

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039561**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.10

(21) Номер заявки
201990021

(22) Дата подачи заявки
2015.10.29

(51) Int. Cl. *A61K 31/53* (2006.01)
A61K 31/685 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ FILOVIRIDAE

(31) 62/072,331; 62/105,619

(32) 2014.10.29; 2015.01.20

(33) US

(43) 2019.10.31

(62) 201790597; 2015.10.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖИЛИД САЙЭНС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Чун Бьён Квон, Кларк Майкл О'Нил
Ханрахан, Дорфлер Эдвард, Хуэй
Хонь Чун, Джордан Роберт, Макман
Ричард Л., Перриш Джей П., Рэй
Эдриан С., Сигель Дастин (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) CHO Aesop et al. Synthesis and antiviral activity of a series of 1'-substituted 4-aza-7,9-dideazaadenosine C-nucleosides. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, 22, pp. 2705-2707
WO-A1-2012012776
WO-A1-2009132135

(57) Предложены соединения, применения указанных соединений и фармацевтические композиции для лечения вирусных инфекций. Предложенные соединения и композиции являются особенно подходящими для применения для лечения инфекций вируса Марбург и вируса Эбола.

B1**039561****039561****B1**

Область техники

Настоящее изобретение в целом относится к соединениям, их применению и фармацевтическим композициям для лечения вирусных инфекций *Filoviridae*, в частности для лечения вируса Эбола, вируса Марбург.

Уровень техники

Филовирусы (например, вирус Эбола (EBOV) и вирус Марбург (MARV)) относятся к числу наиболее смертоносных и вредоносных вирусов. Они вызывают тяжелые, зачастую смертельные вирусные геморрагические лихорадки у людей и отличных от человека приматов (например, нечеловекообразных обезьян, горилл и шимпанзе). Филовирусы вызывают особенную обеспокоенность как возможное биологическое оружие, поскольку они обладают потенциалом к распылению и могут быть использованы в виде аэрозоля в военных целях.

Инкубационный период для филовирусной инфекции составляет от 2 до 21 дня. Начало болезни является острым и характеризуется высокой температурой, головными болями, болями в суставах и мышцах, болью в горле, утомляемостью, диареей, рвотой и болью в животе. У некоторых пациентов могут наблюдаться сыпь, покраснение глаз, икота и внутреннее и наружное кровотечение. В течение одной недели после инфицирования вирусом большинство пациентов испытывают боли в груди и полиорганную недостаточность, впадают в шоковое состояние и умирают. У некоторых пациентов перед смертью также возникают слепота и обширное кровотечение.

Filoviridae представляет собой семейство РНК-вирусов. Установлено существование двух представителей семейства *Filoviridae*: EBOV и MARV. Также установлено существование двух основных патогенных типов вируса семейства *Filoviridae*: *Ebolavirus* (вирус Эбола, эболавирус) и MARV. Обнаружен один вариант MARV и пять видов эболавируса: эболавирус Заир (также называемый вирусом Эбола, EBOV), эболавирус Судан, эболавирус леса Таи, эболавирус Бундибугио и эболавирус Рестон. Точное происхождение, районы распространения и естественная среда обитания *Filoviridae* неизвестны. Однако на основе имеющихся данных и природы сходных вирусов предполагают, что вирусы семейства *Filoviridae* являются зоонозными (то есть переносятся животными) и обычно остаются в животных-хозяевах, обитающих на африканском континенте.

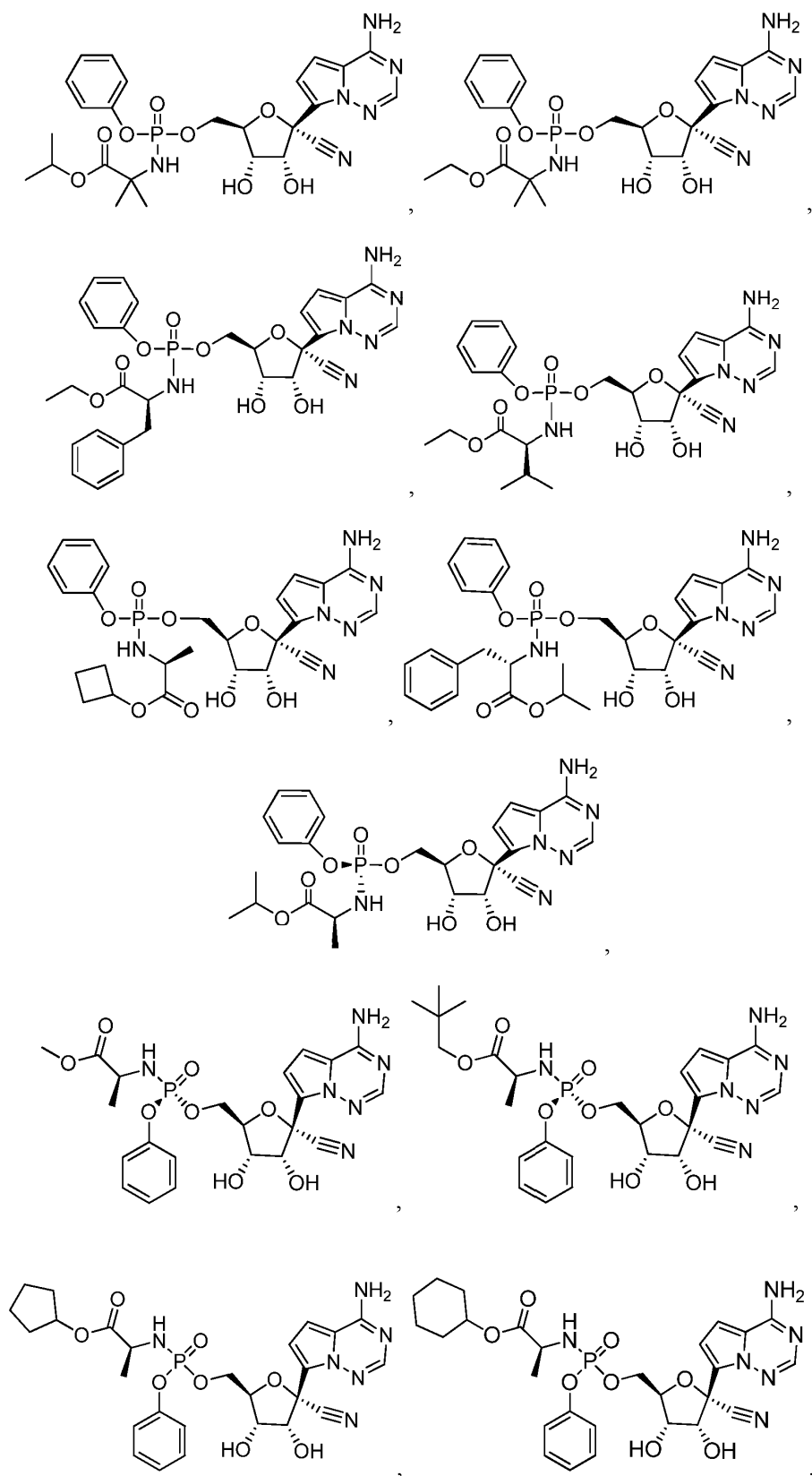
В течение более 30 лет с эболавирусами связывают периодические вспышки геморрагической лихорадки в Центральной Африке, которые вызывают тяжелое заболевание у инфицированных пациентов. Показатели смертности во время таких вспышек варьировались от 50% в случае эболавируса вида Судан (SEBOV) вплоть до 90% в случае эболавируса вида Заир (EBOV, ZEBOV) (Sanchez et al., *Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses*//*Fields Virology* (eds. Knipe, D.M. & Howley, P.M.) 1409-1448 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia)). Вспышка в конце 2007 года в Уганде, по-видимому, вызванная новыми видами эболавируса, привела к смертности, составившей примерно 25% (Towner et al., *PLoS Pathog.*, 4: e1000212 (2008)). ZEBOV также уничтожил популяции диких человекообразных обезьян в том же регионе Африки (Walsh et al., *Nature*, 422:611-614 (2003)).

Предотвращение и лечение филовирусных инфекций, включая эболавирусы (то есть EBOV), сопровождается множеством проблем. На сегодняшний день не существует вакцин или методик постконтактной профилактики, подходящих для предотвращения или борьбы с инфекциями EBOV. Вместо этого пациенты получают лишь поддерживающую терапию, то есть поддержание водно-солевого баланса, кислород, поддержание кровяного давления и лечение любых вторичных инфекций.

Таким образом, существует потребность в композициях и способах лечения инфекций EBOV. Настоящее изобретение предназначено для удовлетворения этой и других потребностей.

Краткое описание изобретения

Предложено соединение, выбранное из группы, состоящей из



или его фармацевтически приемлемая соль.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для лечения или профилактики инфекций Filoviridae, содержащая терапевтически эффективное количество указанного соединения или его фармацевтически приемлемой соли и один или более фармацевтиче-

ски приемлемых носителей или вспомогательных веществ.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено применение указанного соединения, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции для лечения вирусной инфекции Filoviridae у человека.

Подробное описание изобретения

I. Определения.

Если не указано иное, предполагается, что следующие термины и выражения в контексте настоящего описания имеют следующие значения.

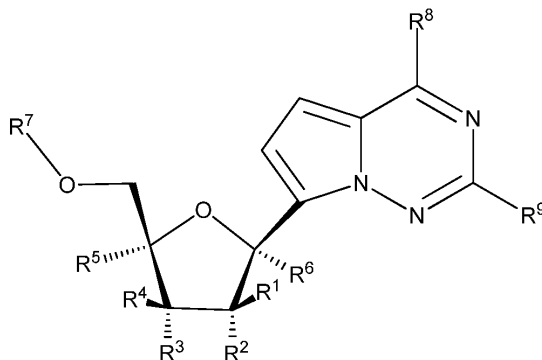
Когда в настоящем описании используются товарные знаки, заявителями подразумевается, что такие указания независимо включают продукт, соответствующий товарному знаку, и активный фармацевтический ингредиент (ингредиенты) продукта, соответствующего товарному знаку.

В контексте настоящего описания "соединение согласно настоящему изобретению" означает соединение или его фармацевтически приемлемую соль. Аналогично в отношении поддающихся выделению промежуточных соединений выражение "соединение формулы (число)" означает соединение указанной формулы и его фармацевтически приемлемые соли.

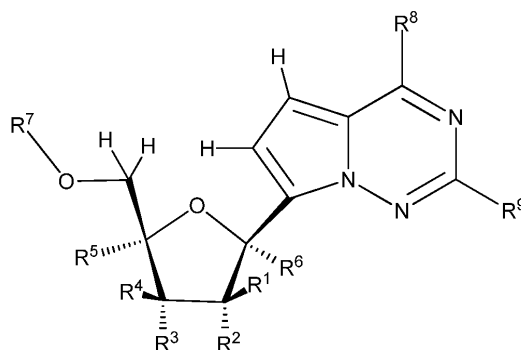
Термин "пролекарство" в контексте настоящего описания относится к любому соединению, которое при введении в биологическую систему образует лекарственное вещество, то есть активный ингредиент, в результате самопроизвольной химической реакции (реакций), катализируемой ферментом химической реакции (реакций), фотолиза и/или метаболической химической реакции (реакций). Таким образом, пролекарство представляет собой ковалентно модифицированный аналог или неактивную форму терапевтически активного соединения.

Специалисту в данной области техники следует понимать, что заместители и другие фрагменты соединений должны быть выбраны так, чтобы получилось соединение, которое является достаточно стабильным для обеспечения подходящего для фармацевтического применения соединения, которое может быть включено в состав приемлемо стабильной фармацевтической композиции. Соединения, которые обладают такой стабильностью, рассматриваются как входящие в объем настоящего изобретения.

Если не указано иное, подразумевается, что атомы углерода соединений имеют валентность, составляющую четыре. В некоторых представлениях химической структуры, где атомы углерода не имеют достаточного числа присоединенных заместителей для достижения валентности, составляющей четыре, следует считать, что остальные заместители при атоме углерода, необходимые для обеспечения валентности, составляющей четыре, представляют собой водород. Например,



означает то же, что и



"Защитная группа" относится к фрагменту соединения, который маскирует или изменяет свойства функциональной группы или свойства соединения в целом. Химическая структура защитной группы варьируется в широких пределах. Одна из функций защитной группы заключается в том, чтобы служить промежуточным соединением в синтезе исходного лекарственного вещества. Химические защитные группы и стратегии введения/снятия защитных групп хорошо известны в данной области техники. См.

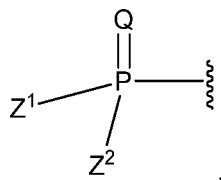
Protective Groups in Organic Chemistry, Theodora W. Greene (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991). См. также Protective Groups in Organic Chemistry, Peter G. M. Wuts and Theodora W. Greene, 4th Ed., 2006. Защитные группы часто применяют, чтобы замаскировать реакционную способность некоторых функциональных групп, способствовать эффективности желаемых химических реакций, например, создавая и разрушая химические связи упорядоченным и заранее спланированным образом. Защита функциональных групп соединения изменяет и другие физические свойства, помимо реакционной способности защищенной функциональной группы, такие как полярность, липофильность (гидрофобность) и другие свойства, которые можно измерить с помощью широко распространенных аналитических инструментов. Химически защищенные промежуточные соединения сами по себе могут быть биологически активными или инертными. Термин "защитные группы для гидроксильных групп" относится к защитным группам, подходящим для защиты гидроксильных групп (-OH).

Защищенные соединения также могут проявлять измененные и в некоторых случаях оптимизированные свойства *in vitro* и *in vivo*, такие как прохождение через клеточные мембраны и устойчивость к ферментативному расщеплению или секвестрации. В этом качестве защищенные соединения с желаемым терапевтическим эффектом можно рассматривать как пролекарства. Другая функция защитной группы заключается в превращении исходного лекарственного средства в пролекарство, в результате чего указанное исходное лекарственное средство высвобождается при превращении пролекарства *in vivo*. Поскольку активные пролекарства могут всасываться более эффективно, чем исходное лекарственное средство, пролекарства могут обладать более сильным действием *in vivo*, чем исходное лекарственное средство. Защитные группы удаляют или *in vitro* в случае химических промежуточных соединений, или *in vivo* в случае пролекарств. В случае химических промежуточных соединений не столь важно, чтобы продукты, полученные после снятия защитных групп, например спирты, были физиологически приемлемыми, хотя в целом более желательно, чтобы указанные продукты были фармакологически безвредными.

Термин "хиральный" относится к молекулам, которые не совпадают с зеркальным отражением при наложении, в то время как термин "ахиральный" относится к молекулам, которые можно наложить на их зеркальное отражение.

Термин "стереоизомеры" относится к соединениям, которые имеют одинаковое химическое строение, но отличаются друг от друга по расположению атомов или групп в пространстве.

"Диастереомер" относится к стереоизомеру с двумя или более центрами хиральности, и при этом молекулы-диастереомеры не являются зеркальными отражениями друг друга. Диастереомеры обладают различными физическими свойствами, например температурами плавления, температурами кипения, спектральными свойствами, реакционной способностью и биологическими свойствами. Например, соединения могут содержать хиральный атом фосфора, когда R⁷ представляет собой



и Z¹ и Z² различны. Когда по меньшей мере один из Z¹ или Z² также содержит хиральный центр, например Z¹ или Z² представляет собой присоединяемый через азот хиральный сложный эфир существующей в природе α-аминокислоты, то соединение будет существовать в виде диастереомеров, поскольку в молекуле существуют два центра хиральности. Все такие диастереомеры и способы их применения, описанные в настоящем описании, охватываются настоящим изобретением. Смеси диастереомеров можно разделить с помощью аналитических методик высокого разрешения, таких как электрофорез, кристаллизация и/или хроматография. Диастереомеры могут обладать различными физическими характеристиками, такими как, но не ограничиваясь ими, растворимость, химическая стабильность и кристалличность, а также могут обладать различными биологическими свойствами, такими как, но не ограничиваясь ими, устойчивость к воздействию ферментов, всасываемость и метаболическая стабильность.

Термин "энантиомеры" относится к двум стереоизомерам соединения, которые представляют собой зеркальные отражения друг друга, не совпадающие при наложении.

Определение "примерно", применяемое по отношению к количеству, включает указанную величину и имеет значение согласно контексту (например, включает долю ошибки, связанную с измерением конкретного количества).

Если не указано иное, термин "лечение" в контексте настоящего описания означает вызывание регресса, облегчение, подавление прогресса или предотвращение нарушения или патологического состояния, к которому применяется указанный термин, или одного или более симптомов такого нарушения или патологического состояния. Термин "проведение лечения" в контексте настоящего описания относится к процессу "лечения", который определен непосредственно перед указанным определением.

Термин "терапевтически эффективное количество" в контексте настоящего описания представляет собой количество соединения, присутствующего в композиции, описанной в настоящем описании, кото-

рое требуется для обеспечения содержания лекарственного средства в выделениях и тканях дыхательных путей и легких или в качестве альтернативы в кровотоке субъекта, подлежащего лечению, необходимого для получения ожидаемой физиологической реакции или желаемого биологического эффекта в случае, когда такую композицию вводят выбранным способом. Точное количество будет зависеть от множества факторов, например конкретного соединения, конкретной активности композиции, применяемого устройства для доставки, физических характеристик композиции, ее предполагаемого применения, а также соображений, связанных с пациентом, таких как состояние тяжести заболевания, контакт с пациентом и т.д., и может быть легко определено специалистом в данной области техники на основе информации, предоставленной в настоящем описании.

Термин "физиологический раствор" означает водный раствор, содержащий 0,9% (мас./об.) NaCl.

Термин "гипертонический солевой раствор" означает водный раствор, содержащий более 0,9% (мас./об.) NaCl. Например, 3% гипертонический солевой раствор будет содержать 3% (мас./об.) NaCl.

"Образование реакционной смеси" относится к процессу приведения в контакт по меньшей мере двух различных соединений таким образом, что они смешиваются и могут вступать в реакцию. Однако следует понимать, что получаемый продукт реакции можно получить непосредственно в результате реакции между добавленными реагентами или из промежуточного соединения, которое может быть получено в реакционной смеси из одного или более добавленных реагентов.

"Связывающий агент" относится к агенту, способному связывать два несовместимых соединения. Связывающие агенты могут быть каталитическими или стехиометрическими. Например, связывающие агенты могут представлять собой связывающий агент на основе лития или связывающий агент на основе магния, такой как реактив Гриньяра. Иллюстративные связывающие агенты включают, но не ограничиваются ими, $n\text{-BuLi}$, MgCl_2 , $i\text{PrMgCl}$, $t\text{BuMgCl}$, PhMgCl или их комбинации.

"Ненуклеофильное основание" относится к электронодонорному основанию Льюиса, такому как азотистые основания, включая триэтиламин, диизопропилэтиламин, N,N -диэтиланилин, пиридин, 2,6-лутидин, 2,4,6-коллидин, 4-диметиламинопиридин и хинуклидин.

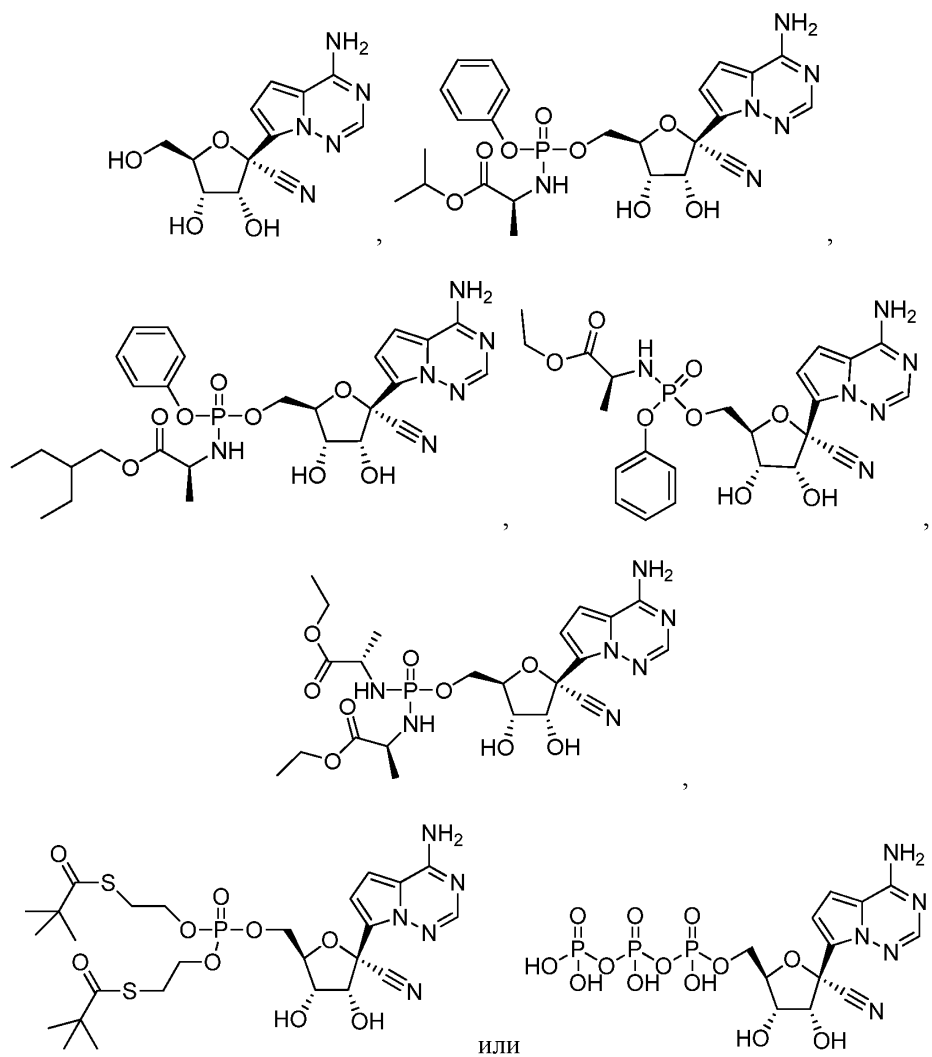
"Уходящая группа" относится к группам, которые сохраняют связывающую электронную пару при гетеролитическом разрыве связи. Например, уходящая группа легко замещается в ходе реакции нуклеофильного замещения. Подходящие уходящие группы включают, но не ограничиваются ими, хлорид, бромид, мезилат, тозилат, трифлат, 4-нитробензолсульфонат, 4-хлорбензолсульфонат, 4-нитрофенокси, пентафторфенокси и т.д. Специалист в данной области техники сможет предложить и другие уходящие группы, подходящие для применения в настоящем изобретении.

"Агент для снятия защитной группы" относится к любому агенту, способному удалять защитную группу. Агент для снятия защитной группы будет зависеть от типа применяемой защитной группы. Типичные агенты для снятия защитных групп известны в данной области техники и могут быть найдены в *Protective Groups in Organic Chemistry*, Peter G. M. Wuts и Theodora W. Greene, 4th Ed., 2006.

II. Соединения согласно настоящему изобретению.

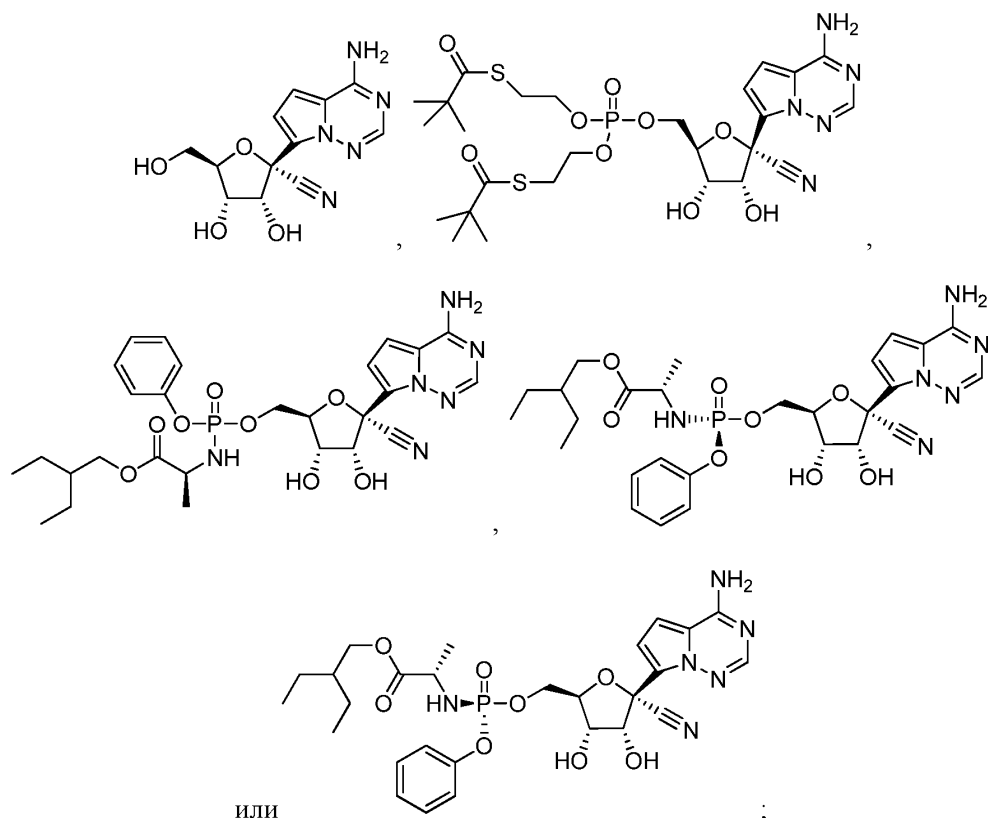
Далее будут приведены подробные ссылки на некоторые варианты реализации настоящего изобретения, примеры которых проиллюстрированы прилагаемыми описанием, структурами и формулами. Несмотря на то, что настоящее изобретение будет описано в сочетании с представленными вариантами реализации, следует понимать, что указанные варианты не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Напротив, подразумевается, что настоящее изобретение охватывает все альтернативы, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в объем настоящего изобретения.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение, которое представляет собой



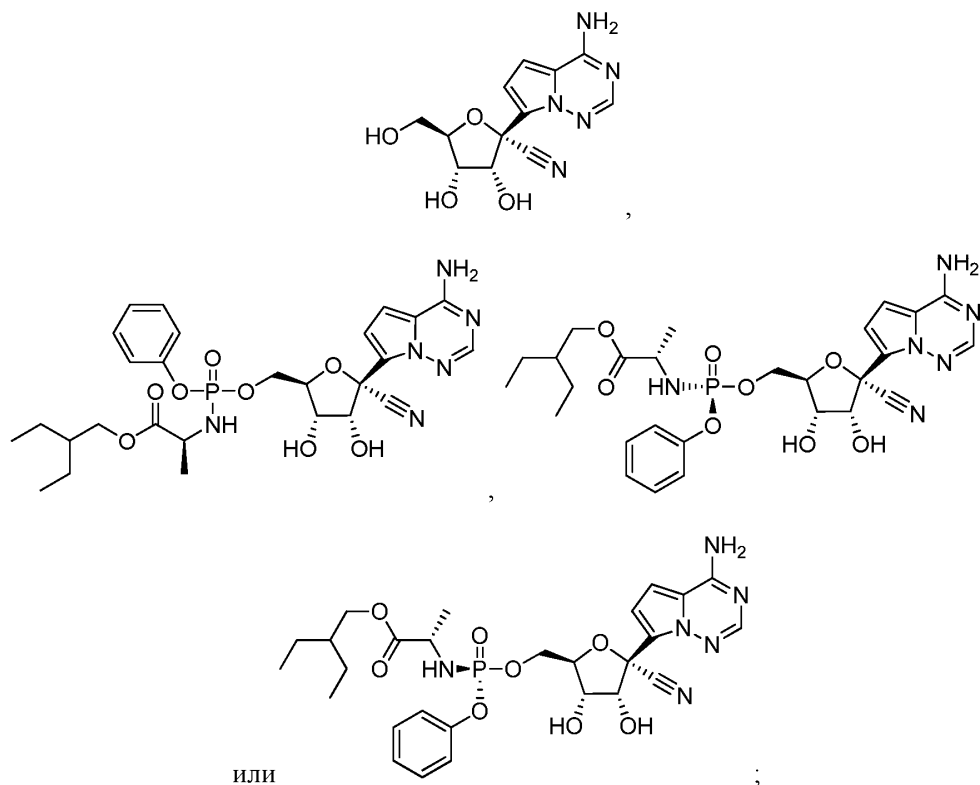
или фармацевтически приемлемая соль, или сложный эфир указанного соединения.

В других вариантах реализации настоящего изобретения предложено соединение, которое представляет собой



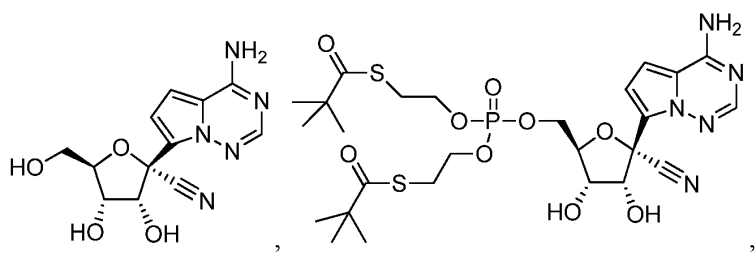
или фармацевтически приемлемая соль, или сложный эфир указанного соединения.

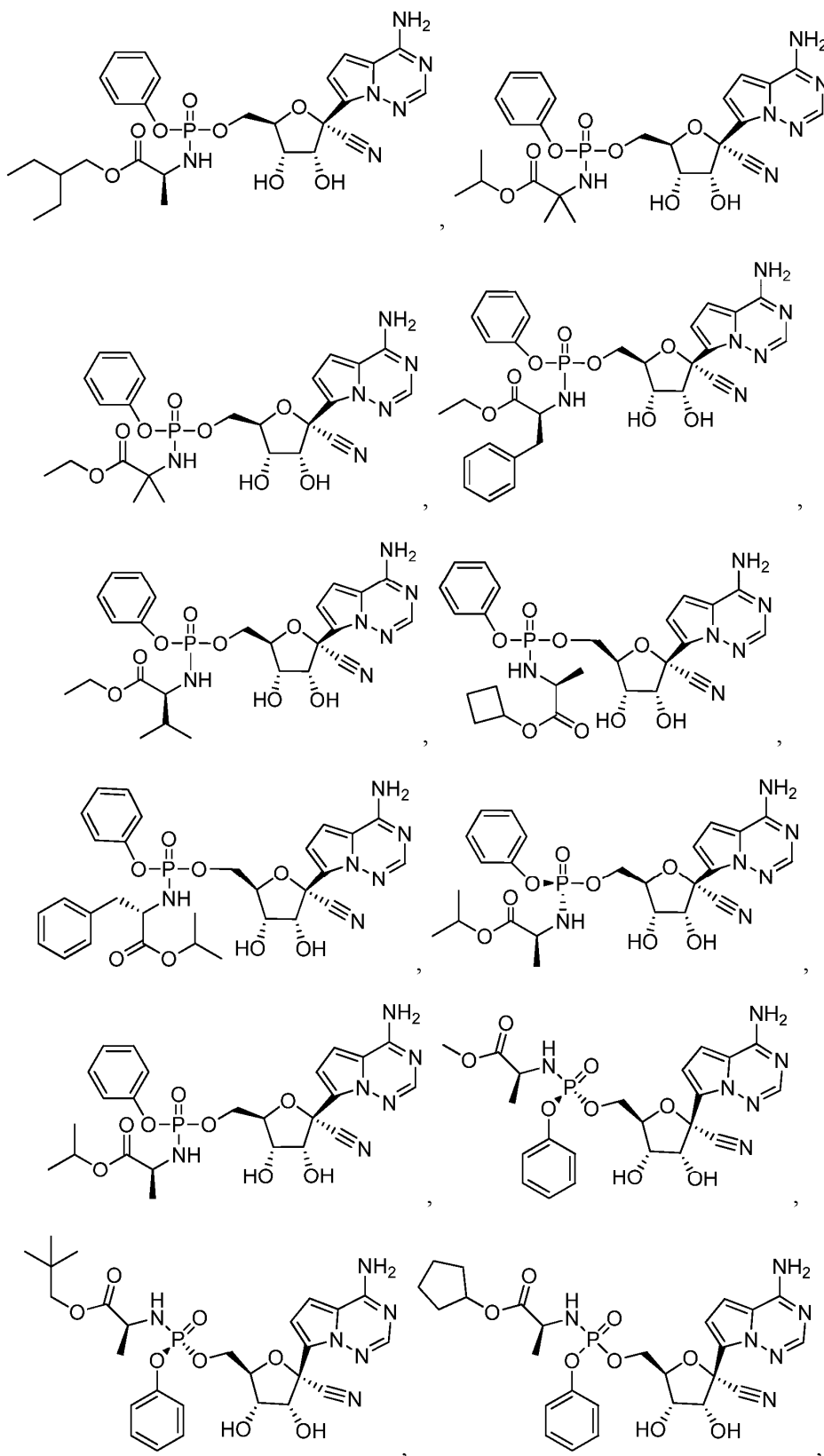
В других вариантах реализации настоящего изобретения предложено соединение, которое представляет собой

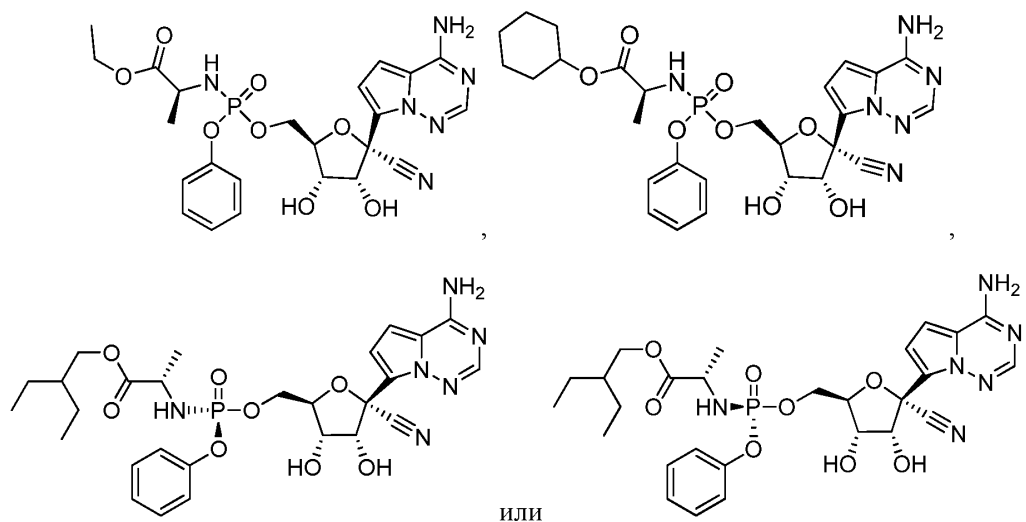


или фармацевтически приемлемая соль, гидрат или сложный эфир указанного соединения.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение, которое представляет собой





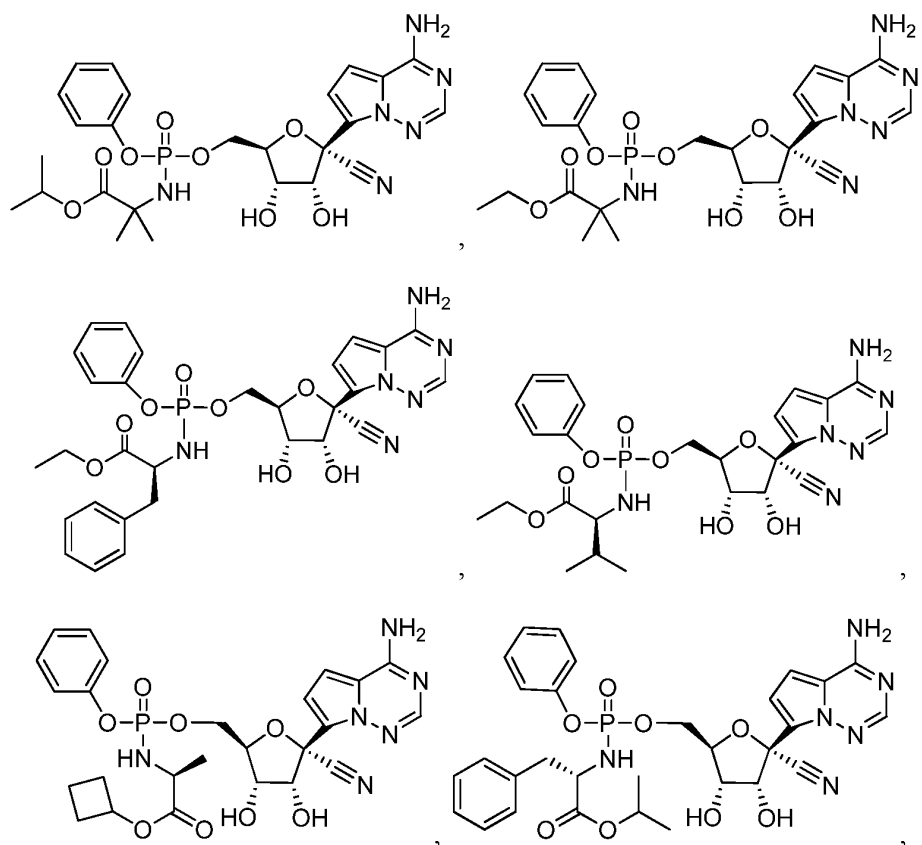


или

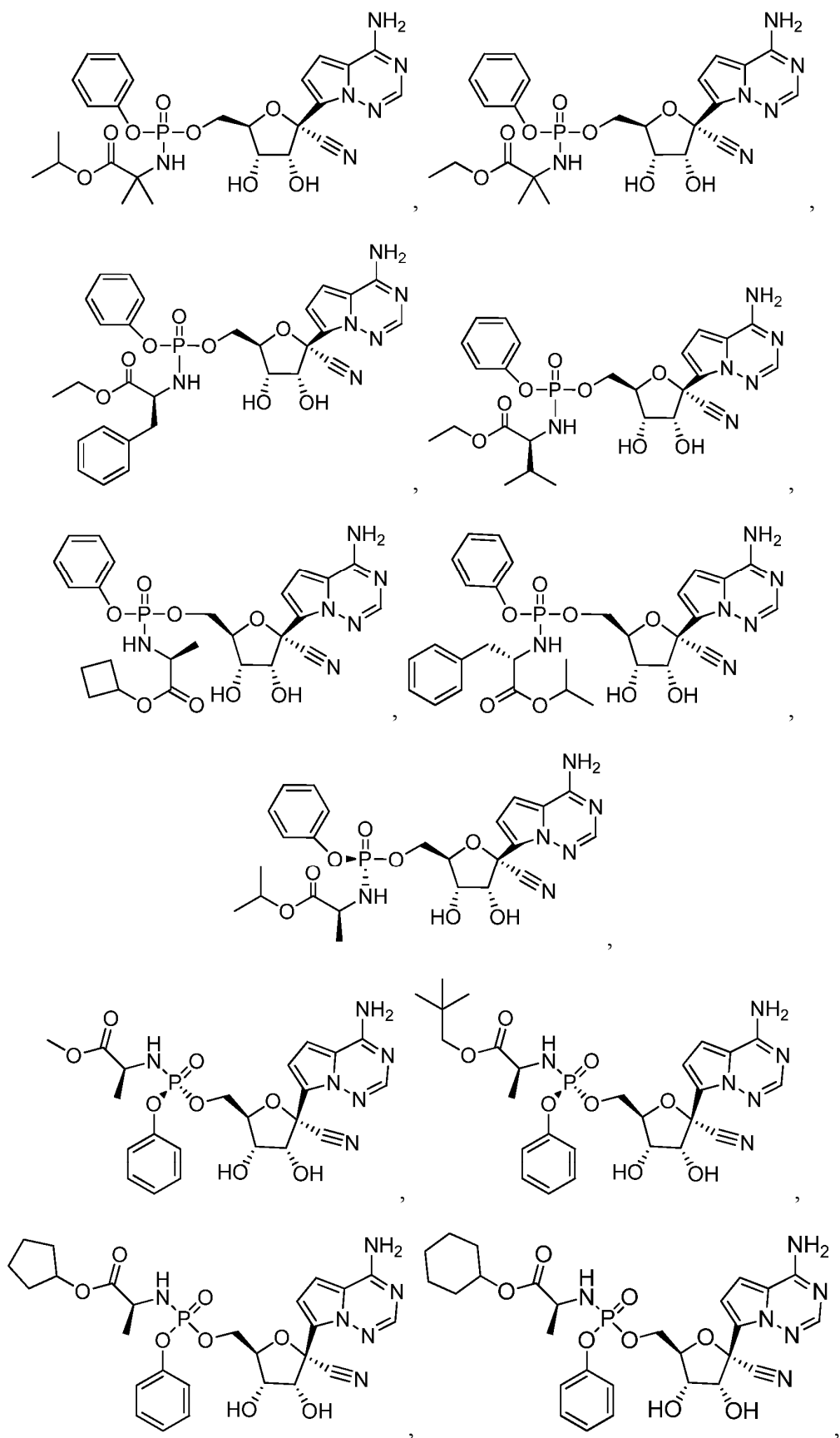
;

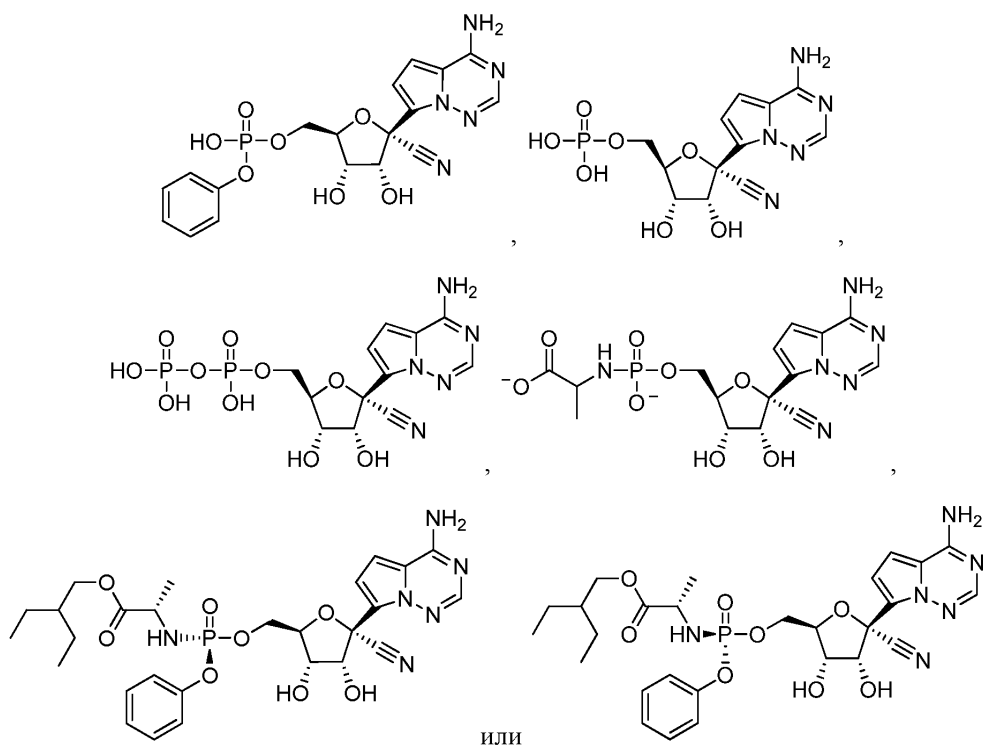
или фармацевтически приемлемая соль, или сложный эфир указанного соединения.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение, которое представляет собой



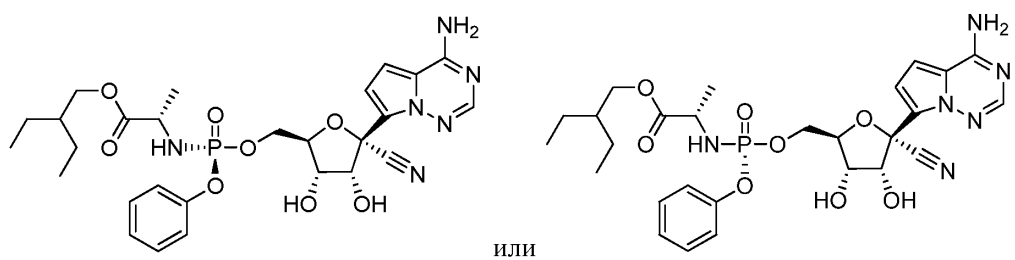
В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение, которое представляет собой





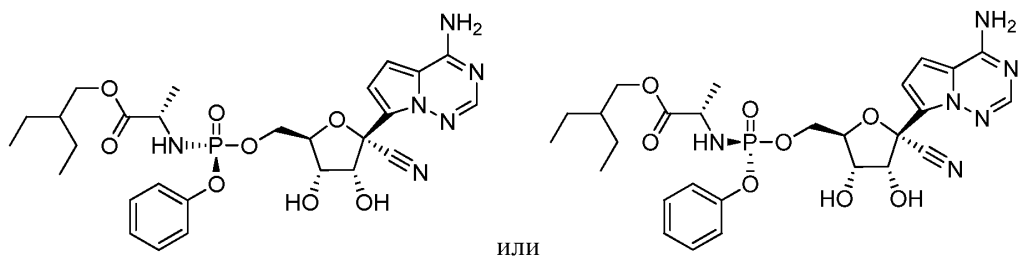
или фармацевтически приемлемая соль, гидрат или сложный эфир указанного соединения.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение, которое представляет собой



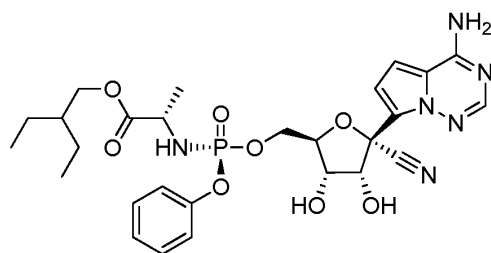
или фармацевтически приемлемая соль, или сложный эфир указанного соединения.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение, которое представляет собой



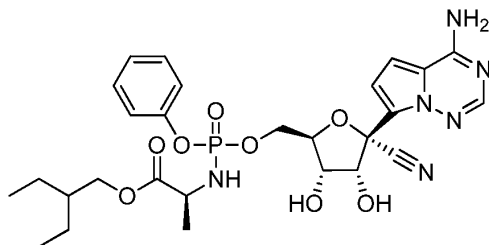
или фармацевтически приемлемая соль, или сложный эфир указанного соединения.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение, которое представляет собой

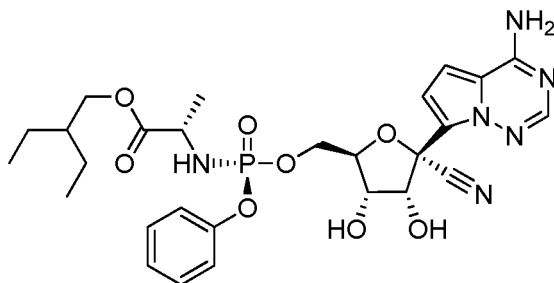


или фармацевтически приемлемая соль, или сложный эфир указанного соединения.

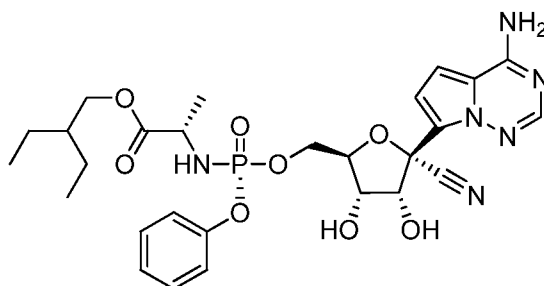
Названия соединений согласно настоящему описанию даны с применением программного обеспечения ACD/Name для именования химических соединений (Advanced Chemistry Development, Inc., Торонто, Канада). Другие соединения или радикалы можно именовать общепринятыми названиями или систематическими или несистематическими названиями. Система названий и нумерации соединений согласно настоящему описанию проиллюстрирована типичным соединением



которое носит название (2S)-2-этилбутил-2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[1,2-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат. Другие соединения согласно настоящему изобретению включают:

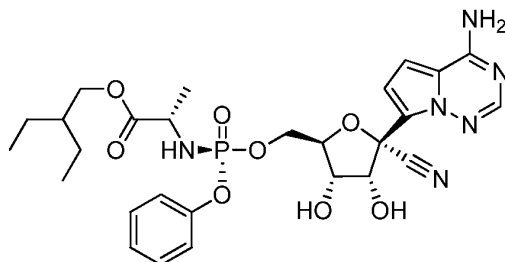


которое носит название (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат, и



которое носит название (S)-2-этилбутил-2-(((R)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат.

(S)-2-этилбутил-2-(((R)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат также может быть представлен как



Любая ссылка на соединения согласно настоящему изобретению, описанные в настоящем описании, также включает ссылку на их физиологически приемлемые соли. Примеры физиологически приемлемых солей соединений согласно настоящему изобретению включают соли, полученные из соответ-

вующего основания, такие как соли щелочного или щелочноземельного металла (например, Na^+ , Li^+ , K^+ , Ca^{+2} и Mg^{+2}); аммония и NR_4^+ (где R определен в настоящем описании). Физиологически приемлемые соли, образованные по атому азота или аминогруппе, включают (а) кислотно-аддитивные соли, образованные неорганическими кислотами, например соляной кислотой, бромистоводородной кислотой, серной кислотой, сульфаминовыми кислотами, фосфорной кислотой, азотной кислотой и тому подобными; (б) соли, образованные органическими кислотами, такими как, например, уксусная кислота, щавелевая кислота, винная кислота, янтарная кислота, малеиновая кислота, фумаровая кислота, глюконовая кислота, лимонная кислота, яблочная кислота, аскорбиновая кислота, бензойная кислота, изэтионовая кислота, лактобионовая кислота, дубильная кислота, пальмитиновая кислота, альгиновая кислота, полиглутаминовая кислота, нафталинсульфоновая кислота, метансульфоновая кислота, п-толуолсульфоновая кислота, бензолсульфоновая кислота, нафталиндисульфоновая кислота, полигалактуроновая кислота, малоновая кислота, сульфосалициловая кислота, гликолевая кислота, 2-гидрокси-3-нафтоат, памоат, салициловая кислота, стеариновая кислота, фталевая кислота, миндальная кислота, молочная кислота, этансульфоновая кислота, лизин, аргинин, глутаминовая кислота, глицин, серин, треонин, аланин, изолейцин, лейцин и тому подобное; и (с) соли, образованные элементарными анионами, например хлором, бромом и иодом. Физиологически приемлемые соли соединения с гидроксигруппой включают анион указанного соединения в комбинации с подходящим катионом, таким как Na^+ и NR_4^+ .

Соединение и его фармацевтически приемлемые соли могут существовать в виде различных полиморфов или псевдополиморфов. В контексте настоящего описания кристаллический полиморфизм означает способность кристаллического соединения существовать в различных кристаллических структурах. Кристаллический полиморфизм может возникать в результате различий в кристаллической упаковке (упаковочный полиморфизм) или различий в упаковке между различными конформерами одной и той же молекулы (конформационный полиморфизм). В контексте настоящего описания кристаллический псевдополиморфизм означает способность гидрата или сольвата соединения существовать в виде различных кристаллических структур. Псевдополиморфы согласно настоящему изобретению могут существовать ввиду различий в кристаллической упаковке (упаковочный псевдополиморфизм) или ввиду различий в упаковке между различными конформерами одной и той же молекулы (конформационный псевдополиморфизм). Настоящее изобретение включает все полиморфы и псевдополиморфы соединений и их фармацевтически приемлемые соли.

Соединение и его фармацевтически приемлемые соли могут также существовать в виде аморфного твердого вещества. В контексте настоящего описания аморфное твердое вещество представляет собой твердое вещество, в котором отсутствует дальний порядок положений атомов в твердом веществе. Это определение также применимо к кристаллам размером 2 нм или менее. Для получения аморфных форм согласно настоящему изобретению могут быть применены добавки, включая растворители. Настоящее изобретение включает все аморфные формы соединений и их фармацевтически приемлемые соли.

Для терапевтического применения соли активных ингредиентов соединений согласно настоящему изобретению будут физиологически приемлемыми, то есть это будут соли, полученные из физиологически приемлемой кислоты или оснований. Однако соли кислот или оснований, которые не являются физиологически приемлемыми, могут также найти применение, например, при получении или очистке физиологически приемлемого соединения. Все соли, вне зависимости от того, получены ли они из физиологически приемлемой кислоты или основания или нет, находятся в рамках объема настоящего изобретения.

В конечном счете, следует понимать, что композиции в настоящем описании содержат соединения согласно настоящему изобретению в их неионизированной, а также цвиттерионной форме, а также комбинации со стехиометрическими количествами воды, как в гидратах.

Следует отметить, что все энантиомеры, диастереомеры и рацемические смеси, таутомеры, полиморфы и псевдополиморфы соединений находятся в рамках заявленных соединений и их фармацевтически приемлемые соли охвачены настоящим изобретением. Все смеси таких энантиомеров и диастереомеров находятся в рамках объема настоящего изобретения.

Соединения согласно настоящему изобретению могут иметь хиральные центры, например хиральные атомы углерода или фосфора. Соединения согласно настоящему изобретению, таким образом, включают рацемические смеси всех стереоизомеров, включая энантиомеры, диастереомеры и атропизомеры. Помимо этого, соединения согласно настоящему изобретению включают обогащенные или разделенные оптические изомеры при любых или всех асимметрических хиральных атомах. Другими словами, хиральные центры, очевидные из изображений, представлены в виде хиральных изомеров или рацемических смесей. Рацемические и диастереомерные смеси, а также индивидуальные оптические изомеры, выделенные или синтезированные, по существу не содержащие своих энантиомерных или диастереомерных партнеров, находятся в рамках объема настоящего изобретения. Рацемические смеси разделяют с получением отдельных по существу оптически чистых изомеров с помощью хорошо известных методов, таких как, например, разделение диастереомерных солей, образованных оптически активными агентами, например, кислотами или основаниями, с последующим превращением их обратно в оптически активные вещества. В большинстве случаев желаемый оптический изомер синтезируют посредством стереоспецифических реакций, начиная с соответствующего стереоизомера желаемого исходного материала.

Используемые в настоящем описании определения и превращения, касающиеся стереохимии, в целом соответствуют приведенным в источниках S.P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; и Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Большое количество органических соединений существует в оптически чистых формах, то есть они могут вращать плоскость плоскополяризованного света. При описании оптически активного соединения приставки D и L или R и S используются для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно ее хирального(ых) центра(ов). Приставки d и l, D и L или (+) и (-) используются для обозначения знака вращения плоскости плоскополяризованного света соединением, где S, (-) или l означают, что соединение является левовращающим, а приставки R, (+) или d означают, что соединение является правовращающим. Для заданной химической структуры указанные стереоизомеры являются идентичными, за исключением того, что они являются зеркальными отражениями друг друга. Конкретный стереоизомер также может быть назван энантиомером, а смесь таких изомеров обычно называют энантиомерной смесью. Смесь энантиомеров 50:50 означает рацемическую смесь или рацемат, который может возникнуть, когда химическая реакция или процесс не являются стереоселективными или стереоспецифичными. Термины "рацемическая смесь" и "рацемат" относятся к эквимольной смеси двух энантиомерных соединений, у которой отсутствует оптическая активность.

Соединения согласно настоящему изобретению в некоторых случаях также могут существовать в виде таутомерных изомеров. Несмотря на то, что может быть изображена только одна резонансная структура с делокализованной связью, все такие формы включены в объем настоящего изобретения. Например, ен-аминовые таутомеры могут существовать для пуриновых, пиримидиновых, имидазольных, гуанидиновых, амидиновых и тетразольных систем, и их возможные таутомерные формы находятся в рамках объема настоящего изобретения.

Любая формула или структура, приведенная в настоящем описании, включая соединения, также предназначена для отображения немеченных форм, а также изотопно-меченных форм соединений. Изотопно-меченные соединения имеют структуры, изображенные формулами, приведенными в настоящем описании, но в них один или более атомов заменены атомами, имеющими определенную атомную массу или массовое число. Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения согласно настоящему описанию, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора и хлора, такие как, но не ограничиваясь ими, ^2H (дейтерий, D), ^3H (третий), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl и ^{125}I . Предполагаются различные изотопно-меченные соединения согласно настоящему описанию, например соединения, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как ^3H , ^{13}C и ^{14}C . Такие изотопно-меченные соединения могут быть подходящими для применения в метаболических исследованиях, исследованиях кинетики реакции, методиках детектирования или визуализации, такие как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), включая исследования распределения лекарственного средства или субстрата в тканях, или при лечении пациентов с применением радиоактивных веществ.

Настоящее описание также включает соединения, в которых от 1 до n атомов водорода, присоединенных к атому углерода, заменены дейтерием, где n соответствует числу атомов водорода в молекуле. Такие соединения обладают повышенной устойчивостью к метаболизму и поэтому являются подходящими для увеличения периода полувыведения любого соединения при введении млекопитающему, в частности человеку. См., например, Foster, "Deuterium Isotope Effects in Studies of Drug Metabolism", Trends Pharmacol. Sci. 5(12):524-527 (1984). Такие соединения синтезируют средствами, хорошо известными в данной области техники, например с применением исходных материалов, в которых один или более атомов водорода заменены дейтерием.

Меченные дейтерием или замещенные терапевтические соединения согласно настоящему описанию могут иметь улучшенные характеристики DMPK (метаболизм и фармакокинетика лекарственного средства, англ.: drug metabolism and pharmacokinetics) в отношении распределения, метаболизма и выведения (англ.: distribution, metabolism and excretion (ADME)). Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, может обеспечить некоторые терапевтические преимущества ввиду большей метаболической стабильности, например увеличенный период полувыведения *in vivo*, сниженную требуемую дозировку и/или улучшенный терапевтический индекс. Меченное ^{18}F соединение может быть пригодным для применения для исследований методами ПЭТ или ОФЭКТ. Изотопно-меченные соединения согласно настоящему описанию и их пролекарства, как правило, могут быть, получены путем проведения процедур, описанных на схемах или в примерах и способах получения, описанных ниже, путем замены не меченного изотопами реагента легкодоступным изотопно-меченым реагентом. Понятно, что дейтерий в данном контексте считается заместителем в соединении.

Концентрация такого более тяжелого изотопа, в частности дейтерия, может быть определена по фактору обогащения изотопом. Предполагается, что в соединениях согласно настоящему описанию любой атом, не указанный как конкретный изотоп, означает любой стабильный изотоп указанного атома. Если не указано иное, когда в определенном положении конкретно указан "H" или "водород", следует понимать, что в данном положении находится водород в его природном изотопном составе. Соответственно, предполагается, что в соединениях согласно настоящему описанию любой атом, конкретно ука-

занный как дейтерий (D), означает дейтерий.

Рекурсивные заместители представляют собой предполагаемый аспект настоящего изобретения. Специалисту в области медицинской химии понятна многоплановость таких заместителей. В тех случаях, когда в варианте реализации настоящего изобретения присутствуют рекурсивные заместители, их общее количество будет определено, как указано выше.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть получены способами, известными специалисту в данной области техники. Например, соединения согласно настоящему изобретению могут быть получены в соответствии со способами, описанными в патенте США № 8008264 и патентной публикации США US 2012/0027752.

А. Метаболиты соединений согласно настоящему изобретению.

Также в объем настоящего изобретения входят полученные *in vivo* метаболические продукты соединений, описанных в настоящем описании, если такие продукты являются новыми и неочевидными из уровня техники. Такие продукты могут получаться, например, в результате окисления, восстановления, гидролиза, амидирования, этерификации и т.п. вводимого соединения, в первую очередь вследствие ферментативных процессов. Соответственно, настоящее изобретение включает новые и неочевидные соединения, получаемые по способу, включающему приведение соединения согласно настоящему изобретению в контакт с млекопитающим на период времени, достаточный для получения метаболического продукта указанного соединения. Такие продукты, как правило, идентифицируют путем получения радиоактивно-меченного (например, посредством ^{14}C или ^3H) соединения согласно настоящему изобретению, введения его парентерально в детектируемой дозе (например, более примерно 0,5 мг/кг) животному, такому как крыса, мышь, морская свинка, обезьяна, или человеку, выдерживания в течение времени, достаточного для прохождения метаболизма (как правило, примерно от 30 с до 30 ч) и выделения продуктов превращения из мочи, крови или других биологических образцов. Указанные продукты могут быть легко выделены, поскольку они являются мечеными (другие продукты выделяют с применением антител, способных связывать эпитопы, сохранившиеся в метаболите). Структуры метаболитов определяют традиционным образом, например посредством анализа методом масс-спектрометрии (МС) или ядерного магнитного резонанса (ЯМР). В целом, анализ метаболитов проводят таким же образом, как и традиционные исследования метаболизма лекарственных средств, известные специалистам в данной области техники. Продукты превращения, при условии, что они иным образом не встречаются *in vivo*, являются подходящими для применения в диагностических исследованиях терапевтического введения соединений согласно настоящему изобретению, даже если сами соединения не обладают активностью против Filoviridae.

Рецепты и способы определения стабильности соединений в имитации секрета желудочно-кишечного тракта известны. Соединения определены в настоящем описании как стабильные в желудочно-кишечном тракте, если менее чем примерно 50 мол.% защищенных групп становятся незащищенными в имитации кишечного или желудочного сока при инкубировании в течение 1 ч при 37°C. Одно то, что соединения являются стабильными в желудочно-кишечном тракте, не означает, что они не могут быть гидролизваны *in vivo*. Пролекарства согласно настоящему изобретению, как правило, будут стабильны в пищеварительной системе, но могут по существу гидролизываться до исходного лекарственного средства в просвете пищеварительной системы, печени или другом органе, в котором может происходить метаболизм, или в клетках в целом.

III. Фармацевтические составы.

Соединения согласно настоящему изобретению вводят в составы с традиционными носителями и вспомогательными веществами, которые будут выбраны в соответствии с обычной практикой. Таблетки будут содержать вспомогательные вещества, агенты, способствующие скольжению, наполнители, связующие агенты и тому подобное. Водные составы получают в стерильной форме, и когда они предназначены для доставки отличным от перорального введения образом, как правило, они являются изотоничными. Все составы необязательно будут содержать вспомогательные вещества, такие как представлено в руководстве "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (1986). Вспомогательные вещества включают аскорбиновую кислоту и другие антиоксиданты, хелатирующие агенты, такие как ЭДТА, углеводы, такие как декстран, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, стеариновую кислоту и тому подобное. pH составов находится в диапазоне от примерно 3 до примерно 11, но, как правило, от составляет примерно 7-10. В некоторых вариантах реализации pH составов содержит от примерно 2 до примерно 5, но, как правило, он содержит от примерно 3 до примерно 4. В некоторых вариантах реализации pH составов содержит от примерно 2 до примерно 10, но, как правило, он содержит от примерно 3,5 до примерно 8,5.

Несмотря на то, что активные ингредиенты возможно вводить по отдельности, может быть предпочтительным представить их в виде фармацевтических составов. Составы, как для ветеринарных целей, так и для применения у человека, согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере один активный ингредиент, как указано выше, вместе с одним или более приемлемыми носителями для них и необязательно другими терапевтическими ингредиентами, в частности дополнительными терапевтическими ингредиентами, которые обсуждаются в настоящем описании. Носитель (носители) должен быть

"приемлемым" в отношении совместимости с другими ингредиентами состава и физиологически безопасным для его реципиента.

Указанные составы включают те из них, которые являются подходящими для указанных выше путей введения. Составы могут быть удобным образом представлены в единичной лекарственной форме и могут быть получены любым из способов, хорошо известных в фармацевтической области. Методики и составы, как правило, можно найти в справочнике Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA). Такие способы включают стадию объединения активного ингредиента с носителем, который составляет один или более дополнительных ингредиентов. В целом составы получают путем равномерного и тщательного объединения активного ингредиента с жидкими носителями, или мелко измельченными твердыми носителями, или обоими из них и дальнейшей формовки продукта в случае необходимости.

Составы согласно настоящему изобретению, подходящие для перорального введения, могут быть представлены в виде дискретных единиц, таких как капсулы, саше или таблетки, каждая из которых содержит заданное количество активного ингредиента; в виде порошка или гранул; в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или жидкой эмульсии вода-в-масле. Активный ингредиент также может быть введен в виде болуса, электуария или пасты.

Таблетку получают путем прессования или формования, необязательно с одним или более вспомогательными ингредиентами. Спрессованные таблетки могут быть получены путем прессования в подходящем устройстве активного ингредиента в свободно текучей форме, такой как порошок или гранулы, необязательно в смеси со связующим агентом, смазывающим агентом, инертным разбавителем, консервантом, поверхностно-активным или диспергирующим агентом. Формованные таблетки могут быть получены путем формования в подходящем устройстве смеси порошкообразного активного ингредиента, увлажненного инертным жидким разбавителем. На таблетки необязательно может быть нанесено покрытие или риска, и необязательно таблетки могут быть приготовлены таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение из них активного ингредиента.

Для инфекций глаз или других наружных тканей, например рта и кожи, составы предпочтительно наносят в виде местной мази или крема, содержащей активный(е) ингредиент(ы) в количестве, например, от 0,075 до 20% мас./мас., (включая содержание активного(ых) ингредиента(ов) в диапазоне от 0,1% до 20% с шагом 0,1% мас./мас., такое как 0,6% мас./мас., 0,7% мас./мас., и т.д.), предпочтительно от 0,2 до 15% мас./мас. и наиболее предпочтительно от 0,5 до 10% мас./мас. При приготовлении состава в виде мази активный(е) ингредиент(ы) может(ут) быть применены вместе с парафиновым или смешиваемым с водой основанием мази. В качестве альтернативы, активный(е) ингредиент(ы) может быть приготовлен в виде крема с основанием крема типа масло-в-воде.

При необходимости водная фаза основания крема может включать, например, по меньшей мере 30% мас./мас. многоатомного спирта, то есть спирта, содержащего две или более гидроксильные группы, такого как пропиленгликоль, бутан-1,3-диол, маннит, сорбит, глицерин и полиэтиленгликоль (включая ПЭГ 400) и их смеси. Составы для местного применения могут при необходимости включать соединение, которое усиливает всасывание или проникновение активного ингредиента через кожу или другие пораженные области. Примеры таких усилителей проникновения через кожу включают диметилсульфоксид и соответствующие аналоги.

Масляная фаза эмульсий согласно настоящему изобретению может быть получена из известных ингредиентов известным образом. Несмотря на то, что данная фаза может содержать только эмульгирующий агент (известный также как эмульгатор), она при необходимости содержит смесь по меньшей мере одного эмульгатора с жиром или маслом или и с жиром, и с маслом. Предпочтительно гидрофильный эмульгатор включен в масляную фазу вместе с липофильным эмульгатором, который выполняет функцию стабилизатора. Также предпочтительно включить и масло, и жир. Эмульгатор(ы) вместе со стабилизатором(ми) или без них образуют так называемый эмульгирующий воск, и такой воск вместе с маслом и жиром образуют так называемое эмульгирующее основание мази, которое образует масляную дисперсионную среду составов, представляющих собой кремы.

Эмульгаторы и стабилизаторы эмульсии, подходящие для применения в составе согласно настоящему изобретению, включают Tween® 60, Span® 80, цетилстеариловый спирт, бензиловый спирт, миристиловый спирт, глицерилмоностеарат и лаурилсульфат натрия. Также эмульгаторы и стабилизаторы эмульсии, подходящие для применения в составе согласно настоящему изобретению, включают Tween® 80.

Выбор подходящих масел или жиров для состава основан на достижении желаемых косметических свойств. Крем предпочтительно должен представлять собой нежирный, не оставляющий следов смываемый продукт с подходящей консистенцией, не позволяющей вытекать из тюбиков и других емкостей. Могут быть применены одно- или двухосновные алкильные эфиры с неразветвленной или разветвленной цепью, такие как диизоадипат, изоцетилстеарат, диэфиры пропиленгликоля с жирными кислотами кокосового масла, изопропилмиристат, децилолеат, изопропилпальмитат, бутилстеарат, 2-этилгексилпальмитат или смесь сложных эфиров с разветвленной цепью, известная как Кродамол CAP

(Crodamol CAP), причем предпочтительными являются последние три сложных эфира. Указанные эфиры могут быть применены отдельно или в комбинации в зависимости от требуемых свойств. В качестве альтернативы, могут быть применены липиды с высокой температурой плавления, такие как белый мягкий парафин и/или жидкий парафин или другие минеральные масла.

Фармацевтические составы в соответствии с настоящим изобретением содержат комбинацию в соответствии с настоящим изобретением вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными веществами и, необязательно, другими терапевтическими агентами. Фармацевтические составы, содержащие активный ингредиент, могут быть представлены в любой форме, подходящей для предполагаемого способа введения. Для целей перорального применения могут быть получены, например, таблетки, пастилки (troches), таблетки для рассасывания (lozenges), водные или масляные суспензии, диспергируемые порошки или гранулы, эмульсии, твердые или мягкие капсулы, сиропы или эликсиры. Композиции, предназначенные для перорального применения, могут быть получены в соответствии с любым способом, известным в области получения фармацевтических композиций, и такие композиции могут содержать один или более агентов, включая подслащивающие агенты, ароматизирующие агенты, окрашивающие агенты и консервирующие агенты, для получения привлекательного препарата. Подходящими являются таблетки, содержащие активный ингредиент, в смеси с нетоксичным фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, подходящим для получения таблеток. Указанные вспомогательные вещества могут представлять собой, например, инертные разбавители, такие как карбонат кальция или натрия, лактоза, фосфат кальция или натрия; гранулирующие и разрыхляющие агенты, такие как кукурузный крахмал или альгиновая кислота; связующие агенты, такие как крахмал, желатин или гуммиарабик (асасия); и смазывающие агенты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк. Таблетки могут быть без покрытия или могут содержать покрытие, полученное известными способами, включая микроинкапсулирование, для отсрочки разложения и всасывания в желудочно-кишечном тракте и тем самым обеспечения замедленного действия в течение более длительного периода времени. Например, может быть применен материал для отсрочки, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, в отдельности или с воском.

Составы для перорального применения могут быть представлены в виде твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, например фосфатом кальция или каолином, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с водой или масляной средой, такой как арахисовое масло, жидкий парафин или оливковое масло.

Водные суспензии согласно настоящему изобретению содержат активные материалы в смеси со вспомогательными веществами, подходящими для получения водных суспензий. Такие вспомогательные вещества включают суспендирующий агент, такой как натрий карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и гуммиарабик, и диспергирующие или смачивающие агенты, такие как существующий в природе фосфатид (например, лецитин), продукт конденсации алкиленоксида с жирной кислотой (например, полиоксипропиленстеарат), продукт конденсации этиленоксида с длинноцепочечным алифатическим спиртом (например, гептадекаэтиленоксидетанол), продукт конденсации этиленоксида с частичным сложным эфиром, полученным из жирной кислоты и ангидрида гексита (например, полиоксипропиленсорбитанмоноолеат). Другие неограничивающие примеры суспендирующих агентов включают Каптисол (Captisol®) (сульфобутиловый простой эфир бета-циклодекстрина, SBE- β -CD). Водная суспензия также может содержать один или более консервантов, таких как этил- или н-пропил-н-гидрокси-бензоат, один или более окрашивающих агентов, один или более ароматизирующих агентов и один или более подслащивающих агентов, таких как сахароза или сахарин.

Масляные суспензии могут быть получены путем суспендирования активного ингредиента в растительном масле, таком как арахисовое масло, оливковое масло, кунжутное масло или кокосовое масло, или в минеральном масле, таком как жидкий парафин. Суспензии для перорального введения могут содержать загуститель, такой как пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Могут быть добавлены подслащивающие агенты, такие как указанные выше, и ароматизирующие агенты с получением привлекательного препарата для перорального введения. Указанные композиции могут быть законсервированы путем добавления антиоксиданта, такого как аскорбиновая кислота.

Диспергируемые порошки и гранулы согласно настоящему изобретению, подходящие для получения водной суспензии путем добавления воды, обеспечивают активный ингредиент в смеси с диспергирующим или смачивающим агентом, суспендирующий агент и один или более консервантов. Примеры подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов представлены агентами, рассмотренными выше. Также могут присутствовать дополнительные вспомогательные вещества, например, подслащивающие, ароматизирующие и окрашивающие агенты.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению также могут быть представлены в форме эмульсий масло-в-воде. Масляная фаза может представлять собой растительное масло, такое как оливковое масло или арахисовое масло, минеральное масло, такое как жидкий парафин, или их смесь. Подходящие эмульгирующие агенты включают существующие в природе камеди, такие как гуммиара-

бик и трагакантовая камедь, существующие в природе фосфатиды, такие как соевый лецитин, сложные эфиры или частичные сложные эфиры, полученные из жирных кислот и ангидридов гекситола, такие как сорбитанмоноолеат, и продукты конденсации этих частичных эфиров с этиленоксидом, такие как полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат. Эмульсия также может содержать подслащивающие и ароматизирующие агенты. Сиропы и эликсиры могут быть приготовлены с подслащивающими агентами, такими как глицерин, сорбит или сахароза. Такие составы также могут содержать смягчающий агент, консервант, ароматизирующий или окрашивающий агент.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть представлены в форме стерильного препарата для инъекций, такого как стерильная водная или маслянистая суспензия для инъекций. Указанная суспензия может быть приготовлена известным в данной области техники способом с применением подходящих диспергирующих и смачивающих агентов, а также суспендирующих агентов, описанных выше. Стерильный препарат для инъекций также может представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в нетоксичном приемлемом для парентерального введения разбавителе или растворителе, такой как раствор в 1,3-бутан-диоле, или он может быть получен в виде лиофилизированного порошка. Стерильный препарат для инъекций также может представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в приемлемом для парентерального введения разбавителе или растворителе. К приемлемым носителям и растворителям, которые могут быть применены, относятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды традиционно могут применяться стерильные нелетучие масла. Для этой цели может применяться любое безвкусное (bland) нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, аналогичным образом при получении препаратов для инъекций может применяться жирная(е) кислота(ы), такие как олеиновая кислота. К приемлемым носителям и растворителям, которые могут быть применены, относятся вода, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, гипертонический раствор хлорида натрия и гипотонический раствор хлорида натрия.

Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя для получения разовой лекарственной формы, будет зависеть от хозяина, подвергаемого лечению, и конкретного пути введения. Например, состав с пролонгированным высвобождением, предназначенный для перорального введения человеку, может содержать приблизительно от 1 до 1000 мг активного материала, объединенного с подходящим и удобным количеством носителя, которое может варьировать от примерно 5 до примерно 95% мас./мас. от общей массы композиции. Фармацевтическая композиция может быть получена таким образом, чтобы обеспечить легко измеряемые количества для введения. Например, водный раствор, предназначенный для внутривенной инфузии, может содержать примерно от 3 до 500 мг активного ингредиента на миллилитр раствора, чтобы обеспечить инфузию подходящего объема со скоростью примерно 30 мл/ч.

Составы, подходящие для местного применения для глаз, также включают глазные капли, и в них активный ингредиент растворен или суспендирован в подходящем носителе, в частности водном растворителе активного ингредиента. Активный ингредиент предпочтительно присутствует в таких составах в концентрации от 0,5 до 20%, предпочтительно от 0,5 до 10%, в частности примерно 1,5% мас./мас.

Составы, подходящие для местного применения в ротовой полости, включают таблетки для рассасывания, содержащие активный ингредиент в ароматизированной основе, обычно сахарозе и гуммиарабике или трагаканте; пастилки (pastilles), содержащие активный ингредиент в инертном основании, таком как желатин и глицерин или сахароза и гуммиарабик; и жидкости для полоскания рта, содержащие активный ингредиент в подходящем жидком носителе.

Составы для ректального введения могут быть представлены в виде суппозитория с подходящей основой, содержащей, например, кокосовое масло или салицилат.

Составы, подходящие для внутрилегочного или назального введения, содержат частицы размером, например, от 0,1 до 500 мкм, таким как 0,5, 1, 30, 35 и т.д., который вводят путем быстрой ингаляции через носовой канал или путем ингаляции через рот для достижения альвеолярных мешочков. Подходящие составы включают водные или масляные растворы активного ингредиента. Составы, подходящие для введения в виде аэрозоля или сухого порошка, могут быть получены в соответствии с обычными способами и могут быть доставлены с другими терапевтическими агентами, такими как соединения, ранее применяемые для лечения или профилактики инфекции Filoviridae, как описано ниже.

Составы, подходящие для вагинального введения, могут быть представлены в виде pessaries, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спреевых составов, содержащих в дополнение к активному ингредиенту такие носители, для которых в данной области техники известно, что они являются подходящими.

Составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворы, которые делают состав изотоничным крови целевого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты и загустители.

Указанные составы представлены в емкостях с единичной дозой или несколькими дозами, например, в запаянных ампулах или флаконах, и могут храниться в высушенном замораживании (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например воды для

инъекций, непосредственно перед применением. Приготовленные для немедленного введения растворы и суспензии для инъекций получают из стерильных порошков, гранул и таблеток такого типа, как описано ранее. Предпочтительными составами с единичной дозой являются составы, содержащие суточную дозу или единичную суточную поддозу активного ингредиента, как указано в настоящем описании выше, или соответствующую их часть.

Следует понимать, что кроме конкретно указанных выше ингредиентов составы согласно настоящему изобретению могут содержать другие агенты, общепринятые в данной области техники, относящиеся к необходимому типу состава, например, агенты, подходящие для перорального введения, могут включать ароматизирующие агенты.

В настоящем изобретении также предложены композиции для применения в ветеринарии, содержащие по меньшей мере один активный ингредиент, определенный выше, совместно с подходящим для применения в ветеринарии носителем для него.

Носители для применения в ветеринарии представляют собой материалы, подходящие для цели введения композиции, и могут представлять собой твердые, жидкие или газообразные материалы, которые в других случаях являются инертными или которые являются приемлемыми для применения в ветеринарии и совместимы с активным ингредиентом. Такие ветеринарные композиции могут быть введены перорально, парентерально или любым другим желаемым способом.

Соединения согласно настоящему изобретению применяют для обеспечения фармацевтических составов с контролируемым высвобождением, содержащим в качестве активного ингредиента одно или более соединений согласно настоящему изобретению ("составов с контролируемым высвобождением"), из которых активный ингредиент высвобождается контролируемым образом и которые приготовлены таким образом, что обеспечивают возможность дозирования с меньшей частотой и имеют улучшенные фармакокинетический профиль и профиль токсичности конкретного активного ингредиента.

IV. Пути введения.

Одно или более соединений согласно настоящему изобретению (в настоящем описании обозначаемые как активные ингредиенты) вводят любым путем, подходящим для состояния, подлежащего лечению. Подходящие пути включают пероральный, ректальный, назальный пути, введение через легкие, местное введение (включая буккальное и подъязычное), вагинальный и парентеральный пути (включая подкожный, внутримышечный, внутривенный, интратекальный и эпидуральный) и тому подобное. Очевидно, что предпочтительный путь может быть различным, например, в зависимости от состояния реципиента. Преимущество соединений согласно настоящему изобретению состоит в том, что они обладают пероральной биодоступностью и могут быть введены перорально.

В способах согласно настоящему изобретению для лечения инфекции *Filoviridae* соединения согласно настоящему изобретению могут быть введены в любое время человеку, который может вступить в контакт с людьми, страдающими инфекцией *Filoviridae*, или уже страдает инфекцией *Filoviridae*. В некоторых вариантах реализации соединения согласно настоящему изобретению могут быть введены профилактически людям, вступающим в контакт с людьми, страдающими инфекцией *Filoviridae*. В некоторых вариантах реализации введение соединений согласно настоящему изобретению может быть произведено людям, для которых тест на инфекцию *Filoviridae* показал положительный результат, но симптомы инфекции *Filoviridae* пока не проявляются. В некоторых вариантах реализации введение соединений согласно настоящему изобретению может быть произведено людям при начале проявления симптомов инфекции *Filoviridae*.

Эффективная доза активного ингредиента зависит по меньшей мере от природы состояния, подлежащего лечению, токсичности, от того, применяют ли соединение профилактически (в меньших дозах) или против активной вирусной инфекции, от способа доставки и фармацевтического состава и будет определяться врачом с применением обычных исследований по увеличению дозы. Может предполагаться доза от примерно 0,0001 до примерно 100 мг/кг массы тела в сутки; как правило от примерно 0,01 до примерно 10 мг/кг массы тела в сутки; более типично от примерно 0,01 до примерно 5 мг/кг массы тела в сутки; наиболее типично от примерно 0,05 до примерно 0,5 мг/кг массы тела в сутки. Например, суточная предполагаемая доза для взрослого человека весом примерно 70 кг будет составлять от 1 мг до 1000 мг, предпочтительно от 5 мг до 500 мг, и может быть представлена в виде разовой дозы или нескольких доз.

Эффективная доза соединения согласно настоящему изобретению для лечения инфекции *Filoviridae* может зависеть от того, вводят ли ее профилактически или для лечения человека, уже страдающего инфекцией *Filoviridae*. Кроме того, доза может зависеть от того, проявляются ли у человека, страдающего инфекцией *Filoviridae*, симптомы инфекции или еще нет. Для людей, которым тест на инфекцию *Filoviridae* показал положительный результат, и людей, у которых проявляются симптомы инфекции *Filoviridae*, могут потребоваться более высокие дозы по сравнению с теми, которые вводят людям для профилактического лечения.

Для введения соединений согласно настоящему изобретению может предполагаться любой подходящий период времени. Например, введение может осуществляться в течение периода от 1 суток до 100 суток, включая 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 суток. Введение также может осуществляться в течение периода от 1 недели до 15 недель, включая 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или

14 недель. Также предполагаются также более длительные периоды введения. Время введения может зависеть от того, вводят ли соединение профилактически или для лечения человека, страдающего инфекцией Filoviridae. Например, профилактическое введение может осуществляться в течение периода, во время которого человек находится в регулярном контакте с другими людьми, страдающими инфекцией Filoviridae, и в течение соответствующего периода времени после последнего контакта с человеком, страдающим инфекцией Filoviridae. Для людей, уже страдающих инфекцией Filoviridae, период введения может включать любое время, необходимое для лечения пациента и определенное время после отрицательного результата теста на инфекцию Filoviridae, чтобы убедиться, что инфекция Filoviridae не возникает повторно.

V. Комбинированная терапия.

Композиции согласно настоящему изобретению также применяют в комбинации с другими активными ингредиентами. Для лечения вирусной инфекции Filoviridae предпочтительно указанный другой терапевтический агент обладает активностью в отношении вирусной инфекции Filoviridae, в частности инфекций вируса Марбург, вируса Эбола и вируса Cuevavirus. Неограничивающими примерами указанных других активных терапевтических агентов являются рибавирин, паливизумаб, мотавизумаб, RSV-IGIV (RespiGam®), MEDI-557, A-60444, MDT-637, BMS-433771, амиодарон, дронадарон, верапамил, конвалесцентная плазма от перенесших вирус Эбола (англ.: Ebola Convalescent Plasma (ECP)), TKM-100201, BCX4430 ((2S,3S,4R,5R)-2-(4-амино-5Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-7-ил)-5-(гидроксиметил)пирролидин-3,4-диол), фавипиравир (также известный как Т-705 или Авиган), Т-705 монофосфат, Т-705 дифосфат, Т-705 трифосфат, FGI-106 (1-N,7-N-бис[3-(диметиламино)пропил]-3,9-диметилхинолино[8,7-h]хинолон-1,7-диамин), JK-05, TKM-Ebola, ZMapp, rNAPc2, VRC-EBOADC076-00-VP, OS-2966, MVA-BN filo, бринцидофовир, вакцина Vaxart против вируса Эбола на основе вектора 5 аденовируса, Ad26-ZEBOV, вакцина ФилоВакс (FiloVax), GOVX-E301, GOVX-E302, ингибиторы проникновения вируса Эбола (ингибиторы NPC1) и rVSV-EBOV, а также их смеси. Соединения и композиции согласно настоящему изобретению также могут быть применены в комбинации с фосфорамидат-морфолиновыми олигомерами (англ.: phosphoramidate morpholino oligomers (PMOs)), которые представляют собой синтетические аналоги антисмысловых нуклеотидов, разработанные таким образом, чтобы препятствовать процессам трансляции путем формирования дуплексов пар оснований со специфическими последовательностями РНК. Примеры PMOs включают AVI-7287, AVI-7288, AVI-7537, AVI-7539, AVI-6002 и AVI-6003. Соединения и композиции согласно настоящему изобретению также предназначены для применения совместно с общим уходом, осуществляемым за пациентами с вирусными инфекциями Filoviridae, включающим парентерально вводимые жидкости (в том числе содержащий декстрозу солевой раствор и лактат Рингера) и питанием, антибиотики (в том числе метронидазольные и цефалоспориновые антибиотики, такие как цефтриаксон и цефуроксим) и/или средства противогрибковой профилактики, лекарства от жара и боли, противорвотные агенты (такие как метоклопрамид) и/или агенты против диареи, витаминные и минеральные добавки (включая витамин К и сульфат цинка), противовоспалительные агенты (такие как ибупрофен), лекарства от боли и лекарства от других распространенных заболеваний для популяции пациентов, такие как агенты против малярии (включая артемизинин и комбинированную терапию артемизинин-люмефантрин), против тифа (включая хинолоновые антибиотики, такие как ципрофлоксацин, макролидные антибиотики, такие как азитромицин, цефалоспориновые антибиотики, такие как цефтриаксон, или аминопенициллины, такие как ампициллин) или против шигеллеза.

Также возможно комбинировать любое соединение согласно настоящему изобретению с одним или более дополнительными активными терапевтическими агентами в единичной лекарственной форме для одновременного или последовательного введения пациенту. Комбинированная терапия может быть произведена в одновременном или последовательном режиме введения. При последовательном введении комбинация может быть введена путем двух или более введений.

Совместное введение соединения согласно настоящему изобретению с одним или более других активных терапевтических агентов, как правило, относится к одновременному или последовательному введению соединения согласно настоящему изобретению и одного или более других активных терапевтических агентов, при котором в организме пациента присутствуют терапевтически эффективные количества как соединения согласно настоящему изобретению, так и одного или более других активных терапевтических агентов.

Совместное введение включает введение единичных доз соединений согласно настоящему изобретению до или после введения единичных доз одного или более других активных терапевтических агентов, например введение соединений согласно настоящему изобретению с интервалом в секунды, минуты или часы относительно введения одного или более других активных терапевтических агентов. Например, единичная доза соединения согласно настоящему изобретению может быть введена сначала с последующим введением в течение секунд или минут единичной дозы одного или более других активных терапевтических агентов. В качестве альтернативы единичная доза одного или более других терапевтических агентов может быть введена сначала с последующим введением единичной дозы соединения согласно настоящему изобретению в течение секунд или минут. В некоторых случаях может быть желательно вводить единичную дозу соединения согласно настоящему изобретению сначала, а потом, с ин-

тервалом в часы (например, 1-12 ч), вводить единичную дозу одного или более других активных терапевтических агентов. В других случаях может быть желательно вводить единичную дозу одного или более других активных терапевтических агентов сначала, а потом, с интервалом в часы (например, 1-12 ч), вводить единичную дозу соединения согласно настоящему изобретению.

Комбинированная терапия может обеспечивать "синергию" и "синергический эффект", то есть достигаемый при совместном применении активных ингредиентов эффект больше, чем сумма эффектов, достигаемых при раздельном применении соединений. Синергический эффект может быть достигнут, когда активный(е) ингредиент(ы): (1) приготовлены вместе, и их вводят или доставляют одновременно в комбинированном составе; (2) доставляются один после другого или параллельно в отдельных составах; или (3) вводят в каком-либо другом режиме. При доставке один после другого синергический эффект может быть достигнут, когда соединения вводят или доставляют последовательно, например в отдельных таблетках, пилюлях или капсулах, или посредством разных инъекций в отдельных шприцах. В целом, при терапии с доставкой один после другого эффективную дозу каждого активного ингредиента вводят последовательно, то есть серийно, тогда как в комбинированной терапии эффективные дозы двух или более активных ингредиентов вводят вместе. Синергический противовирусный эффект означает противовирусный эффект, больший, чем предполагаемые исключительно аддитивные эффекты отдельных соединений комбинации.

Еще в одном варианте реализации настоящего изобретения предложены способы ингибирования полимеразы *Filoviridae* в клетке, включающие приведение клетки, инфицированной филовиром, в контакт с эффективным количеством соединения или фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или сложного эфира с обеспечением тем самым ингибирования полимеразы *Filoviridae*.

Еще в одном варианте реализации настоящего изобретения предложены способы ингибирования полимеразы *Filoviridae* в клетке, включающие приведение клетки, инфицированной филовиром, в контакт с эффективным количеством соединения или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или сложного эфира и по меньшей мере одним дополнительным активным терапевтическим агентом с обеспечением тем самым ингибирования полимеразы *Filoviridae*.

Еще в одном варианте реализации настоящего изобретения предложены способы ингибирования полимеразы *Filoviridae* в клетке, включающие приведение клетки, инфицированной вирусом *Filoviridae*, в контакт с эффективным количеством соединения или фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или сложного эфира и выбранным по меньшей мере одним дополнительным активным терапевтическим агентом.

Еще в одном варианте реализации настоящего изобретения предложены способы лечения вирусной инфекции *Filoviridae* у человека, включающие введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или сложного эфира.

Еще в одном варианте реализации настоящего изобретения предложены способы лечения вирусной инфекции *Filoviridae* у человека, включающие введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или сложного эфира и по меньшей мере одного дополнительного активного терапевтического агента с обеспечением тем самым ингибирования полимеразы *Filoviridae*.

Еще в одном варианте реализации в настоящем описании предложены способы лечения вирусной инфекции *Filoviridae* у человека, включающие введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или его сложного эфира и по меньшей мере одного дополнительного активного терапевтического агента.

Также предложен набор, который содержит соединение или его фармацевтически приемлемую соль, фармацевтически приемлемый сложный эфир, стереоизомер, смесь стереоизомеров или таутомер. В отдельных вариантах реализации предложены отдельные наборы, которые содержат соединение, выбранное из группы, представленной в настоящем описании, а также каждой его подгруппы и варианта реализации, включая отдельные соединения 1, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 и 32 (соединения 1-32), или его фармацевтически приемлемую соль, фармацевтически приемлемый сложный эфир, стереоизомер, смесь стереоизомеров или таутомер. В одном аспекте набор содержит соединение или его фармацевтически приемлемую соль. Каждый из отдельных наборов, описанных в настоящем описании, может содержать этикетку и/или инструкции по применению соединения для лечения заболевания или состояния у субъекта (например, человека), нуждающегося в этом. В некоторых вариантах реализации заболевание или состояние представляет собой вирусную инфекцию *Filoviridae*, включая инфекцию вируса Эбола, или инфекцию вируса Марбург. В других вариантах реализации каждый отдельный набор также может содержать инструкции по применению дополнительных медицинских агентов в комбинации с соединением для лечения заболевания или состояния у субъекта (например, человека), нуждающегося в этом. В некоторых из этих вариантов реализации заболевание или состояние представляет собой инфекцию человека, вызываемую вирусом *Filoviridae*, включая инфекцию, вызываемую вирусом Эбола, или инфекцию, вызываемую вирусом Марбург. Для каждого из наборов в соответствии с настоящим описанием существует дополнительный вариант реализации, согласно которому набор содержит индивидуальные единицы дозы соединения, как описано в настоящем описании, или его фармацев-

тически приемлемой соли, рацемата, энантиомера, диастереомера, таутомера, полиморфа, псевдополиморфа, аморфной формы, гидрата или сольвата. Примеры индивидуальных единиц дозы могут включать пилюли, таблетки, капсулы, предварительно заполненные шприцы или карпульные шприцы, пакеты для внутривенного введения и т.д., каждый из которых содержит терапевтически эффективное количество необходимого соединения или его фармацевтически приемлемой соли, рацемата, энантиомера, диастереомера, таутомера, полиморфа, псевдополиморфа, аморфной формы, гидрата или сольвата. В некоторых вариантах реализации набор может содержать разовую единицу дозы, а в других вариантах реализации представлено множество единиц дозы, такое как количество единиц дозы, требуемое для конкретного режима или периода.

Также предложены изделия, которые содержат соединение или его фармацевтически приемлемую соль, фармацевтически приемлемый сложный эфир, стереоизомер, смесь стереоизомеров или таутомер; и емкость. В одном аспекте изделие содержит соединение и отдельные соединения 1, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 и 32 (соединения 1-32), или их фармацевтически приемлемую соль, и емкость. В отдельных вариантах реализации емкость для изделия может представлять собой флакон, банку, ампулу, предварительно заполненный шприц, блистерную упаковку, жестяную банку, контейнер со съемной крышкой (cap), бутылку, коробку и пакет для внутривенного введения.

VI. Способы ингибирования полимеразы Filoviridae.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам ингибирования активности полимеразы Filoviridae, включающим стадию обработки образца, в котором предполагается наличие Filoviridae, соединением или композицией согласно настоящему изобретению.

Вирусы Filoviridae, которые могут быть обработаны с применением способов согласно настоящему изобретению, представляют собой вирусы с одноцепочечной отрицательно-полярной РНК, которые, как правило, инфицируют приматов. Филовирусы способны размножаться практически во всех типах клеток. Антигены и вирионы филовирусов обнаруживаются главным образом в фибробластах и интерстиции инфицированного индивидуума. Существует три идентифицированных рода филовирусов: вирус Эбола (EBOV; пять видов); вирус Марбург (MARV) и Cuevavirus, также известный как вирус Лловиу (LLOV). Вирионы (вирусные частицы) имеют характерную форму длинных цилиндрических нитевидных частиц, которые могут быть прямыми, изогнутыми, свернутыми или находиться в конфигурации "6" или "U". Иногда они могут быть разветвленными, и их частицы сильно различаются по длине, но при этом диаметр (примерно 80 нм) является практически постоянным. Геном филовируса содержит семь генов, которые кодируют 4 структурных белка вириона (VP30, VP35, нуклеопротеин (NP) и белок полимеразы (L-pol)) и 3 ассоциированных с мембраной белка (VP40, гликопротеин (GP) и VP24).

Род Ebolavirus включает пять известных видов: (1) Bundibugyo ebolavirus, также известный как вирус Бундибугио (BDBV, ранее BEBOV); (2) Reston ebolavirus, также известный как вирус Рестон или Эбола-Рестон (RESTV, ранее REBOV); (3) Sudan ebolavirus, также известный как вирус Судан или Эбола-Судан (SUDV, ранее SEBOV); (4) Tai Forest ebolavirus, также известный как вирус леса Таи или Эбола-Таи (TAFV, ранее CIEBOV); и (5) Zaire ebolavirus, также известный как вирус Эбола или Эбола-Заир (EBOV, ранее ZEBOV).

Род вируса Марбург включает виды Marburg marburgvirus, также известные как вирус Марбург (MARV) или вирус Равн (RAW). Род Cuevavirus включает виды Lloviu cuevavirus, также известные как вирус Лловиу (LLOV).

Композиции согласно настоящему изобретению могут функционировать в качестве ингибиторов полимеразы Filoviridae, в качестве промежуточных соединений для таких ингибиторов или имеют другое применение, описанное ниже. Указанные ингибиторы будут связываться с местом на поверхности или в полости полимеразы Filoviridae, имеющей геометрию, уникальную для полимеразы Filoviridae. Композиции, связывающие полимеразу Filoviridae, могут связываться с различной степенью обратимости. Соединения, связывающиеся по существу необратимо, являются идеальными кандидатами для применения в способе согласно настоящему изобретению. После нанесения метки указанные по существу необратимо связывающиеся композиции являются подходящими для применения в качестве зондов для обнаружения полимеразы Filoviridae. Соответственно, настоящее изобретение относится к способам обнаружения полимеразы Filoviridae в образце, в котором предполагается наличие полимеразы Filoviridae, включающим стадии: обработки образца, в котором предполагается наличие полимеразы Filoviridae, композицией, содержащей соединение согласно настоящему изобретению, связанное с меткой; и наблюдение действия образца на активность метки. Подходящие метки хорошо известны в области диагностики и включают стабильные свободные радикалы, флуорофоры, радиоизотопы, ферменты, хемилюминесцентные группы и хромофены. Метку в соединения согласно настоящему описанию вводят обычным образом, применяя функциональные группы, такие как гидроксил, карбоксил, сульфгидрил или amino.

В контексте настоящего изобретения образцы, в которых предполагается наличие полимеразы Filoviridae, включают природные и искусственные материалы, такие как живые организмы; культуры тканей или клеток; биологические образцы, такие как образцы биологических материалов (крови, сыворотки, мочи, спинномозговой жидкости, слез, мокроты, слюны, образцы тканей и тому подобное); лабораторные образцы; образцы пищи, воды или воздуха; образцы биопродуктов, такие как экстракты клеток, в

частности рекомбинантных клеток, синтезирующих желаемый гликопротеин; и тому подобное. Как правило, в образце будет предполагаться наличие организма, который продуцирует полимеразу Filoviridae, зачастую патогенного организма, такого как вирус Filoviridae. Образцы могут содержаться в любой среде, включая воду и смесь органический растворитель/вода. Образцы включают живые организмы, такие как люди, и искусственные материалы, такие как культуры клеток.

Стадия обработки согласно настоящему изобретению включает добавление композиции согласно настоящему изобретению к образцу и включает добавление предшественника композиции к образцу. Стадия добавления включает любой способ введения, описанный выше.

При необходимости активность полимеразы Filoviridae после нанесения композиции можно наблюдать любым способом, включая прямые и косвенные способы детектирования активности полимеразы Filoviridae. Настоящее изобретение охватывает количественный, качественный и полуколичественный способы определения активности полимеразы Filoviridae. Как правило, применяют один из способов скрининга, описанных выше, однако любой другой способ, такой как наблюдение за физиологическими свойствами живого организма, также является подходящим.

Организмы, которые содержат полимеразу Filoviridae, включают вирус Filoviridae. Соединения согласно настоящему изобретению являются подходящими для применения для лечения или профилактики инфекций Filoviridae у животных или у человека.

Однако при скрининге соединений, способных ингибировать вирусы Filoviridae человека, следует помнить, что результаты анализа ферментов могут не коррелировать с результатами анализов в культуре клеток. Таким образом, анализ на основе клеток должен быть основным инструментом скрининга.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложены способы лечения вирусной инфекции Filoviridae у человека, включающие введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или сложного эфира. В некоторых вариантах реализации инфекция Filoviridae вызвана вирусом Filoviridae. В некоторых вариантах реализации инфекция Filoviridae вызвана вирусом Эбола. В некоторых вариантах реализации инфекция Filoviridae вызвана вирусом Bundibugyo ebolavirus, Reston ebolavirus, Sudan ebolavirus, Tai Forest ebolavirus или Zaire ebolavirus. В некоторых вариантах реализации инфекция Filoviridae вызвана вирусом Марбург. В некоторых вариантах реализации инфекция Filoviridae вызвана вирусом Лловиу. В некоторых вариантах реализации ингибируют полимеразу Filoviridae.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть применены при лечении человека, уже страдающего инфекцией Filoviridae, или могут быть введены профилактически для снижения или уменьшения вероятности возникновения инфекции Filoviridae. Инфекции Filoviridae могут характеризоваться геморрагической лихорадкой, гематемезисом, диареей, загрудинной болью в животе и упадком сил. Инкубационный период составляет около 21 дня после контакта с человеком, страдающим инфекцией Filoviridae. Как правило, исходом инфекции Filoviridae является смерть.

Также в качестве отдельных вариантов реализации предложено соединение, выбранное из каждой из приведенных в настоящем описании формул, а также каждой их подгруппы и варианта реализации, включая соединение, выбранное из группы или одного из конкретных соединений, приведенных в настоящем описании в качестве примеров, включая соединения 1-32, или их фармацевтически приемлемая соль, сольват и/или сложный эфир, для применения в способе лечения инфекции Filoviridae у человека. Также в качестве отдельных вариантов реализации предложено соединение, выбранное из каждой из приведенных в настоящем описании формул, а также каждой их подгруппы и варианта реализации, включая соединение, выбранное из группы, или одного из конкретных соединений, приведенных в настоящем описании в качестве примеров, включая соединения 1-32, или их фармацевтически приемлемая соль, сольват и/или сложный эфир, для применения в способе лечения инфекции вируса Эбола у человека. Также в качестве отдельных вариантов реализации предложено соединение, выбранное из каждой из приведенных в настоящем описании формул, а также каждой их подгруппы и варианта реализации, включая соединение, выбранное из группы, или одного из конкретных соединений, приведенных в настоящем описании в качестве примеров, включая соединения 1-32, или их фармацевтически приемлемая соль, сольват и/или сложный эфир, для применения в способе лечения инфекции вируса Марбург у человека. В каждом из вариантов реализации согласно настоящему описанию, в которых инфекция Filoviridae представляет собой вирус Эбола, существуют дополнительные отдельные варианты реализации, в которых указанная инфекция Filoviridae вызвана вирусом Bundibugyo ebolavirus, Reston ebolavirus, Sudan ebolavirus, Tai Forest ebolavirus или Zaire ebolavirus. В некоторых вариантах реализации инфекция Filoviridae вызвана вирусом Марбург. В некоторых вариантах реализации инфекция Filoviridae вызвана вирусом Лловиу.

В настоящем изобретении также предложены соединения каждой из приведенных в настоящем описании формул, а также каждой из их подгрупп и вариантов реализации, включая соединение, выбранное из группы формулы (IV), или одно из конкретных соединений, приведенных в качестве примеров в настоящем описании, включая соединения 1-32, или их фармацевтически приемлемая соль, сольват и/или сложный эфир, для применения в любом из способов согласно настоящему изобретению, как определено в настоящем описании.

Также в качестве отдельных вариантов реализации предложены применения соединения, выбранного из каждой из приведенных в настоящем описании формул, а также каждой из их подгрупп и вариантов реализации, включая соединение, выбранное из группы, или одно из конкретных соединений, приведенных в качестве примеров в настоящем описании, включая соединения 1-32, или их фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или сложного эфира, для получения лекарственного средства для лечения инфекции Filoviridae у человека. Также в качестве отдельных вариантов реализации предложены применения соединения, выбранного из каждой из приведенных в настоящем описании формул, а также каждой их подгруппы и варианта реализации, включая соединение, выбранное из группы, или одного из конкретных соединений, приведенных в качестве примеров в настоящем описании, включая соединения 1-32, или их фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или сложного эфира, для получения лекарственного средства для лечения инфекции вируса Эбола у человека. Также в качестве отдельных вариантов реализации предложены применения соединения, выбранного из каждой из приведенных в настоящем описании формул, а также каждой их подгруппы и варианта реализации, включая соединение, выбранное из группы, или одного из конкретных соединений, приведенных в качестве примеров в настоящем описании, включая соединения 1-32, или их фармацевтически приемлемой соли, сольвата и/или сложного эфира, для получения лекарственного средства для лечения инфекции вируса Марбург у человека.

VII. Скрининг ингибиторов полимеразы Filoviridae.

Проводят скрининг композиций согласно настоящему изобретению на наличие ингибирующей активности в отношении полимеразы Filoviridae с помощью любой из обычно применяемых методик для определения активности ферментов. В контексте настоящего изобретения, как правило, сначала проводят скрининг композиций на ингибирование полимеразы Filoviridae *in vitro*, а затем для композиций, демонстрирующих ингибирующую активность, проводят скрининг на активность *in vivo*.

Композиции, имеющие K_i (константы ингибирования) *in vitro* менее примерно 5×10^{-6} М и предпочтительно менее примерно 1×10^{-7} М, являются предпочтительными для применения *in vivo*.

Подходящие способы скрининга *in vitro* подробно описаны и не будут конкретизироваться в настоящем описании. Однако в приведенных примерах описаны анализы, подходящие для применения *in vitro*.

VIII. Получение соединений.

Примеры.

В подробном описании экспериментов используются некоторые сокращения и акронимы. Несмотря на то, что большинство из них будут понятны специалисту в данной области техники, табл. 1 содержит список многих из указанных сокращений и акронимов.

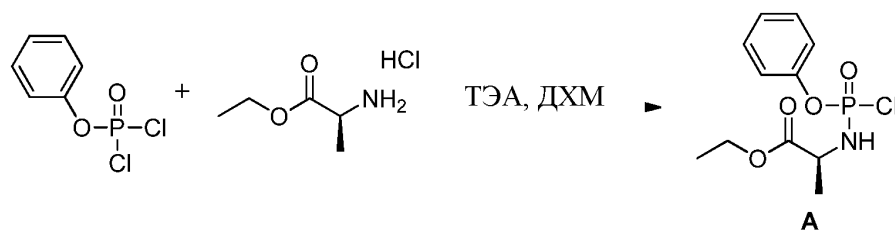
Таблица 1. Список сокращений и акронимов

Сокращение	Значение
Ac ₂ O	уксусный ангидрид
AIBN	2,2'-азобис(2-метилпропионитрил)
Bn	бензил
BnBr	бензилбромид
BCA	бис(триметилсилил)ацетамид
BzCl	бензоилхлорид
КДИ	карбонилдиимидазол
ДАБЦО	1,4-диазабицикло[2.2.2]октан
ДБН	1,5-диазабицикло[4.3.0]нон-5-ен
ДДХ	2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон
ДБУ	1,5-диазабицикло[5.4.0]ундец-5-ен
ДХА	дихлорацетамид
ДЦК	дициклогексилкарбодиимид
ДХМ	дихлорметан
ДМАП	4-диметиламинопиридин
ДМЭ	1,2-диметоксиэтан
DMTCI	диметокситритилхлорид
ДМСО	диметилсульфоксид
DMTr	4,4'-диметокситритил
ДМФА	диметилформамид
EtOAc	этилацетат
ИЭР	ионизация электрораспылением

EtOAc	этилацетат
ГМДС	гексаметилдисилазан
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ЛДА	литийдиизопропиламид
МСНР	масс-спектр низкого разрешения
МХПБК	мета-хлорпербензойная кислота
MeCN	ацетонитрил
MeOH	метанол
ММТХ	монометокситритилхлорид
m/z или m/e	отношение массы к заряду
MH ⁺	масса плюс 1
MH ⁻	масса минус 1
MsOH	метансульфоная кислота
МС или мс	масс-спектр
МТБЭ	трет-бутилметилэфир
NBS	N-бромсукцинимид
Ph	фенил
кт или к.т.	комнатная температура
ТБАФ	тетрабутиламмоний фторид
ТГФ	тетрагидрофуран
TMSCl	хлортриметилсилан
TMSBr	бромтриметилсилан
TMSI	иодтриметилсилан
TMSOTf	(триметилсилил)трифторметилсульфонат
ТЭА	триэтиламин
ТБА	трибутиламин
ТБАП	трибутиламмоний пиррофосфат
TBSCl	трет-бутилдиметилсилилхлорид
ТЭАБ	триэтиламмоний бикарбонат
ТФУ	трифторуксусная кислота
ТСХ или тсх	тонкослойная хроматография
Tr	трифенилметил
Tol	4-метилбензоил
Turbo Grignard	смесь изопропилмагнийхлорида и хлорида лития 1:1
δ	химический сдвиг относительно тетраметилсилана, частей на миллион

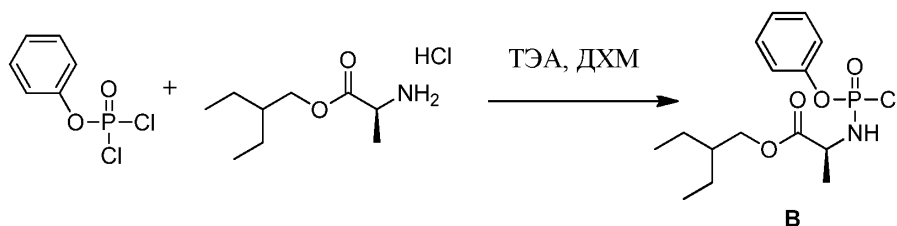
А. Получение соединений.

Пример 1. (2S)-этил-2-(хлор(фенокси)(фосфориламино)пропаноат (хлоридат А).



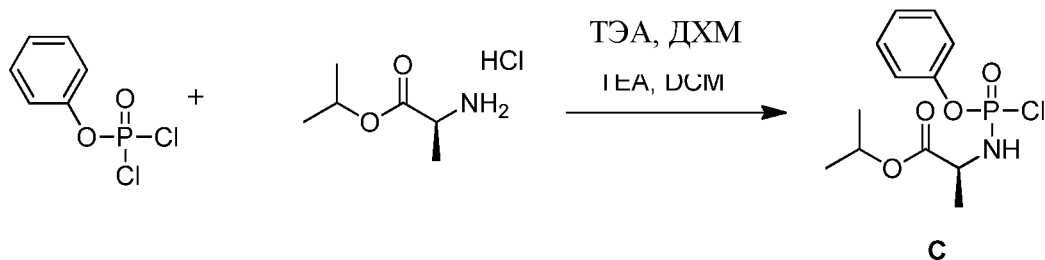
Гидрохлоридную соль этилового эфира аланина (1,69 г, 11 ммоль) растворяли в безводном CH_2Cl_2 (10 мл) и полученную смесь перемешивали при охлаждении до 0°C в атмосфере N_2 (г). Добавляли фенилдихлорфосфат (1,49 мл, 10 ммоль) с последующим добавлением по каплям Et_3N в течение примерно 10 мин. Затем реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение примерно 12 ч. Добавляли безводный Et_2O (50 мл) и полученную смесь перемешивали в течение примерно 30 мин. Полученное твердое вещество удаляли путем фильтрования и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток подвергали хроматографии на силикагеле при элюировании 0-50% EtOAc в гексане с получением промежуточного соединения А. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,39-7,27 (m, 5H), 4,27 (m, 3H), 1,52 (m, 3H), 1,32 (m, 3H). ^{31}P ЯМР (121,4 МГц, CDCl_3) δ 8,2, 7,8.

Пример 2. (2S)-2-этилбутил-2-(хлор((фенокси)(фосфориламино)пропаноат (хлоридат В).



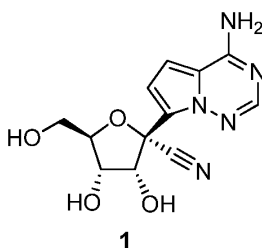
2-Этилбутиловый эфир хлорфосфорамидата аланина В получали с применением той же методики, что и хлоридат А, за исключением замены этилового эфира аланина на 2-этилбутиловый эфир аланина. Полученный неочищенный материал применяли для следующей реакции. Обработка метанолом или этанолом приводила к получению замещенного продукта с требуемым ЖХ/МС сигналом.

Пример 3. (2S)-изопропил-2-(хлор((фенокси)(фосфориламино)пропаноат (хлоридат С).

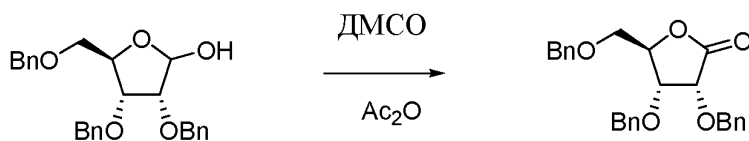


Изопропиловый эфир хлорфосфорамидата аланина С получали с применением той же методики, что и хлоридат А, за исключением замены этилового эфира аланина на изопропиловый эфир аланина. Полученный неочищенный материал применяли для следующей реакции. Обработка метанолом или этанолом приводила к получению замещенного продукта с требуемым ЖХ/МС сигналом.

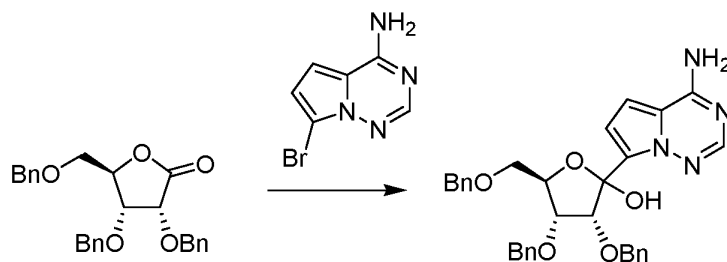
Пример 4. (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[1,2-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрил (соединение 1).



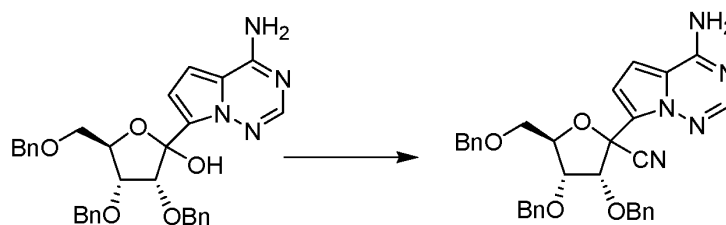
Получение (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[1,2-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила описано ниже.



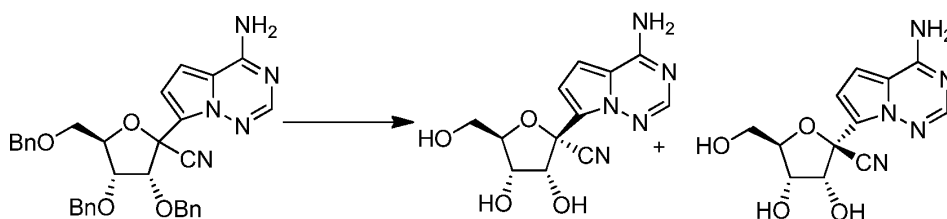
Коммерчески доступный лактол (10 г, 23,8 ммоль) растворяли в безводном ДМСО (30 мл) в атмосфере N₂ (г). Добавляли Ac₂O (20 мл) и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение примерно 48 ч. Реакционную смесь вливали в ледяную H₂O (500 мл) и полученную смесь перемешивали в течение 20 мин. Смесь подвергали экстракции посредством EtOAc (3×200 мл), а затем объединенные органические экстракты промывали H₂O (3×200 мл). Органический экстракт сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в CH₂Cl₂ и подвергали хроматографии на силикагеле при элюировании 25% EtOAc в гексане с получением лактона. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 7,30-7,34 (m, 13H), 7,19-7,21 (m, 2H), 4,55-4,72 (m, 6H), 4,47 (s, 2H), 4,28 (d, J= 3,9 Гц, 1H), 3,66 (m, 2H). ЖХ/МС m/z 436,1 [M+H₂O], 435,2 [M+OH]⁺ Tr=2,82 мин. ВЭЖХ Tr=4,59 [2-98% ACN в H₂] в течение 5 мин при скорости потока 2 мл/мин.



Бромпиразол (полученный согласно WO 2009/132135) (0,5 г, 2,4 ммоль) суспендировали в безводном ТГФ (10 мл) в атмосфере N_2 (г). Суспензию перемешивали и добавляли $TMSCl$ (0,67 мл, 5,28 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 20 мин при комнатной температуре, а затем охлаждали до примерно $-78^\circ C$, после чего медленно добавляли раствор $n-BuLi$ (6 мл, 1,6 н. в гексане, 9,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин при примерно $-78^\circ C$, а затем с помощью шприца добавляли лактон (1 г, 2,4 ммоль). Когда реакция завершалась, что было определено посредством ЖХ/МС, для гашения реакции добавляли $AcOH$. Смесь концентрировали при пониженном давлении и остаток растворяли в смеси CH_2Cl_2 и H_2O (100 мл, 1:1). Отделяли органический слой и промывали H_2O (50 мл). Затем органический слой сушили над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток подвергали хроматографии на силикагеле при элюировании 0-50% $EtOAc$ в гексане с получением продукта в виде смеси аномеров в соотношении 1:1. ЖХ/МС m/z 553 $[M+H]$.



Гидроксинуклеозид (1,1 г, 2,0 ммоль) растворяли в безводном CH_2Cl_2 (40 мл) и раствор охлаждали при перемешивании до примерно $-78^\circ C$ в атмосфере N_2 (г). Добавляли $TMSCN$ (0,931 мл, 7 ммоль) и полученную смесь перемешивали в течение дополнительных 10 мин. К реакционной смеси медленно добавляли $TMSOTf$ (1,63 мл, 9,0 ммоль) и полученную смесь перемешивали в течение 1 ч. Затем реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2 (120 мл) и добавляли водный раствор $NaHCO_3$ (120 мл) для гашения реакции. Реакционную смесь перемешивали в течение дополнительных 10 мин и отделяли органический слой. Водный слой подвергали экстракции CH_2Cl_2 (150 мл) и объединенные органические экстракты сушили над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в минимальном количестве CH_2Cl_2 и подвергали хроматографии на силикагеле при элюировании с применением градиента 0-75% $EtOAc$ и гексана с получением трибензилцианонуклеозида в виде смеси аномеров. 1H ЯМР (300 МГц, CD_3CN) δ 7,94 (s, 0,5H), 7,88 (s, 0,5H), 7,29-7,43 (m, 13H), 7,11-7,19 (m, 1H), 6,82-6,88 (m, 1H), 6,70-6,76 (m, 1H), 6,41 (шир. с, 2H), 5,10 (d, $J=3,9$ Гц, 0,5H), 4,96 (d, $J=5,1$ Гц, 0,5H), 4,31-4,85 (m, 7H), 4,09-4,18 (m, 2H), 3,61-3,90 (m, 2H). ЖХ/МС m/z 562 $[M+H]$.

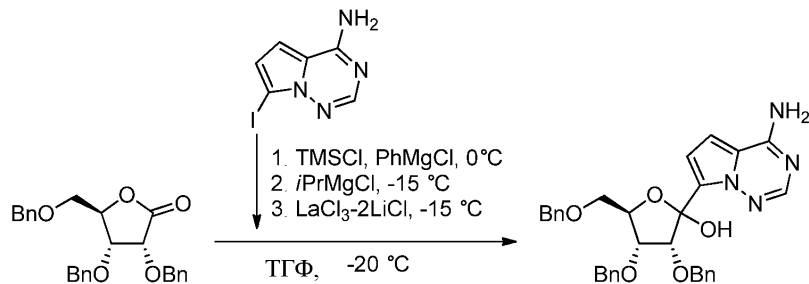


beta 1

Трибензилцианонуклеозид (70 мг, 0,124 ммоль) растворяли в безводном CH_2Cl_2 (2 мл) и охлаждали до примерно $-20^\circ C$ в атмосфере N_2 (г). Добавляли раствор BCl_3 (1 н. в CH_2Cl_2 , 0,506 мл, 0,506 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при $-78^\circ C$. Когда реакция завершалась, что было определено посредством ЖХ/МС, для гашения реакции добавляли $MeOH$. Реакционной смеси давали возможность нагреться до комнатной температуры и растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток подвергали обращенно-фазовой ВЭЖХ на силикагеле C18 при элюировании в течение 5 мин с применением H_2O (0,1% ТФУ), а затем градиента 0-70% $MeCN$ в H_2O (0,1% ТФУ) в течение 35 мин для вымывания α -аномера и β -аномера 1. (α -аномер) 1H ЯМР (300 МГц, D_2O) δ 7,96 (s, 1H), 7,20 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 6,91 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 4,97 (d, $J=4,4$ Гц, 1H), 4,56-4,62 (m, 1H), 4,08-4,14 (m, 1H), 3,90 (dd, $J=12,9, 2,4$ Гц, 1H), 3,70 (dd, $J=13,2, 4,5$ Гц, 1H). (β -аномер) 1H ЯМР (400 МГц, $DMCO$) δ 7,91 (s, 1H), 7,80-8,00 (шир.

с, 2H), 6,85-6,89 (m, 2H), 6,07 (d, J=6,0 Гц, 1H), 5,17 (шир. с, 1H), 4,90 (шир. с, 1H), 4,63 (t, J=3,9 Гц, 1H), 4,02-4,06 (m, 1H), 3,94 (шир. с, 1H), 3,48-3,64 (m, 2H). ЖХ/МС m/z 292,2 [M+H], 290,0 [M-H]. T_r=0,35 мин. ¹³С ЯМР (400 МГц, ДМСО): 156,0, 148,3, 124,3, 117,8, 117,0, 111,2, 101,3, 85,8, 79,0, 74,7, 70,5, 61,4. ВЭЖХ T_r=1,32 мин.

Получение (3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-ола с применением LaCl₃-2LiCl.



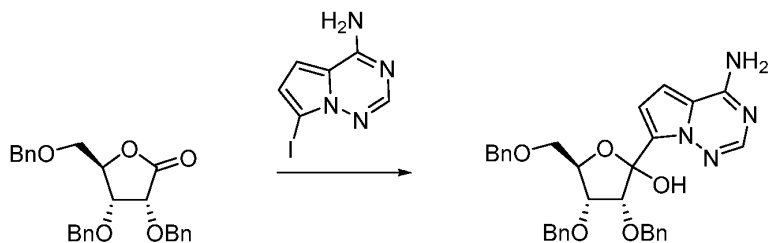
Получали раствор 7-иодпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амин (7,5 г, 28,8 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (67 мл). Раствор охлаждали до примерно 0 °С и добавляли TMSCl (3,3 мл, 30,3 ммоль, 1,05 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение примерно 30 мин, а затем добавляли PhMgCl (2М в ТГФ; 28 мл, 56,8 ммоль, 1,97 экв.) при поддержании внутренней температуры ниже 5 °С. Реакционную смесь встряхивали при примерно 0 °С в течение примерно 35 мин, а затем охлаждали до примерно -15 °С. Затем добавляли iPrMgCl (2М в ТГФ, 14 мл, 30,2 ммоль, 1,05 экв.) при поддержании внутренней температуры ниже -10 °С. После реакции 15 мин при примерно -15 °С добавляли LaCl₃-2LiCl (0,6 М в ТГФ, 50 мл, 14,4 ммоль, 0,5 экв.) при поддержании внутренней температуры ниже примерно -15 °С. Реакционную смесь встряхивали в течение примерно 25 мин при примерно -20 °С.

В отдельной колбе получали раствор (3R,4R,5R)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)дигидрофуран-2(3H)-она (10,0 г, 23,9 ммоль, 0,83 экв.) в ТГФ (45 мл). Раствор охлаждали до примерно -20 °С, а затем переносили в раствор, содержащий реактив Гриньяра, при поддержании внутренней температуры ниже примерно -15 °С. Полученную реакционную смесь перемешивали при примерно -20 °С в течение примерно 30 мин.

Реакцию гасили 2 М HCl (53 мл) и смесь нагревали до примерно 15 °С. Добавляли iPrOAc (38 мл) и разделяли органическую и водную фазы. Нижний водный слой сливали и верхний органический слой последовательно промывали 2,5 мас.% NaHCO₃ (53 мл), 2,5 мас.% NaHCO₃ (53 мл) и 10 мас.% NaCl (53 мл).

Органическую фазу концентрировали до примерно 45 мл, а затем разбавляли iPrOAc (75 мл). Раствор снова концентрировали до примерно 45 мл, а затем разбавляли iPrOAc (23 мл). Раствор концентрировали до примерно 45 мл, а затем фильтровали через слой целита. Отфильтрованный раствор концентрировали до примерно 26 мл, а затем разбавляли МТБЭ (75 мл). Через 2 ч медленно добавляли гептан (23 мл) и суспензию перемешивали при примерно 25 °С в течение примерно 2 ч, а затем охлаждали до примерно -5 °С в течение примерно 8 ч. Твердые вещества выделяли путем фильтрования, и отфильтрованный осадок промывали МТБЭ/гептаном (4:1, 23 мл). Твердые вещества сушили в вакуумной печи при температуре не более примерно 35 °С с получением (3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-ола.

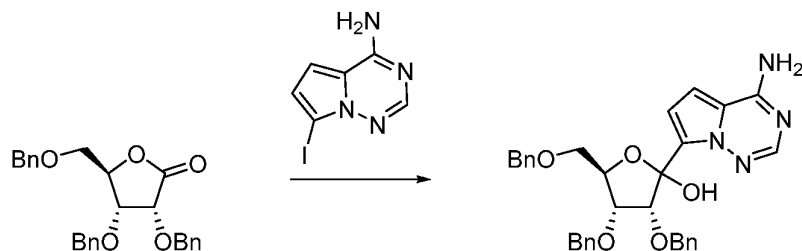
Получение (3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-ола с применением CeCl₃.



Иодпирозол (5,02 г, 19,3 ммоль) растворяли в ТГФ (45 г) и раствор охлаждали до примерно 0 °С при перемешивании. Добавляли TMSCl (2,04 г, 18,7 ммоль) и спустя примерно 1 ч добавляли фенилмагни-хлорид (2,0 М в ТГФ, 19,9 г, 38,2 ммоль). Реакционную смесь охлаждали до примерно -20 °С и медленно добавляли изопропилмагни-хлорид (2,0 М в ТГФ, 9,99 г, 20,5 ммоль). Спустя примерно 30 мин реакци-онную смесь переносили в смесь безводного хлорида церия (4,75 г, 19,3 ммоль) в ТГФ (22 г) при пример-но -20 °С. Спустя примерно 1,5 ч медленно добавляли раствор лактона (6,73 г, 16,1 ммоль) в ТГФ (22 г) и полученную реакционную смесь перемешивали в течение примерно 1 ч. Добавляли 2 М HCl (41 г), смесь нагревали до примерно 15 °С и добавляли изопропилацетат (35 г). Слои разделяли, и органический слой

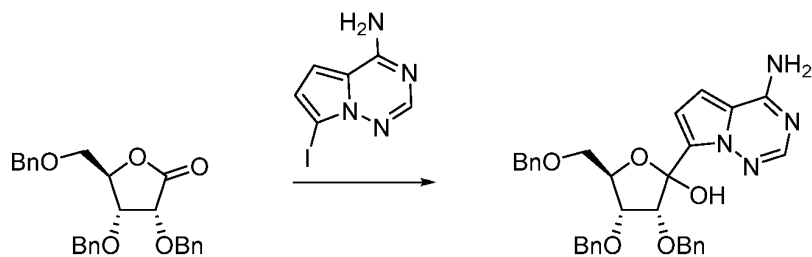
промывали 2,5% NaHCO_3 (2×40 г), 10% NaCl (1×35 г) и концентрировали до объема, составлявшего примерно 30 мл. Вносили изопропилацетат (44 г) и раствор концентрировали до объема, составлявшего примерно 30 мл. Вносили изопропилацетат (43 г) и раствор концентрировали до объема, составлявшего примерно 30 мл. Раствор фильтровали и фильтрат концентрировали до объема, составлявшего примерно 18 мл. Добавляли трет-бутилметилэфир (37 г), а затем затравочные кристаллы продукта (10,7 мг). Спустя примерно 14 ч добавляли н-гептан (10,5 г), и смесь охлаждали до примерно -5°C и фильтровали. Твердые вещества промывали трет-бутилметилэфиром (9 г) при примерно -5°C и сушили под вакуумом при примерно 34°C в течение примерно 15 ч с получением указанного продукта.

Получение (3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-ола с применением CeCl_3 и $i\text{PrMgCl-LiCl}$.



Иодпирозол (5,03 г, 19,3 ммоль) растворяли в ТГФ (45 г) и раствор охлаждали до примерно 0°C при перемешивании в атмосфере N_2 (г). Добавляли TMSCl (2,06 г, 19,0 ммоль) и спустя примерно 1 ч добавляли фенилмагниихлорид (2,0 М в ТГФ, 20,23 г, 38,8 ммоль). Реакционную смесь охлаждали до примерно -20°C и медленно добавляли комплекс изопропилмагниихлорида-хлорида лития (2,0 М в ТГФ, 15,37 г, 21,0 ммоль). Спустя примерно 1 ч реакционную смесь переносили в смесь хлорида церия (4,77 г, 19,4 ммоль) в ТГФ (22 г) при примерно -20°C . Спустя примерно 1 ч медленно добавляли раствор лактона (6,75 г, 16,1 ммоль) в ТГФ (23 г), и полученную реакционную смесь перемешивали в течение примерно 1,5 ч. Добавляли 2 М HCl (40 г), смесь нагревали до примерно 15°C и добавляли изопропилацетат (35 г). Слои разделяли, и органический слой промывали 2,5% NaHCO_3 (2×40 г), 10% NaCl (1×36 г) и концентрировали до объема, составлявшего примерно 30 мл. Добавляли изопропилацетат (44 г) и раствор концентрировали до объема, составлявшего примерно 30 мл. Раствор фильтровали и фильтрат концентрировали до объема, составлявшего примерно 18 мл. Добавляли трет-бутилметилэфир (37 г), а затем затравочные кристаллы продукта (10,5 мг). Спустя примерно 14 ч добавляли н-гептан (11 г), смесь охлаждали до примерно -5°C и фильтровали. Твердые вещества промывали трет-бутилметилэфиром (9 г) при примерно -5°C и сушили под вакуумом при примерно 34°C в течение примерно 15 ч с получением указанного продукта.

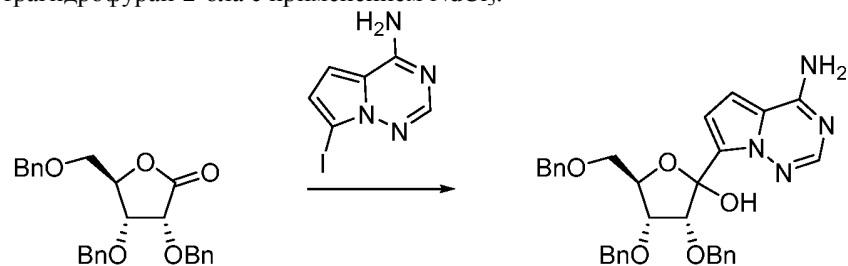
Получение (3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-ола с применением YCl_3 .



Иодпирозол (4,99 г, 19,2 ммоль) растворяли в ТГФ (44 г) и раствор охлаждали до примерно 0°C при перемешивании. Добавляли TMSCl (2,45 г, 19,4 ммоль) и спустя примерно 30 мин добавляли фенилмагниихлорид (2,0 М в ТГФ, 20,29 г, 39,0 ммоль). Реакционную смесь охлаждали до примерно -20°C и медленно добавляли изопропилмагниихлорид (2,0 М в ТГФ, 9,85 г, 20,1 ммоль). Спустя примерно 30 мин реакционную смесь переносили в смесь безводного хлорида иттрия (3,76 г, 19,3 ммоль) и лактона (6,68 г, 16,0 ммоль) в ТГФ (24 г) при примерно -20°C . Спустя примерно 2,5 ч добавляли 2 М HCl (30 г), смесь нагревали до примерно 15°C и добавляли изопропилацетат (22 г). Слои разделяли и органический слой промывали 2,5% NaHCO_3 (2×40 г), 10% NaCl (1×35 г) и концентрировали до объема, составлявшего примерно 30 мл. Вносили изопропилацетат (44 г) и раствор концентрировали до объема, составлявшего примерно 30 мл. Вносили изопропилацетат (45 г) и раствор концентрировали до объема, составлявшего примерно 30 мл. Раствор фильтровали и фильтрат концентрировали до объема, составлявшего примерно 18 мл. Добавляли трет-бутилметилэфир (37 г), а затем затравочные кристаллы продукта (11,5 мг). Спустя примерно 1 ч добавляли н-гептан (15 мл) и смесь охлаждали до примерно -5°C и встряхивали в течение примерно 17 ч. Суспензию фильтровали и твердые вещества промывали смесью трет-бутилметилового эфира (8 г)/н-гептана (2 г), предварительно охлажденной до примерно -5°C . Получен-

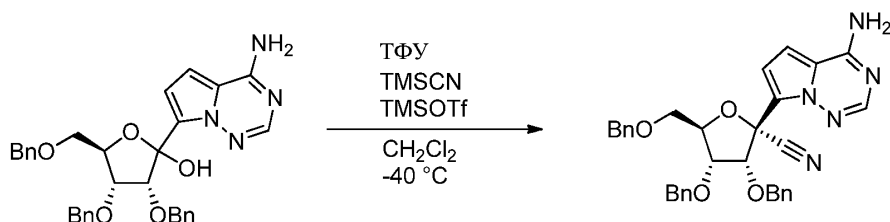
ные твердые вещества сушили под вакуумом при примерно 34°C в течение примерно 22 ч с получением указанного продукта.

Получение (3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-ола с применением NdCl_3 .



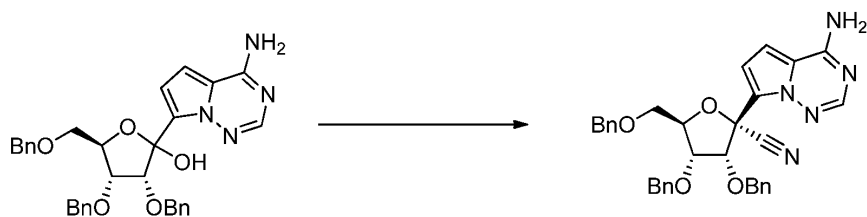
Иодпирозол (5,02 г, 19,3 ммоль) растворяли в ТГФ (38 г) и раствор охлаждали до примерно 0°C при перемешивании в атмосфере N_2 (г). Добавляли TMSCl (2,45 мл, 19,4 ммоль) и спустя примерно 1 ч добавляли фенилмагниихлорид (2,0 М в ТГФ, 19,75 г, 38,0 ммоль). Реакционную смесь охлаждали до примерно -20°C и медленно добавляли изопропилмагниихлорид (2,0 М в ТГФ, 9,40 г, 19,2 ммоль). Спустя примерно 1,5 ч реакционную смесь переносили в смесь безводного хлорида неодима (III) (4,03 г, 16,1 ммоль) и лактона (6,70 г, 16,0 ммоль) в ТГФ (22 г) при примерно -20°C. Спустя примерно 1,5 ч реакционную смесь нагревали до -10°C и еще через 2 ч добавляли 2 М HCl (36 г). Смесь нагревали до примерно 15°C и добавляли изопропилацетат (23 г). Слои разделяли, и органический слой промывали 2,5% NaHCO_3 (2×44 г), 10% NaCl (1×41 г) и концентрировали до объема, составлявшего примерно 30 мл. Вносили изопропилацетат (44 г) и раствор концентрировали до объема, составлявшего примерно 30 мл. Вносили изопропилацетат (45 г) и раствор концентрировали до объема, составлявшего примерно 30 мл. Раствор фильтровали и фильтрат концентрировали до объема, составлявшего примерно 18 мл. Добавляли трет-бутилметилэфир (37 г), а затем затравочные кристаллы продукта (11,9 мг). Спустя примерно 1 ч добавляли н-гептан (15 мл) и смесь охлаждали до примерно -5°C и встряхивали в течение примерно 15 ч. Суспензию фильтровали и твердые вещества промывали смесью трет-бутилметилового эфира (8 г)/н-гептана (11 г), предварительно охлажденной до примерно -5°C. Полученные твердые вещества сушили под вакуумом при примерно 34°C в течение примерно 25 ч с получением указанного продукта.

Получение (2R,3r,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила.



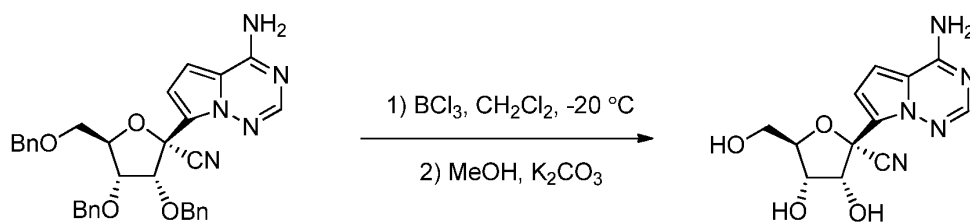
В предварительно охлажденный (-40°C) раствор (3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-ола (10,0 г, 18,1 ммоль, 1,0 экв.) в ДХМ (100 мл) вносили трифторуксусную кислоту (6,19 г, 54,3 ммоль, 3,0 экв.), а затем предварительно охлажденный (-30°C) раствор TMSOTf (24,1 г, 108,6 ммоль, 6,0 экв.) и TMSCN (10,8 г, 108,6 ммоль, 6,0 экв.) в ДХМ (50 мл) при поддержании внутренней температуры ниже примерно -25°C. Реакционную смесь встряхивали при температуре ниже примерно -30°C в течение не менее 10 мин и гасили в предварительно охлажденном (примерно -10°C) растворе 20 мас.% KOH в воде (120 мл). Двухфазную смесь нагревали до температуры окружающей среды. Органический слой отделяли и промывали 10 мас.% NaCl в воде (3×50 мл). Органическую фазу фильтровали, концентрировали под вакуумом до примерно 50 мл, снова разбавляли толуолом (200 мл) и концентрировали под вакуумом до 140 мл при примерно 50°C. В раствор вносили затравку (2R,3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила при примерно 55°C. Смесь встряхивали при примерно 55°C в течение примерно часа и охлаждали до примерно 0°C в течение примерно 6 ч. Твердые вещества выделяли путем фильтрования и отфильтрованный осадок промывали толуолом (30 мл). Твердые вещества сушили под вакуумом при примерно 50°C.

Получение (2R,3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила с помощью химии непрерывных потоков.



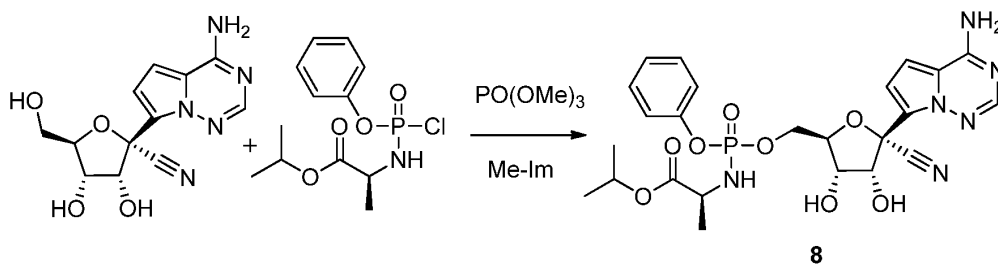
Растворы (3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-ола (23,0 г в 460,07 г ДХМ), TMSOTf (55,81 г в 138,07 г ДХМ) и TMSCN (25,03 г в 138,10 г ДХМ) с помощью насоса последовательно подавали в трубчатый реактор при примерно -40°C. Реакционную смесь собирали в колбу, находившуюся на ледяной бане, содержащей 20% водный раствор КОН (46,91 г КОН и 210 г воды). Слои разделяли и органическую фазу последовательно промывали 10% водным раствором КОН (10 г КОН и 90 мл воды) и 10% соевым раствором (2×100 г). Органическую фазу концентрировали под вакуумом до примерно 4 объемов, вносили изопропиловый спирт (162,89 г) и смесь концентрировали под вакуумом до примерно 10 объемов. Содержимое нагревали до примерно 60°C, затем доводили до примерно 0°C в течение примерно 6,5 ч и встряхивали при примерно 0°C в течение примерно 15,5 ч. Полученную суспензию фильтровали, твердые вещества промывали изопропиловым спиртом (61,79 г), а затем сушили при примерно 50°C при пониженном давлении в течение ночи с получением указанного продукта.

Получение (2R,3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила.



Трибензилцианонуклеозид (48,8 г, 86,9 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в безводном CH₂Cl₂ (244 мл) и охлаждали до примерно -20°C. По каплям добавляли раствор BCl₃ (1М в CH₂Cl₂, 295 мл, 295 ммоль, 3,4 экв.) при поддержании внутренней температуры ниже примерно -15°C. После добавления реакцию смесь перемешивали в течение 1 ч при примерно -20°C. По каплям добавляли MeOH (340 мл) при поддержании внутренней температуры ниже -15 °C. Полученный раствор подвергали дистилляции до примерно 250 мл, затем снова пополнили примерно 250 мл MeOH. Полученный раствор снова подвергали дистилляции до примерно 250 мл, затем снова пополнили примерно 250 мл MeOH и, наконец, подвергали дистилляции до примерно 125 мл. Добавляли воду (125 мл), а затем раствор K₂CO₃ (20 мас. % в воде, 125 мл). Проверяли pH и обнаруживали, что значение pH составляло ~3. Добавляли раствор K₂CO₃ (20 мас. % в воде, 50 мл) и обнаруживали, что значение pH составляло ~8. Полученную суспензию перемешивали в течение ночи, затем фильтровали и промывали водой (50 мл) и MeOH (50 мл). Влажный отфильтрованный осадок продукта сушили при примерно 40°C в течение ночи. ¹H ЯМР (300 МГц, D₂O) δ 7,96 (s, 1H), 7,20 (d, J=4,8 Гц, 1H), 6,91 (d, J=4,8 Гц, 1H), 4,97 (d, J=4,4 Гц, 1H), 4,56-4,62 (m, 1H), 4,08-4,14 (m, 1H), 3,90 (dd, J=12,9, 2,4 Гц, 1H), 3,70 (dd, J=13,2, 4,5 Гц, 1H).

Пример 11. (2S)-изопропил-2-(((2R,3R,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокси-тетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)-фосфиламино)пропаноат (соединение 8).



8

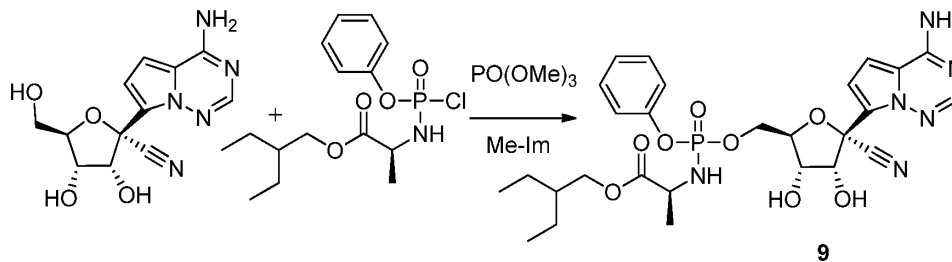
Нуклеозид 1 (45 мг, 0,15 ммоль) растворяли в безводном триметилфосфате (0,5 мл) и раствор перемешивали в атмосфере N₂ (г) при примерно 0°C. К раствору добавляли метилимидазол (36 мкл, 0,45 ммоль). Хлорфосфорамидат С (69 мг, 0,225 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (0,25 мл) и по каплям добавляли к смеси, содержащей нуклеозид. Когда реакция завершалась, что было определено посредством

ЖХ/МС, реакцию смесь разбавляли EtOAc и промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 , насыщенным NaCl , сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток подвергали хроматографии на силикагеле при элюировании 0-5% MeOH в CH_2Cl_2 , а затем препаративной ВЭЖХ с получением указанного продукта. ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD) δ 7,95 (m, 1H), 7,31-6,97 (m, 7H), 4,94 (m, 1H), 4,78 (m, 1H), 4,43 (m, 3H), 4,20 (m, 1H), 3,80 (d, 1H), 1,30-1,18 (m, 9H). ^{31}P ЯМР (121,4 МГц, CD_3OD) δ 3,8. ЖХ/МС m/z 561,0 [M+H], 559,0 [M-H].

Пример 12. (2S)-2-этилбутил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[1,2-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфоамино)пропаноат (соединение 9).

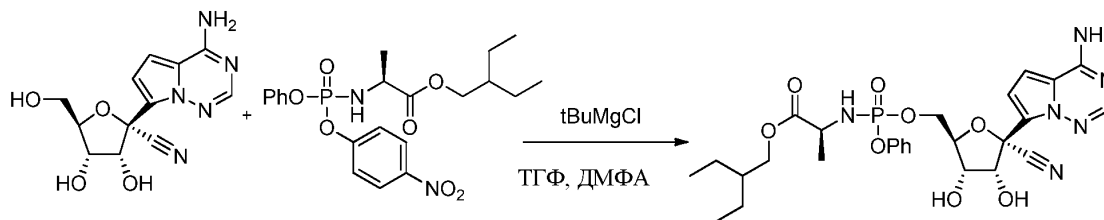
Соединение 9 можно получить несколькими способами, описанными ниже.

Методика 1.



Указанное соединение получали из соединения 1 и хлорида В согласно тому же способу, что в случае получения соединения 8. ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD) δ 7,87 (m, 1H), 7,31-7,16 (m, 5H), 6,92-6,89 (m, 2H), 4,78 (m, 1H), 4,50-3,80 (m, 7H), 1,45-1,24 (m, 8H), 0,95-0,84 (m, 6H). ^{31}P ЯМР (121,4 МГц, CD_3OD) δ 3,7. ЖХ/МС m/z 603,1 [M+H], 601,0 [M-H].

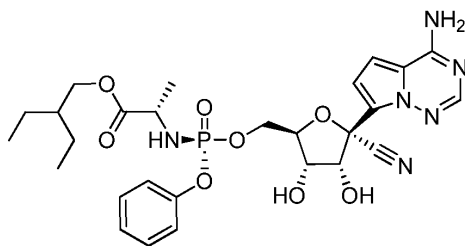
Методика 2.



(2S)-2-этилбутил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат. (2S)-2-этилбутил-2-((((4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат (1,08 г, 2,4 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (9 мл) и перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре. К реакционной смеси одной порцией добавляли (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрил (350 мг, 1,2 ммоль). Затем к реакционной смеси по каплям добавляли раствор трет-бутилмагнийхлорида в ТГФ (1 М, 1,8 мл, 1,8 ммоль) в течение примерно 10 мин. Реакционную смесь перемешивали в течение примерно 2 ч, после чего реакционную смесь разбавляли этилацетатом (50 мл) и промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (3×15 мл), а затем насыщенным водным раствором хлорида натрия (15 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Полученное масло очищали с применением колоночной хроматографии на силикагеле (0-10% MeOH в ДХМ) с получением (2S)-2-этилбутил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата (311 мг, 43%, 1:0,4 диастереомерная смесь по атому фосфора) в виде твердого вещества белого цвета. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 7,85 (m, 1H), 7,34-7,23 (m, 2H), 7,21-7,09 (m, 3H), 6,94-6,84 (m, 2H), 4,78 (d, $J=5,4$ Гц, 1H), 4,46-4,33 (m, 2H), 4,33-4,24 (m, 1H), 4,18 (m, 1H), 4,05-3,80 (m, 3H), 1,52-1,39 (m, 1H), 1,38-1,20 (m, 7H), 0,85 (m, 6H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, CD_3OD) δ 3,71, 3,65. ЖХ/МС m/z 603,1 [M+H], 600,9 [M-H]. ВЭЖХ (градиент 2-98% MeCN- H_2O с 0,1% ТФУ в качестве модификатора в течение 8,5 мин, 1,5 мл/мин, колонка: Phenomenex Kinetex C18, 2,6 мкм 100 Å, 4,6×100 мм) $t_R=5,544$ мин, 5,601 мин.

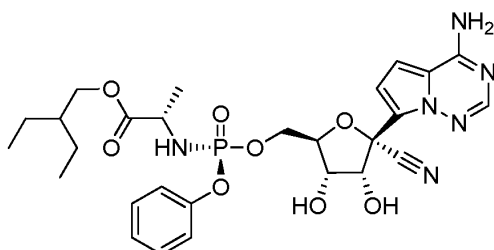
Разделение (S) и (R) диастереомеров. (2S)-2-этилбутил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат растворяли в ацетонитриле. Полученный раствор вносили в хиральную колонку Lux Cellulose-2, уравновешенную ацетонитрилом, и элюировали изократическим ацетонитрилом/метанолом (95:5 об./об.). Первый элюируемый диастереомер имел время удерживания, составлявшее 17,4 мин, и второй элюируемый диастереомер имел время удерживания, составлявшее 25,0 мин.

Первый элюируемый диастереомер представляет собой (S)-2-этилбутил-2-(((R)-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат:



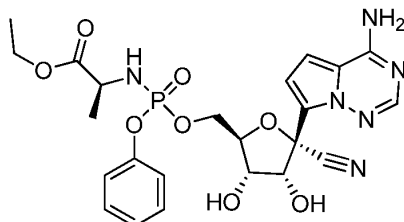
^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 8,05 (s, 1H), 7,36 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 7,29 (шир. т, $J=7,8$ Гц, 2H), 7,19-7,13 (m, 3H), 7,11 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 4,73 (d, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,48-4,38 (m, 2H), 4,37-4,28 (m, 1H), 4,17 (t, $J=5,6$ Гц, 1H), 4,08-3,94 (m, 2H), 3,94-3,80 (m, 1H), 1,48 (сеп, $J=12,0$, 6,1 Гц, 1H), 1,34 (п, $J=7,3$ Гц, 4H), 1,29 (d, $J=7,2$ Гц, 3H), 0,87 (t, $J=7,4$ Гц, 6H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, CD_3OD) δ 3,71 (с). ВЭЖХ (градиент 2-98% $\text{MeCN-H}_2\text{O}$ с 0,1% ТФУ в качестве модификатора в течение 8,5 мин, 1,5 мл/мин, колонка: Phenomenex Kinetex C18, 2,6 мкм 100 Å, 4,6×100 мм) $t_R=5,585$ мин.

Второй элюируемый диастереомер представляет собой (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат:



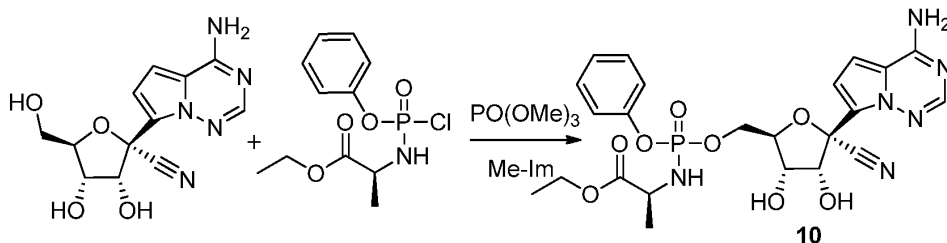
^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 8,08 (s, 1H), 7,36-7,28 (m, 3H), 7,23-7,14 (m, 3H), 7,08 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 4,71 (d, $J=5,3$ Гц, 1H), 4,45-4,34 (m, 2H), 4,32-4,24 (m, 1H), 4,14 (t, $J=5,8$ Гц, 1H), 4,08-3,94 (m, 2H), 3,93-3,85 (m, 1H), 1,47 (сеп, $J=6,2$ Гц, 1H), 1,38-1,26 (m, 7H), 0,87 (t, $J=7,5$ Гц, 6H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, CD_3OD) δ 3,73 (с). ВЭЖХ (градиент 2-98% $\text{MeCN-H}_2\text{O}$ с 0,1% ТФУ в качестве модификатора в течение 8,5 мин, 1,5 мл/мин, колонка: Phenomenex Kinetex C18, 2,6 мкм 100 Å, 4,6×100 мм) $t_R=5,629$ мин.

Пример 13. (2S)-этил-2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)(фосфорил)амино)пропаноат (соединение 10).



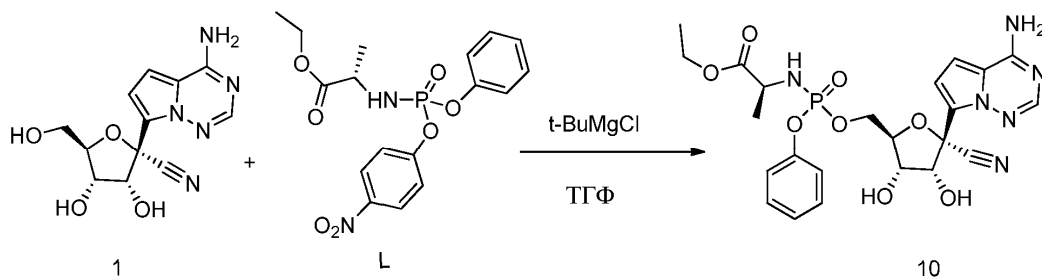
Получение (2S)-этил-2-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата описано ниже.

Методика 1. Получение с применением хлорида А.



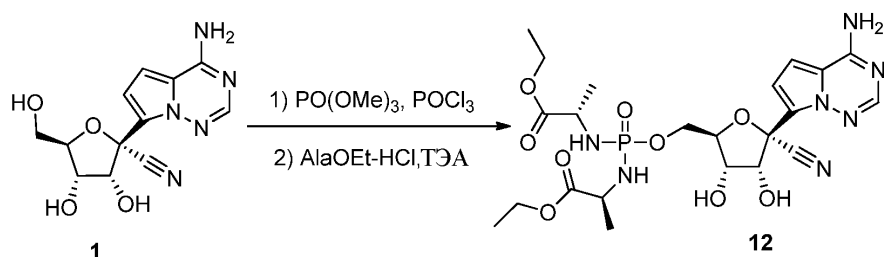
Указанное соединение получали из соединения 1 и хлорида А с применением того же способа, что и в случае получения соединения 8. ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD) δ 7,95 (m, 1H), 7,32-6,97 (m, 7H), 4,78 (m, 1H), 4,43-4,08 (m, 6H), 3,83 (m, 1H), 1,31-1,18 (m, 6H). ^{31}P ЯМР (121,4 МГц, CD_3OD) δ 3,7. ЖХ/МС m/z 547,0 [M+H], 545,0 [M-H].

Методика 2. Получение с применением нитробензольного соединения L.



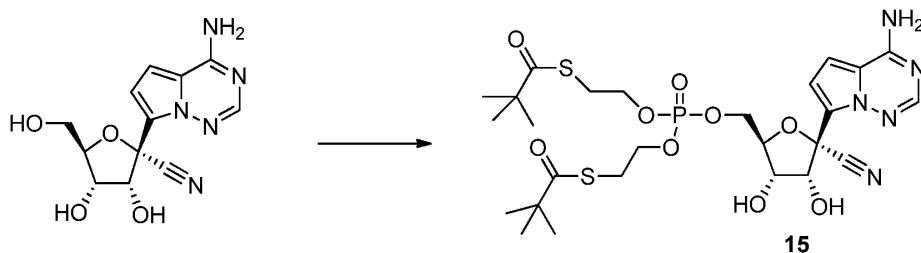
Соединение 1 (50 мг, 0,17 ммоль) растворяли в NMP-ТГФ (1:1 мл) и охлаждали на ледяной бане. Затем добавляли $t\text{BuMgCl}$ (0,257 мл, 0,257 ммоль) в течение примерно 5 мин. Полученной смеси давали возможность нагреться до комнатной температуры и указанную смесь перемешивали в течение примерно 30 мин. Затем добавляли раствор соединения L (полученного согласно US 20120009147, 74,6 мг, 0,189 ммоль) в ТГФ (2 мл). Спустя примерно 30 мин реакционную смесь очищали с помощью ВЭЖХ (от 10 до 80% ацетонитрила в воде) с получением соединения 29 в виде твердого вещества желтого цвета. Твердое вещество дополнительно очищали с помощью хроматографии на силикагеле (от 0 до 20% MeOH в ДХМ) с получением соединения 29. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 7,76 (d, $J=6,0$ Гц, 1H), 7,25-7,14 (m, 2H), 7,11-6,99 (m, 3H), 6,87-6,72 (m, 2H), 4,70 (d, $J=5,4$ Гц, 1H), 4,39-4,24 (m, 2H), 4,20 (dddd, $J=9,7, 7,9, 5,1, 2,8$ Гц, 1H), 4,10 (дт, $J=12,8, 5,5$ Гц, 1H), 4,06-3,91 (m, 2H), 3,72 (ддк, $J=14,3, 9,3, 7,1$ Гц, 1H), 1,17 (dd, $J=7,1, 1,0$ Гц, 1H), 1,14-1,06 (m, 5H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, CD_3OD) δ 3,73, 3,68. МС $m/z=547$ ($M+1$) $^+$.

Пример 15. (2S,2'S)-диэтил-2,2'-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[1,2-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)фосфорил)бис(азанедиил)дипропаноат (соединение 12).



Нуклеозид 1 (14,6 мг, 0,05 ммоль) растворяли в безводном триметилфосфате (0,5 мл) и перемешивали в атмосфере N_2 (г) при комнатной температуре. Добавляли POCl_3 (9,2 мкл, 0,1 ммоль) и полученную смесь перемешивали в течение примерно 60 мин. Добавляли гидрохлорид этилового эфира аланина (61 мг, 0,4 ммоль), а затем Et_3N (70 мкл, 0,5 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение примерно 15 мин, а затем добавляли дополнительный Et_3N (70 мкл, 0,5 ммоль) с получением pH раствора, составлявшего 9-10. Полученную смесь перемешивали в течение примерно 2 ч, а затем разбавляли EtOAc , промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 , а затем насыщенным водным раствором NaCl . Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Остаток подвергали препаративной ВЭЖХ (колонка с фазой C_{18}) с получением указанного продукта 12. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 8,13 (s, 1H), 7,41 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 7,18 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 4,78 (d, $J=5,6$ Гц, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,25-4,08 (m, 7H), 3,83 (m, 2H), 1,33-1,23 (m, 12H). ^{31}P ЯМР (121,4 МГц, CD_3OD) δ 13,8. ЖХ/МС m/z 570,0 [$M+H$], 568,0 [$M-H$].

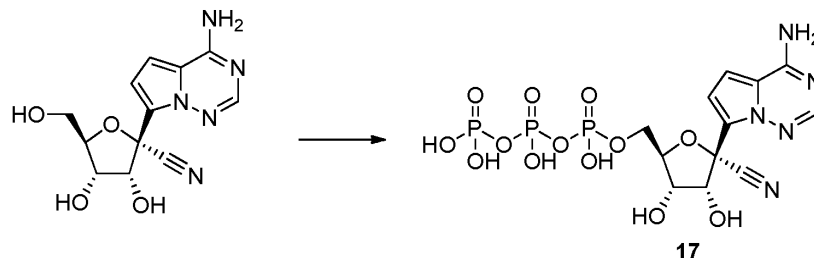
Пример 18. S,S'-2,2'-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[1,2-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)фосфорил)бис(окси)бис(этан-2,1-диил)бис(2,2-диметилпропантиоат) (соединение 15).



Нуклеозид 1 (0,028 г, 0,096 ммоль) растворяли в триметилфосфате (1 мл). Реакционную смесь перемешивали в N_2 (г), а затем обрабатывали 1H-тетразолом (0,021 г, 0,29 ммоль). Реакционную смесь охлаждали до 0°C и добавляли фосфан (Nucleoside, Nucleotides, Nucleic acids; 14; 3-5; 1995; 763-766. Lefebvre, Isabelle; Pompon, Alain; Perigaud, Christian; Girardet, Jean-Luc; Gosselin, Gilles; et al.) (87 мг, 0,192 ммоль).

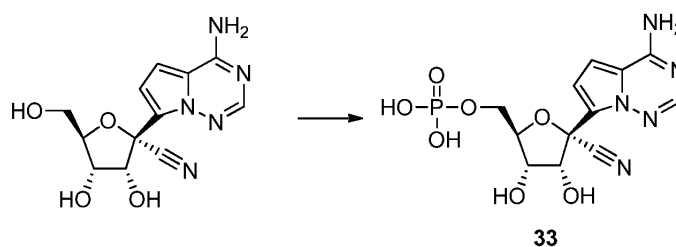
Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч, а затем гасили 30% пероксидом водорода (0,120 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем обрабатывали насыщенным водным раствором тиосульфата натрия (1 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 10 мин, а затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток подвергали препаративной ВЭЖХ для выделения указанного в заголовке продукта 15. ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3CN) δ 7,98 (s, 1H), 6,92 (d, 1H), 6,81 (d, 1H), 6,44 (шир. с, 2H), 4,82 (m, 2H), 4,47 (m, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,00 (m, 4H), 3,80 (шир. с, 1H), 3,11 (m, 4H), 1,24 (s, 9H). ^{31}P ЯМР (121,4 МГц, CD_3CN) δ -1,85 (с). ЖХ/МС m/z 661 [M+H].

Пример 20. ((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилтетрагидротрифосфат (соединение 17).



Соединение 17 получали из соединения 1 с применением методики, сходной с той, что описана ранее (WO 2012012776). Продукт выделяли в виде натриевой соли. ^1H ЯМР (400 МГц, D_2O) δ 7,76 (s, 1H), 6,88 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 6,73 (d, $J=4,4$ Гц, 1H), 4,86 (d, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,43 (m, 1H), 4,39 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 3,94 (m, 1H). ^{31}P ЯМР (121,4 МГц, D_2O) δ -5,4 (d, 1P), -10,8 (d, 1P), -21,1 (t, 1P). ЖХ/МС m/z 530 [M-H], 531,9 [M+H] Tr = 0,22 мин. Ионнообменная ВЭЖХ: Tr=9,95 мин.

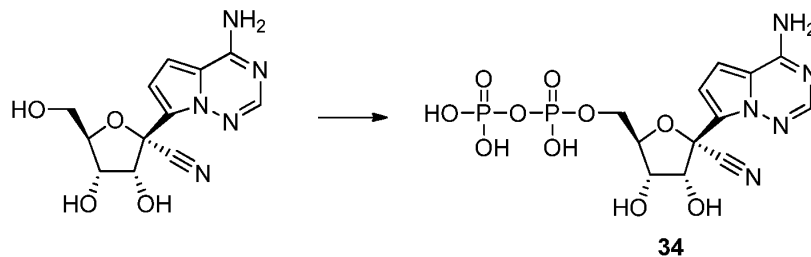
Пример 20-а. ((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфат (соединение 33).



Смесь примерно 0,05 ммоль соединения 1 и примерно 0,5 мл триметилфосфата запечатывали в емкости в течение периода от примерно одного до примерно 48 ч. Смесь охлаждали до температуры от примерно -10°C до примерно 10°C и добавляли примерно 0,075 ммоль оксихлорида фосфора. После периода от примерно одного до примерно 24 ч реакцию гасили примерно 0,5 мл 1 М тетраэтиламмоний бикарбоната и требуемые фракции выделяли с помощью анионообменной хроматографии с получением указанного в заголовке соединения.

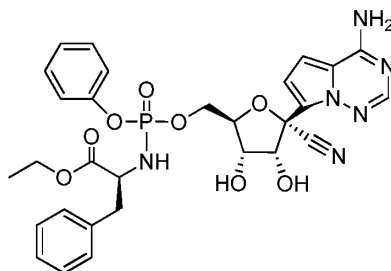
Соединение 33 получали в виде бис-триэтиламмониевой соли из соединения 1, как описано ранее (WO 2011150288). ^1H ЯМР (400 МГц, D_2O) δ 7,82 (s, 1H), 6,91-6,88 (m, 1H), 6,81-6,78 (m, 1H), 4,87-4,84 (m, 1H), 4,40-4,30 (m, 2H), 3,95-3,77 (m, 2H), 3,10-3,00 (m, 6H), 1,20-1,10 (m, 9H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, D_2O) δ 2,33. МС m/z 371.

Пример 20-б. ((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилтригидродифосфат (соединение 34).



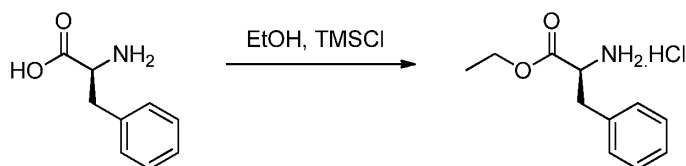
Соединение 34 получали в виде трилитиевой соли из соединения 1, как описано ранее (WO 2002057425). ^{31}P ЯМР (162 МГц, D_2O) δ -5,34 (д), -9,75 (д). МС m/z 451.

Пример 24. (2S)-этил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-3-фенилпропаноат (21).



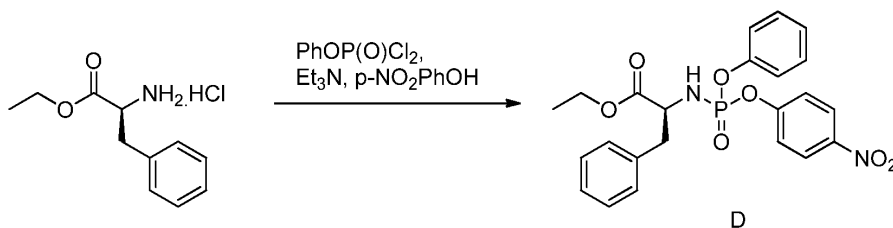
Получение (2S)-этил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-3-фенилпропаноата описано ниже.

Получение гидрохлорида (S)-этил-2-амино-3-фенилпропаноата.



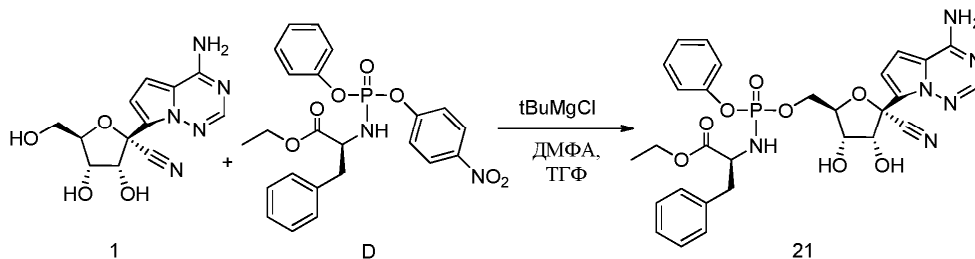
L-фенилаланин (5 г, 30 ммоль) вносили в EtOH (30 мл). К реакционной смеси при комнатной температуре добавляли TMSCl (6,915 мл, 54 ммоль). Реакционный сосуд снабжали обратным холодильником и реакционную смесь помещали на баню с температурой 80°C. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. На следующий день реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, концентрировали при пониженном давлении и полученный остаток вносили в Et₂O. Полученную суспензию фильтровали и выделенные твердые вещества дополнительно промывали Et₂O. Промытые твердые вещества помещали в глубокий вакуум с получением примера гидрохлорида (S)-этил-2-амино-3-фенилпропаноата. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8,52 (s, 3H), 7,30 (m, 5H), 4,24 (ABX, J_{AX}=7,8 Гц, J_{BX}=6,2 Гц, 1H), 4,11 (m, 2H), 3,17, 3,05 (ABX, J_{AB}=14 Гц, J_{BX}=5,8 Гц, J_{AX}=7,6 Гц, 2H), 1,09 (t, J=6,8 Гц, 3H).

Получение (2S)-этил-2-(((4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)амино)-3-фенилпропаноата (соединение D).



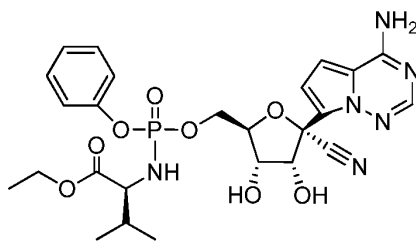
Гидрохлорид (S)-этил-2-амино-3-фенилпропаноата (1,01 г, 4,41 ммоль) растворяли в ДХМ (50 мл). Указанный раствор охлаждали до примерно 0°C и добавляли PhOP(O)Cl₂ (0,656 мл, 4,41 ммоль) с последующим медленным добавлением Et₃N (1,62 мл, 11,5 ммоль) в течение 5 мин. Холодную баню удаляли и реакционной смеси давали нагреваться до комнатной температуры и перемешиваться в течение периода 80 мин. Добавляли p-NO₂PhOH (0,583 г, 4,19 ммоль), а затем дополнительный Et₃N (0,3 мл, 2,1 ммоль). Ход реакции контролировали посредством ЖХ/МС. После завершения реакции реакционную смесь разбавляли Et₂O и полученные твердые вещества удаляли путем фильтрования. Фильтрат концентрировали и соединение D выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (картридж 25 г для сухого ввода, 120 г колонка; элюент: 100% гексан при линейном изменении до 55% EtOAc в гексане). ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 8,17 (m, 2H), 7,33 (m, 2H), 7,09-7,25 (m, 10H), 4,17 (m, 1H), 4,07 (m, 2H), 3,08 (m, 1H), 2,84 (m, 1H), 1,14 (m, 3H). ³¹P ЯМР (162 МГц, DMSO-d₆) δ -1,479 (с), -1,719 (с). МС m/z=471,01 [M+1].

Получение (2S)-этил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-3-фенилпропаноата (соединение 21).



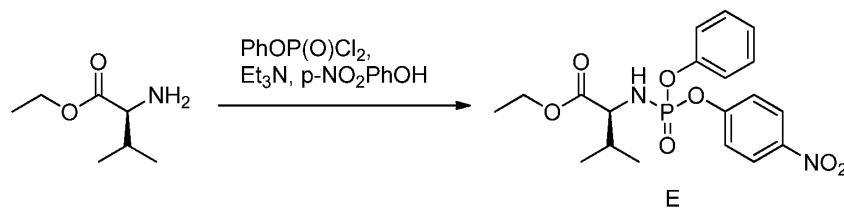
Соединение 1 (0,030 г, 0,103 ммоль) растворяли в ДМФА (1 мл), а затем добавляли ТГФ (0,5 мл). К реакционной смеси по каплям добавляли *t*-BuMgCl (1М/ТГФ, 154,5 мкл, 0,154 ммоль) при интенсивном перемешивании. Полученную белую суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение примерно 30 мин. К реакционной смеси по каплям добавляли раствор соединения D (0,058 г, 0,124 ммоль) в ТГФ (1 мл) при комнатной температуре. Ход реакции контролировали посредством ЖХ/МС. Когда в ходе реакции была достигнута степень превращения, составлявшая 50%, реакционную смесь охлаждали на ледяной бане и гасили ледяной уксусной кислотой (70 мкл). Реакционную смесь концентрировали и соединение 21 выделяли из остатка с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 7,91 (d, *J*=4 Гц, 1H), 7,90 (шир. с, 2H), 7,09-7,30 (m, 8H), 7,01, (t, *J*=8,2 Гц, 2H), 6,89 (d, *J*=4,4 Гц, 1H), 6,82 (t, *J*=4,4 Гц, 1H), 6,27 (m, 1H), 6,14 (m, 1H), 5,34 (m, 1H), 4,62 (t, *J*=5,6 Гц, 1H), 4,15 (m, 1H), 3,78-4,01 (m, 6H), 2,92 (m, 1H), 2,78 (m, 1H), 1,04 (m, 3H). ³¹Р ЯМР (162 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 3,69 (с), 3,34 (с). МС *m/z*=623,0 [M+H].

Пример 25. (2S)-этил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-3-метилбутаноат (22).



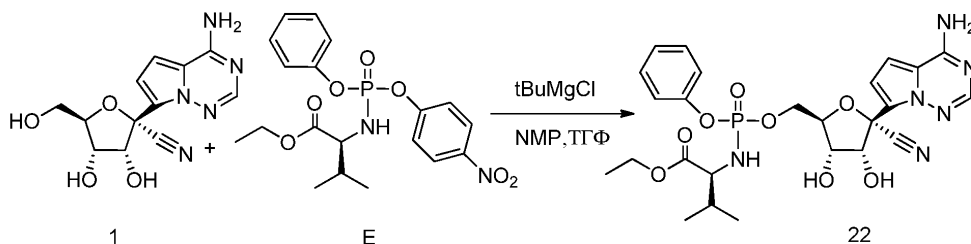
Получение (2S)-этил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-3-метилбутаноата описано ниже.

Получение (2S)-этил-3-метил-2-(((4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)амино)бутаноата (соединение E).



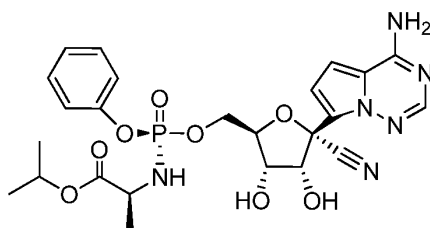
(S)-этил-2-амино-3-метилбутаноат (0,351 г, 1,932 ммоль) растворяли в ДХМ (17 мл). Указанный раствор охлаждали на ледяной бане и добавляли PhOP(O)Cl₂ (0,287 мл, 1,932 ммоль) с последующим медленным добавлением Et₃N (1,62 мл, 11,4 ммоль) в течение примерно 5 мин. Холодную баню удаляли и реакционной смеси давали возможность нагреться до комнатной температуры и перемешиваться в течение периода 1 ч. Добавляли *p*-NO₂PhOH (0,255 г, 1,836 ммоль) и ход реакции контролировали с помощью ЖХ/МС. После завершения реакции смесь разбавляли Et₂O и полученные твердые вещества удаляли путем фильтрования. Фильтрат концентрировали и соединение E выделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (картридж 12 г для сухого ввода, 80 г колонка; элюент: 100% гексан при линейном изменении до 55% EtOAc в гексане). ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8,30 (d, *J*=9,2 Гц, 2H), 7,48 (t, *J*=9,6 Гц, 2H), 7,40 (t, *J*=7,8 Гц, 2H), 7,20-7,27 (m, 3H), 6,60 (quart, *J*=11,6 Гц, 1H), 4,01 (m, 2H), 3,61 (m, 1H), 1,93 (m, 1H), 1,11 (m, 3H), 0,79 (m, 6H). ³¹Р ЯМР (162 МГц, ДМСО-*d*₆) δ -0,342 (с), -0,578 (с). МС *m/z*=422,9 [M+H].

Получение (2S)-этил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-3-метилбутаноата (соединение 22).

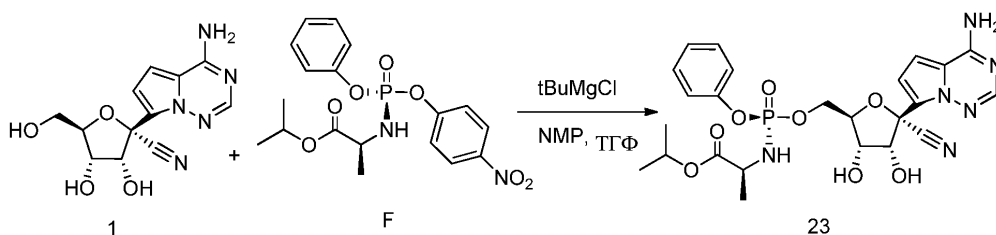


Соединение 1 (0,040 г, 0,137 ммоль) растворяли в NMP (1,5 мл), а затем добавляли ТГФ (0,25 мл). Указанный раствор охлаждали на ледяной бане и по каплям добавляли *t*-BuMgCl (1М/ТГФ, 425,7 мкл, 0,426 ммоль) при интенсивном перемешивании. Ледяную баню удаляли и полученную белую суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение примерно 15 мин. К реакционной смеси по каплям добавляли раствор соединения E (0,081 г, 0,192 ммоль) в ТГФ (0,5 мл) при комнатной температуре. Ход реакции контролировали с помощью ЖХ/МС. Когда в ходе реакции была достигнута степень превращения, составлявшая 50%, реакционную смесь охлаждали на ледяной бане и гасили ледяной уксусной кислотой (70 мкл). Реакционную смесь концентрировали и соединение 22 наполовину очищали от остатка с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Наполовину чистый материал дополнительно очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (картридж 12 г для сухого ввода, 40 г колонка; элюент: 100% EtOAc при линейном изменении до 10% MeOH в EtOAc) с получением соединения 22. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,91 (d, $J=1,6$ Гц, 1H), 7,88 (шир. с, 2H), 7,32 (m, 2H), 7,15 (m, 3H), 6,90 (t, $J=4,2$ Гц, 1H), 6,84 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 6,26 (dd, $J=13,4, 6,2$ Гц, 1H), 5,87 (quart, $J=11,2$ Гц, 1H), 5,35 (m, 1H), 4,64 (m, 1H), 4,25 (m, 2H), 3,93-4,15 (m, 4H), 3,45 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 1,09-1,16 (m, 3H), 0,70-0,83 (m, 6H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, ДМСО- d_6) δ 4,59 (с), 4,47 (с). МС $m/z=575,02$ [M+H].

Пример 26. (S)-изопропил-2-(((R)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат (23).

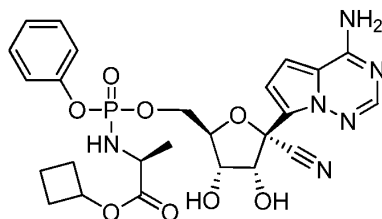


Получение (S)-изопропил-2-(((R)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата описано ниже.

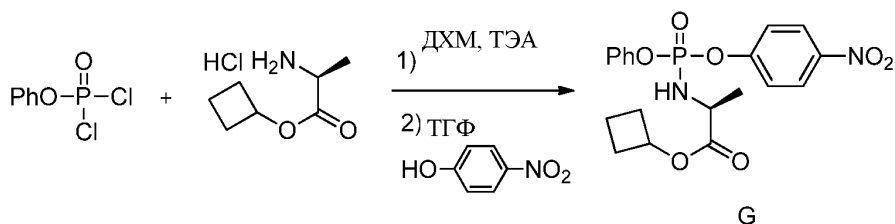


Соединение 1 (60,0 мг, 206 мкмоль) растворяли в NMP (0,28 мл). Добавляли ТГФ (0,2 мл), а затем трет-бутилмагнийхлорид (1,0 М раствор в тетрагидрофуране, 0,309 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона. Спустя 20 мин добавляли раствор соединения F (полученного согласно Cho, A. et al., J. Med. Chem. 2014, 57, 1812-1825, 81 мг, 206 мкмоль) в ТГФ (0,2 мл) и полученную смесь нагревали до примерно 50°C. После 3 ч реакционную смесь оставляли остыть до комнатной температуры и очищали непосредственно с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка Phenomenex Synergi 4 мкм Hydro-RR 80A 150×30 мм, градиент 5-100% ацетонитрил/вода) с получением соединения 23. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 7,86 (s, 1H), 7,34-7,26 (m, 2H), 7,21-7,12 (m, 3H), 6,91 (d, $J=4,6$ Гц, 1H), 6,87 (d, $J=4,6$ Гц, 1H), 4,92 (септ, $J=6,3$ Гц, 1H), 4,80 (d, $J=5,4$ Гц, 1H), 4,43-4,34 (m, 1H), 4,33-4,24 (m, 1H), 4,18 (t, $J=5,6$ Гц, 1H), 3,82 (дк, $J=9,7, 7,1$ Гц, 2H), 1,27 (dd, $J=7,1, 1,0$ Гц, 3H), 1,18 (dd, $J=6,3, 4,8$ Гц, 6H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, CD_3OD) δ 3,72 (с). ЖХ/МС: $t_R = 1,39$ мин, МС $m/z = 561,11$ [M+H]; ЖХ-система: Thermo Accela 1250 для СВЭЖХ; МС-система: Thermo LCQ Fleet; колонка: Kinetex 2,6 мкм XB-C18 100Å, 50 ×4,6 мм; растворители: ACN с 0,1% уксусной кислоты, вода с 0,1% уксусной кислоты; градиент: 0 мин - 2,0 мин 2-100% ACN, 2,0 мин - 3,05 мин 100% ACN, 3,05 мин - 3,2 мин 100% - 2% ACN, 3,2 мин - 3,5 мин 2% ACN при 2 мкл/мин. ВЭЖХ: $t_R = 2,523$ мин; ВЭЖХ-система: Agilent серии 1100; колонка: Gemini 5 мкм C18 110Å, 50×4,6 мм; растворители: ACN с 0,1% ТФУ, вода с 0,1% ТФУ; градиент: 0 мин - 5,0 мин 2-98% ACN, 5,0 мин - 6,0 мин 98% ACN при 2 мл/мин.

Пример 27. (2S)-циклобутил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат (24).

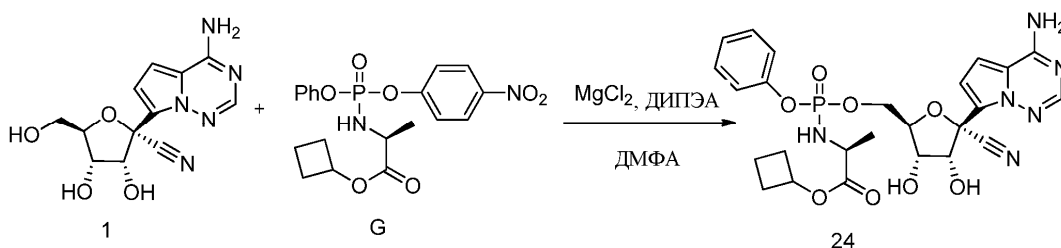


Получение (2S)-циклобутил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата описано ниже.
Получение (2S)-циклобутил-2-(((4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата (соединение G).



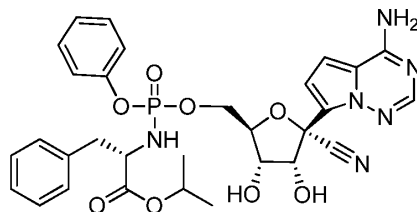
Фенилдихлорфосфат (1,49 мл, 10 ммоль) растворяли в 10 мл безводного ДХМ и перемешивали в атмосфере азота на ледяной бане. Одной порцией добавляли гидрохлорид изобутилового эфира L-аланина (0,9 г, 5 ммоль). Затем по каплям добавляли триэтиламин (765 мкл, 5,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение примерно 1 ч. По каплям добавляли дополнительный триэтиламин (765 мкл, 5,5 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение примерно 45 мин. Одной порцией добавляли п-нитрофенол (1,25 г, 9 ммоль) и перемешивали в течение примерно 30 мин. Добавляли триэтиламин (765 мкл, 5,5 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение примерно 2 ч. Затем добавляли дополнительный п-нитрофенол (1,25 г, 9 ммоль) и триэтиламин (765 мкл, 5,5 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение еще примерно 2 ч. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Полученное неочищенное вещество разбавляли EtOAc и дважды промывали 5% водным раствором лимонной кислоты, а затем насыщенным водным раствором хлорида натрия. Затем органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали на колонке с силикагелем (0-20-50% EtOAc в гексане) с получением соединения G. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 8,33-8,23 (m, 2H), 7,52-7,33 (m, 4H), 7,33-7,17 (m, 3H), 4,96-4,85 (m, 1H), 4,07-3,96 (m, 1H), 2,27 (m, 2H), 2,07-1,91 (m, 2H), 1,83-1,70 (m, 1H), 1,70-1,55 (m, 1H), 1,32 (m, 3H). ³¹P ЯМР (162 МГц, CD₃OD) δ -1,36, -1,59. МС m/z=420,9 [M+H].

Получение (2S)-циклобутил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата (соединение 24).



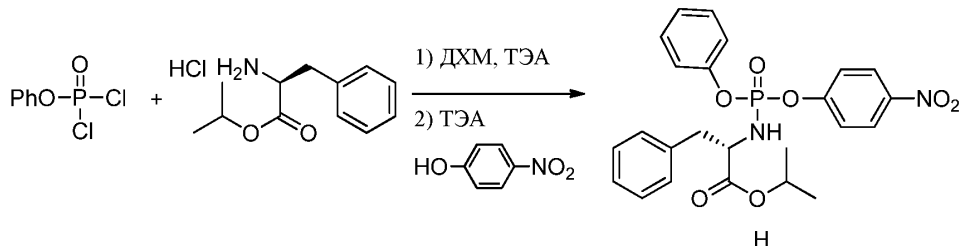
Соединение 1 (58 мг, 0,2 ммоль) смешивали с соединением G (101 мг, 0,24 ммоль) в 2 мл безводного ДМФА. Одной порцией добавляли хлорид магния (42 мг, 0,44 ммоль). Реакционную смесь нагревали до примерно 50°C. Добавляли ДИПЭА (87 мкл, 0,5 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение примерно 2 ч при примерно 50°C. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли EtOAc и промывали 5% водным раствором лимонной кислоты, а затем насыщенным водным раствором хлорида натрия. Затем органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали на колонке с силикагелем (0-2-5% MeOH в ДХМ) с получением соединения 24. ¹H ЯМР (400 МГц, метанол-d₄) δ 7,85 (m, 1H), 7,34-7,22 (m, 2H), 7,22-7,08 (m, 3H), 6,94-6,84 (m, 2H), 4,95-4,85 (m, 1H), 4,79 (m, 1H), 4,46-4,34 (m, 2H), 4,34-4,24 (m, 1H), 4,19 (m, 1H), 3,81 (m, 1H), 2,27 (m, 2H), 2,01 (m, 2H), 1,84-1,68 (m, 1H), 1,62 (m, 1H), 1,30-1,16 (m, 3H). ³¹P ЯМР (162 МГц, CD₃OD) δ 3,70, 3,65. МС m/z=573,0 [M+H].

Пример 28. (2S)-изопропил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-3-фенилпропаноат (25).



Получение (2S)-изопропил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-3-фенилпропаноата описано ниже.

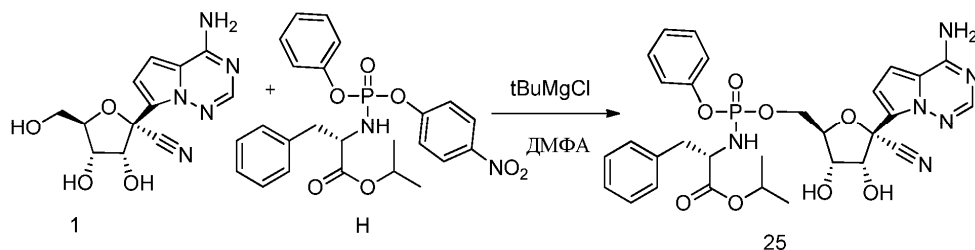
Получение (2S)-изопропил-2-(((4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)амино)-3-фенилпропаноата (соединение Н).



Фенилдихлорфосфат (718 мкл, 4,8 ммоль) растворяли в 10 мл безводного ДХМ и перемешивали в атмосфере азота на ледяной бане. Одной порцией добавляли гидрохлорид изопропилового эфира L-фенилаланина (1 г, 4,1 ммоль). Добавляли еще 10 мл безводного ДХМ. По каплям добавляли триэтиламин (736 мкл, 5,3 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение примерно 30 мин. Затем по каплям добавляли дополнительный триэтиламин (736 мкл, 5,3 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин. Затем по каплям добавляли дополнительный триэтиламин (736 мкл, 5,3 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение примерно 15 мин. Затем добавляли p-нитрофенол (600 мг, 4,32 ммоль). Затем ледяную баню удаляли и реакционной смеси давали возможность нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение примерно 2 ч. Добавляли дополнительные p-нитрофенол (50 мг) и триэтиламин (736 мкл, 5,3 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение примерно 1 ч.

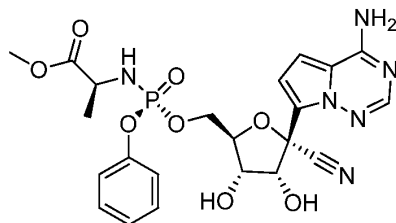
Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, разбавляли EtOAc и дважды промывали 5% водным раствором лимонной кислоты, а затем насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали на колонке с силикагелем (0-15% EtOAc в гексане) с получением соединения Н. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,17 (m, 2H), 7,38-7,13 (m, 10H), 7,13-7,02 (m, 2H), 4,95 (m, 1H), 4,31 (m, 1H), 3,69 (m, 1H), 3,02 (dd, J=6,1, 1,8 Гц, 2H), 1,21-1,08 (m, 6H). ³¹P ЯМР (162 МГц, CDCl₃) δ -2,96, -2,98. МС m/z=485,0 [M+H].

Получение (2S)-изопропил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-3-фенилпропаноата (соединение 25).

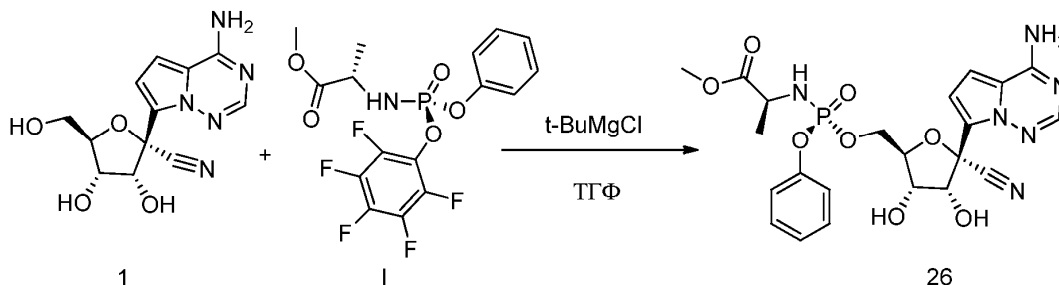


Смешивали соединение 1 (58 мг, 0,2 ммоль) и соединение Н (116 мг, 0,24 ммоль) и добавляли 2 мл безводного ДМФА. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре. По каплям добавляли 1 M tBuMgCl в ТГФ (300 мкл, 0,3 ммоль) в течение 3 мин, а затем реакционную смесь перемешивали в течение примерно 16 ч. Реакционную смесь разбавляли EtOAc и промывали 5% водным раствором лимонной кислоты, насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, а затем насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали на колонке с силикагелем (0-5% MeOH в ДХМ) с получением соединения 25. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 7,84 (m, 1H), 7,27-7,08 (m, 8H), 7,08-6,97 (m, 2H), 6,88 (m, 2H), 4,91-4,84 (m, 1H), 4,74 (m, 1H), 4,26 (m, 1H), 4,19-4,04 (m, 2H), 4,04-3,91 (m, 2H), 2,97 (m, 1H), 2,82 (m, 1H), 1,14 (m, 3H), 1,06 (m, 3H). ³¹P ЯМР (162 МГц, CD₃OD) δ 3,63, 3,25. МС m/z=637,0 [M+H].

Пример 29. (S)-метил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат (26).

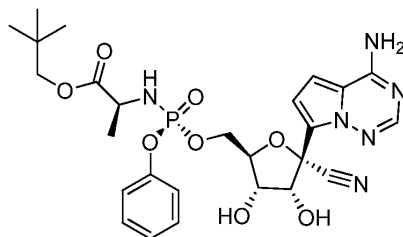


Получение (S)-метил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата описано ниже.

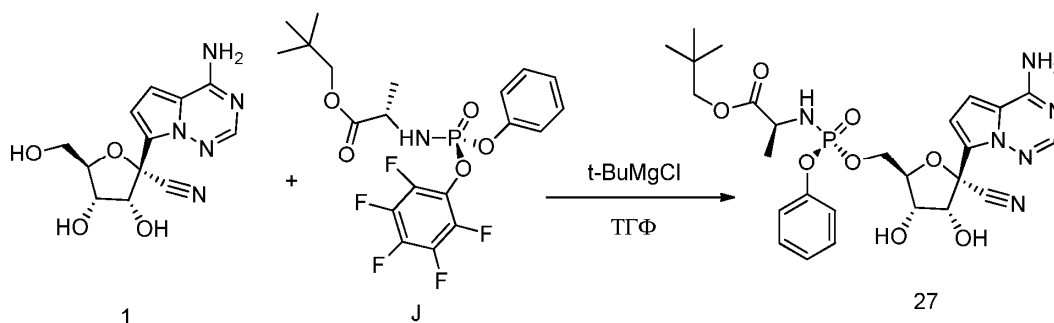


Соединение 1 (100 мг, 0,34 ммоль) растворяли в ТГФ (2 мл) и охлаждали на ледяной бане. Затем медленно по каплям добавляли 1 М t-BuMgCl (0,52 мл, 0,77 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение примерно 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли соединение I (полученное согласно WO 2012142085, 219 мг, 0,52 ммоль) в ТГФ (2 мл) в течение 5 мин и полученную смесь перемешивали в течение примерно 24 ч при комнатной температуре. Затем реакционную смесь разбавляли EtOAc, охлаждали на ледяной бане, промывали водным раствором NaHCO₃ (2 мл), промывали соевым раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. Полученную смесь очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (от 0 до 20% MeOH в ДХМ) и препаративной ВЭЖХ (от 10 до 80% ацетонитрила в воде) с получением соединения 26. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 7,86 (s, 1H), 7,29 (dd, J=8,6, 7,2 Гц, 2H), 7,21-7,09 (m, 3H), 6,94-6,81 (m, 2H), 4,79 (d, J=5,4 Гц, 1H), 4,38 (дк, J=10,8, 5,3, 2,7 Гц, 2H), 4,33-4,23 (m, 1H), 4,18 (t, J=5,5 Гц, 1H), 3,86 (дк, J=9,9, 7,1 Гц, 1H), 3,62 (s, 3H), 1,27 (dd, J=7,2, 1,1 Гц, 3H). МС m/z = 533 (M+1)⁺.

Пример 30. (S)-неопентил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат (27).



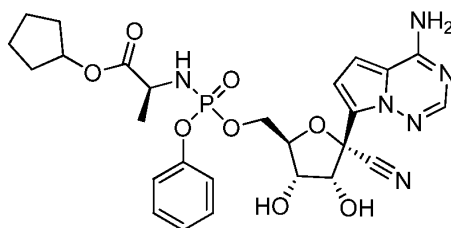
Получение (S)-неопентил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата описано ниже.



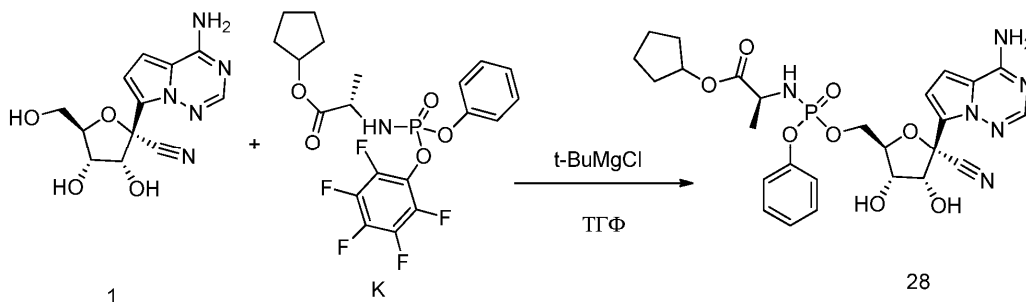
Соединение 1 (100 мг, 0,34 ммоль) растворяли в ТГФ (2 мл) и охлаждали на ледяной бане. Затем медленно по каплям добавляли 1 М t-BuMgCl (0,52 мл, 0,77 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение примерно 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли соединение J (полученное со-

гласно WO2012075140, 248 мг, 0,52 ммоль) в течение примерно 5 мин и полученную смесь перемешивали в течение примерно 24 ч при комнатной температуре, разбавляли EtOAc, охлаждали на ледяной бане, обрабатывали водным раствором NaHCO_3 (2 мл), промывали солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. Полученную смесь очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (от 0 до 20% MeOH в ДХМ) и препаративной ВЭЖХ (от 10 до 80% ацетонитрила в воде) с получением соединения 27. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 7,86 (s, 1H), 7,36-7,24 (m, 2H), 7,23-7,10 (m, 3H), 6,96-6,85 (m, 2H), 4,78 (d, $J=5,4$ Гц, 1H), 4,38 (тдд, $J=10,0, 4,9, 2,5$ Гц, 2H), 4,32-4,24 (m, 1H), 4,17 (t, $J=5,6$ Гц, 1H), 3,91 (дк, $J=9,8, 7,1$ Гц, 1H), 3,81 (d, $J=10,5$ Гц, 1H), 3,69 (d, $J=10,5$ Гц, 1H), 1,31 (dd, $J=7,2, 1,1$ Гц, 3H), 0,89 (s, 9H). МС $m/z=589$ ($M+1$) $^+$.

Пример 31. (2S)-циклопентил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат (28).

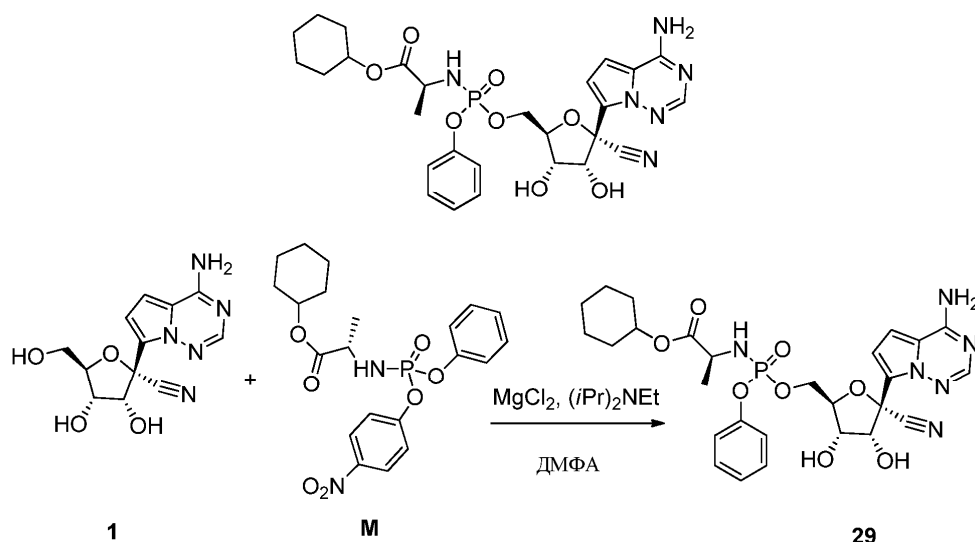


Получение (2S)-циклопентил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата описано ниже.



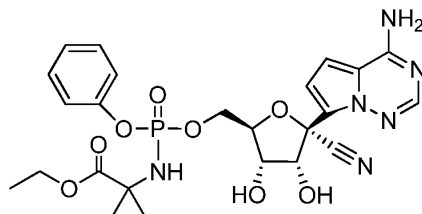
Соединение 1 (100 мг, 0,34 ммоль) растворяли в ТГФ (2 мл) и охлаждали на ледяной бане. Затем медленно по каплям добавляли 1 М $t\text{-BuMgCl}$ (0,52 мл, 0,77 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение примерно 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли соединение К (полученное согласно WO2012075140, 247 мг, 0,52 ммоль) в ТГФ (2 мл) в течение примерно 5 мин и полученную смесь перемешивали в течение примерно 24 ч при комнатной температуре, разбавляли EtOAc, охлаждали на ледяной бане, обрабатывали водным раствором NaHCO_3 (2 мл), промывали солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. Полученную смесь очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (от 0 до 20% MeOH в ДХМ) и препаративной ВЭЖХ (от 10 до 80% ацетонитрила в воде) с получением примера 28. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 7,85 (s, 1H), 7,33-7,22 (m, 2H), 7,14 (тдд, $J=7,6, 2,1, 1,1$ Гц, 3H), 6,95-6,87 (m, 2H), 5,13-5,00 (m, 1H), 4,78 (d, $J=5,4$ Гц, 1H), 4,48-4,35 (m, 2H), 4,30 (ddd, $J=10,6, 5,7, 3,6$ Гц, 1H), 4,19 (t, $J=5,4$ Гц, 1H), 3,78 (дк, $J=9,2, 7,1$ Гц, 1H), 1,81 (дтд, $J=12,5, 5,9, 2,4$ Гц, 2H), 1,74-1,49 (m, 6H), 1,21 (dd, $J=7,1, 1,2$ Гц, 3H). МС $m/z = 587$ ($M+1$) $^+$.

Пример 32. (2S)-циклогексил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноат (29).



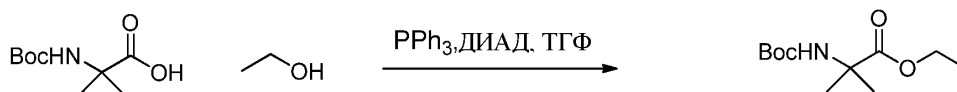
К смеси соединения 1 (50 мг, 0,343 ммоль), соединения М (полученного согласно US 20130143835, 93 мг, 0,209 ммоль) и $MgCl_2$ (24,5 мг, 0,257 ммоль) в ДМФА (1 мл) по каплям добавляли диизопропилэтиламин (0,075 мл, 0,43 ммоль) в течение примерно 5 мин при примерно $0^\circ C$. Полученную смесь перемешивали при примерно $50^\circ C$ в течение примерно 1 ч. Затем реакционную смесь охлаждали на ледяной бане, обрабатывали 1 М раствором лимонной кислоты (0,5 мл) и очищали непосредственно с помощью препаративной ВЭЖХ (от 0 до 70% ACN в воде) с получением соединения 29. 1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 7,84 (s, 1H), 7,32-7,23 (m, 2H), 7,18-7,10 (m, 3H), 6,93-6,87 (m, 2H), 4,78 (d, $J=5,4$ Гц, 1H), 4,67 (td, $J=8,7, 4,2$ Гц, 1H), 4,48-4,35 (m, 2H), 4,30 (ddd, $J=10,8, 5,7, 3,7$ Гц, 1H), 4,20 (t, $J=5,4$ Гц, 1H), 3,88-3,71 (m, 1H), 1,83-1,63 (m, 4H), 1,58-1,46 (m, 1H), 1,46-1,24 (m, 5H), 1,24 (s, 3H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, CD_3OD) δ 3,75. МС $m/z=601$ ($M+1$) $^+$.

Пример 33. Этил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-2-метилпропаноат (30).



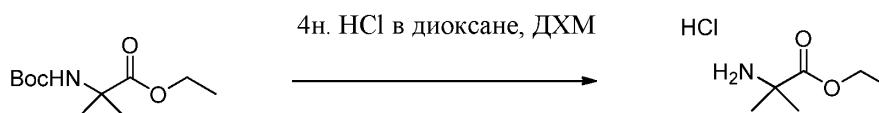
Получение этил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-2-метилпропаноата описано ниже.

Получение этил-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпропаноата.



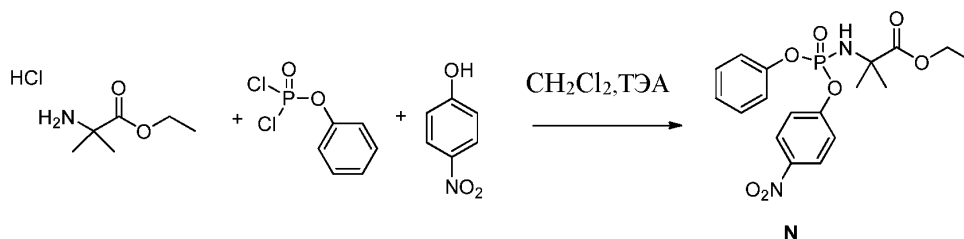
Трифенилфосфин (6,18 г, 25,00 ммоль) вносили в ТГФ (30 мл). Далее вносили ДИАД (4,92 мл, 25,00 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Растворяли 2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпропановую кислоту (5,08 г, 25,00 ммоль) в ТГФ (20 мл) и добавляли к реакционной смеси с последующим добавлением этанола (2,19 мл, 37,49 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение примерно 1 ч. Растворители удаляли при пониженном давлении и неочищенное вещество растворяли в смеси Et_2O :гексан 1:1 (120 мл). Твердый трифенилфосфиноксид отфильтровывали и растворитель удаляли при пониженном давлении. Неочищенное вещество вносили в минимальное количество CH_2Cl_2 и очищали с помощью хроматографии на силикагеле при элюировании 0-50% $EtOAc$ /Гекс с получением этил-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпропаноата. 1H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 4,18 (quart, $J=7,1$ Гц, 2H), 1,49 (s, 6H), 1,43 (s, 9H), 1,27 (t, $J=7,1$ Гц, 3H).

Получение гидрохлорида этил-2-амино-2-метилпропаноата.



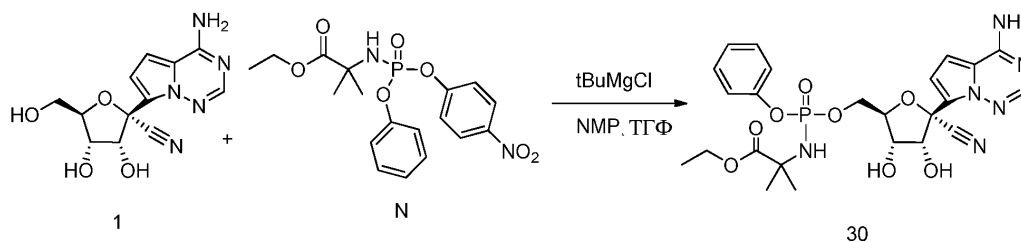
Этил-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпропаноат (2,71 г, 11,72 ммоль) вносили в CH_2Cl_2 (25 мл), медленно добавляли 4 н. HCl в диоксане (25 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре. Через 1 ч путем ТСХ определяли, что реакция прошла полностью. Растворители удаляли при пониженном давлении и неочищенное вещество дважды выпаривали совместно с Et_2O , а затем помещали в глубокий вакуум с получением гидрохлорида этил-2-амино-2-метилпропаноата. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ : 8,70 (s, 3H), 4,18 (quart, $J=7,1$ Гц, 2H), 1,46 (s, 6H), 1,21 (t, $J=7,1$ Гц, 3H).

Получение этил-2-метил-2-(((4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата (соединение N).



Фенилдихлорфосфат (0,97 мл, 6,50 ммоль) и гидрохлорид этил-2-амино-2-метилпропаноата (1,09 г, 6,50 ммоль) вносили в CH_2Cl_2 (50 мл). Реакционную смесь охлаждали до примерно 0°C и медленно добавляли ТЭА (1,75 мл, 12,45 ммоль). Холодную баню удаляли и позволяли реакционной смеси перемешиваться при комнатной температуре. После примерно 2 ч путем ^{31}P ЯМР определяли, что добавление аминокислоты завершилось. Вносили п-нитрофенол (0,860 г, 6,17 ммоль) с последующим добавлением ТЭА (0,87 г, 7,69 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре. После примерно 2 ч путем ЖХ/МС определяли, что реакция прошла полностью. Реакционную смесь разбавляли Et_2O и отфильтровывали соли ТЭА- HCl . Неочищенное вещество концентрировали и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (0-50% EtOAc/Hex) с получением соединения N. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 8,37-8,21 (m, 2H), 7,55-7,44 (m, 2H), 7,43-7,33 (m, 2H), 7,30-7,09 (m, 3H), 6,57 (d, $J=10,1$ Гц, 1H), 3,99 (quart, $J=7,1$ Гц, 2H), 1,39 (s, 6H), 1,08 (t, $J=7,1$ Гц, 3H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, DMSO-d_6) δ - 2,87. ЖХ/МС: t_R = 1,65 мин, МС m/z = 408,97 $[\text{M}+1]^+$; ЖХ-система: Thermo Accela 1250 для СВЭЖХ; МС-система: Thermo LCQ Fleet; колонка: Kinetex 2,6 мкм XB-C18 100Å, 50×3,00 мм; растворители: ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты, вода с 0,1% муравьиной кислоты; градиент: 0 мин - 2,4 мин 2-100% ACN, 2,4 мин - 2,80 мин 100% ACN, 2,8 мин - 2,85 мин 100% - 2% ACN, 2,85 мин - 3,0 мин 2% ACN при 1,8 мл/мин.

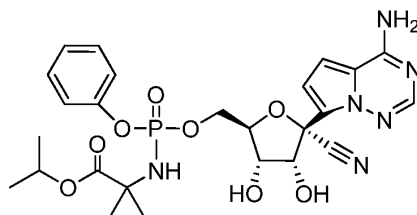
Получение этил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-2-метилпропаноата (соединение 30).



Соединение 1 (66 мг, 0,23 ммоль) вносили в NMP (2,0 мл). Смесь охлаждали до примерно 0°C и медленно добавляли $t\text{BuMgCl}$ (1,0 М в ТГФ, 0,34 мл, 0,34 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при примерно 0°C в течение примерно 30 мин, а затем добавляли раствор соединения N (139 мг, 0,34 ммоль) в ТГФ (1,0 мл). Холодную баню удаляли и помещали реакционную смесь в предварительно нагретую до примерно 50°C масляную баню. После примерно 2 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и гасили уксусной кислотой и метанолом. Неочищенное вещество концентрировали и очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ без модификатора с получением соединения 30. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,89 (m, 3H), 7,31 (quart, $J=8,1$ Гц, 2H), 7,22-7,05 (m, 3H), 6,87 (d, $J=4,5$, 1H), 6,80 (d, $J=4,5$ Гц, 1H), 6,27 (d, $J=11,7$, 1H), 5,81 (d, $J=9,7$, 1H), 5,35 (d, $J=5,6$ Гц, 1H), 4,64 (дт, $J=9,0$, 5,6 Гц, 1H), 4,24 (m, 2H), 4,11 (m, 1H), 4,04-3,90 (m, 3H), 1,39-1,23 (m, 6H), 1,10 (t, $J=7,1$, 3H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, DMSO-d_6) δ 2,45, 2,41. ЖХ/МС: t_R =1,03 мин, МС m/z =561,03 $[\text{M}+1]^+$; ЖХ-система: Thermo Accela 1250 для СВЭЖХ; МС-система: Thermo LCQ Fleet; колонка: Kinetex 2,6 мкм XB-C18 100Å, 50×3,00 мм; растворители: ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты, вода с 0,1% муравьиной кислоты; градиент: 0 мин - 2,4 мин 2-100% ACN, 2,4 мин - 2,80 мин 100% ACN, 2,8 мин - 2,85 мин 100% - 2%

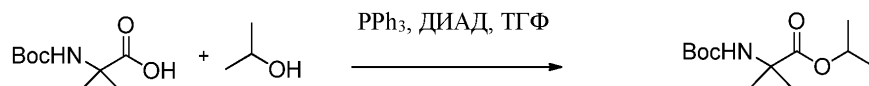
ACN, 2,85 мин - 3,0 мин 2% ACN при 1,8 мл/мин.

Пример 34. Изопропил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-2-метилпропаноат (31).



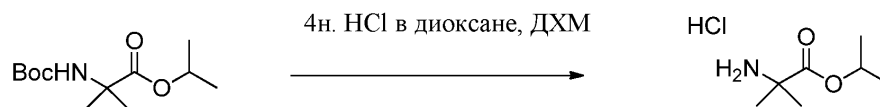
Получение изопропил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-2-метилпропаноата описано ниже.

Получение изопропил-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпропаноата.



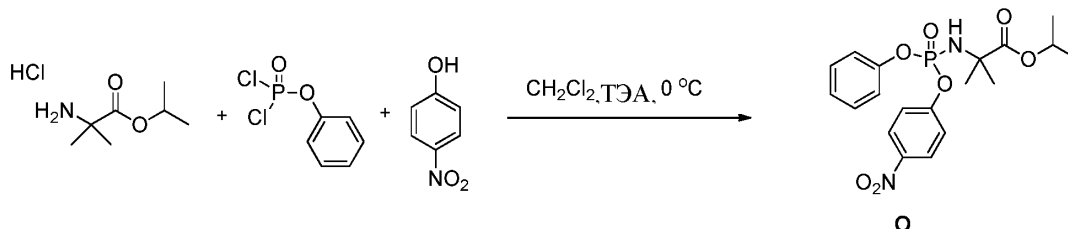
Трифенилфосфин (6,17 г, 25,00 ммоль) вносили в ТГФ (30 мл). Далее вносили ДИАД (4,92 мл, 25,00 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение примерно 10 мин. 2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпропановую кислоту (5,07 г, 25,00 ммоль) вносили в ТГФ (20 мл) и добавляли к реакционной смеси с последующим добавлением изопропанола (1,91 мл, 25,00 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение примерно 1 ч. Растворители удаляли при пониженном давлении и неочищенное вещество растворяли в смеси Et₂O:гексан 1:1 (120 мл). Твердый трифенилфосфиноксид отфильтровывали и растворитель удаляли при пониженном давлении. Полученное неочищенное вещество вносили в минимальное количество CH₂Cl₂ и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (0-50% EtOAc/Hex) с получением изопропил-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпропаноата. ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 5,03 (п, J=6,2 Гц, 1H), 1,48 (s, 6H), 1,40 (d, J=6,2 Гц, 9H), 1,24 (d, J=6,3 Гц, 6H).

Получение гидрохлорида изопропил-2-амино-2-метилпропаноата.



Изопропил-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпропаноат (4,09 г, 16,67 ммоль) вносили в CH₂Cl₂ (50 мл), медленно добавляли 4 н. HCl в диоксане (50 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре. Спустя примерно 1 ч путем ТСХ определяли, что реакция прошла полностью. Растворители удаляли при пониженном давлении и неочищенное вещество дважды выпаривали совместно с Et₂O, а затем помещали в глубокий вакуум с получением гидрохлорида изопропил-2-амино-2-метилпропаноата. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8,61 (s, 3H), 4,96 (п, J=6,2 Гц, 1H), 1,44 (s, 6H), 1,22 (d, J=6,2 Гц, 6H).

Получение изопропил-2-метил-2-(((4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата (соединение O).

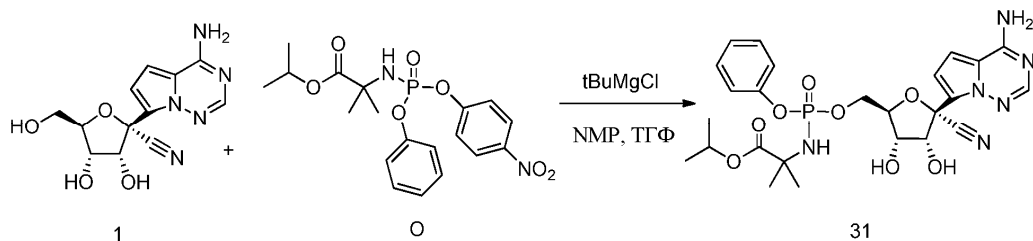


Фенилдихлорфосфат (0,83 мл, 5,58 ммоль) и гидрохлорид изопропил-2-амино-2-метилпропаноата (1,01 г, 5,58 ммоль) вносили в CH₂Cl₂ (50 мл). Реакционную смесь охлаждали до 0 °C и медленно добавляли ТЭА (1,61 мл, 11,45 ммоль). Холодную баню удаляли и позволяли реакционной смеси перемешиваться при комнатной температуре. После примерно 2 ч путем ³¹P ЯМР определяли, что добавление аминокислоты завершилось. Вносили п-нитрофенол (0,74 г, 5,30 ммоль) с последующим добавлением ТЭА (0,81, 5,84 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре. После примерно 2 ч путем ЖХ/МС определяли, что реакция прошла полностью. Реакционную смесь разбавляли Et₂O и отфильтровывали соли ТЭА·HCl.

Неочищенное вещество концентрировали и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (0-50% EtOAc/Hex) с получением соединения O. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8,42-8,19 (m, 2H), 7,55-7,43

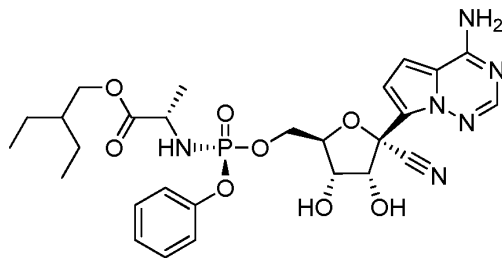
(m, 2H), 7,39 (dd, J=8,6, 7,2 Гц, 2H), 7,30-7,12 (m, 3H), 6,53 (d, J=10,1 Гц, 1H), 4,82 (гепт, J=6,3 Гц, 1H), 1,38 (s, 6H), 1,09 (d, J=6,3, 6H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, ДМСО- d_6) δ -2,84. ЖХ/МС: t_R =1,73 мин, МС m/z =422,92 [M+1]; ЖХ-система: Thermo Accela 1250 для СВЭЖХ; МС-система: Thermo LCQ Fleet; колонка: Kinetex 2,6 мкм ХВ-С18 100Å, 50×3,00 мм; растворители: ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты, вода с 0,1% муравьиной кислоты; градиент: 0 мин - 2,4 мин 2-100% АСН, 2,4 мин - 2,80 мин 100% АСН, 2,8 мин - 2,85 мин 100% - 2% АСН, 2,85 мин - 3,0 мин 2% АСН при 1,8 мл/мин.

Получение изопропил-2-((((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)-2-метилпропаноата (соединение 31).



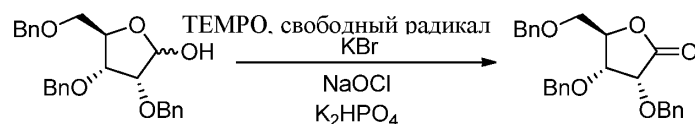
Соединение 1 (66 мг, 0,23 ммоль) вносили в NMP (2,0 мл). Охлаждали смесь до примерно 0°C и медленно добавляли $t\text{BuMgCl}$ (1,0 М в ТГФ, 0,57 мл, 0,57 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при примерно 0°C в течение примерно 30 мин, а затем добавляли раствор соединения О (143 мг, 0,34 ммоль) в ТГФ (1,0 мл). Холодную баню удаляли и помещали реакционную смесь в предварительно нагретую до примерно 50°C масляную баню. После примерно 2 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и гасили уксусной кислотой и метанолом. Неочищенное вещество концентрировали и очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ без модификатора с получением соединения 31. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,88 (m, 3H), 7,30 (td, J=8,5, 7,0 Гц, 2H), 7,20-7,04 (m, 3H), 6,87 (d, J=4,5, 1H), 6,80 (d, J=4,5 Гц, 1H), 6,27 (d, 6,1 Гц, 1H), 5,75 (t, J=9,1 Гц, 1H), 5,34 (d, J=5,7 Гц, 1H), 4,81 (п, J=6,3 Гц, 1H), 4,71-4,50 (m, 1H), 4,23 (m, 2H), 4,11 (m, 1H), 4,03-3,83 (m, 1H), 1,37-1,23 (m, 6H), 1,18-1,04 (m, 6H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, ДМСО) δ 2,47, 2,43. ЖХ/МС: t_R = 1,08 мин, МС m/z =575,06 [M+1]; ЖХ-система: Thermo Accela 1250 для СВЭЖХ; МС-система: Thermo LCQ Fleet; колонка: Kinetex 2,6 мкм ХВ-С18 100Å, 50×3,00 мм; растворители: ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты, вода с 0,1% муравьиной кислоты; градиент: 0 мин - 2,4 мин 2-100% АСН, 2,4 мин - 2,80 мин 100% АСН, 2,8 мин - 2,85 мин 100% - 2% АСН, 2,85 мин -3,0 мин 2% АСН при 1,8 мл/мин.

Пример 35. (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата (32).



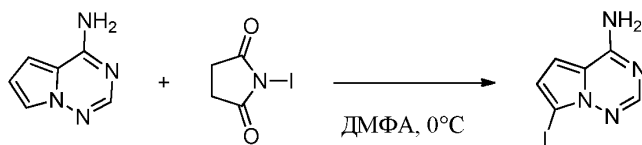
Получение (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата описано ниже.

Получение (3R,4R,5R)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)дигидрофуран-2(3H)-она.



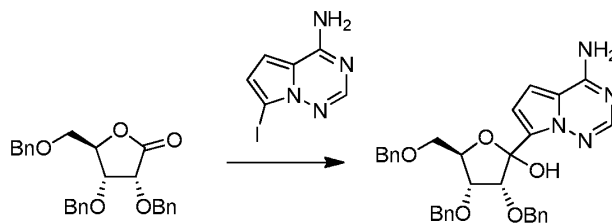
(3R,4R,5R)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-ол (15,0 г) объединяли с МТБЭ (60,0 мл), KBr (424,5 мг), водным раствором K_2HPO_4 (2,5 М, 14,3 мл) и TEMPO (56 мг). Указанную смесь охлаждали до примерно 1°C. Порциями медленно вносили водный раствор гипохлорита натрия (7,9 мас.%) до полного расхода исходного материала, отмеченного с помощью теста с применением крахмала/иодида. Слои разделяли и водный слой подвергали экстракции МТБЭ. Объединенную органическую фазу сушили над MgSO_4 и концентрировали при пониженном давлении с получением указанного продукта в виде твердого вещества.

Получение (4-амино-7-иодпирроло[2,1-f][1,2,4]триазина).



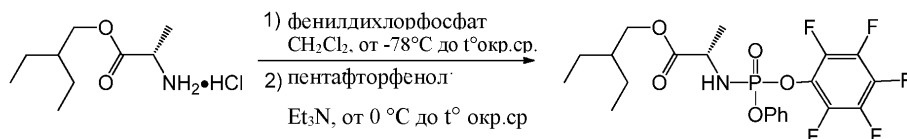
К холодному раствору 4-аминопирроло[2,1-*f*][1,2,4]-триазина (10,03 г; 74,8 ммоль) в *N,N*-диметилформамиде (70,27 г) порциями вносили *N*-иодсукцинимид (17,01 г; 75,6 ммоль) при поддержании температуры содержимого на уровне примерно 0°C. После завершения реакции (спустя примерно 3 ч при примерно 0°C) реакционную смесь переносили в 1 М водный раствор гидроксида натрия (11 г NaOH и 276 мл воды) при поддержании температуры содержимого на уровне примерно 20-30°C. Полученную суспензию встряхивали при примерно 22°C в течение 1,5 ч, а затем фильтровали. Твердые вещества промывали водой (50 мл) и сушили при примерно 50°C под вакуумом с получением 4-амино-7-иодпирроло[2,1-*f*][1,2,4]триазина в виде твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 7,90 (s, 1H), 7,78 (шир. с, 2H), 6,98 (d, *J*=4,4 Гц, 1H), 6,82 (d, *J*=4,4 Гц, 1H). ¹³C ЯМР (101 МГц, DMSO-*d*₆) δ 155,7, 149,1, 118,8, 118,1, 104,4, 71,9. MS *m/z*=260,97 [M+H].

Получение (3*R*,4*R*,5*R*)-2-(4-аминопирроло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис(бензилокси)-5-((бензилокси)метил)тетрагидрофуран-2-ола с применением (4-амино-7-иодпирроло[2,1-*f*][1,2,4]триазина).



В реактор в атмосфере азота вносили иодзамещенное основание (iodobase) 2 (81 г) и ТГФ (1,6 л). Полученный раствор охлаждали до примерно 5°C и вносили TMSCl (68 г). Затем медленно вносили PhMgCl (345 мл, 1,8 М в ТГФ) при поддержании внутренней температуры примерно ≤5°C. Реакционную смесь перемешивали при примерно 0°C в течение 30 мин, а затем охлаждали до примерно -15°C. Медленно вносили *i*PrMgCl-LiCl (311 мл, 1,1 М в ТГФ) при поддержании внутренней температуры ниже примерно -12°C. После примерно 10 мин перемешивания при примерно -15°C реакционную смесь охлаждали до примерно -20°C и вносили раствор лактона 1 (130 г) в ТГФ (400 мл). Затем реакционную смесь встряхивали при примерно -20°C в течение примерно 1 ч и гасили AcOH (57 мл). Реакционную смесь нагревали до примерно 0°C и pH доводили до 7-8 с помощью водного раствора NaHCO₃ (5 мас.%, 1300 мл). Затем реакционную смесь разбавляли EtOAc (1300 мл) и разделяли органический и водный слои. Органический слой промывали 1 н. HCl (1300 мл), водным раствором NaHCO₃ (5 мас.%, 1300 мл) и соевым раствором (1300 мл), а затем сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали до сухого состояния. Очистка путем колоночной хроматографии на силикагеле с применением градиента смеси MeOH и EtOAc приводила к получению указанного продукта.

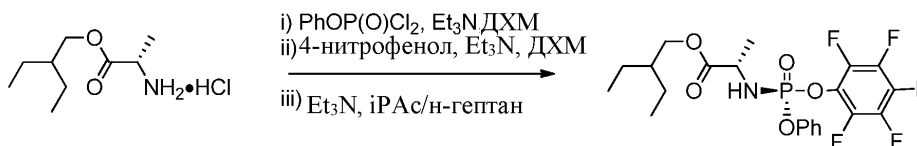
Получение ((2*S*)-2-этилбутил-2-(((перфторфенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата) (смесь *Sp* и *Rp*).



Гидрохлорид 2-этилбутилового эфира L-аланина (5,0 г, 23,84 ммоль) объединяли с метиленхлоридом (40 мл), охлаждали до примерно -78°C и добавляли фенилдихлорфосфат (3,65 мл, 23,84 ммоль). Добавляли триэтиламин (6,6 мл, 47,68 ммоль) в течение примерно 60 мин при примерно -78°C и полученную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до примерно 0°C и добавляли пентафторфенол (4,4 г, 23,84 ммоль). Добавляли триэтиламин (3,3 мл, 23,84 ммоль) в течение примерно 60 мин. Полученную смесь перемешивали в течение примерно 3 ч при температуре окружающей среды и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в EtOAc, несколько раз промывали водным раствором карбоната натрия и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с применением градиента EtOAc и гексана (от 0 до 30%). Фракции, содержавшие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением (2*S*)-2-этилбутил-2-(((перфторфенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата в виде твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-*d*) δ 7,41-7,32 (m, 4H), 7,30-7,17 (m, 6H), 4,24-4,16 (m, 1H), 4,13-4,03 (m, 4H), 4,01-3,89 (m, 1H), 1,59-1,42 (m, 8H), 1,40-1,31 (m, 8H), 0,88 (t,

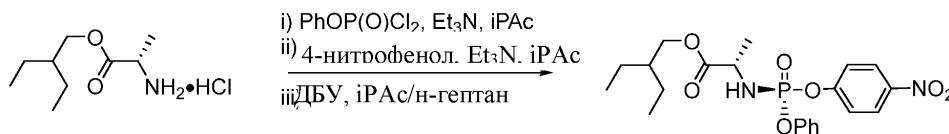
$J=7,5$ Гц, 12Н). ^{31}P ЯМР (162 МГц, хлороформ- d) δ -1,52. ^{19}F ЯМР (377 МГц, хлороформ- d) δ -153,63, -153,93 (м), -160,05 (td, $J=21,9$, 3,6 Гц), -162,65 (qd, $J=22,4$, 20,5, 4,5 Гц). МС $m/z=496$ $[\text{M}+\text{H}]$.

Получение ((2S)-2-этилбутил-2-(((перфторфенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата).



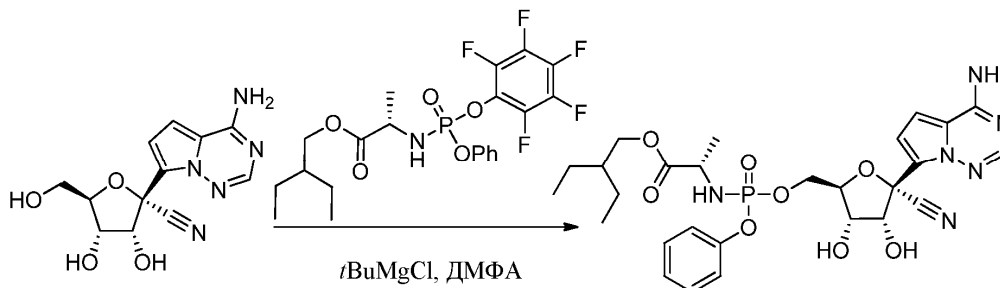
Гидрохлорид 2-этилбутилового эфира L-аланина (40,10 г, 0,191 ммоль) растворяли в дихлорметане (533 г) и раствор охлаждали при перемешивании до примерно -15°C в атмосфере N_2 (г). Добавляли фенилдихлорфосфат (40,32 г, 0,191 моль) с последующим медленным добавлением триэтиламина (41,58 г, 0,411 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при примерно -15°C в течение примерно 1,5 ч. Добавляли пентафторфенол (35,14 г, 0,191 моль), а затем триэтиламин (19,23 г, 0,190 моль) и реакционную смесь перемешивали в течение примерно 2 ч. Реакционную смесь нагревали до примерно 0°C и добавляли 0,5 М HCl (279,19 г). Смесь нагревали до примерно 22°C и органический слой отделяли и промывали 5% водным раствором KHCO_3 (281 г), а затем водой (281 г). Аликвоту органического слоя (453,10 г из 604,30 г раствора) концентрировали до объема, составлявшего примерно 120 мл, добавляли изопропилацетат (157 г) и раствор концентрировали до сухого состояния. Остаток растворяли в изопропилацетате (158 г). Полученный раствор концентрировали до объема, составлявшего примерно 120 мл, и температуру доводили до примерно 45°C . Добавляли н-гептан (165 г) и смесь охлаждали до 22°C в течение примерно 1 ч. Добавляли н-гептан (167 г) и смесь охлаждали до примерно 0°C . Добавляли триэтиламин (2,90 г, 0,0287 моль) и полученную смесь перемешивали при 0°C в течение примерно 17 ч. Смесь фильтровали, твердые вещества промывали н-гептаном (145 г) и твердые вещества сушили под вакуумом при примерно 40°C в течение примерно 15 ч с получением 2-этилбутил-((S)-(пентафторфенокси)(фенокси)фосфорил)-L-аланината.

Получение 2-этилбутил-((S)-(4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)-L-аланината.



Суспензию гидрохлорида 2-этилбутилового эфира L-аланина (20,08 г, 95,8 ммоль) и изопропилацетата (174 г) охлаждали при перемешивании до примерно -20°C . Добавляли фенилдихлорфосфат (20,37 г, 96,5 ммоль) с последующим медленным добавлением триэтиламина (20,97 г, 207,2 ммоль) и полученную смесь перемешивали при примерно -20°C в течение примерно 1 ч. Добавляли 4-нитрофенол (13,23 г, 95,1 ммоль) с последующим медленным добавлением триэтиламина (10,01 г, 98,8 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение примерно 1,5 ч. Реакционную смесь нагревали до примерно 0°C и добавляли 0,5 М HCl (140 г). Органический слой отделяли и промывали 5% Na_2CO_3 (2×100 г) и 10% NaCl (2×100 г). Затем органический слой концентрировали до объема, составлявшего примерно 80 мл, и добавляли изопропилацетат (4 г), а затем н-гептан (110 г). Добавляли затравочные кристаллы продукта (0,100 г), а затем вторую порцию н-гептана (110 г) и смесь охлаждали до примерно 0°C . Добавляли 1,8-дизабициклоундец-7-ен (1,49 г, 9,79 ммоль) и полученную смесь перемешивали при примерно 0°C в течение примерно 21 ч. Полученные твердые вещества фильтровали и промывали сначала н-гептаном (61 г), а затем H_2O (2×100 г). Твердые вещества перемешивали с H_2O (200 г) в течение примерно 1,5 ч, фильтровали и промывали H_2O (3×100 г), а затем н-гептаном (61 г). Полученные твердые вещества сушили под вакуумом при примерно 40°C в течение примерно 19 ч с получением 2-этилбутил-((S)-(4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)-L-аланината.

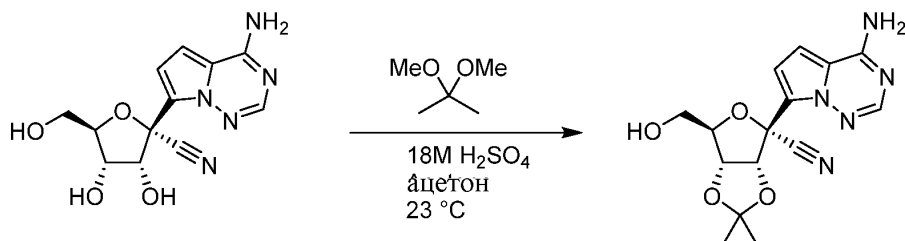
Получение соединения, указанного в заголовке (смесь Sp и Rp).



Нуклеозид (29 мг, 0,1 ммоль), фосфонамид (60 мг, 0,12 ммоль) и N,N -диметилформамид (2 мл) объ-

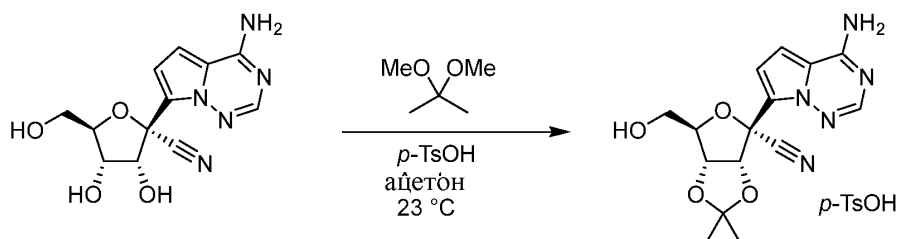
единяли при температуре окружающей среды. Медленно добавляли трет-бутилмагнийхлорид (1М в ТГФ, 0,15 мл). Спустя примерно 1 ч реакцию смесь разбавляли этилацетатом, промывали водным раствором лимонной кислоты (5 мас.%), насыщенным водным раствором NaHCO_3 и насыщенным соевым раствором. Органическую фазу сушили над Na_2SO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с применением градиента метанола и CH_2Cl_2 (от 0 до 5%). Фракции, содержавшие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением указанного продукта.

Получение (3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-6-(гидроксиметил)-2,2-диметилтетрагидрофурано[3,4-d][1,3]диоксол-4-карбонитрила.



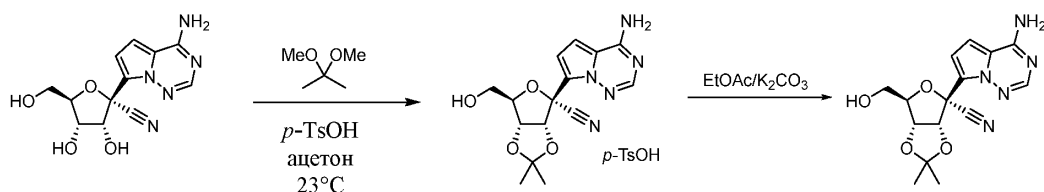
К смеси (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила (5,8 г, 0,02 моль), 2,2-диметоксипропана (11,59 мл, 0,09 моль) и ацетона (145 мл) при температуре окружающей среды добавляли серную кислоту (18 М, 1,44 мл). Смесь нагревали до примерно 45°C. Спустя примерно 30 мин смесь охлаждали до температуры окружающей среды и добавляли бикарбонат натрия (5,8 г) и воду (5,8 мл). Через 15 мин смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток вносили в этилацетат (150 мл) и воду (50 мл). Водный слой подвергали экстракции этилацетатом (2×50 мл). Объединенную органическую фазу сушили над сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила. ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 7,84 (s, 1H), 6,93 (d, J=4,6 Гц, 1H), 6,89 (d, J=4,6 Гц, 1H), 5,40 (d, J=6,7 Гц, 1H), 5,00 (dd, J=6,7, 3,3 Гц, 1H), 4,48-4,40 (m, 1H), 3,81-3,72 (m, 2H), 1,71 (s, 3H), 1,40 (s, 3H). МС $m/z=332,23$ [M+1].

Получение TsOH соли (3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-6-(гидроксиметил)-2,2-диметилтетрагидрофурано[3,4-d][1,3]диоксол-4-карбонитрила.



К смеси (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила (5,0 г, 17,2 ммоль, 1,0 экв.), 2,2-диметоксипропана (10,5 мл, 86 ммоль, 5,0 экв.) и ацетона (25 мл) при температуре окружающей среды добавляли п-толилсульфоновую кислоту (3,59 г, 1,1 экв.). Полученную смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Спустя примерно 30 мин добавляли изопропилацетат (25 мл) в течение примерно одного часа. Полученную суспензию фильтровали и промывали смесью гептан:изопропилацетат 2:1 (25 мл). Продукт сушили под вакуумом при примерно 40°C.

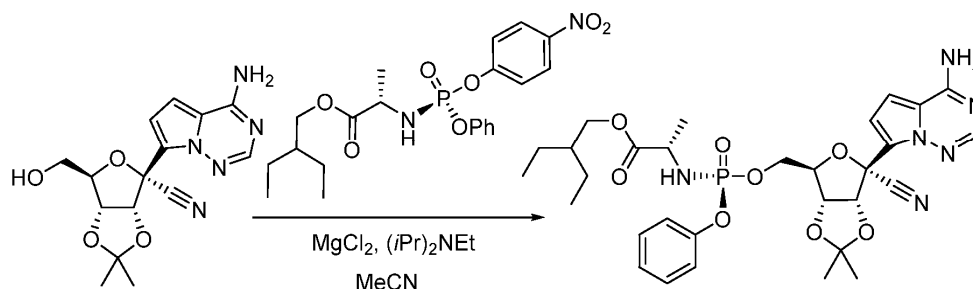
Получение (3aR,4R,6R,6aR)-4-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-6-(гидроксиметил)-2,2-диметилтетрагидрофурано[3,4-d][1,3]диоксол-4-карбонитрила.



К смеси (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила (5 г, 17,2 ммоль, 1,0 экв.), 2,2-диметоксипропана (10,5 мл, 86 ммоль, 5,0 экв.) и ацетона (25 мл) при температуре окружающей среды добавляли п-толилсульфоновую кислоту (3,59 г, 1,1 экв.). Полученную смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Спустя 30 мин добавляли изопропилацетат (25 мл) в течение 1 ч. Полученную суспензию фильтровали и промывали

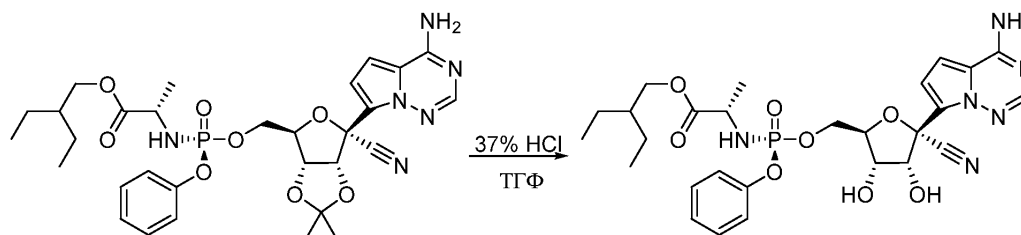
смесью гептан:изопропилацетат 2:1 (25 мл). Продукт сушили под вакуумом при 40°C. Выделенное твердое вещество добавляли в реактор и добавляли 5% раствор K_2CO_3 (50 мл) и этилацетат (50 мл). Слои разделяли и водный слой промывали этилацетатом (25 мл). Объединенные органические слои промывали водой (25 мл), а затем концентрировали до примерно 25 мл. Реактор заполняли изопропилацетатом (25 мл) и концентрировали до примерно 25 мл. Реактор снова заполняли изопропилацетатом (25 мл) и концентрировали до 25 мл. В полученный раствор вносили затравку с получением густой суспензии. К указанной суспензии добавляли гептан (25 мл) в течение 1 ч. Полученную суспензию фильтровали и промывали смесью гептан:изопропилацетат 2:1 (25 мл). Продукт сушили под вакуумом при 40°C. 1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 7,84 (s, 1H), 6,93 (d, $J=4,6$ Гц, 1H), 6,89 (d, $J=4,6$ Гц, 1H), 5,40 (d, $J=6,7$ Гц, 1H), 5,00 (dd, $J=6,7, 3,3$ Гц, 1H), 4,48-4,40 (m, 1H), 3,81-3,72 (m, 2H), 1,71 (s, 3H), 1,40 (s, 3H). МС $m/z = 332,23 [M+1]$.

Получение (2S)-2-этилбутил-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата.



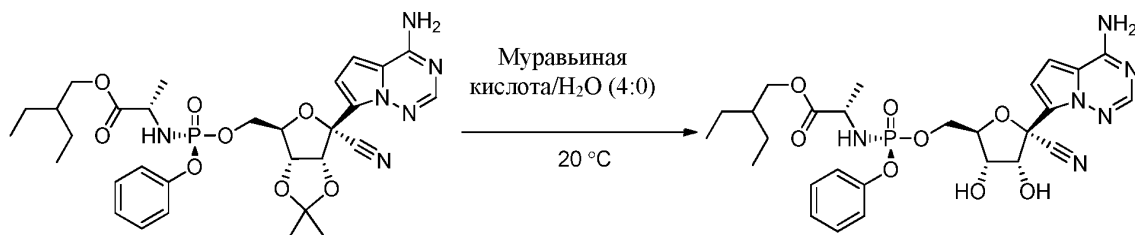
Ацетонитрил (100 мл) объединяли с (2S)-2-этилбутил-2-((((4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноатом (9,6 г, 21,31 ммоль), спиртом в качестве субстрата (6,6 г, 0,02 моль), хлоридом магния (1,9 г, 19,91 ммоль) при температуре окружающей среды. Смесь встряхивали в течение примерно 15 мин и добавляли N,N-диизопропилэтиламин (8,67 мл, 49,78 ммоль). Спустя примерно 4 ч реакционную смесь разбавляли этилацетатом (100 мл), охлаждали до примерно 0°C и объединяли с водным раствором лимонной кислоты (5 мас.%, 100 мл). Органическую фазу промывали водным раствором лимонной кислоты (5 мас.%, 100 мл) и насыщенным водным раствором хлорида аммония (40 мл), водным раствором карбоната калия (10 мас.%, 2×100 мл) и насыщенным водным солевым раствором (100 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. 1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ 7,86 (s, 1H), 7,31-7,22 (m, 2H), 7,17-7,09 (m, 3H), 6,93-6,84 (m, 2H), 5,34 (d, $J=6,7$ Гц, 1H), 4,98 (dd, $J=6,6, 3,5$ Гц, 1H), 4,59-4,50 (m, 1H), 4,36-4,22 (m, 2H), 4,02 (dd, $J=10,9, 5,7$ Гц, 1H), 3,91 (dd, $J=10,9, 5,7$ Гц, 1H), 3,83 (дк, $J=9,7, 7,1$ Гц, 1H), 1,70 (s, 3H), 1,50-1,41 (m, 1H), 1,39 (s, 3H), 1,36-1,21 (m, 7H), 0,86 (t, $J=7,4$ Гц, 6H). МС $m/z=643,21 [M+1]$.

Получение (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата (соединение 32).



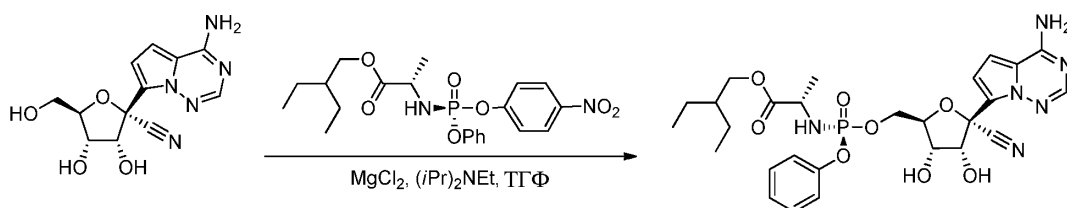
Неочищенный ацетонид (12,85 г) объединяли с тетрагидрофураном (50 мл) и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в тетрагидрофуране (100 мл), охлаждали до примерно 0°C и медленно добавляли концентрированную HCl (20 мл). Смеси давали возможность нагреться до температуры окружающей среды. После расхода исходного ацетонида, определенного путем ВЭЖХ-анализа, добавляли воду (100 мл), а затем насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (200 мл). Смесь подвергали экстракции этилацетатом (100 мл), органическую фазу промывали насыщенным водным солевым раствором (50 мл), сушили над сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с применением градиента метанола и этилацетата (от 0 до 20%). Фракции, содержавшие продукт, концентрировали при пониженном давлении с получением указанного продукта.

Получение (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата (соединение 32).

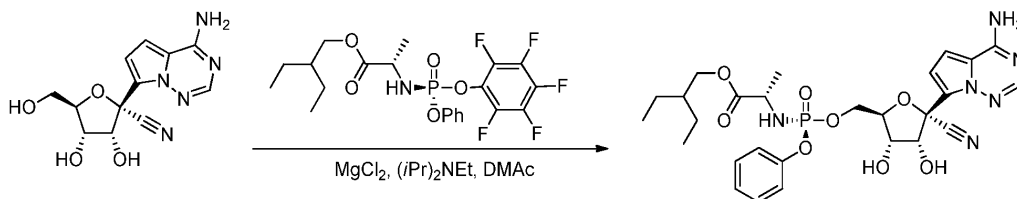


Во флакон, содержащий (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-6-циано-2,2-диметилтетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксифосфорил)амино)пропаноат (30 мг, 0,05 ммоль), добавляли 80% водный раствор муравьиной кислоты (1,5 мл). После 18 ч при примерно 20°C с помощью ВЭЖХ и ЖХ/МС было подтверждено полное превращение. МС (m/z)=603 ($M+1$)⁺.

Получение (S)-2-этилбутил-2-(((S)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксифосфорил)амино)пропаноата (соединение 32) с применением прямого сочетания.

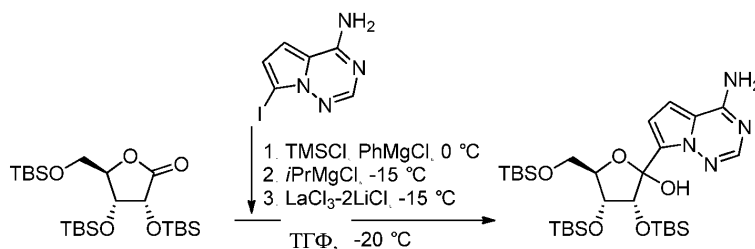


В смесь (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила (0,5 г, 2 ммоль), (S)-2-этилбутил-2-(((S)-((4-нитрофеноксифосфорил)амино)пропаноата (0,9 г, 2 ммоль) и $MgCl_2$ (0,2 г, 2 ммоль) вносили N,N-диметилацетамид (10 мл). Полученную смесь нагревали до примерно 30°C при постоянном перемешивании. Затем медленно добавляли N,N-диизопропилэтиламин (0,7 мл, 4 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение примерно 6 ч. Вносили воду (H_2O) (10 мл), а затем 2-МеТНФ (10 мл) и разделяли органическую и водную фазы. Затем водный слой подвергали обратной экстракции 2-МеТНФ (10 мл). Органический слой объединяли и промывали 10 мас.% раствором лимонной кислоты (10 мл), а затем 10 мас.% раствором K_2CO_3 (10 мл) и H_2O (10 мл). Перед разделением слоев добавляли небольшое количество солевого раствора для растворения эмульсий в промывочной воде. Органический слой выпаривали до сухого состояния с получением 0,65 г пены. Затем добавляли $iPrOAc$ (2,6 мл) и смесь нагревали до примерно 40°C для обеспечения растворения. Раствор охлаждали до примерно 20°C и полученную смесь перемешивали в течение примерно 3 дней. Твердые вещества выделяли путем фильтрования и отфильтрованный осадок промывали небольшим количеством $iPrOAc$. Твердые вещества сушили с получением (S)-2-этилбутил-2-(((S)-((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(феноксифосфорил)амино)пропаноата.



В смесь (2R,3R,4S,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила (0,2 г, 0,7 ммоль), (S)-2-этилбутил-2-(((S)-((перфторфеноксифосфорил)амино)пропаноата (0,3 г, 0,7 ммоль) и $MgCl_2$ (0,1 г, 1 ммоль) вносили N,N-диметилацетамид (4 мл). Полученную смесь нагревали до примерно 30°C при постоянном перемешивании. Затем медленно добавляли N,N-диизопропилэтиламин (0,3 мл, 2 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 5 ч. Превращение в продукт было подтверждено с помощью СВЭЖХ-анализа.

Получение (3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидрофуран-2-ола.

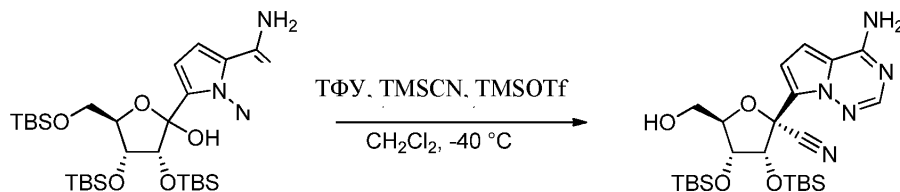


Получали раствор 7-иодпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-4-амина (13,9 г, 53,5 ммоль) в ТГФ (280 мл). Раствор охлаждали до примерно 0°C и добавляли TMSCl (13,6 мл, 107 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение примерно 20 мин, а затем добавляли PhMgCl (2М в ТГФ; 53,5 мл, 56,8 ммоль) при поддержании внутренней температуры ниже примерно 5°C. Реакционную смесь встряхивали при примерно 0°C в течение примерно 30 мин, а затем охлаждали до примерно -20°C. Затем добавляли iPrMgCl-LiCl (1,3 М в ТГФ, 43,1 мл, 56 ммоль) при поддержании внутренней температуры ниже примерно -15°C. Реакционную смесь встряхивали в течение примерно 30 мин при примерно -20°C.

В отдельной колбе получали раствор (3R,4R,5R)-3,4-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)дигидрофуран-2(3H)-она (25,0 г, 50,9 ммоль, 0,83 экв.) в LaCl₃·2LiCl (0,6 М в ТГФ, 85 мл, 50,9 ммоль). Затем указанный раствор переносили в раствор, содержащий реактив Гриньяра, при поддержании внутренней температуры ниже -20°C. Полученную реакционную смесь встряхивали при примерно -20°C в течение примерно 4 ч.

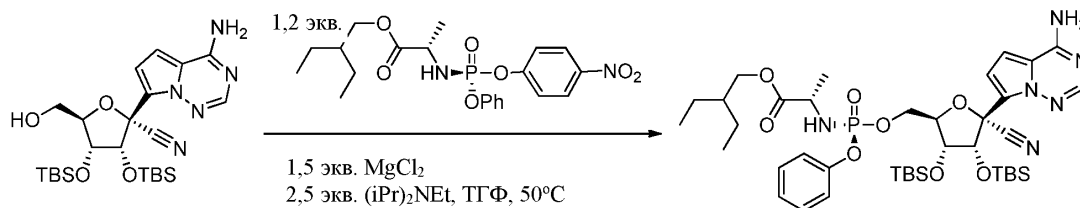
Реакцию гасили 1 М HCl (140 мл) и смесь нагревали до температуры окружающей среды. Добавляли EtOAc (140 мл) и разделяли органическую и водную фазы. Водный слой подвергали экстракции посредством EtOAc (200 мл). Объединенные EtOAc слои подвергали экстракции последовательно насыщенным водным раствором NaHCO₃ (2×200 мл), водой (200 мл) и соевым раствором (200 мл). Органический слой концентрировали, а затем очищали с помощью хроматографии на силикагеле (30% EtOAc/гексан) с получением (3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидрофуран-2-ола. ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 8,15-7,88 (m, 1H), 7,51 (d, J=4,8 Гц, 0,5H), 7,02-6,92 (m, 0,5H), 6,65-6,57 (m, 1H), 5,66-5,24 (m, 3H), 4,49-3,50 (m, 4H), 0,97-0,78 (26H), 0,65 (s, 1,5H), 0,19-0,00 (m, 15,5H), -0,22 (s, 1H), -0,55 (s, 1H). MS m/z=626 (M+H).

Получение (2R,3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила.

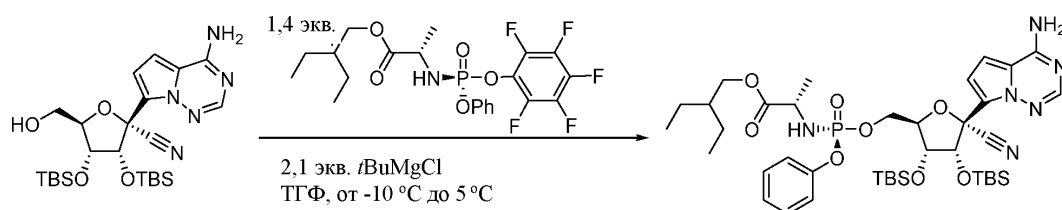


Раствор (3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидрофуран-2-ола (1,50 г, 2,40 ммоль) в CH₂Cl₂ (15 мл) охлаждали до примерно -40°C. Добавляли трифторуксусную кислоту (0,555 мл, 7,20 ммоль) при поддержании температуры ниже -20°C. В отдельной колбе триметилсилилтрифторметансульфонат (2,60 мл, 14,4 ммоль) добавляли к 5 мл CH₂Cl₂ (5 мл) при примерно 15°C с последующим добавлением триметилсилилцианида (1,92 мл, 14,4 ммоль) и раствор охлаждали до примерно -30°C. Охлажденный раствор добавляли к раствору (3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)тетрагидрофуран-2-ола при поддержании температуры ниже -25°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 15 мин при примерно -30°C. Реакцию гасили триэтиламино (3,34 мл, 24,0 ммоль) и смесь нагревали до примерно 0°C. Добавляли воду (50 мл) при поддержании температуры ниже примерно 20°C. Когда добавление было завершено, смесь перемешивали в течение 15 мин при комнатной температуре. Слои разделяли и органический слой промывали последовательно KOH (20 мл), водой (20 мл) и соевым раствором (20 мл). Органический слой сушили над Na₂SO₄, концентрировали, а затем очищали с помощью хроматографии на силикагеле (30% EtOAc/гексан) с получением указанного продукта в виде смеси диастереомеров в соотношении 3,8:1. Смесь дополнительно очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (от 0 до 95% ACN в воде) с получением указанного продукта в виде отдельного диастереомера. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8,14-7,92 (m, 2H), 7,89 (s, 1H), 6,95 (d, J=4,8 Гц, 1H), 6,88 (d, J=4,4 Гц, 1H), 5,27 (d, J=4,6 Гц, 1H), 5,10 (dd, J=7,7, 4,6 Гц, 1H), 4,31 (dd, J=4,7, 1,4 Гц, 1H), 4,12 (ddd, J=5,9, 4,1, 1,4 Гц, 1H), 3,80-3,69 (m, 1H), 3,56 (td, J=7,8, 3,9 Гц, 1H), 0,93 (s, 9H), 0,75 (s, 9H), 0,11 (s, 3H), 0,09 (s, 3H), -0,15 (s, 3H), -0,62 (s, 3H). MS m/z=520 (M+H).

Получение (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-цианотетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата.

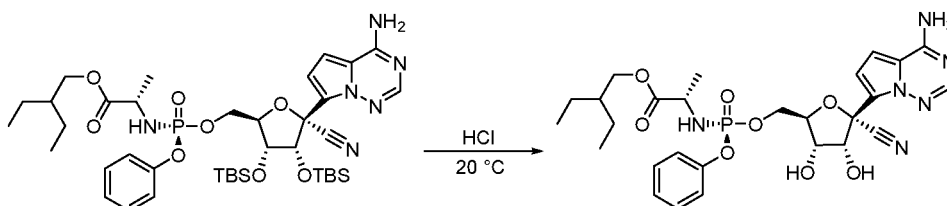


В смесь (2R,3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила (16 мг, 0,03 ммоль), (S)-2-этилбутил-2-(((S)-4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата (17 мг, 0,04 ммоль) и MgCl_2 (4 мг, 0,05 ммоль) вносили ТГФ (0,3 мл). Полученную смесь нагревали до примерно 50°C при постоянном перемешивании. Затем добавляли N,N-диизопропилэтиламин (0,013 мл, 0,08 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 21 ч. Превращение в продукт было подтверждено с помощью СВЭЖХ и ЖХ/МС-анализа. МС $m/z=831$ (M+H).

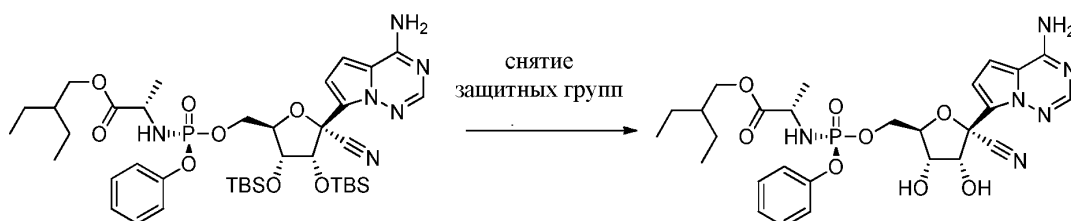


Раствор (2R,3R,4R,5R)-2-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-карбонитрила (16 мг, 0,03 ммоль) в ТГФ (0,3 мл) охлаждали до -10°C. По каплям добавляли $t\text{BuMgCl}$ (0,07 мл, 0,07 ммоль), а затем раствор (S)-2-этилбутил-2-(((S)-4-перфторфенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата (22 мг, 0,04 ммоль) в ТГФ (0,15 мл). Реакционную смесь нагревали до 5°C и перемешивали в течение 16 ч. Реакцию гасили MeOH, концентрировали, а затем очищали с помощью хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан) с получением указанного продукта. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,97 (s, 1H), 7,38-7,29 (m, 2H), 7,25-7,21 (m, 2H), 7,21-7,13 (m, 1H), 7,11 (d, $J=4,6$ Гц, 1H), 6,65 (d, $J=4,6$ Гц, 1H), 5,88 (шир. с, 2H), 5,35 (d, $J=4,4$ Гц, 1H), 4,49-4,41 (m, 1H), 4,41-4,35 (m, 1H), 4,32-4,26 (m, 1H), 4,24 (dd, $J=4,5, 1,7$ Гц, 1H), 4,10-3,99 (m, 2H), 3,96 (dd, $J=10,9, 5,7$ Гц, 1H), 3,80-3,72 (m, 1H), 1,48 (г, $J=6,2$ Гц, 1H), 1,39-1,28 (m, 7H), 0,96 (s, 9H), 0,85 (t, $J=7,5$ Гц, 6H), 0,80 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H), -0,13 (s, 3H), -0,56 (s, 3H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, CDCl_3) δ 2,74 (с). МС $m/z=831$ (M+H).

Получение (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата.



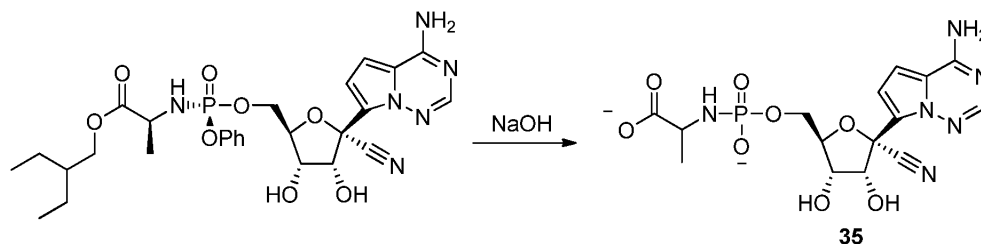
Неочищенный раствор (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-цианотетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата охлаждали до примерно 0°C и медленно добавляли концентрированную HCl (0,05 мл, 0,62 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение примерно 72 ч при примерно 20°C. Превращение в продукт было подтверждено с помощью СВЭЖХ и ЖХ/МС-анализа. МС $m/z=603$ (M+H).



Раствор (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-бис((трет-бутилдиметилсилил)окси)-5-цианотетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата во фториде или кислоте может обеспечивать снятие защитных групп с получением раствора (S)-2-этилбутил-2-(((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата.

Типичные фториды включают, но не ограничиваются ими, ТБАФ, KF, пиридиний гидрофторид, триэтиламмоний гидрофторид, фторид водорода, хлористоводородную кислоту, толуолсульфоновую кислоту или любой другой подходящий источник фторида. Типичные кислоты включают, но не ограничиваются ими, кислоты, указанные в Greene, T.W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups In Organic Synthesis*, 4th Ed., John Wiley & Sons: New York, 2006.

Пример 35-а. (((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)оксидофосфорил)аланинат (соединение 35).



2-этилбутил-((S)-(((2R,3S,4R,5R)-5-(4-аминопирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил)-5-циано-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)(фенокси)фосфорил)-L-аланинат (130 мг, 0,216 ммоль) растворяли в смеси ацетонитрила (6 мл) и воды (2 мл). По каплям добавляли водный раствор гидроксида натрия (2 н., 0,5 мл) в течение 5 мин при комнатной температуре и реакционную смесь перемешивали. Спустя 2 ч полученную смесь концентрировали при пониженном давлении и остаток очищали с помощью ВЭЖХ на колонке C18 при элюировании водой с получением желаемого продукта в виде бис-натриевой соли. ¹H ЯМР (400 МГц, D₂O) δ 7,79 (s, 1H), 6,86 (d, J=4,7 Гц, 1H), 6,80 (d, J=4,7 Гц, 1H), 4,86 (d, J=5,4 Гц, 1H), 4,40-4,34 (m, 1H), 4,30 (dd, J=5,3, 3,0 Гц, 1H), 3,75 (кдд, J=11,6, 4,5, 3,1 Гц, 2H), 3,20 (дк, J=8,6, 7,1 Гц, 1H), 0,86 (d, J=7,0 Гц, 3H). ³¹P ЯМР (162 МГц, D₂O) δ 7,30. ЖХ/МС m/z 442,95 [M+H]. ВЭЖХ (градиент 2-98% MeCN-H₂O с 0,1% ТФУ в качестве модификатора в течение 8,5 мин, 1,5 мл/мин, колонка: Phenomenex Kinetex C18, 2,6 мкм 100 Å, 4,6×100 мм) t_R=2,694 мин.

А. Противовирусная активность.

Другой аспект изобретения относится к способам ингибирования вирусных инфекций, включающим стадию обработки образца или субъекта, для которого предполагается необходимость такого ингибирования композицией согласно настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения образцы, предположительно содержащие вирус, включают природные или искусственные материалы, такие как живые организмы; ткани или клеточные культуры; биологические образцы, такие как образцы биологического материала (крови, сыворотки, мочи, спинномозговой жидкости, слез, мокроты, слюны, образцы тканей и тому подобное); лабораторные образцы; образцы пищи, воды или воздуха; образцы биопродуктов, такие как экстракты клеток, в частности рекомбинантных клеток, синтезирующих желаемый гликопротеин; и тому подобное. Обычно для образца предполагается наличие организма, который индуцирует вирусную инфекцию, часто патогенного организма, такого как опухолевый вирус. Образцы могут содержаться в любой среде, включая воду и смеси органических растворителей и воды. Образцы включают живые организмы, такие как люди, и искусственные материалы, такие как клеточные культуры.

При желании, противовирусную активность соединения согласно настоящему изобретению после применения композиции можно наблюдать любым способом, включая прямые и косвенные способы обнаружения такой активности. В настоящее изобретение включены количественные, качественные и полуколичественные методы определения такой активности. Обычно применяют один из методов скрининга, описанных выше, однако любой другой метод, такой как наблюдение за физиологическими свойствами живого организма, также применим.

Противовирусную активность соединения согласно настоящему изобретению можно измерить, используя стандартные протоколы скрининга, которые известны. Например, противовирусную активность соединения можно измерить с использованием следующих общих протоколов.

Вирус	Линия клеток	Формат планшета	Число клеток	Множественность заражения (БОЕ на клетку)	Инкубирование (сутки)	Определение	Значения
EBOV (Заир)	Hela	384	4000	0.5	2	HCS	EC50
EBOV (Заир)	HFF-1			2		HCS	
EBOV-GFP	Huh-7	96	10000	0.1	4	GFP	
EBOV-GFP	HMVEC-TERT					GFP	
EBOV-LUC	Huh-7					LUC	
MARV-GFP	Huh-7					GFP	
NiV	Hela					CPE	
NiV-GFP	HMVEC-TERT					GFP	
NiV-LUC	HMVEC-TERT					LUC	

EBOV: Вирус Эбола, вид Заир
EBOV-GFP: Репортерный вирус Эбола, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок
EBOV-LUC: Репортерный вирус Эбола, экспрессирующий люциферазу
MARV-GFP: Вирус Марбург, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок
NiV: Вирус Нипах
NiV-GFP: Репортерный вирус Нипах, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок
NiV-LUC: Репортерный вирус Нипах, экспрессирующий люциферазу

HCS: Одновременная многопараметрическая визуализация (иммуноокрашивание GP-белка вируса Эбола)
GFP: Зеленый флуоресцентный белок
LUC: Люцифераза
CPE: Цитопатические эффекты, определяемые с помощью реагента CellTiter-Glo (CTG)

Hela: Эпителиальная клетка Hela (карциномы шейки матки)
HFF-1: Фибробласт крайней плоти человека
Huh-7: Гепатоцит
HMVEC-TERT: Клетки эндотелия сосудов человека, иммортализованные теломеразным каталитическим белком

Пример 36. Анализ противовирусной активности в отношении вируса Эбола и анализ цитотоксичности.

Противовирусную активность соединения 1 и соединения 9 определяли в отношении вируса Эбола (EBOV), вируса Марбург (MARV) (табл. 2) и вируса Нипах (MV) (табл. 3), используя полностью реплицирующиеся репортерные вирусы, экспрессирующие люциферазу или зеленый флуоресцентный белок (GFP) (Uebelhoefer, L.S., 2014. AVR; Hoenen, T., 2013. AVR). Также противовирусную активность соединения 1 и соединения 9 определяли в отношении вируса Эбола (EBOV), вируса Марбург (MARV) (табл. 2-а), используя полностью реплицирующиеся репортерные вирусы, экспрессирующие люциферазу или зеленый флуоресцентный белок (GFP) (Uebelhoefer, L.S., 2014. AVR; Hoenen, T., 2013. AVR). Все исследования проводили в условиях уровня 4 биологической безопасности (BSL-4) в Центрах контроля и предотвращения заболевания (англ.: Centers for Disease Control and Prevention (CDC)). Анализы противовирусной активности в отношении вируса Эбола проводили в первичных клетках микрососудов эндотелия человека, иммортализованные теломеразным каталитическим белком (HMVEC-TERT) и клетки Huh-7 (Shao, R., 2004, BBRC). Противовирусную активность в отношении вируса Нипах определяли в клетках HMVEC-TERT и Hela.

Анализы противовирусной активности проводили в 96-луночных планшетах. Получали восемьдесят концентраций соединения путем 3-кратного серийного разведения в среде и 100 мкл на лунку каждого разведенного раствора в трех повторностях переносили в планшеты, на которые предварительно монослоем высевали клетки. Планшеты переносили в условия BSL-4 и в планшеты с внесенными клетками и серийно разведенными соединениями добавляли соответствующим образом разведенный раствор вируса, который готовили в среде для клеточных культур и для которого предварительно определяли титр вируса. Каждый планшет включал три лунки инфицированных необработанных клеток и три лунки неинфицированных клеток, которые служили в качестве контролей, соответственно, 0% и 100% ингибирования вируса. После инфицирования планшеты для анализа инкубировали в течение 3-4 дней в инкубаторе клеточных культур. После инкубирования определяли репликацию вируса с помощью считывателя планшетов Envision по прямой флуоресценции репортерных вирусов, экспрессирующих GFP, или репортерных вирусов, экспрессирующих люциферазу, после соответствующего добавления субстрата лю-

циферазы. Для анализа выхода вируса среды от инфицированных клеток удаляли и часть использовали для количественного определения вирусной РНК посредством количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР). Оставшиеся среды серийно разводили и определяли количество инфицирующего вируса с использованием разбавленных сред для инфицирования монослоев свежих клеток, таким образом, определяли инфицирующую дозу для культур тканей, которая вызывала 50% цитопатических эффектов (TCID₅₀), используя реагент Cell TiterGlo (Promega, Madison, WI). Для анализа вызываемого вирусом цитопатического эффекта (CPE) определяли жизнеспособность инфицированных клеток, используя реагент Cell TiterGlo.

Процент ингибирования рассчитывали для каждой исследуемой концентрации по отношению к контролям, соответствующим 0% и 100% ингибирования, и значение EC₅₀ для каждого соединения определяли посредством нелинейной регрессии как эффективную концентрацию соединения, которая ингибировала репликацию вируса на 50%.

Пример 37. EBOV-GFP, клетки HMVEC-TERT.

Клетки HMVEC-TERT высевали в 96-луночные планшеты. Получали восемь-десять концентраций соединения путем 3-кратного серийного разведения и 100 мкл на лунку каждого разведенного раствора в трех повторностях переносили в планшеты, на которые предварительно монослоем высевали клетки HMVEC-TERT. Планшеты переносили в условия BSL-4, и в планшеты с внесенными клетками и серийно разведенными соединениями добавляли соответствующим образом разведенный раствор вируса EBOV-GFP, который готовили в среде для клеточных культур и для которого предварительно определяли титр вируса. Каждый планшет включал три лунки инфицированных необработанных клеток и три лунки неинфицированных клеток, которые служили в качестве контролей, соответственно, 0% и 100% ингибирования вируса. После инфицирования планшеты для анализа инкубировали в течение 3-4 дней в инкубаторе клеточных культур. После инкубирования определяли репликацию вируса с помощью считывателя планшетов Envision по прямой флуоресценции для определения экспрессии GFP из репортерного вируса. Процент ингибирования рассчитывали для каждой исследуемой концентрации по отношению к контролям, соответствующим 0% и 100% ингибирования, и значение EC₅₀ для каждого соединения определяли посредством нелинейной регрессии как эффективную концентрацию соединения, которая ингибировала репликацию вируса на 50%.

Пример 38. EBOV-GFP, клетки Nuh-7.

Клетки Nuh-7 высевали в 96-луночные планшеты. Получали восемь-десять концентраций соединения путем 3-кратного серийного разведения и 100 мкл на лунку каждого раствора в трех повторностях переносили в планшеты, на которые предварительно монослоем высевали клетки Nuh-7. Планшеты переносили в условия BSL-4 и в планшеты с внесенными клетками и серийно разведенными соединениями добавляли соответствующим образом разведенный раствор вируса EBOV-GFP, который готовили в среде для клеточных культур и для которого предварительно определяли титр вируса. Каждый планшет включал три лунки инфицированных необработанных клеток и три лунки неинфицированных клеток, которые служили в качестве контролей, соответственно, 0% и 100% ингибирования вируса. После инфицирования планшеты для анализа инкубировали в течение 3-4 дней в инкубаторе клеточных культур. После инкубирования определяли репликацию вируса с помощью считывателя планшетов Envision по прямой флуоресценции для определения экспрессии GFP из репортерного вируса. Процент ингибирования рассчитывали для каждой исследуемой концентрации по отношению к контролям, соответствующим 0% и 100% ингибирования, и значение EC₅₀ для каждого соединения определяли посредством нелинейной регрессии как эффективную концентрацию соединения, которая ингибировала репликацию вируса на 50%.

Пример 39. EBOV-Luc, клетки Nuh-7.

Клетки Nuh-7 высевали в 96-луночные планшеты. Получали восемь-десять концентраций соединения путем 3-кратного серийного разведения и 100 мкл на лунку каждого раствора в трех повторностях переносили в планшеты, на которые предварительно монослоем высевали клетки. Планшеты переносили в условия BSL-4 и в планшеты с внесенными клетками и серийно разведенными соединениями добавляли соответствующим образом разведенный раствор вируса EBOV-Luc, который готовили в среде для клеточных культур и для которого предварительно определяли титр вируса. Каждый планшет включал три лунки инфицированных необработанных клеток и три лунки неинфицированных клеток, которые служили в качестве контролей, соответственно, 0% и 100% ингибирования вируса. После инфицирования планшеты для анализа инкубировали в течение 3-4 дней в инкубаторе клеточных культур. После инкубирования определяли репликацию вируса с помощью считывателя планшетов Envision после соответствующего добавления субстрата люциферазы. Процент ингибирования рассчитывали для каждой исследуемой концентрации по отношению к контролям, соответствующим 0% и 100% ингибирования, и значение EC₅₀ для каждого соединения определяли посредством нелинейной регрессии как эффективную концентрацию соединения, которая ингибировала репликацию вируса на 50%.

Пример 40. MARV-GFP, клетки Nuh-7.

Клетки Nuh-7 высевали в 96-луночные планшеты. Получали восемь-десять концентраций соединения путем 3-кратного серийного разведения и 100 мкл на лунку каждого раствора в трех повторностях переносили в планшеты, на которые предварительно монослоем высевали клетки Nuh-7. Планшеты пе-

переносили в условия BSL-4 и добавляли соответствующим образом разведенный раствор вируса MARV-GFP, который готовили в среде для клеточных культур и для которого предварительно определяли титр вируса. Каждый планшет включал три лунки инфицированных необработанных клеток и три лунки неинфицированных клеток, которые служили в качестве контролей, соответственно, 0% и 100% ингибирования вируса. После инфицирования планшеты для анализа инкубировали в течение 3-4 дней в инкубаторе клеточных культур. После инкубирования определяли репликацию вируса с помощью считывателя планшетов Envision по прямой флуоресценции для определения экспрессии GFP из репортерного вируса. Процент ингибирования рассчитывали для каждой исследуемой концентрации по отношению к контролям, соответствующим 0% и 100% ингибирования, и значение EC_{50} для каждого соединения определяли посредством нелинейной регрессии как эффективную концентрацию соединения, которая ингибировала репликацию вируса на 50%.

Пример 41. Вирус Эбола, клетки Nuh-7 (PHK).

Клетки Nuh-7 высевали в 96-луночные планшеты. Получали восемь-десять концентраций соединения путем 3-кратного серийного разведения и 100 мкл на лунку каждого разведенного раствора в трех повторностях переносили в планшеты, на которые предварительно монослоем высевали клетки Nuh-7. Планшеты переносили в условия BSL-4 и в планшеты с внесенными клетками и серийно разведенными соединениями добавляли соответствующим образом разведенный раствор вируса EBOV, который готовили в среде для клеточных культур и для которого предварительно определяли титр вируса. Каждый планшет включал три лунки инфицированных необработанных клеток и три лунки неинфицированных клеток, которые служили в качестве контролей, соответственно, 0% и 100% ингибирования вируса. После инфицирования планшеты для анализа инкубировали в течение 3-4 дней в инкубаторе клеточных культур. После инкубирования среды от инфицированных клеток удаляли и часть использовали для количественного определения вирусной РНК посредством количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР). Процент ингибирования рассчитывали для каждой исследуемой концентрации по отношению к контролям, соответствующим 0% и 100% ингибирования, и значение EC_{50} для каждого соединения определяли посредством нелинейной регрессии как эффективную концентрацию соединения, которая ингибировала репликацию вируса на 50%.

Пример 42. Вирус Эбола, клетки Nuh-7 (выход).

Клетки Nuh-7 высевали в 96-луночные планшеты. Получали восемь-десять концентраций соединения путем 3-кратного серийного разведения и 100 мкл на лунку каждого разведенного раствора в трех повторностях переносили в планшеты, на которые предварительно монослоем высевали клетки Nuh-7. Планшеты переносили в условия BSL-4 и в планшеты с внесенными клетками и серийно разведенными соединениями добавляли соответствующим образом разведенный раствор вируса EBOV, который готовили в среде для клеточных культур и для которого предварительно определяли титр вируса. Каждый планшет включал три лунки инфицированных необработанных клеток и три лунки неинфицированных клеток, которые служили в качестве контролей, соответственно, 0% и 100% ингибирования вируса. После инфицирования планшеты для анализа инкубировали в течение 3-4 дней в инкубаторе клеточных культур. После инкубирования среды от инфицированных клеток удаляли и разбавляли, получая 10-кратные серийные разведения. Количество инфицирующего вируса определяли с использованием разбавленных сред для инфицирования монослоев свежих клеток и таким образом определяли инфицирующую дозу для культур тканей, которая вызывала 50% цитопатических эффектов (TCID₅₀), используя реагент Cell TiterGlo (Promega, Madison, WI). Процент ингибирования рассчитывали для каждой исследуемой концентрации по отношению к контролям, соответствующим 0% и 100% ингибирования, и значение EC_{50} для каждого соединения определяли посредством нелинейной регрессии как эффективную концентрацию соединения, которая ингибировала репликацию вируса на 50%.

Пример 43. Вирус Эбола, клетки HeLa.

Противовирусную активность выбранных соединений определяли в отношении вируса Эбола (EBOV), вид Заир, в условиях уровня 4 биологической безопасности (BSL-4) в Медицинском исследовательском институте инфекционных заболеваний армии США (англ.: US Army Medical Research Institute for Infections Disease (USAMRIID)). Клетки HeLa высевали в 384-луночные планшеты в количестве 5000 клеток на лунку. Противовирусную активность каждого соединения определяли в четырех повторностях. Восемь-десять концентраций соединения добавляли в 3-кратных серийных разведениях непосредственно к культурам клеток с использованием цифрового распределителя HP300 за 2 ч до инфицирования. Планшеты переносили в условия BSL-4 и в планшеты с внесенными клетками и серийно разведенными соединениями добавляли соответствующим образом разведенный раствор вируса, который готовили в среде для клеточных культур и для которого предварительно определяли титр вируса. Каждый планшет включал три лунки инфицированных необработанных клеток и три лунки неинфицированных клеток, которые служили в качестве контролей, соответственно, 0% и 100% ингибирования вируса. После инфицирования планшеты для анализа инкубировали в течение 2 дней в инкубаторе клеточных культур. После инкубирования клетки фиксировали в растворе формалина и определяли репликацию вируса путем определения количества гликопротеинов вируса Эбола после иммуноокрашивания и одновременной многопараметрической визуализации с использованием прибора для конфокальной микроскопии Perkin

Elmer Opera. Процент ингибирования рассчитывали для каждой исследуемой концентрации по отношению к контролям, соответствующим 0% и 100% ингибирования, и значение EC_{50} для каждого соединения определяли посредством нелинейной регрессии как эффективную концентрацию соединения, которая ингибировала репликацию вируса на 50%.

Пример 44. Вирус Эбола, культуры макрофагов.

Противовирусную активность выбранных соединений определяли в отношении вируса Эбола (EBOV), вид Заир, в условиях уровня 4 биологической безопасности (BSL-4) в Медицинском исследовательском институте инфекционных заболеваний армии США (англ.: US Army Medical Research Institute for Infectious Disease (USAMRIID)). Культуры макрофагов выделяли из свежих мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека и дифференцировали в присутствии 5 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и 50 мкМ В-меркаптоэтанола. Среда заменялась каждые 2 дня и клетки, прикрепившиеся к планшету с культурой ткани, через 7 дней удаляли посредством 0,5М ЭДТА в 1× фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ), концентрировали посредством центрифугирования при 200×g в течение 10 мин и помещали в 384-луночные планшеты для исследований в количестве 40000 клеток на лунку. Противовирусную активность каждого соединения определяли в четырех повторностях. Восемь-десять концентраций соединения добавляли в 3-кратных серийных разведениях непосредственно к культурам клеток с использованием цифрового распределителя HP300 за 2 ч до инфицирования. Планшеты переносили в условия BSL-4 и в планшеты с внесенными клетками и серийно разведенными соединениями добавляли соответствующим образом разведенный раствор вируса, который готовили в среде для клеточных культур и для которого предварительно определяли титр вируса. Каждый планшет включал три лунки инфицированных необработанных клеток и три лунки неинфицированных клеток, которые служили в качестве контролей, соответственно, 0% и 100% ингибирования вируса. После инфицирования планшеты для анализа инкубировали в течение 2 дней в инкубаторе клеточных культур. После инкубирования клетки фиксировали в растворе формалина и определяли репликацию вируса путем определения количества гликопротеинов вируса Эбола после иммуноокрашивания и одновременной многопараметрической визуализации с использованием прибора для конфокальной микроскопии Perkin Elmer Opera. Процент ингибирования рассчитывали для каждой исследуемой концентрации по отношению к контролям, соответствующим 0% и 100% ингибирования, и значение EC_{50} для каждого соединения определяли посредством нелинейной регрессии как эффективную концентрацию соединения, которая ингибировала репликацию вируса на 50%.

Пример 45. Nipah-GFP, клетки HMVEC-TERT.

Клетки HMVEC-TERT высевали в 96-луночные планшеты. Получали восемь-десять концентраций соединения путем 3-кратного серийного разведения и 100 мкл на лунку каждого раствора в трех повторностях переносили в планшеты, на которые предварительно монослоем высевали клетки HMVEC-TERT. Планшеты переносили в условия BSL-4 и в планшеты с внесенными клетками и серийно разведенными соединениями добавляли соответствующим образом разведенный раствор вируса NiV-GFP, который готовили в среде для клеточных культур и для которого предварительно определяли титр вируса. Каждый планшет включал три лунки инфицированных необработанных клеток и три лунки неинфицированных клеток, которые служили в качестве контролей, соответственно, 0% и 100% ингибирования вируса. После инфицирования планшеты для анализа инкубировали в течение 3-4 дней в инкубаторе клеточных культур. После инкубирования определяли репликацию вируса в считывателе планшетов Envision по прямой флуоресценции для определения экспрессии GFP из репортерного вируса. Процент ингибирования рассчитывали для каждой исследуемой концентрации по отношению к контролям, соответствующим 0% и 100% ингибирования, и значение EC_{50} для каждого соединения определяли посредством нелинейной регрессии как эффективную концентрацию соединения, которая ингибировала репликацию вируса на 50%.

Пример 46. NiV-Luc, HMVEC-TERT.

Клетки HMVEC-TERT высевали в 96-луночные планшеты. Получали восемь-десять концентраций соединения путем 3-кратного серийного разведения и 100 мкл на лунку каждого разведенного раствора в трех повторностях переносили в планшеты, на которые предварительно монослоем высевали клетки. Планшеты переносили в условия BSL-4 и в планшеты с внесенными клетками и серийно разведенными соединениями добавляли соответствующим образом разведенный раствор вируса NiV-Luc, который готовили в среде для клеточных культур и для которого предварительно определяли титр вируса. Каждый планшет включал три лунки инфицированных необработанных клеток и три лунки неинфицированных клеток, которые служили в качестве контролей, соответственно, 0% и 100% ингибирования вируса. После инфицирования планшеты для анализа инкубировали в течение 3-4 дней в инкубаторе клеточных культур. После инкубирования определяли репликацию вируса с помощью считывателя планшетов Envision после соответствующего добавления субстрата люциферазы. Процент ингибирования рассчитывали для каждой исследуемой концентрации по отношению к контролям, соответствующим 0% и 100% ингибирования, и значение EC_{50} для каждого соединения определяли посредством нелинейной регрессии как эффективную концентрацию соединения, которая ингибировала репликацию вируса на 50%.

Пример 47. NiV, Hela (выход).

Клетки Hela высевали в 96-луночные планшеты. Получали восемь-десять концентраций соединения путем 3-кратного серийного разведения и 100 мкл на лунку каждого разведенного раствора в трех повторностях переносили в планшеты, на которые предварительно монослоем высевали клетки Hela. Планшеты переносили в условия BSL-4 и в планшеты с внесенными клетками и серийно разведенными соединениями добавляли соответствующим образом разведенный раствор вируса Niv, который готовили в среде для клеточных культур и для которого предварительно определяли титр вируса. Каждый планшет включал три лунки инфицированных необработанных клеток и три лунки неинфицированных клеток, которые служили в качестве контролей, соответственно, 0% и 100% ингибирования вируса. После инфицирования планшеты для анализа инкубировали в течение 4 дней в инкубаторе клеточных культур. После инкубирования среды от инфицированных клеток удаляли и разбавляли, получая 10-кратные серийные разведения. Количество инфицирующего вируса определяли с использованием разбавленных сред для инфицирования монослоев свежих клеток и таким образом определяли инфицирующую дозу для культур тканей, которая вызвала 50% цитопатических эффектов (TCID₅₀), используя реагент Cell TiterGlo (Promega, Madison, WI). Процент ингибирования рассчитывали для каждой исследуемой концентрации по отношению к контролям, соответствующим 0% и 100% ингибирования, и значение EC₅₀ для каждого соединения определяли посредством нелинейной регрессии как эффективную концентрацию соединения, которая ингибировала репликацию вируса на 50%.

Пример 48. Niv, Hela (РНК).

Клетки Huh-7 высевали в 96-луночные планшеты. Получали восемь-десять концентраций соединения путем 3-кратного серийного разведения и 100 мкл на лунку каждого разведенного раствора в трех повторностях переносили в планшеты, на которые предварительно монослоем высевали клетки Hela. Планшеты переносили в условия BSL-4 и в планшеты с внесенными клетками и серийно разведенными соединениями добавляли соответствующим образом разведенный раствор вируса Niv, который готовили в среде для клеточных культур и для которого предварительно определяли титр вируса. Каждый планшет включал три лунки инфицированных необработанных клеток и три лунки неинфицированных клеток, которые служили в качестве контролей, соответственно, 0% и 100% ингибирования вируса. После инфицирования планшеты для анализа инкубировали в течение 3-4 дней в инкубаторе клеточных культур. После инкубирования среды от инфицированных клеток удаляли и часть использовали для количественного определения вирусной РНК посредством количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР). Процент ингибирования рассчитывали для каждой исследуемой концентрации по отношению к контролям, соответствующим 0% и 100% ингибирования, и значение EC₅₀ для каждого соединения определяли посредством нелинейной регрессии как эффективную концентрацию соединения, которая ингибировала репликацию вируса на 50%.

Таблица 2. Анализы противовирусной активности в отношении вируса Эбола и вируса Марбург

	EC ₅₀ (нМ)							
Анализ	Репортерный вирус				РНК	Выход	Экспрессия антигена (одновременная многопараметрическая визуализация)	
Вирус	EBOV-GFP		EVOV-Luc	MARV-GFP	Вирус Эбола			
Линия клеток	HMVEC-TERT	Huh-7	Huh-7	Huh-7	Huh-7		Hela	Макрофаг
Соединение 1	771	1492	3126	1726	H/O	H/O	>20000	>20000
Соединение 9	121	90	H/O	H/O	1	1029	290	501
(R)-диастереомер Соединения 9	62	70	H/O	H/O	H/O	H/O		
(S)-диастереомер Соединения 9 (Соединение 32)	40	81	H/O	H/O	H/O	H/O		
Соединение 10								
Соединение 15	630	271	H/O	H/O	H/O	H/O		
Соединение 21	905							270
Соединение 22	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O		
Соединение 23	458						1650	243,350
Соединение 24								
Соединение 25								
Соединение 26	283						970, 1180	1180
Соединение 27	82						182	
Соединение 28	102						975	120
Соединение 29								
Соединение 30								
Соединение 31	11061						>20000	1230

EBOV-GFP: Вирус Эбола, экспрессирующий репортерный ген

GFP EBOV-Luc: Вирус Эбола, экспрессирующий репортерный ген люциферазы

MARV-GFP: Вирус Марбург, экспрессирующий репортерный ген

GFP Вирус Эбола: Вирус Эбола, штамм 2014

Таблица 2-а. Анализ противовирусной активности в отношении вируса Эбола и вируса Марбург

Анализ	EC ₅₀ (нМ)						
	Репортерный вирус				РНК	Выход	Экспессия антигена (одновременная многопараметрическая визуализация)
Вирус	EBOV-GFP		EVOV-Luc	MARV-GFP	Эбола		
Линия клеток	HMVEC-TERT	Huh-7	Huh-7	Huh-7	Huh-7	Hela	Макрофаг
Соединение 1	771	1492	3126	1726	H/O	H/O	>20000
Соединение 9	121	90	H/O	H/O	1	1029	290, 270
(R)-диастереомер Соединения 9	62	70	H/O	H/O	H/O	H/O	210
(S)-диастереомер Соединения 9 (Соединение 32)	40	81	H/O	H/O	H/O	H/O	100
Соединение 10							3200
Соединение 15	630	271	H/O	H/O	H/O	H/O	520
Соединение 21	905, 473						270
Соединение 22	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	H/O	11570
Соединение 23	458						1650, 1845
Соединение 24							785
Соединение 25							6720
Соединение 26	283						970, 1180, 1103
Соединение 27	82						182
Соединение 28	102						975, 682
Соединение 29							275
Соединение 30	11061						>20000
Соединение 31							>20000, >10000

EBOV-GFP: Вирус Эбола, экспрессирующий репортерный ген

GFP EBOV-Luc: Вирус Эбола, экспрессирующий репортерный ген люциферазы

MARV-GFP: Вирус Марбург, экспрессирующий репортерный ген

GFP Вирус Эбола: Вирус Эбола, штамм 2014

Таблица 3. Анализ противовирусной активности в отношении вируса Нипах и вируса Хендра

	EC ₅₀ (нМ)			
Анализ	Репортерный вирус		Цитопатический эффект (CPE)	Выход
Вирус	NiV GFP	NiV Luc	NiV	
Линия клеток	HMVEC-TERT		Hela	
Соединение 1	13420	3500	1484	
Соединение 9	60	30	N/O	N/O

NiV GFP: Вирус Нипах, экспрессирующий репортерный ген

GFP NiV-Luc: Вирус Нипах, экспрессирующий репортерный ген люциферазы

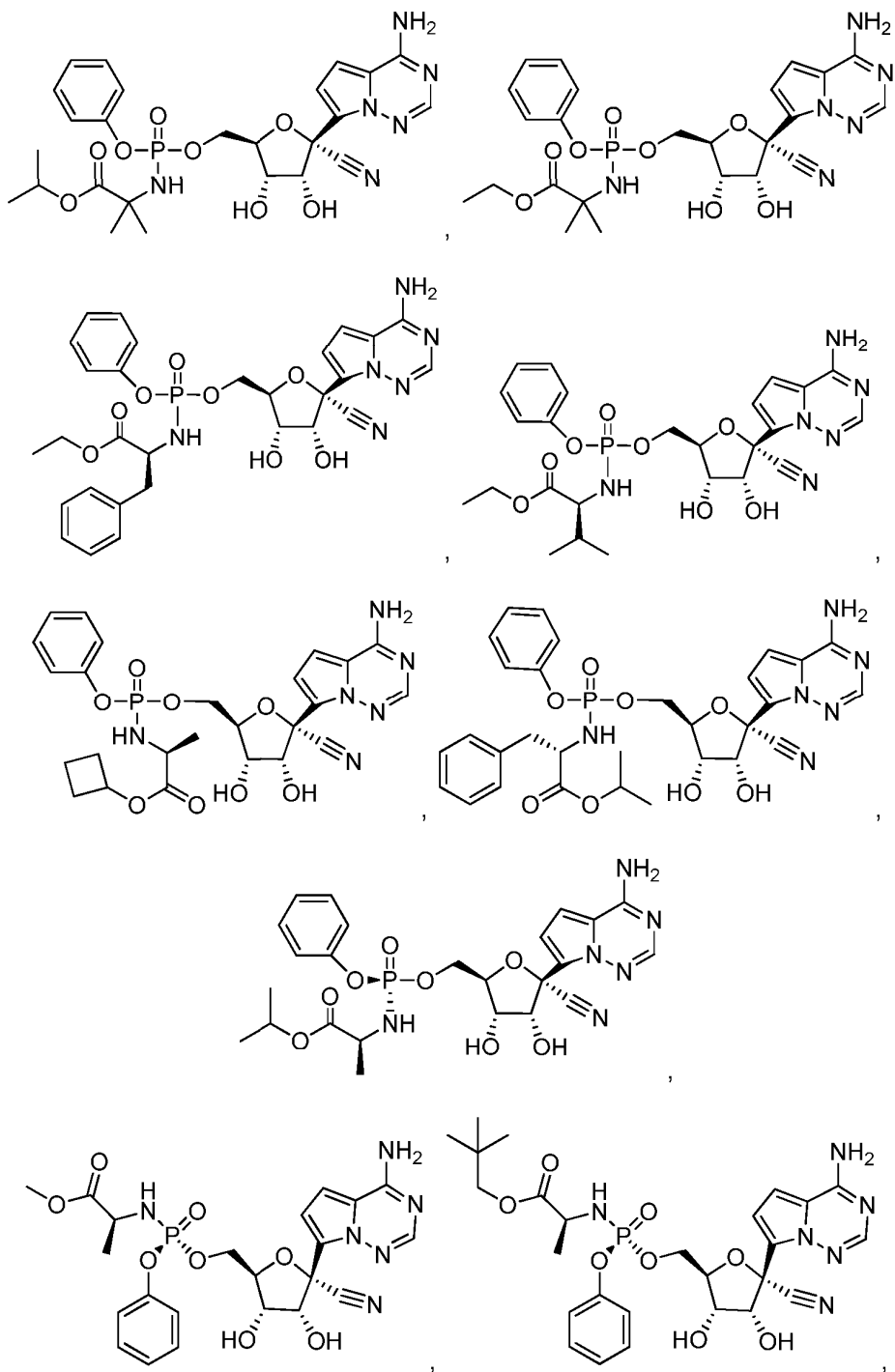
NiV: Вирус Нипах

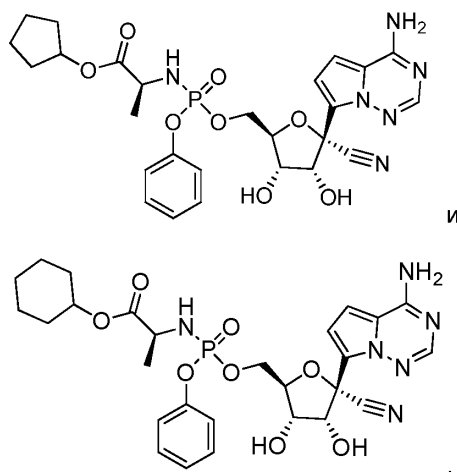
Все публикации, патенты и патентные документы, упомянутые выше, включены в настоящее описание посредством ссылки, как если бы они были включены посредством ссылки по отдельности.

Настоящее изобретение описано со ссылкой на различные конкретные и предпочтительные варианты реализации и методики. Тем не менее, специалисту в данной области техники понятно, что может быть сделано множество вариаций и модификаций, не выходящих за рамки сущности и объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, выбранное из группы, состоящей из





или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики инфекций Filoviridae, содержащая терапевтически эффективное количество соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли и один или более фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ.

3. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики инфекций Filoviridae, содержащая терапевтически эффективное количество соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли и по меньшей мере один другой терапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из рибавирина, паливизумаба, мотавизумаба, RSV-IGIV (RespiGam®), мотавизумаба-YTE (MEDI-557), 3-(S)-(1-(2-фторфенил)-3-(2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-бензо[e][1,4]дiazепин-3-ил)-мочевины (A-60444), 2-[[2-гидрокси-5-[(E)-(5-метилтетразол-1-ил)иминометил]фенил]-(4-гидроксифенил)метил]-4-[(E)-(5-метилтетразол-1-ил)иминометил]фенола (MDT-637), моногидрат 1-циклопропил-3-[[1-(4-гидроксibuтил)-1H-бензимидазол-2-ил]метил]-1,3-дигидроимидазо[4,5-с]пиридин-2-он бис-гидрохлорида (BMS-433771), амиодарона, дронедарона, верапамила, конвалесцентной плазмы от перенесших вирус Эбола (ECP), ТКМ-100201, BCX4430 ((2S,3S,4R,5R)-2-(4-амино-5H-пирроло[3,2-d]пиримидин-7-ил)-5-(гидроксиметил)пирролидин-3,4-диола), фавипиравира (также известного как T-705 или Авиган), T-705 монофосфата, T-705 дифосфата, T-705 трифосфата, FGI-106 (1-N,7-N-бис[3-(диметиламино)пропил]-3,9-диметилхинолино[8,7-h]хинолон-1,7-диамина), JK-05, ТКМ-Ebola, ZMapp, рекомбинантного антикоагулянтного белка нематод c2 (rNAPc2), VRC-EBOADC076-00-VP, OS-2966, MVA-BN filo, бринцидофовира, вакцины Vaxart против вируса Эбола на основе вектора 5 аденовируса, Ad26-ZEBOV, вакцины ФилоВакс (FiloVax), GOVX-E301, GOVX-E302, ингибиторов проникновения вируса Эбола (ингибиторов NPC1) и rVSV-EBOV и их смесей.

4. Фармацевтическая композиция по п.3, в которой указанный по меньшей мере один другой терапевтический агент представляет собой ZMapp.

5. Применение соединения по п.1, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по любому из пп.2-4 для лечения вирусной инфекции Filoviridae у человека.

6. Применение по п.5, где вирусная инфекция Filoviridae представляет собой инфекцию вируса Эбола.

7. Применение по п.5, где вирусная инфекция Filoviridae представляет собой инфекцию вируса Марбург.

8. Применение соединения по п.1, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по любому из пп.2-4 для изготовления лекарственного средства для лечения вирусной инфекции Filoviridae у человека.

9. Применение по п.8, где вирусная инфекция Filoviridae представляет собой инфекцию вируса Эбола.

10. Применение по п.8, где вирусная инфекция Filoviridae представляет собой инфекцию вируса Марбург.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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