/или с уменьшенной чувствительностью к титру вируса.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится главным образом к способам лечения гриппа, к способам ингибирования репликации вирусов гриппа, к способам уменьшения количества вирусов гриппа и к соединениям и композициям, которые можно использовать для таких способов.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, соответствующим структурным формулам



или их фармацевтически приемлемым солям.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения гриппа, ингибирующей репликацию вирусов гриппа или снижающей количество вирусов гриппа, содержащей соединение, описанное в настоящем описании (например, соединение 14, 42, 87, 91 или его фармацевтически приемлемая соль), и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу уменьшения количества вируса гриппа в биологическом образце, включающему введение в указанный биологический образец эффективного количества соединения, описанного в настоящем описании (например, соединение 14, 42, 87, 91 или его фармацевтически приемлемая соль), причем биологический образец представляет собой клеточную культуру или ее экстракт; биоптат, полученный от млекопитающего, или его экстракт; кровь, слюну, мочу, фекалии, сперму или слезную жидкость.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибирования репликации вирусов гриппа в биологическом образце, включающему стадию введения в указанный биологический образец эффективного количества соединения, описанного в настоящем описании (например, соединение 14, 42, 87, 91 или его фармацевтически приемлемая соль), причем биологический образец представляет собой клеточную культуру или ее экстракт; биоптат, полученный от млекопитающего, или его экстракт; кровь, слюну, мочу, фекалии, сперму или слезную жидкость.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибирования репликации вирусов гриппа в биологическом образце, включающий стадию введения в указанный биологический образец эффективного количества фармацевтической композиции, где биологический образец представляет собой клеточную культуру или ее экстракт; биоптат, полученный от млекопитающего, или его экстракт; кровь, слюну, мочу, фекалии, сперму или слезную жидкость.

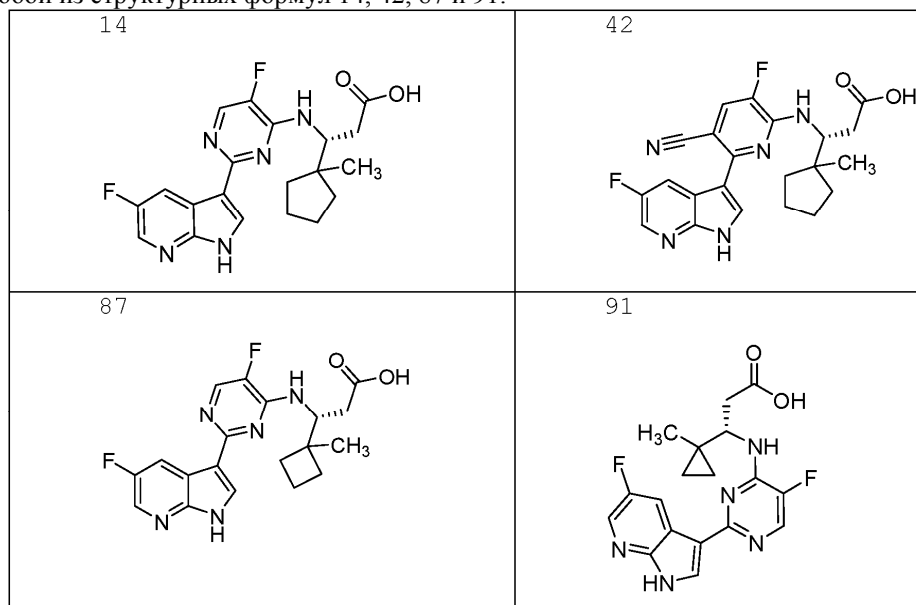
В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу уменьшения количества вирусов гриппа в биологическом образце, включающий введение в указанный биологический образец эффективного количества фармацевтической композиции, где биологический образец представляет собой клеточную культуру или ее экстракт; биоптат, полученный от млекопитающего, или его экстракт; кровь, слюну, мочу, фекалии, сперму или слезную жидкость.

Краткое описание чертежа

На чертеже показаны определенные соединения по изобретению.

Подробное описание изобретения

Соединения по изобретению являются такими, как описано в формуле изобретения. В некоторых вариантах осуществления соединения по изобретению или их фармацевтически приемлемые соли представлены любой из структурных формул 14, 42, 87 и 91:



Соединения по изобретению, описанные в настоящем описании, можно получать с помощью любого подходящего способа, известного в данной области. Например, их можно получать в соответствии с методиками, описанными в WO 2005/095400, WO 2007/084557, WO 2010/011768, WO 2010/011756, WO 2010/011772, WO 2009/073300 и PCT/US2010/038988, поданными 17 июня 2010 года. Например, соединения, представленные в табл. 1 и на чертеже, и конкретные соединения, представленные выше, можно получать любым подходящим способом, известным в данной области, например WO 2005/095400, WO 2007/084557, WO 2010/011768, WO 2010/011756, WP 2010/011772, WO 2009/073300 и PCT/US 2010/038988, и с помощью иллюстративных способов синтеза, описанных ниже в разделе "Примеры".

Определения и общая терминология

Для целей настоящего изобретения химические элементы указаны в соответствии с периодической таблицей элементов, версия CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed. Кроме того, общие принципы органической химии описаны в "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, и "March's Advanced Organic Chemistry", 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Фармацевтически приемлемые соли, сольваты, клатраты, пролекарства и другие производные

Соединения, описанные в настоящем описании, могут существовать в свободной форме или, когда это целесообразно, в качестве солей. Соли, которые являются фармацевтически приемлемыми, представляют особый интерес, поскольку они пригодны для введения соединений, описанных ниже, для медицинских целей. Соли, которые не являются фармацевтически приемлемыми, пригодны в процессах получения, для целей выделения и очистки и в некоторых случаях для применения в разделении стереоизомерных форм соединений по изобретению или их промежуточных соединений.

Как используют в рамках изобретения, термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям соединения, которые являются пригодными с медицинской точки зрения для применения в контакте с тканями людей и низших животных без излишних побочных эффектов, таких как токсичность, раздражение или аллергический ответ и т.п., и соответствуют приемлемому соотношению польза/риск.

Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области. Например, S.M. Berge et al. описывают подробно фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19, 1977, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки. Фармацевтически приемлемые соли соединений, описанных в настоящем описании, включают соли, образованные из пригодных неорганических и органических кислот и оснований. Эти соли можно получать *in situ* во время конечного выделения и очистки соединений.

Когда соединение, описанное в настоящем описании, содержит основную группу или достаточно основную биоизостеру, кислотно-аддитивные соли можно получать путем 1) реакции очищенного соединения в его форме свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой, и 2) выделения образовавшейся таким образом соли. На практике кислотно-аддитивные соли могут быть более удобной формой для применения, и применение соли равносильно применению формы свободного основания.

Примерами фармацевтически приемлемых, нетоксичных кислотно-аддитивных солей являются соли аминокислот, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, виннокаменная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с использованием других способов, используемых в данной области, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают: адипаты, альгинаты, аскорбаты, аспартаты, бензолсульфонаты, бензоаты, бисульфаты, бораты, бутираты, камфораты, камфорсульфонаты, цитраты, циклопентанпропионаты, диглюконаты, додецилсульфаты, этансульфонаты, формиаты, fumarаты, глюкогептаноаты, глицерофосфаты, гликоляты, глюконаты, гликоляты, гемисульфаты, гептаноаты, гексаноаты, гидрохлориды, гидробромиды, гидройодиды, 2-гидроксиэтансульфонаты, лактобионаты, лактаты, лаураты, лаурилсульфаты, малаты, малеаты, малонаты, метансульфонаты, 2-нафталинсульфонаты, никотинаты, нитраты, олеаты, оксалаты, пальмитаты, памоаты, пектинаты, персульфаты, 3-фенилпропионаты, фосфаты, пикраты, пивалаты, пропионаты, салицилаты, стеараты, сукцинаты, сульфаты, тартраты, тиоцианаты, *p*-толуолсульфонаты, ундеканаты, валераты и т.п.

Когда соединение, описанное в настоящем описании, содержит карбоксигруппу или достаточно кислотную биоизостеру, основно-аддитивные соли можно получать путем 1) реакции очищенного соединения в его кислотной форме с подходящим органическим или неорганическим основанием и 2) выделения образовавшейся таким образом соли. На практике использование основно-аддитивной соли может быть более удобным, и применение солевой формы в сущности равносильно применению формы свободной кислоты. Соли, происходящие из соответствующих оснований, включают соли щелочных металлов (например, натрия, лития и калия), щелочноземельных металлов (например, магния и кальция), аммония и $N^+(C_{1-4} \text{алкила})_4$. Это изобретение также предусматривает кватернизацию любых основных азотсодержащих групп соединений, описанных в настоящем описании. Путем такой кватернизации можно получать растворимые в воде или масле или диспергируемые продукты.

Основно-аддитивные соли включают фармацевтически приемлемые соли металлов и аминов. Подходящие соли металлов включают соли натрия, калия, кальция, бария, цинка, магния и алюминия. Соли натрия и калия обычно являются предпочтительными. Другие фармацевтически приемлемые соли включают в соответствующих случаях нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и аминов, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арилсульфонат. Пригодные неорганические основно-аддитивные соли получают из металлосодержащих оснований, которые включают гидрид натрия, гидро-

ксид натрия, гидроксид калия, гидроксид кальция, гидроксид алюминия, гидроксид лития, гидроксид магния, гидроксид цинка и т.п. Пригодные аминсодержащие основно-аддитивные соли получают из аминов, которые часто используют в медицинской химии, вследствие их низкой токсичности и приемлемости для медицинского применения. Аммиак, этилендиамин, N-метилглюкамин, лизин, аргинин, орнитин, холин, N,N'-добензилэтилендиамин, хлорпрокаин, диэтаноламин, прокаин, N-бензилфенэтиламин, диэтиламин, пиперазин, трис(гидроксиметил)аминометан, гидроксид тетраметиламмония, триэтиламин, дибензиламин, эфенамин, дегидроабизтиламин, N-этилпиперидин, бензиламин, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, этиламин, основные аминокислоты, дициклогексиламин и т.п.

Другие кислоты и основания, которые сами по себе не являются фармацевтически приемлемыми, можно использовать для получения солей, пригодных в качестве промежуточных соединений для получения соединений, описанных в настоящем описании, и их фармацевтически приемлемых кислотно- или основно-аддитивных солей.

Следует понимать, что настоящее изобретение включает смеси/комбинации различных фармацевтически приемлемых солей и также смеси/комбинации соединений в свободной форме и фармацевтически приемлемых солей.

Применение соединений по изобретению

Один аспект настоящего изобретения относится главным образом к применению соединений, описанных в настоящем описании, или их фармацевтически приемлемых солей, или фармацевтически приемлемых композиций, содержащих такое соединение или его фармацевтически приемлемую соль, для ингибирования репликации вирусов гриппа в биологическом образце или у пациента, для снижения количества вирусов гриппа (снижения вирусного титра) в биологическом образце или у пациента и для лечения гриппа у пациента.

В другом варианте осуществления соединения, описанные в настоящем описании, или их фармацевтически приемлемые соли можно использовать для снижения вирусного титра в биологическом образце (например, в инфицированной клеточной культуре) или у человека (например, титр вируса в легких пациента).

Термины "опосредуемое вирусом гриппа состояние", "инфекции вирусом гриппа" или "грипп", как используют в рамках изобретения, используют взаимозаменяемо для обозначения заболевания, вызываемого инфекцией вируса гриппа.

Грипп представляет собой инфекционное заболевание, вызванное вирусами гриппа, которое поражает птиц и млекопитающих. Вирусы гриппа представляют собой РНК-вирусы семейства Orthomyxoviridae, которое включает пять родов: вирус гриппа А, вирус гриппа В, вирус гриппа С, Isavirus и вирус Thogoto. Род вируса гриппа А имеет один вид, вирус гриппа А, который может быть подразделен на различные типы, исходя из антительного ответа на эти вирусы: H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 и H10N7. Род вируса гриппа В имеет один вид, вирус гриппа В. Вирус гриппа В практически исключительно инфицирует людей и менее распространен, чем вирус гриппа А. Род вируса гриппа С имеет один вид, вирус гриппа С, который инфицирует людей и свиней и может вызывать тяжелое заболевание и локальные эпидемии. Однако вирус гриппа С менее распространен, чем другие типы, и обычно, по-видимому, вызывает мягкое заболевание у детей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения грипп или вирусы гриппа ассоциированы с вирусом гриппа А или В. В некоторых вариантах осуществления изобретения грипп или вирусы гриппа ассоциированы с вирусом гриппа А. В некоторых конкретных вариантах осуществления изобретения вирус гриппа А представляет собой H1N1, H2N2, H3N2 или H5N1.

У человека обычными симптомами гриппа являются озноб, лихорадка, фарингит, мышечные боли, тяжелая головная боль, кашель, слабость и общий дискомфорт. В более тяжелых случаях грипп вызывает пневмонию, которая может быть летальной, в частности у детей младшего возраста и у пожилых. Хотя его часто путают с простудой, грипп является значительно более тяжелым заболеванием и вызывается отличающимся типом вируса. Грипп может приводить к тошноте и рвоте, особенно у детей, однако эти симптомы более характерны для не имеющего к нему отношения гастроэнтерита, который иногда называют "желудочным гриппом" или "24-часовым гриппом".

Симптомы гриппа появляются довольно внезапно от одних до двух суток после инфицирования. Обычно первыми симптомами являются озноб или ощущение озноба, но лихорадка также часто появляется рано при инфицировании, причем температура тела находится в диапазоне 38-39°C (приблизительно 100-103°F). Многие люди настолько плохо себя чувствуют, что они прикованы к постели в течение нескольких суток, с ломотой и болями по всему организму, которые хуже в их спине и ногах. Симптомы гриппа могут включать боли в организме, особенно в суставе и горле, крайнее ощущение холода и лихорадка, усталость, головная боль, раздраженные глаза со слезоотделением, покрасневшие глаза, кожа (особенно лицо), полость рта, глотка и нос, боль в животе (у детей с вирусом гриппа В). Симптомы вируса являются неспецифическими, перекрываясь со многими патогенами ("гриппоподобные заболевания"). Обычно для подтверждения диагноза требуются лабораторные данные.

Термины "заболевание", "нарушение" и "состояние" могут использоваться в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения опосредуемого вирусом гриппа медицинского или патологического состояния.

Как используют в рамках изобретения, термины "индивидуум" и "пациент" используют взаимозаменяемо. Термины "индивидуум" и "пациент" относятся к животному (например, птице, такой как курица, перепел или индейка, или млекопитающему), в частности "млекопитающему", включающему не примата (например, корова, свинья, лошадь, овца, кролик, морская свинка, крыса, кошка, собака и мышь) и примата (например, обезьяну, шимпанзе и человека), более конкретно человека. В одном варианте осуществления индивидуум представляет собой не являющееся человеком животное, такое как сельскохозяйственное животное (например, лошадь, корова, свинья или овца), или домашнее животное (например, собака, кошка, морская свинка или кролик). В предпочтительном варианте осуществления индивидуумом является "человек".

Термин "биологический образец", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, клеточные культуры или их экстракты; материал биопсии, полученный от млекопитающего, или его экстракты; кровь, слюну, мочу, экскременты, сперму, слезную жидкость, или другие жидкости организма, или их экстракты.

Как используют в рамках изобретения, "множественность инфекции" или "МОИ" представляет собой соотношение инфекционных агентов (например, фак или вирус) и мишеней инфекции (например, клетка). Например, при описании группы клеток, инокулированных инфекционными вирусными частицами, множественность инфекции или МОИ представляет собой отношение, определяемое количеством инфекционных вирусных частиц, помещенных в лунку, деленное на количество клеток-мишеней, присутствующих в этой лунке.

Как используют в рамках изобретения, термин "ингибирование репликации вирусов гриппа" включает как снижение уровня репликации вируса (например, снижение по меньшей мере на 10%), так и полную остановку репликации вируса (т.е. 100% снижение уровня репликации вируса). В некоторых вариантах осуществления репликация вирусов гриппа ингибируется по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95%.

Репликацию вируса гриппа можно измерять любым подходящим способом, известным в данной области. Например, можно измерять титр вируса гриппа в биологическом образце (например, инфицированной клеточной культуре) или у человека (например, титр вируса в легких у пациента). Более конкретно, для клеточных анализов в каждом случае клетки культивируют *in vitro*, в культуру добавляют вирус в присутствии или в отсутствие исследуемого соединения и после подходящего периода времени оценивают зависимый от вируса результат. Для типичных анализов можно использовать клетки почки собаки Madin-Darby (MDCK) и адаптированный к стандартной культуре ткани штамм вируса A/Puerto Rico/8/34. Первый тип клеточного анализа, который можно использовать в рамках изобретения, зависит от гибели инфицированных клеток-мишеней - процесса, называемого цитопатическим эффектом (CPE), где вирусная инфекция вызывает истощение клеточных ресурсов и в конечном итоге лизис клетки. В первом типе клеточного анализа инфицируют низкую долю клеток в лунках микропланшета для титрования (как правило, от 1/10 до 1/1000), вирусу позволяют пройти несколько раундов репликации на протяжении 48-72 ч, а затем измеряют уровень гибели клеток с использованием снижения содержания АТФ в клетках по сравнению с неинфицированными контролями. Второй тип клеточного анализа, который можно использовать в рамках изобретения, зависит от умножения вирусспецифических молекул РНК в инфицированных клетках, причем уровни РНК прямо измеряют с использованием способа гибридизации ДНК с разветвленной цепью (бДНК). Во втором типе клеточного анализа низкое количество клеток первоначально инфицируют в лунках микропланшета для титрования, вирусу позволяют реплицироваться в инфицированных клетках и распространяться в дополнительные серии клеток, а затем клетки лизируют и измеряют содержание вирусной РНК. Этот анализ останавливают рано, обычно через 18-36 ч, когда все клетки-мишени все еще являются жизнеспособными. Вирусную РНК количественно определяют гибридизацией со специфическими олигонуклеотидными зондами, фиксированными к лункам планшета для анализа, с последующей амплификацией сигнала гибридизацией с дополнительными зондами, связанными с репортерным ферментом.

Как используют в рамках изобретения "титр вируса (или титр)" является мерой концентрации вируса. Для исследования титра можно использовать серийное разведение для получения приблизительной количественной информации из аналитической методики, которая в сущности дает только положительную или отрицательную оценку. Титр соответствует наиболее высокому фактору разведения, который все еще приводит к положительным результатам; например, положительные результаты в первых 8 серийных двукратных разведениях преобразуются в титр 1:256. Конкретным примером является титр вируса. Для определения титра приготавливают несколько разведений, таких как 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ..., 10^{-8} . Наиболее низкая концентрация вируса, которая все еще инфицирует клетки, представляет собой титр вируса.

Как используют в рамках изобретения, термины "лечить", "лечение" и "проведение лечения" отно-

сятся как к терапевтическому, так и к профилактическому лечению. Например, терапевтическое лечение включает снижение или облегчение прогрессирования, тяжести и/или длительности, опосредуемых вирусом гриппа состояний, или облегчение одного или нескольких симптомов (особенно одного или нескольких явных симптомов), опосредуемых вирусом гриппа состояний, вследствие введения одного или нескольких терапевтических средств (например, одного или нескольких терапевтических средств, таких как соединение или композиция по изобретению). В конкретных вариантах осуществления терапевтическое лечение включает облегчение по меньшей мере одного поддающегося измерению физического параметра опосредуемого вирусом гриппа состояния. В других вариантах осуществления терапевтическое лечение включает ингибирование прогрессирования опосредуемого вирусом гриппа состояния, либо физически, например путем стабилизации явного симптома, либо физиологически, например путем стабилизации физического параметра, или посредством обоих из них. В других вариантах осуществления терапевтическое лечение включает снижение или стабилизацию опосредуемых вирусом гриппа инфекций. Противовирусные лекарственные средства можно использовать в амбулаторных условиях для лечения людей, которые уже имеют грипп, для снижения тяжести симптомов и уменьшения количества дней, в течение которых они больны.

Согласно US CDC "вспышка" гриппа определяется как внезапное увеличение количества случаев острых лихорадочных респираторных заболеваний (AFRI), возникающих в течение периода от 48 до 72 ч в группе людей, которые находятся в непосредственной близости друг от друга (например, на одной и той же площади дома престарелых, в одной и той же семье и т.д.) выше нормальной фоновой частоты или когда результаты тестов какого-либо анализируемого индивидуума в популяции являются положительными на грипп. Один случай подтвержденного гриппа любым способом тестирования считается вспышкой.

"Кластер" определяют как группу из трех или более случаев AFRI, возникающих в пределах периода от 48 до 72 ч в группе людей, которые находятся в непосредственной близости друг от друга (например, на одной и той же площади дома престарелых, в одной и той же семье и т.д.).

Как используют в рамках изобретения, "индексный случай", "первичный случай" или "нулевой пациент" является первичным пациентом в популяционной выборке, подвергаемой эпидемиологическому исследованию. При использовании в основном для обозначения таких пациентов в эпидемиологических исследованиях, этот термин не выделяют с заглавной буквы. Когда термин относится к конкретному индивидууму вместо имени этого индивидуума в отчете конкретного исследования, термин выделяют заглавной буквой как "Нулевой пациент". Часто ученые проводят поиск индексного случая для определения того, как заболевание распространяется и какой резервуар содержит заболевание между вспышками. Следует отметить, что индексный случай является первым пациентом, который указывает на существование вспышки. Более ранние случаи могут быть выявлены и обозначены как первичные, вторичные, третичные и т.д.

В одном варианте осуществления способы по изобретению являются предупреждающей или "превентивной" мерой у пациента, особенно человека, имеющего предрасположенность к осложнениям вследствие инфекции вирусом гриппа. Термин "превентивный", как используют в рамках изобретения, как, например, в превентивном применении, "превентивно" и т.д., является профилактическим применением в ситуациях, в которых "индексный случай" или "вспышка" были подтверждены, для предупреждения распространения инфекции в остальной части общества или популяционной группы.

В другом варианте осуществления способы по изобретению используют в качестве "превентивной" меры для членов общества или популяционной группы, особенно людей, для предупреждения распространения инфекции.

Как используют в рамках изобретения, "эффективное количество" относится к количеству, достаточному для индукции требуемого биологического ответа. В рамках настоящего изобретения требуемым биологическим ответом является ингибирование репликации вируса гриппа, уменьшение количества вируса гриппа или снижение или смягчение тяжести, длительности, прогрессирования или возникновения инфекции вирусом гриппа, предупреждения распространения инфекции вирусом гриппа, предупреждения рецидива, развития, возникновения или прогрессирования симптома, ассоциированного с инфекцией вирусом гриппа, или для усиления или улучшения профилактического или терапевтического эффекта(ов) другой терапии, используемой против инфекций вирусом гриппа. Точное количество соединения, вводимого индивидууму, зависит от способа введения, типа и тяжести инфекции и от конкретных характеристик индивидуума, таких как общее состояние здоровья, возраст, пол, масса тела и переносимость лекарственных средств. Квалифицированный специалист способен определить соответствующие дозировки в зависимости от этих и других факторов. При совместном введении с другими вирусными средствами, например при совместном введении с лекарственным средством против гриппа, "эффективное количество" второго средства будет зависеть от типа используемого лекарственного средства. Подходящие дозировки известны для одобренных средств и могут быть скорректированы квалифицированным специалистом в зависимости от состояния индивидуума, типа состояния(ий), подвергаемых лечению, и используемого количества соединения, описанного в настоящем описании. В случаях когда количество явно не указано, должно предполагаться эффективное количество. Например, соединения, описанные в настоя-

шем описании, можно вводить индивидууму в диапазоне доз приблизительно от 0,01 до 100 мг/кг массы тела/сутки для терапевтического или профилактического лечения.

Как правило, режимы дозирования можно выбирать в соответствии с различными факторами, включающими подвергнутое лечению нарушение и тяжесть нарушения; активность конкретного используемого соединения; конкретную используемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания пациента; время введения, путь введения и скорость выведения конкретного используемого соединения; функцию почек и печени индивидуума; и конкретное используемое соединение или его соль, длительность лечения; лекарственные средства, используемые в комбинации или по совпадению с конкретным используемым соединением, и сходных факторов, хорошо известных в области медицины. Квалифицированный специалист может без труда определить и назначить эффективное количество соединений, описанных в настоящем описании, требуемое для лечения, предупреждения, ингибирования (полностью или частично) или остановки прогрессирования заболевания.

Дозировки соединений, описанных в настоящем описании, могут находиться в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 100 мг/кг массы тела/сутки, от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мг/кг массы тела/сутки, от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мг/кг массы тела/сутки или от приблизительно 1 до приблизительно 25 мг/кг массы тела/сутки. Понятно, что общее суточное количество можно вводить в однократной дозе или его можно вводить путем многократного дозирования, как например, два раза в сутки (например, каждые 12 ч), три раза в сутки (например, каждые 8 ч) или четыре раза в сутки (например, каждые 6 ч).

Для терапевтического лечения соединения, описанные в настоящем описании, можно вводить пациенту в пределах, например, 48 ч (или в пределах 40 ч, или менее 2 суток, или менее 1,5 суток, или в пределах 24 ч) от появления симптомов (например, заложенность носа, боль в горле, кашель, ломота, усталость, головная боль и озноб/потливость). Терапевтическое лечение может длиться в течение любого подходящего периода, например в течение 5 суток, 7 суток, 10 суток, 14 суток и т.д. Для профилактического лечения в ходе вспышки в обществе соединения, описанные в настоящем описании, можно вводить пациенту в пределах, например, 2 суток от возникновения симптомов в индексном случае, и его можно проводить в течение любого подходящего периода, например, в течение 7 суток, 10 суток, 14 суток, 20 суток, 28 суток, 35 суток, 42 суток и т.д.

В рамках изобретения можно использовать различные типы способов ведения, и они подробно описаны ниже в разделе под названием "Способы введения".

Фармацевтические композиции

Соединения, описанные в настоящем описании, можно составлять в фармацевтические композиции, которые дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, адъювант или наполнитель. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение по изобретению, описанное выше, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, адъювант или наполнитель. В одном варианте осуществления настоящее изобретение представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую эффективное количество соединения по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, адъювант или наполнитель. Фармацевтически приемлемые носители включают, например, фармацевтические разбавители, эксципиенты или носители, пригодным образом выбранные в отношении предполагаемой формы введения, и согласуются с общепринятой фармацевтической практикой.

"Эффективное количество" включает "терапевтически эффективное количество" и "профилактически эффективное количество". Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному для лечения и/или смягчения инфекции вирусом гриппа у пациента, инфицированного вирусом гриппа. Термин "профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному для предупреждения и/или существенного уменьшения вероятности или размера вспышки инфекции вирусом гриппа. Конкретные примеры эффективных количеств описаны выше в разделе под названием "Применение соединений по изобретению".

Фармацевтически приемлемый носитель может содержать инертные ингредиенты, которые не ингибируют чрезмерно биологическую активность соединений. Фармацевтически приемлемые носители должны быть биосовместимыми, например нетоксичными, не вызывающими воспаления, неиммуногенными, или они должны быть лишены других нежелательных реакций или побочных эффектов при введении индивидууму. Можно использовать стандартные способы фармацевтического составления.

Фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель, как используют в рамках изобретения, включает любые и все растворители, разбавители или другой жидкий наполнитель, диспергирующие или суспендирующие добавки, поверхностно-активные вещества, обеспечивающие изотоничность средства, загустители или эмульгаторы, консерванты, твердые связующие вещества, смазывающие вещества и т.п., как является пригодным для конкретной требуемой дозированной формы. В Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) описаны различные носители, используемые при составлении фармацевтически приемлемых композиций, и известные способы их получения. За исключением случаев, когда какой-либо общепринятый носитель не

совместим с соединениями, описанными в настоящем описании, как, например, путем обеспечения какого-либо нежелательного биологического эффекта или иного взаимодействия вредоносным образом с любым другим компонентом(ами) фармацевтически приемлемой композиции, предусматривается, что его применение находится в объеме настоящего изобретения. Как используют в рамках изобретения, выражение "побочные эффекты" охватывает нежелательные и неблагоприятные эффекты средства терапии (например, профилактического или терапевтического средства). Побочные эффекты всегда являются нежелательными, однако нежелательные эффекты не всегда являются неблагоприятными. Неблагоприятный эффект средства терапии (например, профилактического или терапевтического средства) может быть вредоносным, или неудобным, или сопряженным с риском. Побочные эффекты включают, но не ограничиваются ими, лихорадку, озноб, вялость, желудочно-кишечную токсичность (включая желудочные и кишечные язвы и эрозии), тошноту, рвоту, нейротоксичность, нефротоксичность, почечную токсичность (включая такие состояния как папиллярный некроз и хронический интерстициальный нефрит), печеночную токсичность (включая повышенные уровни ферментов печени в сыворотке), миелотоксичность (включая лейкопению, миелосупрессию, тромбоцитопению и анемию), сухость полости рта, привкус металла, продление срока беременности, слабость, сонливость, боль (включая мышечную боль, боль в костях и головную боль), потерю волос, астению, головокружение, экстрапирамидальные симптомы, акатизию, сердечно-сосудистые нарушения и половую дисфункцию.

Некоторые примеры веществ, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают, но не ограничиваются ими, ионообменные вещества, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, белки сыворотки (такие как сывороточный альбумин человека), буферные вещества (такие как twin 80, фосфаты, глицин, сорбиновая кислота или сорбат калия), смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты (такие как протамина сульфат, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат калия, хлорид натрия или соли цинка), коллоидный диоксид кремния, трисалицилат магния, поливинилпирролидон, полиакрилаты, воски, блок-сополимеры полиэтиленполиоксипропилен, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, ланолин, сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошковый трагакант; солод; желатин; тальк; эксципиенты, такие как масло какао и воски суппозиторийев; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло; сафлоровое масло; кунжутное масло; оливковое масло; кукурузное масло и соевое масло; гликоли; такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; не содержащую пирогенов воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт и фосфатно-солевые буферы, а также другие нетоксичные совместимые смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также в композиции могут присутствовать красители, антиадгезивы, покровные вещества, подсластители, вкусовые добавки и отдушки, консерванты и антиоксиданты, в зависимости от мнения составителя.

Способы введения

Соединения и фармацевтически приемлемые композиции, описанные выше, можно вводить человеку и другим животным перорально, ректально, парентерально, внутрь полости, внутривагинально, внутривагинально, местно (с помощью порошков, мазей или капель), буккально, в качестве перорального или назального спрея и т.п., в зависимости от тяжести подвергаемой лечению инфекции.

Жидкие дозированные формы для перорального введения включают, но не ограничиваются ими, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активным соединениям жидкие дозированные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, например, такие как вода или другие растворители, солюбилизаторы и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное масло, масло из зародышей семян, оливковое, касторовое и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, их смеси. Помимо инертных разбавителей, пероральные композиции также могут включать адьюванты, такие как смачивающие вещества, эмульгирующие и суспендирующие вещества, подсластители, вкусовые добавки и отдушки.

Инъекционные препараты, например стерильные инъекционные водные или масляные суспензии, можно изготавливать известными способами с использованием пригодных диспергирующих или смачивающих веществ и суспендирующих веществ. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор, суспензию или эмульсию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например раствор в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые можно использовать, находятся вода, раствор Рингера, U.S.P. и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды традиционно используют стерильные жирные масла. Для этой цели можно использовать любое легкое жирное масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, для получения инъекционных препаратов используют жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Инъекционные составы можно стерилизовать, например, фильтрацией через сдерживающий бактерии фильтр или путем включения стерилизующих средств в форме стерильных твердых композиций, которые могут быть растворены или диспергированы в стерильной воде или другом стерильном носителе для инъекций перед применением.

Для пролонгирования эффекта соединения, описанного в настоящем описании, часто желательно замедлить всасывание соединения из области подкожной или внутримышечной инъекции. Это можно осуществлять путем использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного вещества с плохой растворимостью. В этом случае уровень всасывания соединения зависит от скорости растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. Альтернативно растворение или суспендирование соединения в масляном носителе обеспечивает замедленное всасывание парентерально вводимой формы соединения. Инъекционные депо-формы получают путем формирования микроинкапсулированных матриц соединения в биodeградируемые полимеры, такие как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения соединения и полимера и характеристик конкретного используемого полимера можно контролировать скорость высвобождения соединения. Примеры других биodeградируемых полимеров включают сложные поли(ортоэфир) и поли(ангидриды). Инъекционные депо-составы также получают путем заключения соединения в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма.

Композиции для ректального или вагинального введения, в частности, представляют собой суппозитории, которые можно получать смешиванием соединений, описанных в настоящем описании, с пригодными не вызывающими раздражения эксципиентами или носителями, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или воск для суппозитория, которые являются твердыми при температуре окружающей среды, но жидкими при температуре тела и, таким образом, плавятся в прямой кишке или вагинальной полости и высвобождают активное соединение.

Твердые дозированные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых дозированных формах активное соединение смешивают по меньшей мере с одним инертным фармацевтически приемлемым эксципиентом или носителем, таким как цитрат натрия или дикальций фосфат и/или а) наполнителями или сухими разбавителями, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота, б) связующими веществами, например, такими как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидинон, сахароза и гуммиарабик, в) смачивающими веществами, такими как глицерин, г) дезинтегрирующими веществами, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или маниоковый крахмал, альгиновая кислота, определенные силикаты и карбонат натрия, е) удерживающими раствор веществами, такими как парафин, ф) ускоряющими всасывание веществами, такими как четвертичные соединения аммония, г) смачивающими веществами, например, такими как цетиловый спирт и моностеарат глицерина, h) абсорбентами, такими как каолин и бентонитовая глина, и i) смазывающими веществами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль дозированная форма также содержит буферные агенты.

Твердые композиции сходного типа также можно использовать в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах с использованием таких эксципиентов как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п. Твердые дозированные формы в виде таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул можно получать с покрытиями и оболочками, такими как кишечнорастворимые оболочки и другие покрытия, хорошо известные в области составления фармацевтических составов. Они необязательно могут содержать замутняющие вещества и также могут иметь такую композицию, чтобы высвободить активный ингредиент(ы) только или предпочтительно в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно замедленным образом. Примеры композиций для покрытия, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски. Твердые композиции сходного типа также можно использовать в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах с использованием таких эксципиентов как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

Активные соединения также могут быть в микроинкапсулированной форме с одним или несколькими эксципиентами, как указано выше. Твердые дозированные формы таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул можно получать с покрытиями и оболочками, такими как кишечнорастворимые покрытия, контролирующее высвобождение покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области составления фармацевтических препаративных форм. В таких твердых дозированных формах активное соединение может быть смешано по меньшей мере с одним инертным разбавителем, таким как сахароза, лактоза или крахмал. Такие дозированные формы также могут содержать, согласно обычной практике, дополнительные вещества, отличные от инертных разбавителей, например смазывающие вещества для таблетирования и другие добавки для таблетирования, такие как стеарат магния и микрокристаллическая целлюлоза. В случае капсул, таблеток и пилюль, дозированные формы также могут содержать буферные средства. Они необязательно могут содержать замутняющие вещества и также могут иметь композицию, чтобы высвободить активный ингредиент(ы) только или предпочтительно в определенной части кишечника, необязательно замедленным образом.

Примеры композиций покрытия, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски.

Дозированные формы для местного или чрескожного введения соединения по изобретению включают мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, порошки, растворы, спреи, ингалируемые средства или пластыри. Активный компонент смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и любыми необходимыми консервантами или буферами, если требуется. Также в объем изобретения входят офтальмологические составы, ушные капли и глазные капли. Кроме того, настоящее изобретение охватывает применение чрескожных пластырей, которые имеют дополнительное преимущество обеспечения контролируемой доставки соединения в организм. Такие дозированные формы можно получать путем растворения или диспергирования соединения в надлежащей среде. Также можно использовать усиливающие всасывание вещества для увеличения поступления соединения через кожу. Скорость можно контролировать либо путем предоставления контролирующей скоростью мембраны, либо путем диспергирования соединения в полимерной матрице или геле.

Композиции, описанные в настоящем описании, можно вводить перорально, парентерально, с помощью ингаляционного аэрозоля, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или через имплантированный резервуар. Термин "парентеральный", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, подкожный, внутривенный, внутримышечный, внутрисуставной, внутрисиновиальный, внутригрудинный, интратекальный, внутривисцеральный, проводимый внутрь очага повреждения и внутривисцеральной способы инъекции или инфузии. В частности, композиции вводят перорально, внутривисцерально или внутривенно.

Стерильные инъекционные формы композиций по изобретению могут представлять собой водную или масляную суспензию. Эти суспензии могут быть изготовлены в соответствии со способами, известными в данной области, с использованием пригодных диспергирующих или смачивающих веществ и суспендирующих веществ. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например раствор в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых наполнителей и растворителей, которые можно использовать, находятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды традиционно используют стерильные жирные масла. Для этой цели можно использовать любое легкое жирное масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, пригодны для получения инъекционных препаратов так же, как природные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, особенно в их полиоксиэтилированных версиях. Эти масляные растворы или суспензии также могут содержать разбавитель на основе спирта длинной цепи или диспергирующее вещество, такое как карбоксиметилцеллюлоза, или сходные диспергирующие вещества, которые обычно используют при составлении фармацевтически приемлемых дозированных форм, включая эмульсии и суспензии. Также для составления можно использовать другие широко используемые поверхностно-активные вещества, такие как Tween, Span и другие эмульгаторы или усилители биодоступности, которые обычно используются при изготовлении фармацевтически приемлемых твердых, жидких или иных дозированных форм.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, можно вводить перорально в любой перорально приемлемой дозированной форме, включая, но не ограничиваясь ими, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для перорального применения обычно используемые носители включают, но не ограничиваются ими, лактозу и кукурузный крахмал. Также обычно добавляют смазывающие вещества, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсулы пригодные разбавители включают лактозу и сухой кукурузный крахмал. Когда для перорального применения требуются водные суспензии, активный ингредиент комбинируют с эмульгирующими и суспендирующими веществами. Если желательно, также можно добавлять определенные подсластители, вкусовые добавки или красители.

Альтернативно фармацевтически приемлемые композиции, описанные в настоящем описании, можно вводить в форме суппозитория для ректального введения. Их можно получать путем смешивания средства с пригодным, не вызывающим раздражения эксципиентом, который является твердым при комнатной температуре, но жидким при ректальной температуре и, таким образом, плавится в прямой кишке, высвобождая терапевтическое средство. Такие материалы включают масло какао, пчелиный воск и полиэтиленгликоли.

Фармацевтические композиции по изобретению также можно вводить местно, особенно когда мишень для лечения включает области или органы, легкодоступные при местном применении, включая заболевания глаза, кожи или нижнего отдела кишечника. Пригодные составы для местного введения легко получают для каждой из этих областей или органов.

Местное применение для нижнего отдела кишечника можно осуществлять с помощью состава ректального суппозитория (см. выше) или в пригодном составе для применения с помощью клизмы. Также можно использовать местные чрескожные пластыри.

Для местного применения фармацевтически приемлемые композиции можно составлять в форме

пригодной мази, содержащей активный компонент, суспендированный или растворенный в одном или нескольких носителях. Носители для местного введения соединений по изобретению включают, но не ограничиваются ими, минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксипропилен, соединение полиоксипропилена, эмульгирующий воск и воду. Альтернативно фармацевтические композиции можно составлять в виде пригодного лосьона или крема, содержащего активные компоненты, суспендированные или растворенные в одном нескольких фармацевтически приемлемых носителях. Пригодные носители включают, но не ограничиваются ими, минеральное масло, моностеарат сорбитана, полисорбат 60, воск на основе цетиловых сложных эфиров, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

Для офтальмологического применения фармацевтически приемлемые композиции могут быть составлены в форме микронизированных суспензий в изотоническом стерильном физиологическом растворе с доведенным значением pH или в другом водном растворе, или, в частности, в качестве растворов в изотоническом стерильном физиологическом растворе с доведенным значением pH или другом водном растворе, либо с консервантом, таким как хлорид бензалкония, либо без него. Альтернативно для офтальмологического применения фармацевтические композиции можно составлять в форме мази, такой как вазелин.

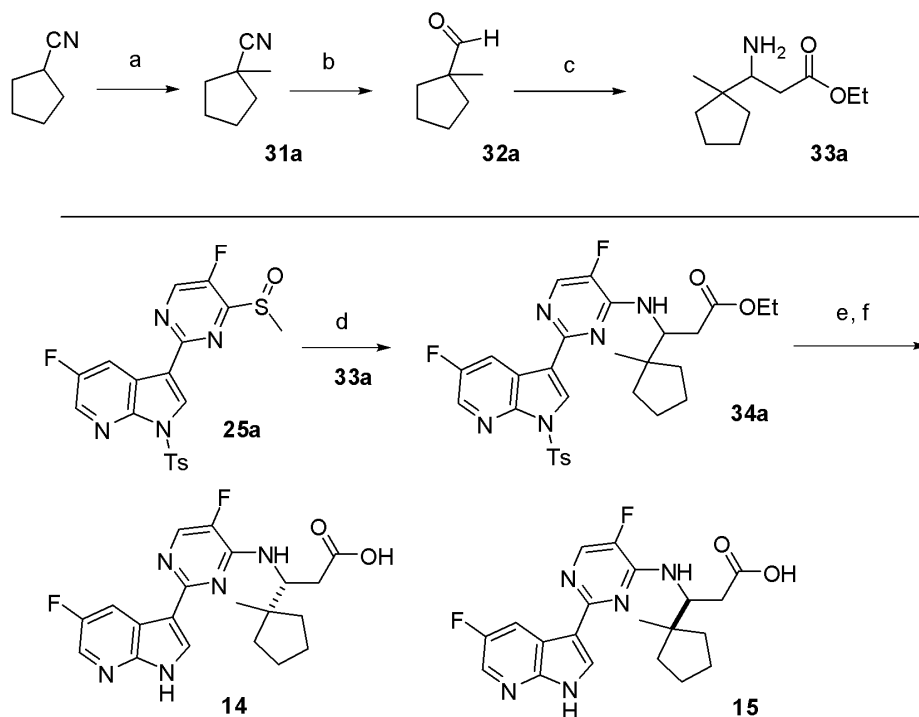
Фармацевтически приемлемые композиции по изобретению также можно вводить при помощи назального аэрозоля или ингаляции. Такие композиции получают способами, хорошо известными в области составления фармацевтических препаратов, и их можно получать в форме растворов в физиологическом растворе с использованием бензилового спирта или других пригодных консервантов, усиливающих всасывание средств для повышения биодоступности, фторуглеродов и/или других общепринятых растворяющих или диспергирующих веществ.

Соединения для применения в способах по изобретению можно составлять в виде единичной дозированной формы. Термин "единичная дозированная форма" относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичной дозировки для индивидуумов, подвергаемых лечению, причем каждая единица содержит заданное количество активного вещества, вычисленное так, чтобы обеспечить требуемый терапевтический эффект, необязательно в сочетании с подходящим фармацевтическим носителем. Единичная дозированная форма может быть предназначена для однократной суточной дозы или одной из множества суточных доз (например, приблизительно от 1 до 4 или более раз в сутки). Когда используют множество суточных доз, единичная дозированная форма может быть одинаковой или может отличаться для каждой дозы.

Примеры

Получение соединений 14 и 15.

Схема синтеза 6.



a) LiHMDS, MeI, THF -78°C ; b) DIBAL, CH_2Cl_2 , -78°C ; c) малоновая кислота, ацетат аммония, этанол, 80°C ; d) Pr_2NEt , THF, 80°C ; e) LiOH, THF- H_2O (3:1), 130°C , микроволновое излучение; f) хиральное разделение SFC

Получение 1-метилциклопентанкарбонитрила (31a).

К холодному (-78°C) раствору LiHMDS (48,0 мл 1 М раствора в тетрагидрофуране, 48,0 ммоль) в тетрагидрофуране по каплям добавляли раствор циклопентанкарбонитрила (3,81 г, 40,0 ммоль) в тетрагидрофуране (10 мл) в течение 5 мин. После перемешивания при -78°C в течение тридцати минут добавляли метилиодид (3,74 мл, 60,00 ммоль) одной порцией. Реакционной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры в течение ночи. Раствор охлаждали до 0°C, добавляли этилацетат (50 мл) и насыщенный водный раствор хлорида аммония (20 мл). Добавляли дополнительную воду (10 мл) для растворения твердого вещества. Органический слой отделяли и промывали насыщенным водным раствором хлорида аммония (20 мл). Водный слой экстрагировали этилацетатом (2×20 мл). Объединенные органические фазы промывали рассолом, сушили (MgSO₄), фильтровали и концентрировали в вакууме с получением 4,7 г масла желтого цвета, которое использовали без дальнейшей очистки. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 2,04-1,93 (м, 2H), 1,77-1,65 (м, 2H), 1,66-1,55 (м, 2H), 1,54 (м, 2H), 1,25 (с, 3H).

Получение 1-метилциклопентанкарбальдегида (32a).

К холодному (-78°C) раствору гидрида диизобутилалюминия (100,0 мл 1 М раствора, 100,0 ммоль) в дихлорметане по каплям добавляли раствор 1-метилциклопентанкарбонитрила 31a (4,3 г, 40,0 ммоль) в дихлорметане (5 мл). Реакционную смесь поддерживали при -78°C в течение 30 мин. Баню с сухим льдом удаляли и добавляли метанол (1 мл) для гашения реакции. Добавляли раствор тартрата калия натрия (30 мл, 10% раствор) и смесь энергично перемешивали. Органический слой отделяли и водный слой экстрагировали дихлорметаном (3×20 мл). Объединенные органические фазы промывали рассолом, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением 3 г масла светло-желтого цвета, которое использовали без дальнейшей очистки. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 2,04-1,93 (м, 2H), 1,77-1,65 (м, 2H), 1,66-1,55 (м, 2H), 1,54 (м, 2H), 1,25 (с, 3H).

Получение этил 3-амино-3-(1-метилциклопентил)пропаноата (33a).

Смесь 1-метилциклопентанкарбальдегида 32a (3,00 г, 26,75 ммоль), малоновой кислоты (1,29 мл, 20,00 ммоль) и ацетата аммония (3,08 г, 40,00 ммоль) в этаноле (5 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 12 ч. Осадок отделяли фильтрацией и промывали этанолом. Фильтрат использовали без дальнейшей очистки.

К описанному выше раствору в этаноле добавляли серную кислоту (1,07 мл, 20,00 ммоль) и нагревали до температуры кипения с обратным холодильником в течение 2 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток разбавляли водой (20 мл) и простым эфиром (10 мл). Водный слой отделяли и промывали простым эфиром (10 мл). Органические слои удаляли. Водный раствор нейтрализовывали раствором гидроксида натрия (6 н.) до основного и экстрагировали этилацетатом (3×10 мл). Объединенные органические слои промывали водой (10 мл), рассолом (10 мл), фильтровали, сушили (MgSO₄), фильтровали и концентрировали в вакууме с получением 1,5 г клейкого масла светло-желтого цвета, которое превращалось в твердое вещество при стоянии. Неочищенный продукт использовали без дальнейшей очистки. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,25-4,14 (кв, 2H), 3,40 (ушир.с, 2H), 3,20-3,09 (м, 1H), 2,48 (дд, J=26,2, 16,0, 6,6 Гц, 2H), 1,77-1,58 (м, 4H), 1,52 (м, 2H), 1,47-1,32 (м, 2H), 1,25 (м, 3H), 0,94 (с, 3H).

Получение этил 3-((5-фтор-2-(5-фтор-1-тозил-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиримидин-4-ил)амино)-3-(1-метилциклопентил)пропаноата (34a).

Суспензию этил 3-амино-3-(1-метилциклопентил)пропаноата 33a (0,20 г, 1,00 ммоль), 5-фтор-3-(5-фтор-4-метилсульфинилпиримидин-2-ил)-1-(п-толилсульфонил)-пирроло[2,3-b]пиридина 25a (0,54 г, 1,20 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламина (0,26 мл, 1,50 ммоль) в THF (14,4 мл) кипятили с обратным холодильником при 80°C в течение ночи. После удаления растворителя в вакууме неочищенный продукт очищали хроматографией на силикагеле (градиент 0-50% EtOAc/гексаны) с получением 300 мг целевого продукта в виде твердого вещества светло-желтого цвета. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,49 (дд, J=9,0, 2,8 Гц, 1H), 8,46 (с, 1H), 8,23 (д, J=1,5 Гц, 1H), 8,02 (д, J=8,3 Гц, 2H), 7,99 (д, J=3,1 Гц, 1H), 7,20 (д, J=7,8 Гц, 2H), 5,23 (д, J=8,9 Гц, 1H), 4,80 (тд, J=9,7, 3,6 Гц, 1H), 4,04 (кв, J=7,1 Гц, 1H), 3,91 (кв, J=7,1 Гц, 2H), 2,73-2,58 (м, 1H), 2,44 (дд, J=14,7, 9,6 Гц, 1H), 2,33-2,21 (м, 3H), 1,72-1,46 (м, 7H), 1,42-1,31 (м, 1H), 1,28 (т, J=6,1 Гц, 1H), 1,17 (дд, J=13,4, 6,2 Гц, 2H), 0,98 (т, J=7,1 Гц, 6H); градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, RT=4,25 мин (M+H) 584,29.

Получение этил 3-((5-фтор-2-(5-фтор-1-тозил-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиримидин-4-ил)амино)-3-(1-метилциклопентил)пропаноата (14, 15).

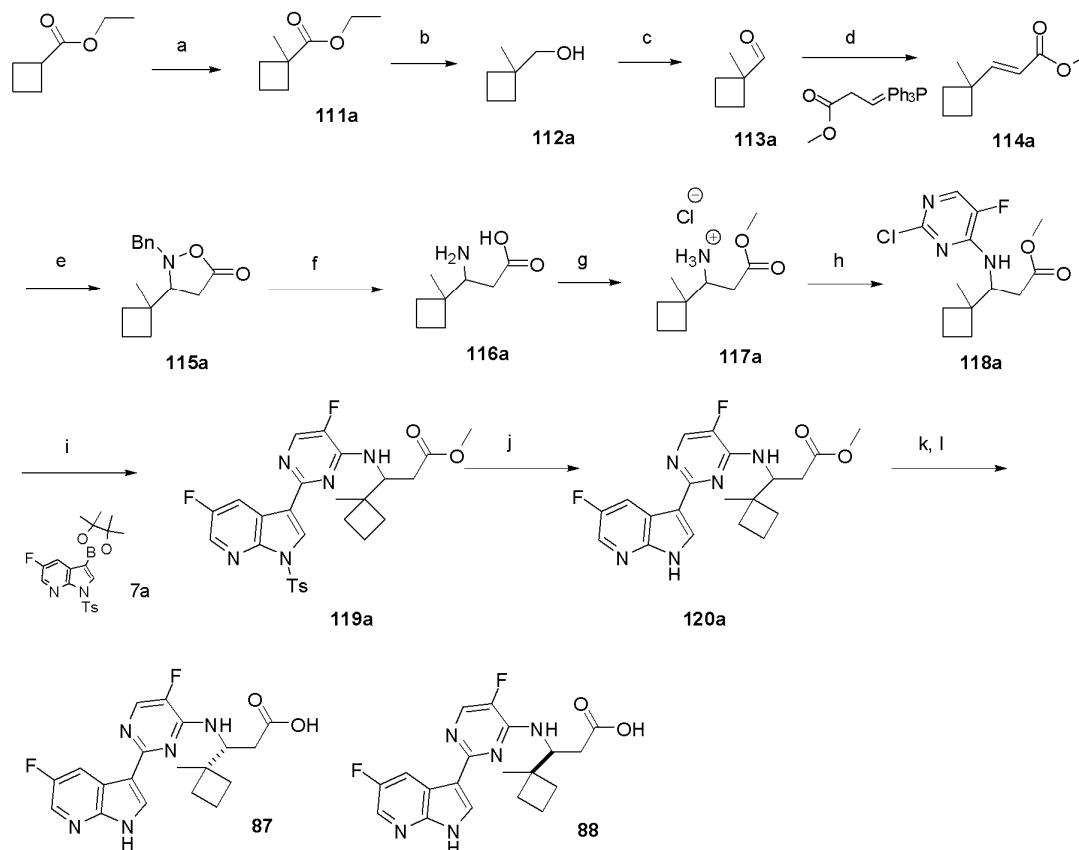
К раствору этил 3-((5-фтор-2-(5-фтор-1-тозил-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиримидин-4-ил)амино)-3-(1-метилциклопентил)пропаноата 34a (0,16 г, 0,27 ммоль) в THF (6 мл) добавляли LiOH (1,50 мл 1 М раствора, 1,50 ммоль). Реакционную смесь облучали в микроволновом реакторе в течение 30 мин при 130°C. Добавляли насыщенный водный раствор NH₄Cl для подкисления смеси. Полученный белый осадок собирали и промывали водой, ацетонитрилом и простым эфиром. Затем твердое вещество сушили в вакууме с получением чистой требуемой кислоты. К твердому веществу добавляли хлористоводородную кислоту (2 мл 1 н. раствора), и смесь лиофилизировали с получением 120 мг целевого продукта в виде соли хлористоводородной кислоты (порошок светло-желтого цвета). ¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 8,64 (д, J=9,3 Гц, 1H), 8,14 (д, J=8,3 Гц, 2H), 7,97 (д, J=3,6 Гц, 1H), 4,99 (д, J=6,3 Гц, 1H), 3,37 (с,

1H), 2,75 (дд, J=14,9, 3,6 Гц, 1H), 2,55 (дд, J=14,8, 9,7 Гц, 1H), 1,83-1,57 (м, 6H), 1,54-1,42 (м, 1H), 1,37 (дд, J=11,9, 5,6 Гц, 1H), 1,11 (д, J=19,2 Гц, 3H); градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, RT=2,10 мин (M+H) 401,94.

Рацемическую смесь карбоновых кислот подвергали хиральному разделению SFC с получением индивидуальных энантиомеров, 14 и 15.

Получение соединений 62, 81 и 88.

Схема синтеза 17.



(a) LDA, MeI, THF; (b) LiAlH₄, простой эфир; (c) PCC, CH₂Cl₂; (d) 2-(трифенилфосфоранилиден)ацетат, CH₂Cl₂; (e) N-бензилгидроксиламин-HCl, CH₂Cl₂; (f) H₂, Pd/C, MeOH; (g) AcCl, MeOH, кипячение с обратным холодильником; (h) 2,4-дихлор-5-фторпиримидин, Et₃N, EtOH, THF, 55°C; (i) 5-фтор-1-(п-толилсульфонил)-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пирроло-[2,3-b]пиридин, 7a, Pd₂(dba)₃, XPhos, K₃PO₄, 2-MeTHF, H₂O, 115°C; (j) HCl, диоксан, ацетонитрил, 65°C; (k) LiOH, THF, H₂O, 50°C.

Получение этил 1-метилциклобутанкарбоксилата (111a).

Раствор этилциклобутанкарбоксилата (20,0 г, 156,0 ммоль) в THF (160 мл) по каплям добавляли к холодному (-78°C) раствору LDA (164 ммоль 2 М раствора) в THF (40 мл). Раствор нагревали до 0°C, а затем вновь охлаждали до -40°C, затем добавляли йодометан (10,2 мл, 163,8 ммоль). Раствор медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором хлорида аммония и добавляли простой эфир. Слои разделяли и водный слой промывали простым эфиром. Объединенные органические слои промывали 1 н. HCl, а затем сушили над MgSO₄. Продукт очищали перегонкой. ¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 4,20-4,05 (м, 2H), 2,57-2,33 (м, 2H), 2,08-1,94 (м, 1H), 1,94-1,77 (м, 3H), 1,40 (с, 3H), 1,27 (тт, J=7,1, 1,5 Гц, 3H).

Получение (1-метилциклобутил)метанола (112a).

Алюмогидрид лития (2,1 г, 59,4 ммоль) суспендировали в простом эфире (150 мл) и охлаждали до 0°C. К суспензии LiAlH₄ по каплям добавляли раствор этил 1-метилциклобутанкарбоксилата, 111a, (13,0 г, 91,4 ммоль) в простом эфире (60 мл). Смесь перемешивали в течение 2 ч на ледяной бане, а затем медленно гасили 1 н. HCl. Слои разделяли и водный слой промывали простым эфиром. Объединенные органические слои промывали рассолом и летучие вещества удаляли с помощью мягкого тока азота с получением целевого продукта, который использовали без дальнейшей очистки. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 3,54-3,39 (м, 4H), 1,99-1,74 (м, 8H), 1,74-1,62 (м, 4H), 1,46-1,18 (м, 3H), 1,13 (д, J=1,7 Гц, 6H).

Получение 1-метилциклобутанкарбальдегида (113a) и метил 3-(1-метилциклобутил)акрилата (114a).

Раствор (1-метилциклобутил)метанола 112a (1,00 г, 9,98 ммоль) в дихлорметане (25 мл) добавляли к суспензии PCC (2,69 г, 12,50 ммоль) и целита (2,70 г) в дихлорметане (25 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч и фильтровали через слой силикагеля (элюирование дихлорметаном). Раствори-

тели удаляли с помощью тока азота до тех пор, пока объем не составил приблизительно 20 мл. Добавляли 2-(трифенилфосфоранилиден)ацетат (0,98 г, 10,00 ммоль) одной порцией и смесь перемешивали в течение 7 ч. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении и добавляли 10% раствор гексаны/простой эфир. Полученное твердое вещество отфильтровывали и выбрасывали. Полученный раствор выливали прямо на силикагель и элюировали смесью EtOAc/гексаны с получением целевого продукта. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,05 (д, J=15,8 Гц, 1H), 5,66 (дд, J=15,8, 1,3 Гц, 1H), 4,21-4,00 (м, 2H), 2,12-1,73 (м, 7H), 1,29-1,17 (м, 6H).

Получение (+/-)-2-бензил-3-(1-метилциклобутил)изоксазолидин-5-она (115a).

N-бензилгидроксиламин (хлористоводородная кислота) (0,28 г, 1,80 ммоль) и триэтиламин (0,28 мл, 2,00 ммоль) добавляли к раствору метил 3-(1-метилциклобутил)акрилата 114a (0,26 г, 1,50 ммоль) в дихлорметане (9,5 мл). Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и смесь разбавляли дихлорметаном и водой. Слои разделяли с помощью фазового разделителя и водный слой промывали дихлорметаном. Органические слои объединяли и летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали на силикагеле (EtOAc/гексан) с получением целевого продукта в качестве рацемической смеси: градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, RT=1,47 мин (M+N) 246,10.

Получение (+/-)-3-амино-3-(1-метилциклобутил)пропановой кислоты (116a).

Раствор рацемического 2-бензил-3-(1-метилциклобутил)изоксазолидин-5-она, 115a, (0,18 г, 1,28 ммоль) в MeOH (2,9 мл) встряхивали в течение ночи под давлением водорода 50 фунт/кв. дюйм (344,7 кПа) в присутствии 50 мг катализатора на основе гидроксида палладия. Смесь фильтровали через целит и летучие вещества удаляли при пониженном давлении с получением целевого продукта, который использовали без дальнейшей очистки. ¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 3,42 (дд, J=11,0, 1,9 Гц, 1H), 2,26 (ддд, J=27,8, 16,7, 6,5 Гц, 2H), 1,86 (дддд, J=36,9, 26,3, 11,2, 7,6 Гц, 6H), 1,18 (с, 3H).

Получение (+/-)-метил 3-((2-хлор-5-фторпиримидин-4-ил)амино)-3-(1-метилциклобутил)пропаноата (118a).

Рацемическую 3-амино-3-(1-метилциклобутил)пропановую кислоту 116a (2,3 г, 14,4 ммоль) растворяли в метаноле (104 мл). Раствор охлаждали на ледяной бане и по каплям добавляли ацетилхлорид (5,6 г, 71,9 ммоль) (температуру поддерживали на уровне <10°C). Реакционную смесь нагревали до 65°C и перемешивали при этой температуре в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, а затем промывали толуолом для удаления летучих веществ. Неочищенный рацемический хлорид 3-метокси-1-(1-метилциклобутил)-3-оксопропан-1-аминия 117a использовали без дальнейшей очистки.

Рацемический хлорид 3-метокси-1-(1-метилциклобутил)-3-оксопропан-1-аминия 117a (3,3 г, 15,9 ммоль) растворяли в смеси 59 мл THF и 6,6 мл EtOH и раствор охлаждали на ледяной бане. Добавляли 2,4-дихлор-5-фторпиримидин (2,9 г, 18,0 ммоль), а затем по каплям добавляли триэтиламин (5,1 г, 51,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 55°C в течение 17 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, после чего добавляли воду и дихлорметан. Фазы разделяли и водный слой промывали дихлорметаном. Органические слои объединяли и промывали рассолом. Растворители удаляли и остаток очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексан) с получением целевого продукта: градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, RT=3,23 мин (M+N) 302,35.

Получение (+/-)-метил 3-((5-фтор-2-(5-фтор-1-тозил-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиримидин-4-ил)амино)-3-(1-метилциклобутил)пропаноата (119a).

Раствор 5-фтор-1-(п-толилсульфонил)-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пирроло[2,3-b]пиридина 7a (3,31 г, 7,95 ммоль), рацемического метил 3-((2-хлор-5-фторпиримидин-4-ил)амино)-3-(1-метилциклобутил)пропаноата 118a (2,00 г, 6,63 ммоль) и K₃PO₄ (4,22 г, 20,00 ммоль) в 2-MeTHF (253 мл) и воде (56 мл) продували азотом в течение 0,75 ч. Добавляли XPhos (0,38 г, 0,80 ммоль) и Pd₂(dba)₃ (0,15 г, 0,17 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при 115°C в закрытой пробирке в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали и водную фазу удаляли. Органическую фазу фильтровали через слой целита и смесь концентрировали до сухого состояния. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны) с получением целевого продукта: градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, RT=2,32 мин (M+N) 556,44.

Получение (+/-)-метил 3-((5-фтор-2-(5-фтор-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиримидин-4-ил)амино)-3-(1-метилциклобутил)пропаноат (120a).

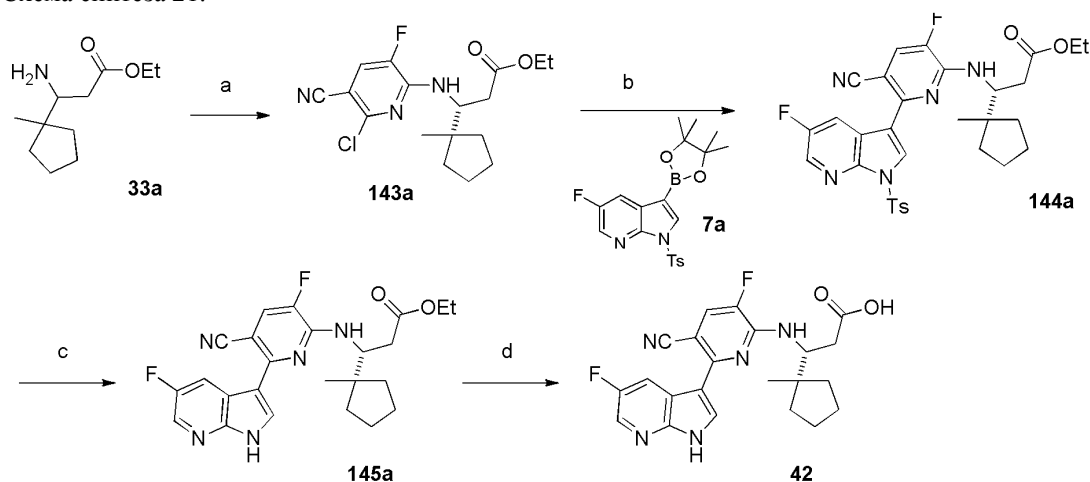
К рацемическому раствору метил 3-((5-фтор-2-(5-фтор-1-тозил-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиримидин-4-ил)амино)-3-(1-метилциклобутил)пропаноата 119a (3,3 г, 5,9 ммоль) в ацетонитриле (25 мл) добавляли HCl (26 мл 4 н. раствора в диоксане). Реакционную смесь нагревали до 65°C в течение 4 ч. Раствор охлаждали до комнатной температуры и растворители удаляли при пониженном давлении. Смесь промывали ацетонитрилом, после чего добавляли водный раствор бикарбоната натрия и этилацетат. Фазы разделяли и водный слой промывали этилацетатом. Объединенные органические фазы сушили Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc/гексаны) с получением целевого продукта: градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, RT=2,34 мин (M+N) 403,11.

Получение 3-((5-фтор-2-(5-фтор-1Н-пирроло[2,3-*b*]пиридин-3-ил)пиримидин-4-ил)амино)-3-(1-метилциклобутил)пропановой кислоты (87 и 88).

К раствору метил 3-((5-фтор-2-(5-фтор-1Н-пирроло[2,3-*b*]пиридин-3-ил)пиримидин-4-ил)амино)-3-(1-метилциклобутил)пропаноата (11) (1,75 г, 4,36 ммоль) в THF (25 мл) добавляли 1 н. водный раствор LiOH (13,1 мл). Смесь нагревали до 50°C в течение 3,5 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой. THF удаляли при пониженном давлении, а затем остаток промывали два раза гексанами. Добавляли простой эфир и слои разделяли (слой простого эфира отбрасывали). pH доводили до 5,5 с 1 н. HCl и полученное твердое вещество фильтровали и промывали водой. Твердое вещество промывали гептаном и сушили над P₂O₅ с получением целевого продукта. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO) δ 12,17 (д, J=60,2 Гц, 2H), 8,59 (д, J=8,4 Гц, 1H), 8,39-8,05 (м, 3H), 7,52 (с, 1H), 5,00 (с, 1H), 2,23 (д, J=7,7 Гц, 1H), 2,00 (с, 1H), 1,81 (д, J=48,3 Гц, 2H), 1,62 (с, 1H), 1,46 (с, 1H), 1,21 (с, 3H); градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, RT=2,08 мин (M+H) 388,46. Рацемическую смесь подвергали хиральному разделению SFC с получением отдельных энантиомеров, 87 и 88.

Получение соединения 42.

Схема синтеза 21.



(a) 2-хлор-5,6-дифторпиридин-3-карбонитрил, Et₃N, THF, EtOH; (b) 5-фтор-1-(*p*-толилсульфонил)-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пирроло[2,3-*b*]пиридин 7a, X-phos, Pd₂(dba)₃, K₃PO₄, 2-метил THF, H₂O, 130°C; c) NaOMe, THF; d) LiOH, THF, H₂O.

Получение (R)-этил 3-(6-хлор-5-циано-3-фторпиридин-2-иламино)-3-(1-метилциклопентил)пропаноата (143a).

К раствору рацемического этил 3-амино-3-(1-метилциклопентил)пропаноата 33a (0,40 г, 2,01 ммоль) и 2,6-дихлор-5-фторпиридин-3-карбонитрила (0,46 г, 2,41 ммоль) в THF (20 мл) добавляли триэтиламин (0,67 мл, 4,82 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 90°C в пробирке высокого давления в течение 18 ч. Реакционную смесь фильтровали и полученный фильтрат концентрировали в вакууме. Продукт очищали хроматографией на силикагеле (25% EtOAc/гексаны) с получением 380 мг целевого продукта в качестве рацемической смеси. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,31 (д, J=9,7 Гц, 1H), 5,56 (д, J=8,9 Гц, 1H), 4,68 (тд, J=9,6, 3,6 Гц, 1H), 4,07 (кв, J=7,1 Гц, 2H), 2,68 (дд, J=14,8, 3,7 Гц, 1H), 2,46 (дд, J=14,8, 9,3 Гц, 1H), 1,77-1,62 (м, 4H), 1,61-1,49 (м, 2H), 1,47-1,37 (м, 1H), 1,35-1,26 (м, 1H), 1,19 (т, J=7,1 Гц, 3H), 1,01 (с, 3H); градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, время удержания = 3,81 мин (M+H) 354,98. Рацемическую смесь подвергали хиральному разделению SFC с получением индивидуальных энантиомеров, 143a и 143b. (R)-энантиомер 143a использовали для следующей стадии синтеза.

Получение (R)-этил 3-(5-циано-3-фтор-6-(5-фтор-1-тозил-1Н-пирроло[2,3-*b*]пиридин-3-ил)пиримидин-2-иламино)-3-(1-метилциклопентил)пропаноата (144a).

Раствор 5-фтор-1-(*p*-толилсульфонил)-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пирроло[2,3-*b*]пиридина 7a (0,155 г, 0,373 ммоль), рацемического этил 3-[(6-хлор-5-циано-3-фтор-2-пиридил)амино]-3-(1-метилциклопентил)пропаноата 143a (0,120 г, 0,339 ммоль) и K₃PO₄ (0,288 г, 1,357 ммоль) в 2-метил THF (10,0 мл) и H₂O (0,24 мл) дегазировали в токе азота в течение 30 мин. К смеси добавляли X-phos (0,020 г, 0,041 ммоль) и Pd₂(dba)₃ (0,008 г, 0,008 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 130°C в пробирке высокого давления в течение 45 мин. Органическую фазу фильтровали через слой целита и концентрировали в вакууме. Полученный неочищенный материал очищали хроматографией на силикагеле (30% EtOAc/гексаны) с получением 150 мг целевого продукта. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,67 (с, 1H), 8,44 (дт, J=15,3, 7,7 Гц, 1H), 8,37 (д, J=1,5 Гц, 1H), 8,13 (т, J=7,6 Гц, 2H), 7,41 (д, J=10,3 Гц, 1H), 7,32 (д, J=7,5 Гц, 2H), 5,38 (т, J=9,7 Гц, 1H), 4,89 (тд, J=10,1, 3,3 Гц, 1H), 4,02-3,91 (м, 2H), 2,74 (дд, J=15,1, 3,5 Гц, 1H), 2,52 (дд, J=15,1, 10,2 Гц, 1H), 2,40 (с, 3H), 1,61 (ддт, J=32,0, 20,7, 7,7 Гц, 7H), 1,49-1,30 (м, 3H), 1,27 (т, J=7,1 Гц, 3H), 1,08-0,97 (м, 3H). Градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин,

C18/ACN, время удержания = 4,22 мин (M+H) 608,29.

Получение (R)-метил 3-(5-циано-3-фтор-6-(5-фтор-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиридин-2-иламино)-3-(1-метилциклопентил)пропаноата (145a).

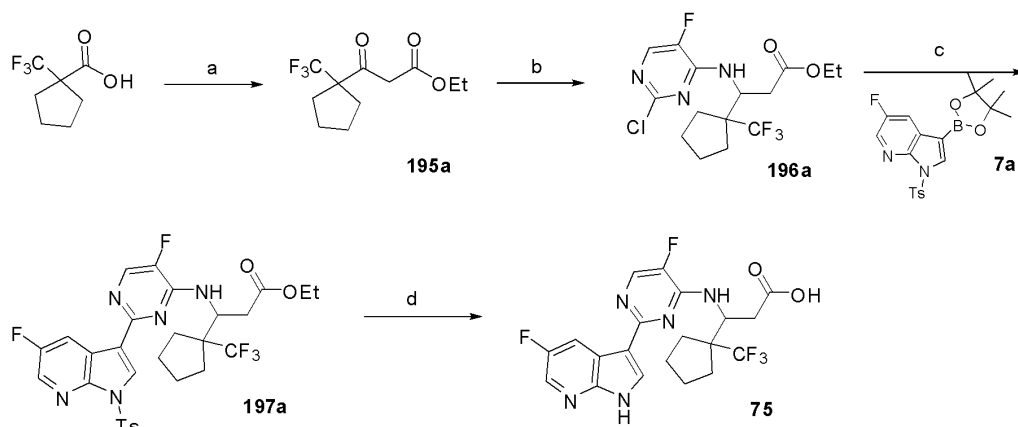
К раствору рацемического этил 3-(5-циано-3-фтор-6-(5-фтор-1-тозил-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиридин-2-иламино)-3-(1-метилциклопентил)пропаноата 144a (0,150 г, 0,247 ммоль) в THF (20 мл) добавляли метоксид натрия (0,053 мл 25 мас.% раствора в MeOH, 0,247 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 мин. Реакционную смесь разбавляли насыщенным водным раствором NaHCO₃ и EtOAc. Органическую фазу сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Продукт очищали хроматографией на силикагеле (40% EtOAc/гексаны) с получением 90 мг целевого продукта в качестве смеси этилового и метилового сложных эфиров. Смесь использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 10,18 (с, 1H), 8,65 (дд, J=9,6, 2,5 Гц, 1H), 8,48 (д, J=2,8 Гц, 1H), 8,32 (с, 1H), 7,37 (т, J=14,1 Гц, 1H), 5,38 (д, J=7,9 Гц, 1H), 5,02 (тд, J=9,8, 3,5 Гц, 1H), 3,54 (с, 3H), 2,80 (дт, J=15,8, 7,9 Гц, 1H), 2,57 (дд, J=14,9, 9,8 Гц, 1H), 1,80-1,57 (м, 7H), 1,43 (дд, J=24,5, 14,1, 6,0 Гц, 3H), 1,08 (с, 3H); градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, время удержания = 3,60 мин (M+H) 440,26.

Получение (R)-3-(5-циано-3-фтор-6-(5-фтор-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиридин-2-иламино)-3-(1-метилциклопентил)пропановой кислоты (42).

К раствору рацемического метил 3-(5-циано-3-фтор-6-(5-фтор-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиридин-2-иламино)-3-(1-метилциклопентил)пропаноата 145a (0,090 г, 0,204 ммоль) в THF (30 мл) добавляли раствор гидроксида лития (0,035 г, 0,819 ммоль) в H₂O (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при 70°C в течение ночи. Органическую фазу удаляли при пониженном давлении, и полученный остаток очищали препаративной ВЭЖХ. Соответствующие фракции ВЭЖХ экстрагировали EtOAc, и растворитель удаляли при пониженном давлении: ¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 8,64 (дд, J=8,4, 2,4 Гц, 1H), 8,57 (с, 1H), 8,24 (д, J=4,4 Гц, 1H), 5,19 (д, J=8,7 Гц, 1H), 2,78 (кв.д, J=15,9, 6,6 Гц, 2H), 1,85-1,57 (м, 6H), 1,48 (дд, J=11,8, 6,0 Гц, 1H), 1,36 (дт, J=12,0, 6,0 Гц, 1H), 1,11 (с, 3H); градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, время удержания = 3,21 мин (M+H) 426,25.

Получение соединений 75, 76, 79, 85, 93 и 95.

Схема синтеза 31.



(a) i) карбонилдиимдазол, CH₂Cl₂; ii) этилмалонат калия, MgCl₂, DMAP, Et₃N, THF, CH₃CN; (b) i) ацетат аммония, EtOH, кипячение с обратным холодильником; ii) цианоборгидрид натрия, AcOH, EtOAc; iii) 2,4-дихлор-5-фторпиримидин, ¹Pr₂NEt, EtOH; (c) 5-фтор-1-(п-толилсульфонил)-3-(4,4,5,5-тетрамethyl-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пирроло[2,3-b]пиридин, 7a, X-phos, Pd₂(dba)₃, K₃PO₄, 2-метил THF, H₂O, 135°C, микроволновое излучение; (d) LiOH, MeOH, 65°C.

Получение этил 3-око-3-(1-(трифторметил)циклопентил)пропаноата (195a).

К раствору 1-(трифторметил)циклопентанкарбоновой кислоты (1,30 г, 7,14 ммоль) в дихлорметане (14 мл) добавляли карбонилдиимдазол (5,46 г, 33,68 ммоль). После перемешивания в течение 5 ч при комнатной температуре реакционную смесь концентрировали в вакууме до образования остатка.

В другой колбе 3-этокси-3-оксoproпаноат (ион калия) (2,03 г, 11,90 ммоль) смешивали с дихлормагнийем (1,13 г, 11,90 ммоль) и DMAP (72,65 мг, 0,59 ммоль) в THF (23,13 мл) и ацетонитриле (11,57 мл). Через 3 ч добавляли описанный выше неочищенный раствор в THF (10 мл), а затем триэтиламин (1,66 мл, 11,90 ммоль). Реакционной смеси позволяли перемешаться при 25°C в течение 8 ч. Неочищенный продукт выделяли путем экстрагирования в этилацетат (2×100 мл) против 1 н. HCl (100 мл), сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме с получением 1,0 г целевого продукта в виде масла желтого цвета. ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 12,58 (с, H), 5,32 (с, H), 4,27-4,18 (м, 2H), 2,33-2,14 (м, 2H), 2,05-1,85 (м, 4H), 1,77-1,69 (м, 2H) и 1,30 (тд, J=7,1, 3,2 Гц, 3H) м.д.

Получение (+/-)-этил 3-(2-хлор-5-фторпиримидин-4-иламино)-3-(1-(трифторметил)циклопентил)пропаноата (196a).

Раствор этил 3-оксо-3-(1-(трифторметил)циклопентил)пропаноата 195а (0,500 г, 1,982 ммоль) и ацетата аммония (0,458 г, 5,946 ммоль) в EtOH (20 мл) нагревали до температуры кипения с обратным холодильником в течение 3 ч. Неочищенную реакционную смесь концентрировали в вакууме до остатка и перерастворяли в EtOAc (20 мл). Новую смесь охлаждали до 0°C и к смеси добавляли уксусную кислоту (0,338 мл, 5,946 ммоль) и цианоборгидрид натрия (0,498 г, 7,928 ммоль, 4 экв.). Реакционной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь гасили насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл) и экстрагировали этилацетатом (2×20 мл). Органическую фазу концентрировали в вакууме и перерастворяли в EtOH (20 мл). К раствору добавляли 2,4-дихлор-5-фторпиримидин (0,496 г, 2,973 ммоль) и основание N,N-диизопропилэтиламин (2,0 мл). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 12 ч, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc) с получением 84 мг целевого продукта в виде масла желтого цвета: градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, время удержания = 3,54 мин (M+H) 384,40.

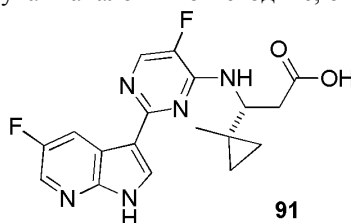
Получение (+/-)-этил 3-(5-фтор-2-(5-фтор-1-тозил-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиримидин-4-иламино)-3-(1-(трифторметил)циклопентил)пропаноата (197а).

К раствору рацемического этил 3-(2-хлор-5-фторпиримидин-4-иламино)-3-(1-(трифторметил)циклопентил)пропаноата 196а (0,084 г, 0,219 ммоль) в THF (10 мл) и воде (1 мл) добавляли 5-фтор-1-(п-толилсульфонил)-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пирроло[2,3-b]пиридин 7а (0,137 г, 0,328 ммоль) и фосфат калия (0,140 г, 0,657 ммоль). Полученную смесь дегазировали в токе азота в течение 10 мин. Затем к реакционной смеси добавляли X-Phos (0,010 г, 0,021 ммоль) и Pd₂(dba)₃ (0,010 г, 0,011 ммоль). Реакционную смесь облучали в течение 15 мин при 135°C микроволновым излучением. Полученную смесь концентрировали в вакууме до масла коричневого цвета, которое очищали хроматографией на силикагеле (EtOAc/CH₂Cl₂) с получением 80 мг целевого продукта в виде твердого вещества светло-желтого цвета: градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, время удержания = 4,22 мин (M+H) 638,42.

Получение (+/-)-3-(5-фтор-2-(5-фтор-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиримидин-4-иламино)-3-(1-(трифторметил)циклопентил)пропановой кислоты (75).

К раствору рацемического этил 3-(5-фтор-2-(5-фтор-1-тозил-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиримидин-4-иламино)-3-(1-(трифторметил)циклопентил)пропаноата 197а (0,080 г, 0,120 ммоль) в THF (10 мл) добавляли гидроксид лития (2 мл 2 н. раствора). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч и охлаждали до комнатной температуры. Неводный растворитель удаляли при пониженном давлении и водный слой доводили до pH 4. Водный слой экстрагировали этилацетатом (2×20 мл). Объединенные органические фазы концентрировали в вакууме с получением 16 мг целевого продукта в виде твердого вещества светло-желтого цвета. ¹H ЯМР (300 МГц, d₆-DMCO) δ 8,51 (с, Н), 8,25-7,97 (м, 2Н), 7,58-7,42 (м, 2Н), 7,12 (д, J=7,5 Гц, Н), 4,35 (м, Н), 2,85 (м, 2Н) и 1,27-0,70 (м, 8Н) м.д.; градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, время удержания = 2,55 мин (M+H) 456,45.

Следующие аналоги можно получать аналогично методике, описанной выше для соединения 75:



(R)-3-((5-фтор-2-(5-фтор-1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)пиримидин-4-ил)амино)-3-(1-метилциклопропил)пропановая кислота (91).

Градиент LCMS 10-90%, 0,1% муравьиная кислота, 5 мин, C18/ACN, (M+H) 374.

Пример 2. Анализ противовирусной активности в отношении вируса гриппа.

Анализы противовирусной активности проводили с использованием двух клеточных способов.

Была разработана модификация стандартного способа анализа цитопатического эффекта (CPE) в 384-луночном микропланшете для титрования, аналогично Noah, et al. (Antiviral Res. 73:50-60, 2006). В кратком изложении клетки MDCK инкубировали с исследуемыми соединениями и вирусом гриппа А (A/PR/8/34), при низкой множественности инфекции (приблизительная MOI=0,005) в течение 72 ч при 37°C и жизнеспособность клеток измеряли с использованием детекции АТФ (CellTiter Glo, Promega Inc.). Контрольные лунки, содержащие клетки и вирус, демонстрируют гибель клеток, в то время как лунки, содержащие клетки, вирус и активные противовирусные соединения, демонстрируют выживание клеток (защита клеток). Оценивали различные концентрации исследуемых соединений в четырех экземплярах, например в диапазоне приблизительно от 20 мкМ до 1 нМ. Кривые доза-эффект получали с использованием стандартных 4-параметрических способов аппроксимации кривой и концентрацию исследуемого соединения, приводящую к 50% защите клеток, или выживание клеток, эквивалентное 50% неинфициро-

ванных лунок, регистрировали в качестве IC_{50} .

Был разработан второй клеточный анализ противовирусной активности, который зависит от умножения вирусспецифических молекул РНК в инфицированных клетках, причем уровни РНК прямо измеряли с использованием способа гибридизации с ДНК с разветвленной цепью (bДНК), (Wagaman et al., J. Virol Meth, 105:105-114, 2002). В этом анализе клетки сначала инфицируют в лунках 96-луночного микропланшета для титрования, вирусу позволяют реплицироваться в инфицированных клетках и распространяться в дополнительные серии клеток, а затем клетки лизируют и измеряют содержание вирусной РНК. Этот анализ останавливают раньше, чем анализ СРЕ, обычно через 18-36 ч, когда все клетки-мишени все еще являются жизнеспособными. Вирусную РНК количественно определяют гибридизацией лизатов в лунках с конкретными олигонуклеотидными зондами, фиксированными к лункам планшета для анализа, с последующей амплификацией сигнала гибридизацией с дополнительными зондами, связанными с репортерным ферментом, в соответствии с инструкциями изготовителя (Quantigene 1.0, Panomics, Inc.). Вирусную РНК минус-цепи измеряют с использованием зондов, сконструированных для гена гемагглютинина А консенсусного типа. Контрольные лунки, содержащие клетки и вирус, использовали для определения 100% уровня репликации вируса и кривые доза-эффект для исследуемых противовирусных соединений анализировали с использованием способов 4-параметрической аппроксимации. Концентрацию исследуемого соединения, приводящую к уровням вирусной РНК, равным 50% уровням вирусной РНК в контрольных лунках, регистрировали как EC_{50} .

Способы культивирования вируса и клеток: клетки почки собаки Madin-Darby (CCL-34 American Type Culture Collection) поддерживали в модифицированной способом Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 2 мМ L-глутамином, 1000 Е/мл пенициллина, 1000 мкг/мл стрептомицина, 10 мМ HEPES и 10% эмбриональной телячьей сывороткой. Для анализа СРЕ за сутки до анализа клетки суспендировали путем трипсинизации и 10000 клеток на лунку распределяли в лунки 384-луночного планшета в объеме 50 мкл. В день анализа прикрепляющиеся клетки промывали посредством трех замен DMEM, содержащей 1 мкг/мл обработанного ТРСК трипсина, без эмбриональной телячьей сыворотки. Анализы начинали добавлением 30 TCID₅₀ вируса и исследуемого соединения в среде, содержащей 1 мкг/мл обработанного ТРСК трипсина, в конечном объеме 50 мкл. Планшеты инкубировали в течение 72 ч при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Альтернативно клетки выращивали в DMEM + эмбриональная телячья сыворотка, как описано выше, но в день анализа их трипсинизировали, промывали 2 раза и суспендировали в бессывороточной среде для клеток EX-Cell MDCK cell medium (SAFC Biosciences, Lenexa, KS) и высевали в лунки в количестве 20000 клеток на лунку. Затем эти лунки использовали для анализа после инкубации в течение 5 ч без необходимости в промывании.

Вирус гриппа, штамм A/PR/8/34 (адаптированный для тканевой культуры) получали от ATCC (VR-1469). Исходные культуры вируса с низким количеством пассажей получали в клетках MDCK с использованием стандартных способов (WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, 2002) и измерения TCID₅₀ проводили путем тестирования серийных разведений на клетках MDCK в 384-луночном формате анализа СРЕ, как описано выше, и результаты вычисляли с использованием способа Karber.

Средние значения IC_{50} (средние значения для всех результатов) для определенных конкретных соединений обобщенно представлены в табл. 1:

- A: IC_{50} (среднее значение для всех результатов) < 0,3 мкМ;
- B: $0,3 \text{ мкМ} \leq IC_{50}$ (среднее значение для всех результатов) $\leq 3,3 \text{ мкМ}$;
- C: IC_{50} (среднее значение для всех результатов) > 3,3 мкМ.

Средние величины EC_{50} (среднее значение для всех результатов) для определенных соединений также обобщенно представлены в табл. 1:

- A: EC_{50} (среднее значение для всех результатов) < 0,3 мкМ;
- B: $0,3 \text{ мкМ} \leq EC_{50}$ (среднее значение для всех результатов) $\leq 3,3 \text{ мкМ}$;
- C: EC_{50} (среднее значение для всех результатов) > 3,3 мкМ.

Средние значения EC_{99} (среднее значение для всех результатов) для определенных соединений также обобщенно представлены в табл. 1:

- A: EC_{99} (среднее значение для всех результатов) < 0,3 мкМ;
- B: $0,3 \text{ мкМ} \leq EC_{99}$ (среднее значение для всех результатов) $\leq 3,3 \text{ мкМ}$;
- C: EC_{99} (среднее значение для всех результатов) > 3,3 мкМ.

Некоторые иллюстративные данные являются следующими: соединение 1: $IC_{50}=0,006 \text{ мкМ}$, $EC_{50}=0,009 \text{ мкМ}$, $EC_{99}=0,0094 \text{ мкМ}$; соединение 2: $IC_{50}=0,004 \text{ мкМ}$, $EC_{50}=0,009 \text{ мкМ}$, $EC_{99}=0,0063 \text{ мкМ}$; соединение 6: $IC_{50}=0,004 \text{ мкМ}$, $EC_{50}=0,015 \text{ мкМ}$, $EC_{99}=0,082 \text{ мкМ}$; соединение 69: $IC_{50}=2,31 \text{ мкМ}$, $EC_{50}=0,8 \text{ мкМ}$, $EC_{99}=8,4 \text{ мкМ}$; соединение 76: $IC_{50}=0,423 \text{ мкМ}$, $EC_{50}=0,25 \text{ мкМ}$, $EC_{99}=1,4 \text{ мкМ}$.

Таблица 1 Данные IC₅₀, EC₅₀, ЯМР и LCMS для соединений по изобретению

Соединение №	MDCK IC ₅₀ (мкМ)	бДНК EC ₅₀ (мкМ)	бДНК EC ₉₉ (мкМ)	ЯМР	M+1	LCMS RT
14	A	A	A		402,32	2,13
42	A	A	A	¹ H ЯМР (300 МГц, CDC1 ₃) δ 10,70 (с, 1H), 8,42 (дд, J=9,6, 2,6 Гц, 1H), 8,05 (с, 1H), 7,73 (с, 1H), 7,40 (т, J=8,4 Гц, 1H), 5,32 (д, J=6,6 Гц, 1H), 4,83 (т, J=9,4 Гц, 1H), 2,89 (д, J=5,3 Гц, 1H), 2,34 (дд, J=12,8, 9,6 Гц, 1H), 1,92-1,37 (м, 8H), 1,32-1,24 (м, 1H), 1,20-1,06 (м, 3H).	426,31	3,27
87	A	A	A		389,13	2,02
91	A	A	B		374,42	1,96

Пример 4. Анализ синергии/антагонизма.

Для анализа синергии/антагонизма исследуемые соединения оценивали в анализе на основе CPE в течение трех суток с клетками MDCK, инфицированными A/Puerto Rico/8/34 при MOI 0,01, в экспериментах с комбинациями либо с ингибиторами нейраминидазы озельтамивиром карбоксилатом или занамивиром, либо с ингибитором полимеразы T-705 (см., например, Ruruta et al., Antiviral Research, 82: 95-102 (2009), "T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections"), с использованием способа независимости Bliss (MacSynergy, Pritchard and Shipman, 1990). См., например, Prichard, M.N. and C. Shipman, Jr., A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. Antiviral Res, 1990. 14(4-5): p. 181-205. Этот стандартный способ вовлекает исследование различных комбинаций концентраций ингибиторов в шахматном порядке, и величину синергии вычисляют путем сравнения наблюдаемой поверхности ответа с ожидаемым результатом, вычисленным исходя из простой аддитивности индивидуальных средств по отдельности. Величины синергии более 100 считают высокой синергией и величины от 50 до 100 считают умеренной синергией. Величины синергии, равные нулю, отражают аддитивность, и отрицательные величины синергии отражают антагонизм между средствами.

Таблица 4 Данные о синергии/антагонизме

Эксперименты с комбинациями с использованием способа независимости Bliss (MacSynergy)		
Независимость Bliss	Величина синергии, 95% доверительный интервал	Результат
Соединение 14 + озельтамивир	545	высокая синергия
Соединение 14 + фавипиравир	349	высокая синергия
Соединение 14 + занамивир	255	высокая синергия
Соединение 87 + озельтамивир	348	высокая синергия
Соединение 87 + фавипиравир	412	высокая синергия
Соединение 87 + занамивир	2,7	незначимо

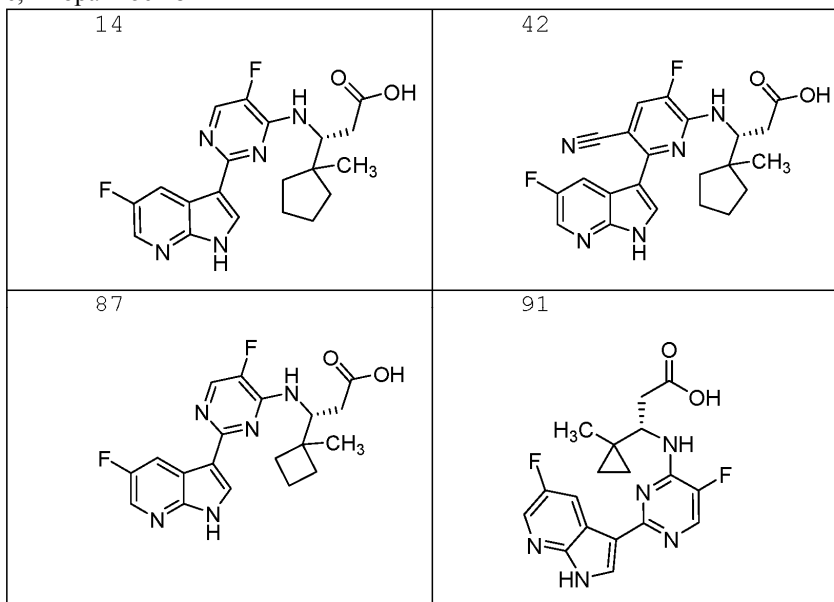
Все ссылки, предоставленные в настоящем описании, включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Как используют в рамках изобретения, все сокращения, символы и допущения согласуются с теми, которые используются в современной научной литературе. См., например, Janet S.

Dodd, ed., The ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors, 2nd Ed., Washington, D.C.: American Chemical Society, 1997.

Следует понимать, что, хотя изобретение описано с помощью подробного описания, представленное выше описание предназначено для иллюстрации, но не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в объеме следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, выбранное из



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Фармацевтическая композиция для лечения гриппа, ингибирующая репликацию вирусов гриппа или снижающая количество вирусов гриппа, содержащая эффективное количество соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли, и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель.

3. Способ ингибирования репликации вирусов гриппа в биологическом образце, включающий стадию введения в указанный биологический образец эффективного количества соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли, где биологический образец представляет собой клеточную культуру или ее экстракт; биоптат, полученный от млекопитающего, или его экстракт; кровь, слюну, мочу, фекалии, сперму или слезную жидкость.

4. Способ уменьшения количества вирусов гриппа в биологическом образце, включающий введение в указанный биологический образец эффективного количества соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли, где биологический образец представляет собой клеточную культуру или ее экстракт; биоптат, полученный от млекопитающего, или его экстракт; кровь, слюну, мочу, фекалии, сперму или слезную жидкость.

5. Способ ингибирования репликации вирусов гриппа в биологическом образце, включающий стадию введения в указанный биологический образец эффективного количества фармацевтической композиции по п.2, где биологический образец представляет собой клеточную культуру или ее экстракт; биоптат, полученный от млекопитающего, или его экстракт; кровь, слюну, мочу, фекалии, сперму или слезную жидкость.

6. Способ уменьшения количества вирусов гриппа в биологическом образце, включающий введение в указанный биологический образец эффективного количества фармацевтической композиции по п.2, где биологический образец представляет собой клеточную культуру или ее экстракт; биоптат, полученный от млекопитающего, или его экстракт; кровь, слюну, мочу, фекалии, сперму или слезную жидкость.

