

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 045261

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.09

(21) Номер заявки
202192343

(22) Дата подачи заявки
2020.08.13

(51) Int. Cl. C07D 403/14 (2006.01)
A61K 31/4178 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(54) ПАНГЕНОТИПИЧНЫЙ ИНГИБИТОР БЕЛКА NS5А ВИРУСА ГЕПАТИТА С,
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И
ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 2019133505

(32) 2019.10.22

(33) RU

(43) 2021.11.29

(86) PCT/RU2020/000430

(87) WO 2021/080458 2021.04.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ИВАЩЕНКО АНДРЕЙ
АЛЕКСАНДРОВИЧ (RU);
ИВАЩЕНКО АЛЕКСАНДР
ВАСИЛЬЕВИЧ; САВЧУК НИКОЛАЙ
ФИЛИППОВИЧ; ИВАЩЕНКО
АЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА; АЛЛА
ХЕМ, ЛЛС (US)

(72) Изобретатель:

Иващенко Андрей Александрович
(RU), Иващенко Александр
Васильевич (US), Митькин Олег
Дмитриевич (RU)

(74) Представитель:

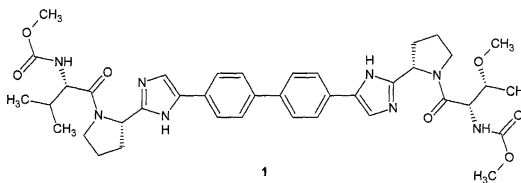
Шмакова Е.А. (RU)

(56) BELEMA M. et al.: "Hepatitis S Virus
NS5A Replication Complex Inhibitors: The Discovery
of Daclatasvir", J. Med. Chem., 2014, vol. 57, p.
2013-2032

GAO M. et al.: "Chemical genetics strategy
identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent
clinical effect", Nature, 2010, vol. 465, p. 96-100

RU-C1-2518369
EA-B1-16633

(57) Изобретение относится к новому соединению формулы (1), его кристаллической или поликристаллической форме и их фармацевтически приемлемой соли, способу их получения и применения.



B1

045261

045261

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к новым пангенотипичным ингибиторам белка NS5A вируса гепатита С (ВГС), фармацевтической композиции и способам их получения и применения.

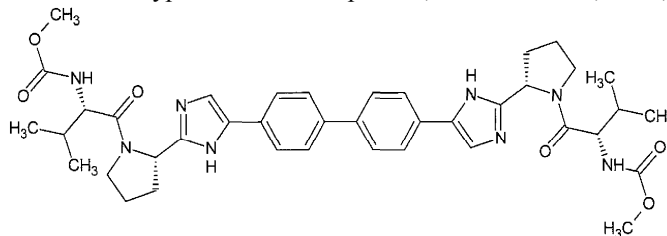
Предшествующий уровень техники

Инфекционное заболевание гепатит С, вызванное ВГС, относится к числу наиболее распространенных заболеваний печени и широко распространено во всем мире. Согласно ежегодным отчетам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) более 130-150 млн человек инфицированы и более 350-500 тысяч умирают от связанных с ВГС заболеваний печени [WHO fact sheet N0 164. Hepatitis C, World Health Organization: Geneva, updated July, 2013, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>]. В соответствии со статистической оценкой Центров по контролю и профилактике заболеваний в США примерно 3,2 млн человек страдают хронической формой этого заболевания [Hepatitis C., Information for Health Professionals, Centers for Disease Control: Atlanta, <http://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/#>]. Острые стадии заболевания часто наблюдаются после длительных и бессимптомных периодов. Примерно 75-85% вновь инфицированных людей становятся хронически инфицированными. Среди этих пациентов 60-70% будут страдать хроническим заболеванием печени. В 5-20% случаев диагностируются цирроз или рак печени, приводящие в 1-5% случаев к летальному исходу. Неудивительно, что ВГС является наиболее частым показанием для трансплантации печени [Germani, G. et al., HCV in liver transplantation, Semin. Immunopathol., 2013, 35 (1), 101-110].

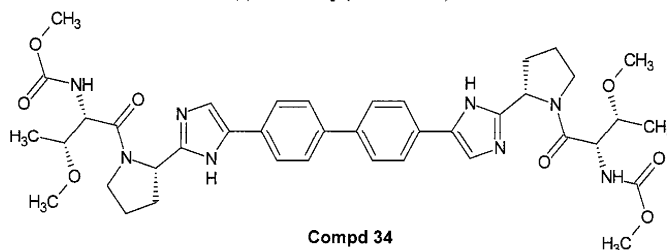
Исходя из вышесказанного существует значительная необходимость поиска соединений, являющихся пангенотипичными ингибиторами белка NS5A ВГС.

В настоящее время ряд и пангенотипичных ингибиторов NS5A ВГС проходят клинические испытания или уже используется для лечения гепатита С, включая Даклатасвир (Daclatasvir) (BMS-790052) [Gao, M. et al., Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect, Nature, 2010, 465, 96-100, <https://www.pharmacompass.com/patent-expiry-expiration/daclatasvir-dihydrochloride>, [https://web.archive.org/web/20161109153849, http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/206843s004lbl.pdf](https://web.archive.org/web/20161109153849/http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/206843s004lbl.pdf)], Ледипасвир (Ledipasvir) (GS-5885) [Link, J. et al., J. Med. Chem., 57, 2033-2046, 2014, WO 2010/132601], Гепавивир (Hepavivir) (AV-4025) [Ivachtchenko, A.V. et al., J. Med. Chem., 57, 7716-7730, 2014, WO 2012/074437, <http://allachem.com/wp-content/uploads/2013/08/hcv-AV4025-082413.doc>], Омбитасвир (Ombitasvir) (ABT-267) [DeGoey et al., J. Med Chem., 57, 2047-2057, 2014, WO 2010/144646], Элбасвир (Elbasvir) (MK-8742) [Coburn, C.A. et al., ChemMedChem, 8, 1930-1940, 2013, WO 2012/040923, WO 2012/041014] и другие ингибиторы NS5A.

Наиболее продвинутым и синтетически наиболее доступным пангенотипичным ингибитором NS5A ВГС является даклатасвир (англ. daclatasvir, BMS-790052, торговое название Daklinza), который уже успешно используется для лечения гепатита С [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/206843Orig1s000MicroR.pdf]. Известны также его структурные аналоги, в частности ингибитор NS5A формулы A1. Поиск более эффективных аналогов даклатосвира продолжается [M. Belema et al., Hepatitis C Virus NS5Ab Replication Complex Inhibitors. Part 6: Discovery of a Novel and Highly Potent Biarylimidazole Chemotype with Inhibitory Activity Toward Genotypes 1a and 1b Replicons, J. Med. Chem., 2014, 57, 1995-2012; M. Belema et al., Hepatitis C Virus NS5A Replication Complex Inhibitors: The Discovery of Daclatasvir, J. Med. Chem., 2014, 57, 2013-2032]. Известен, в частности, близкий аналог даклатасвира - ингибитор NS5A формулы Compd 34, который уступает даклатасвиру по активности к генотипам gT1a gT1b NS5A ВГС и фармакокинетическим параметрам (табл. 1) [Belema M. et al., Hepatitis C Virus NS5Ab Replication Complex Inhibitors. Part 6: Discovery of a Novel and Highly Potent Biarylimidazole Chemotype with Inhibitory Activity Toward Genotypes 1a and 1b Replicons, J. Med. Chem., 2014, 57, 2013-2032].



Даклатасвир (BMS-790052)



Compd 34

Таблица 1

Активность и фармакокинетические параметры в крысах известных ингибиторов дактатосвира (BMS-790052)^a и Comp 34^b по отношению к генотипам NS5A ВГС

Генотипы ВГС	EC ₅₀ (нМ)	
	BMS-790052 ^a	Comp 34 ^b
gT1a	50.0	126.0
gT1b	9.0	53.0
gT2a	71.0	
gT3a	146.0	
Фармакокинетические параметры в крысах при РО, 4ч ^b		
AUC, нМ·ч	2181	472
C ^P -4ч, нМ	661	121
C ^L -4ч, нМ	2239	453

^a Gao, M. et al., Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect, Nature, 2010, 465, 96-100.

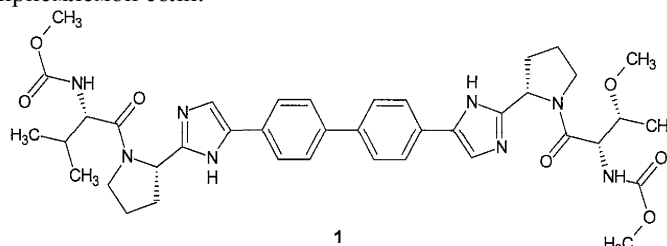
^b Belema, M. et al., J. Med. Chem., 2014, 57, 2013-2032.

AUC - площадь под кинетической кривой концентрация-время.

До настоящего времени отсутствуют структурные аналоги дактатосвира, обладающие улучшенными фармакологическими свойствами. В этой связи поиск новых эффективных и синтетически доступных аналогов дактатосвира с улучшенными характеристиками остается актуальной задачей.

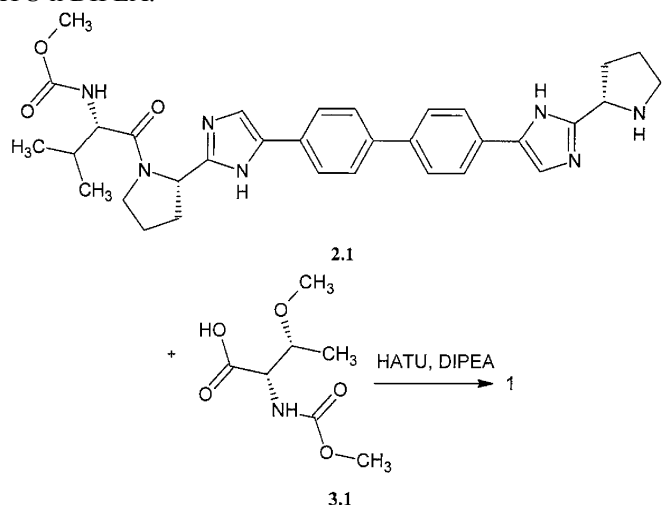
Раскрытие изобретения

Настоящее изобретение относится к неизвестному ранее пангенотипичному ингибитору NS5A ВГС формулы 1, представляющему собой метил [(1S)-1-{(2S)-2-[5-(4'-{2-[(2S)-1-{(2S,3R)-3-метокси-2-[(метоксикарбонил)амино]бутаноил} пирролидин-2-ил]-1H-имидазол-5-ил} бифенил-4-ил)-1H-имидазол-2-ил]пирролидин-1-ил}-2-метилпропил]карбамат, его кристаллической или поликристаллической форме и их фармацевтически приемлемой соли.



1

Ингибитор формулы 1 получают (схема 1) ацилированием метил [(1S)-2-метил-1-{(2S)-2-[5-(4'-{2-[(2S)-пирролидин-2-ил]-1H-имидазол-5-ил} бифенил-4-ил)-1H-имидазол-2-ил]пирролидин-1-ил} карбонил)пропил]карбамата (2.1) N-метоксикарбонил-O-метил-L-треонином (3.1) в диметилформамиде в присутствии HATU и DIPEA.



3.1

Схема 1. Получение ингибитора формулы 1.

Ингибитор формулы 1 получают (схема 2) ацилированием метил [(1S,2R)-2-метокси-1-{(2S)-2-[5-(4'-{2-[(2S)-пирролидин-2-ил]-1H-имидазол-5-ил} бифенил-4-ил)-1H-имидазол-2-ил]пирролидин-1-ил} карбонил)пропил]карбамата (2.2) N-метоксикарбонил-L-валин (3.2) в присутствии HATU и DIPEA.

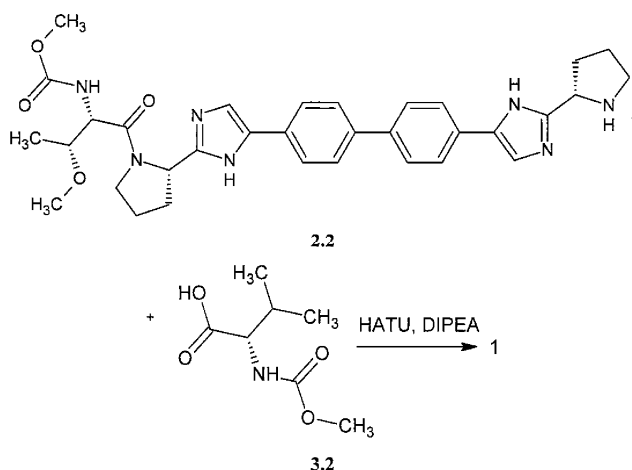


Схема 2. Получение ингибитора формулы 1.

Ингибитор формулы 1 в одинаковых условиях проявляет по отношению к различным генотипам ВГС пиколярную активность (табл. 2), которая сопоставима или более высокая по сравнению с известными ингибиторами BMS-790052 и Compd 34. В частности, новый ингибитор формулы 1 показал более высокую активность, чем BMS-790052, по отношению к генотипам gT1a и gT3a и сопоставимую активность по отношению к gT1b и gT2a. Ингибитор формулы 1 в одинаковых условиях проявляет более высокую активность, чем Compd 34, по отношению к gT1a, gT1b, gT3a и gT4a и сопоставимую активность по отношению к gT2a.

Таблица 2

Активность нового ингибитора формулы 1 и известных ингибиторов BMS-790052 и Comp 34^b по отношению к генотипам NS5A ВГС и их фармакокинетические параметры, полученные в сопоставимых условиях

Генотипы ВГС	EC ₅₀ (нМ)			
	Ингибитор формулы 1	BMS-790052	Comp 34	
gT1a	12,0	30,0	100,0	
gT1b	3,8	3,6	5,5	
gT2a	16,0	16,0	13,0	
gT3a	380,0	463,0	820,0	
gT4a	39,0	27,0	126,0	
Фармакокинетические параметры в крысах при РО 10 мг/кг				
AUC _{посл} , ч·нг/мл	4774	873	98	
C ^p _{макс} *, нг/мл	1285	281	48	
F, %	45,0	18,9	3,2	
C ^L _{макс} *, нг/г	1092	3454	423	

* Максимальная концентрация в плазме (C^p_{макс}) и печени (C^L_{макс}).

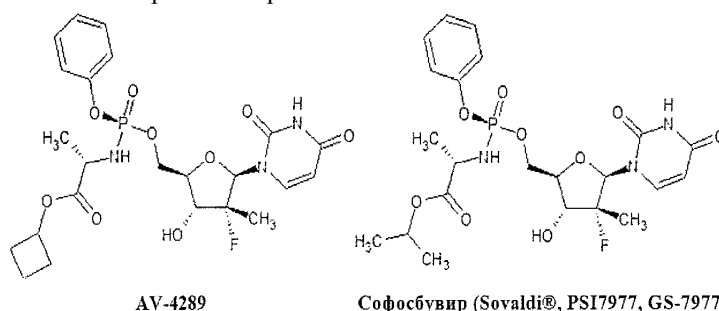
Фармакокинетические параметры в крысах при пероральном введении нового ингибитора формулы 1, BMS-790052 и Compd 34 в одинаковых условиях приведены в табл. 2. Как видно из табл. 2, новый ингибитор формулы 1 по сравнению с известными ингибиторами имеет значительно более приемлемые фармакокинетические параметры, в том числе биодоступность F=45,0%, AUC_{посл}=4774 ч·нг/мл и максимальную концентрацию в плазме C^p_{макс}=1285 нг/мл. Эти же параметры у BMS-790052 значения F=18,9%, AUC_{посл}=873 ч·нг/мл и C^p_{макс}=281 нг/мл, а у Compd 34 эти параметры имеют еще меньшее значение: F=3,2%, AUC_{посл}=98 ч·нг/мл и C^p_{макс}=48 нг/мл.

Предметом данного изобретения является также фармацевтическая композиция, содержащие ингибитор формулы 1, или его кристаллическую или поликристаллическую форму, или их фармацевтически приемлемую соль в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом.

Ингибитор формулы 1, или его кристаллическая или поликристаллическая форма, или их фармацевтически приемлемая соль по настоящему изобретению можно применять в виде одного активного фармацевтического агента или в сочетании с одним или более агентами для лечения или профилактики инфекций гепатита С или симптомов инфицирования ВГС. Другие агенты, применяемые в сочетании с ингибитором формулы 1, включают терапевтические средства для лечения заболеваний, обусловленных

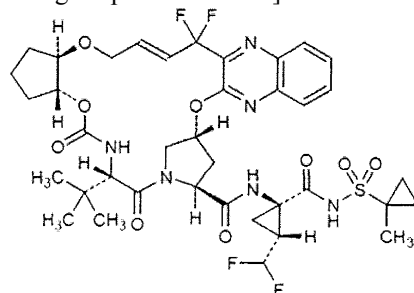
инфекцией ВГС, которые подавляют репликацию ВГС прямыми или косвенными механизмами. Эти агенты включают, но не ограничиваются ими, иммуномодуляторы хозяина (например, интерферон-альфа, пегилированный интерферон-альфа, консенсусный интерферон, интерферон-бета, интерферон-гамма, CpG-олигонуклеотиды и т.п.); противовирусные соединения, ингибирующие функции клеток хозяина, такие как инозинмонофосфат дегидрогеназа (например, рибавирин и т.п.); цитокины, модулирующие иммунную функцию (например, интерлейкин 2, интерлейкин 6 и интерлейкин 12); соединение, усиливающее развитие ответа Т-клетки-хелпера первого типа; интерферирующая РНК; антисмысловая РНК; вакцины, содержащие антигены ВГС или комбинации антиген-адъювант, направленные против ВГС; и любой агент или комбинация агентов, которые ингибируют репликацию ВГС действием на другие белки вирусного генома, участвующие в репликации вируса, и/или влияют на функцию других вирусных мишеней, таких как ингибиторы протеазы NS3/NS4A, геликазы NS3, полимеразы NS5B, белка NS4A и белка NS5A.

Вариантом настоящего изобретения является фиксированная композиция, включающая новый ингибитор формулы 1, или его кристаллическую или поликристаллическую форму, или их фармацевтически приемлемую соль по настоящему изобретению и AV-4289 [RU 2644156 (2018), PCT/RU2017/000210] или софосбувир (Sovaldi®, PSI7977, GS-7977) [US 7964580 (2011), US8334270 (2012) и RU 2478104 (2013)] в качестве пролекарства ингибитора полимеразы NS5B.



Более предпочтительными являются капсулы или таблетки, содержащие фиксированные дозы активных веществ в весовом соотношении ингибитор формулы 1, или его кристаллическая или поликристаллическая форма, или их фармацевтически приемлемая соль по настоящему изобретению: AV-4289; или ингибитор формулы 1, или его кристаллическая или поликристаллическая форма, или их фармацевтически приемлемая соль по настоящему изобретению: софосбувир от 1:10 до 1:1. Например, капсулы или таблетки содержат 400 мг ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению и 400 мг H027-4289; 200 мг ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению и 400 мг H027-4289; 160 мг ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению и 400 мг H027-4289; 80 мг ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению и 400 мг H027-4289; 40 мг ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению и 200 мг H027-4289; или 40 мг ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению и 400 мг H027-4289. Вместо AV-4289 в капсулах или таблетках может использоваться софосбувир.

Другим вариантом настоящего изобретения является также фиксированная композиция, включающая ингибитор формулы 1, или его кристаллическую или поликристаллическую форму, или их фармацевтически приемлемую соль по настоящему изобретению и ингибитор протеазы NS3/NS4A, например глекапревир (ABT-493) [US 8648037 (2014), US 20170088583 (2017), US 9220748 (2014), <https://newdrugapprovals.org/2016/10/05/glecaprevir-abt-493/>] или его аналоги.



Глекапревир (ABT-493)

Более предпочтительными являются капсулы или таблетки, содержащие фиксированные дозы активных веществ в весовом соотношении ингибитор формулы 1, или его кристаллическая или поликри-

сталлическая форма, или их фармацевтически приемлемая соль по настоящему изобретению: глекапревир от 1:4 до 1:1. Например, капсулы или таблетки содержат 300 мг ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению и 300 мг глекапревира; 120 мг ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению и 300 мг глекапревира; 40 мг ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению и 100 мг глекапревира.

Предметом настоящего изобретения является также способ лечения или профилактики заболевания, вызванного ВГС, включающий совместное введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, одного или более агентов, которые выбираются из группы, состоящей из иммуномодулятора хозяина и второго или более противовирусных агентов или их комбинации, с терапевтически эффективным количеством ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению или комбинации ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению. Примерами иммуномодулятора хозяина являются, но не ограничиваются ими, интерферон-альфа, пегилированный интерферон-альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма, цитокин, вакцина и вакцина, содержащая антиген и вспомогательное вещество, и указанное второе противовирусное средство ингибирует репликацию ВГС либо путем ингибирования функций клеток хозяина, ассоциированных с репликацией вируса, либо действием белков генома вируса. Неограничивающим примером РНК-содержащего вируса является вирус гепатита С (ВГС).

Еще одним вариантом осуществления настоящего изобретения является способ лечения или профилактики инфекционного заболевания, вызванного ВГС, включающий совместное введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, одного или более агентов, которые лечат или облегчают симптомы инфекции ВГС, включая цирроз и воспаление печени, с терапевтически эффективным количеством ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению.

Другие агенты, применяемые в сочетании с ингибитором формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формой, или с их фармацевтически приемлемой солью по настоящему изобретению, включают терапевтические средства для лечения заболеваний, обусловленных инфекцией ВГС, которые подавляют репликацию ВГС прямыми или косвенными механизмами. Эти агенты включают, но не ограничиваются ими, иммуномодуляторы хозяина (например, интерферон-альфа, пегилированный интерферон-альфа, консенсусный интерферон, интерферон-бета, интерферон-гамма, CpG-олигонуклеотиды и т.п.); противовирусные соединения, ингибирующие функции клеток хозяина, такие как инозинмонофосфат дегидрогеназа (например, рибавирин и т.п.); цитокины, модулирующие иммунную функцию (например, интерлейкин 2, интерлейкин 6 и интерлейкин 12); соединение, усиливающее развитие ответа Т-клетки хелпера первого типа; интерферирующая РНК; антисмысловая РНК; вакцины, содержащие антигены ВГС или комбинации антиген-адъювант, направленные против ВГС; и любой агент или комбинация агентов, которые ингибируют репликацию ВГС действием на другие белки вирусного генома, участвующие в репликации вируса, и/или влияют на функцию других вирусных мишеней, таких как ингибиторы протеазы NS3/NS4A, геликазы NS3, полимеразы NS5B, белка NS4A и белка NS5A.

Еще одним вариантом осуществления настоящего изобретения является способ лечения или профилактики заболевания, инфекционного ВГС, включающий совместное введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, одного или более агентов, предназначенных для лечения пациентов от заболевания, вызванного вирусом гепатита В (ВГВ), с терапевтически эффективным количеством ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению. Агент, предназначенный для лечения пациентов от заболевания, вызванного вирусом гепатита В (ВГВ), может представлять собой, например, но не ограничиваясь ими, L-дезокситимидин, адефовир, ламивудин или тенофовир или любую их комбинацию.

Еще одним вариантом осуществления настоящего изобретения является способ лечения или профилактики инфекционного заболевания, вызванного ВГС, включающий совместное введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, одного или более агентов, предназначенных для лечения пациентов от заболевания, вызванного вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), с терапевтически эффективным количеством ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению. Агент, предназначенный для лечения пациентов от заболевания, вызванного вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), может включать, но не ограничивается ими, ритонавир, лопинавир, индинавир, нелфинавир, саквинавир, ампренавир, атазана-вир, типранавир, ТМС-114, фосампренавир, зидовудин, ламивудин, диданозин, ставудин, тенофовир, зальцитабин, абакавир, эфавиренз, невирапин, делавирдин, ТМС-125, L-870812, S-1360, энфувиртид (Т-20) и Т-1249 или любую их комбинацию.

Может случиться так, что пациент может быть совместно заражен вирусом гепатита С и одним или несколькими другими вирусами, включая, но не ограничиваясь ими, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита А (ВГА) или вирус гепатита В (ВГВ). Таким образом, в настоящем изобретении

также рассматривается комбинированная терапия для лечения таких коинфекций путем совместного введения ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению с по меньшей мере одним ингибитором ВИЧ, ВГА или ВГВ.

Кроме того, настоящее изобретение предусматривает применение ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению и одного или нескольких агентов, выбранных из группы, состоящей из иммуномодулятора хозяина и одного или более дополнительных противовирусных агентов или их комбинации, для приготовления лекарственного средства для лечения инфекции, вызванной ВГС. Примерами иммуномодулятора хозяина являются, но не ограничиваются ими, интерферон-альфа, пегилированный интерферон-альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма, цитокин и вакцина. Предпочтительно, чтобы указанный дополнительный противовирусный агент ингибировал репликацию ВГС либо путем ингибирования функций клеток хозяина, ассоциированных с репликацией вируса, либо действием на белки генома вируса.

При использовании в вышеуказанных или других способах лечения ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению вместе с одним или несколькими агентами, как определено здесь выше, может быть использована в чистой форме или, если такие формы существуют, в виде их фармацевтически приемлемой соли. В альтернативном варианте такая комбинация терапевтических агентов может вводиться в виде фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению в сочетании с одним или несколькими агентами, как определено здесь выше, и фармацевтически приемлемым носителем. Такие фармацевтические композиции могут быть использованы для ингибирования ВГС путем контактирования указанного вируса с указанной фармацевтической композицией. Такие композиции пригодны для лечения или профилактики инфекционного заболевания ВГС.

Следовательно, еще одним вариантом осуществления изобретения является способ лечения или профилактики инфекционного заболевания, вызванного ВГС, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, фармацевтической композиции, содержащей ингибитор формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению и одного или более агентов, как определено здесь выше, с фармацевтически приемлемым носителем.

При введении в комбинации терапевтические агенты можно составлять в виде отдельных композиций, которые вводятся в одно и то же время или в течение заданного периода времени, или терапевтические агенты можно вводить в виде фиксированной дозированной лекарственной формы.

Противовирусные средства, предназначенные для использования в такой комбинированной терапии, включают в себя агенты (соединения или биологически активные вещества), которые являются эффективными для ингибирования формирования и/или репликации вируса у млекопитающего, включая, но не ограничиваясь ими, агенты, которые блокируют механизмы действия хозяина или вируса, необходимые для формирования и/или репликации вируса у млекопитающего. Такие агенты могут быть выбраны из другого анти-ВГС агента, ингибитора ВИЧ, ингибитора ВГА или ингибитора ВГВ.

Другие агенты, которые можно вводить в комбинации с ингибитором формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формой, или их фармацевтически приемлемой солью по настоящему изобретению, включают ингибитор цитохром Р450-зависимой монооксигеназы (здесь также упоминается как ингибитор СYP), ингибирующий, как ожидается, метаболизм заявленных здесь соединений. Следовательно, ингибитор цитохром Р450-зависимой монооксигеназы должен быть в количестве, эффективном для ингибирования метаболизма заявленных здесь соединений. Соответственно ингибитор СYP вводят в количестве, достаточном для увеличения биодоступности ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, когда биодоступность увеличивается по сравнению с биодоступностью в отсутствие ингибитора СYP.

В одном варианте осуществления изобретения предлагаются способы улучшения фармакокинетики ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению. Преимущества улучшения фармакокинетики лекарственных средств известны в данной области техники (см., например, US Patent App. № 2004/0091527; US 2004/0152625). Соответственно одним из вариантов осуществления данного изобретения является способ, включающий введение ингибитора СYP3A4 и ингибитора AV-4126 или его фармацевтически приемлемой соли.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является способ, включающий введение ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению и ингибитора изофермента 3A4 ("СYP3A4"), изофермента 2C19 ("СYP2C19"), изофермента 2D6 ("СYP2D6"), изофермента 1A2 ("СYP1A2"), изофермента

2С9 ("СУР2С9") или изофермента 2Е1 ("СУР2Е1"). В предпочтительном варианте ингибитор СУР предпочтительно ингибирует СУР3А4. Любой ингибитор СУР, который улучшает фармакокинетику ингибитора AV-4126 или его фармацевтически приемлемой соли, может быть использован в способе данного изобретения. Эти ингибиторы СУР включают, но не ограничиваются ими, ритонавир (см., например, WO 94/14436), кетоконазол, тролеандомицин, 4-метилпиразол, циклоспорин, клонетиазол, циметидин, итраконазол, флуконазол, миконазол, флувоксамин, флуоксетин, нефазодон, сертралин, индинавир, нелфинавир, ампренавир, фосампренавир, саквинавир, лопинавир, делавирдин, эритромицин, VX-944 и VX-497. Предпочтительные ингибиторы СУР включают ритонавир, кетоконазол, тролеандомицин, 4-метилпиразол, циклоспорин и клонетиазол.

Следует понимать, что комбинационное лечение в соответствии с настоящим изобретением проводится с использованием единичной упаковки или с использованием упаковок всех требуемых лекарственных форм, в каждой из которых содержится вкладыш с инструкцией по применению, обеспечивающей правильное использование пациентом изобретения, что является дополнительным достоинством настоящего изобретения.

Следующей особенностью изобретения является упаковка, содержащая минимум один ингибитор формулы 1, или его кристаллическую или поликристаллическую форму, или их фармацевтически приемлемую соль по настоящему изобретению и ингибитор СУР, а также информационный вкладыш, содержащий указания по применению комбинации препаратов по настоящему изобретению. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения упаковка дополнительно содержит один или несколько дополнительных агентов согласно настоящему описанию. Дополнительный агент или агенты могут быть либо вложены в общую упаковку, либо упакованы отдельно.

Другой аспект настоящего изобретения включает в себя упакованный набор для пациента, предназначенный для лечения или профилактики инфекции ВГС, который включает в себя: одну или более лекарственных форм каждого фармацевтического компонента; контейнер, в котором одна или несколько лекарственных форм хранятся до использования, и инструкции по применению лекарства в оптимальном режиме при лечении или профилактике заболеваний, обусловленных ВГС-инфекцией.

Соответственно данное изобретение предусматривает наборы для одновременного или последовательного введения ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению, при этом ингибитор СУР (и необязательно дополнительный агент) или его производные получают обычным способом. Как правило, такой набор будет содержать, например, композицию ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению и необязательно один или несколько дополнительных агентов в фармацевтически приемлемом носителе (и в виде одной или нескольких лекарственных форм), а также письменные инструкции по одновременному или последовательному введению.

В другом варианте осуществления изобретения предлагается набор в упаковке, куда входит одна или несколько лекарственных форм для самостоятельного введения; емкость, предпочтительно герметичная, для хранения лекарственных форм до использования; и инструкции по применению лекарства. Инструкции обычно представляют собой письменные указания на вкладыше, этикетке и/или других компонентах набора, а лекарственная форма или формы соответствуют настоящему описанию. Каждая лекарственная форма может помещаться в индивидуальную упаковку, например блистер, представляющий собой металлизированную пластиковую основу, заламинированную фольгой, где лекарственные формы упакованы по одной в ячейке или пузыре, или же лекарственные формы могут помещаться в общую емкость, например пластиковую тару. Кроме того, современные наборы обычно включают в себя средства для упаковки отдельных компонентов набора, таких как лекарственные формы, емкости и письменные инструкции по применению. Такие средства для упаковки могут представлять собой картонные или бумажные коробки, пластиковые саше или саше из фольги и т.д.

Определения

Ниже перечислены определения различных терминов, используемых для описания настоящего изобретения. Эти определения относятся к терминам, используемым по всему тексту описания и формулы настоящего изобретения, если в конкретных случаях не ограничено иначе как в отдельности, так и как часть более крупной группы.

"Активный компонент" (лекарственное вещество) означает физиологически активное соединение синтетического или иного (биотехнологического, растительного, животного, микробицидного и т.д.) происхождения, которое проявляет фармакологическую активность и является активным ингредиентом фармацевтической композиции, используемой в производстве.

"Лекарственное средство" означает соединение (или смесь соединений в виде фармацевтической композиции) и лекарственный препарат в виде таблеток, капсул, инъекций, мазей и других готовых форм, предназначенных для восстановления, улучшения или изменения физиологических функций у людей и животных, а также для лечения и профилактики заболеваний, для диагностики, анестезии, контрацепции, в косметологии и т.д.

"Терапевтический коктейль" представляет собой одновременно вводимую комбинацию из двух или

более лекарственных средств, проявляющих различный механизм фармакологического действия и направленных на различные биомишени, участвующие в процессе заболевания.

"Фармацевтическая композиция" означает композицию, включающую ингибитор AV-4126 или его фармацевтически приемлемую соль и как минимум один компонент, который выбирается из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых наполнителей, растворителей, разбавителей, носителей, вспомогательных средств, распределителей и вспомогательных веществ, средств доставки, таких как консерванты, стабилизаторы, наполнители, разрыхлители, увлажнители, эмульгаторы, суспендирующие агенты, загустители, подсластители, корригенты вкуса, ароматизаторы, антибактериальные агенты, фунгициды, смазывающие вещества и регуляторы пролонгированной доставки, выбор и соответствующие пропорции которых зависят от характера и способа введения и дозировки. Примерами подходящих суспендирующих агентов являются этоксилированный изостеариловый спирт, полиоксиэтен, сорбитол и сорбитоловый эфир, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также их смеси.

Защита от микроорганизмов может быть обеспечена различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, такими как, например, парабыны, хлорбутанол, сорбиновая кислота и подобными соединениями. Композиция может также содержать изотонические агенты, такие как, например, сахар, хлорид натрия и подобные соединения. Пролонгированный эффект композиции достигается с помощью агентов, замедляющих абсорбцию активного ингредиента, например, моностеаратом алюминия или желатином. Примеры подходящих носителей, растворителей, разбавителей и средств доставки, используемых для инъекций: вода, этанол, полиспирты и их смеси, натуральные масла (такие как оливковое масло) и органические сложные эфиры (таких как этилолеат). Примерами наполнителей являются лактоза, молочный сахар, цитрат натрия, карбонат кальция, фосфат кальция и т.п. Примерами разрыхлителей и распределителей являются крахмал, альгиновая кислота и ее соли и силикаты.

Примерами подходящих лубрикантов являются стеарат магния, лаурилсульфат натрия, тальк и полиэтиленгликоль с высокой молекулярной массой. Фармацевтическую композицию для перорального, сублингвального, трансдермального, внутримышечного, внутривенного, подкожного и местного или ректального способов введения активного ингредиента, отдельно или в комбинации с другим активным соединением, можно вводить людям и животным в стандартной лекарственной форме или в смеси с традиционными фармацевтическими носителями. Подходящие стандартные лекарственные формы включают пероральные формы, такие как таблетки, желатиновые капсулы, пилюли, порошки, гранулы, жевательные резинки и пероральные растворы или суспензии; сублингвальная и трансбуккальная формы; аэрозоли; импланты; местная, трансдермальная, подкожная, внутримышечная, внутривенная, интраназальная и интраокулярная формы, а также ректальная форма.

"Фармацевтически приемлемая соль" означает относительно нетоксичные, органические и неорганические соли кислот и оснований, раскрытые в настоящем изобретении. Соли можно приготовить *in situ* в процессе синтеза, выделения или очистки соединений или их можно приготовить специально. Фармацевтически приемлемые соли могут быть приготовлены из неорганических или органических кислот. Примеры подходящих неорганических кислот включают, но не ограничиваются ими, соляную, бромистоводородную, азотную, угольную, серную и фосфорную кислоты. Примеры подходящих органических кислот включают, но не ограничиваются ими, алифатические, циклоалифатические, ароматические, арилатические, гетероциклические, карбоксильные и сульфоновые классы органических кислот. Конкретные примеры подходящих органических кислот включают ацетат, трифторацетат, формиат, пропионат, сукцинат, гликолят, глюконат, диглюконат, лактат, малат, тартрат, цитрат, аскорбат, глюкуроонат, малеат, фумарат, пируват, аспарат, глутамат, бензоат, анранилат, мезилат, стеарат, салицилат, п-гидроксибензоат, фенилацетат, манделат, эмбонат (памоат), метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, пантотенат, толуолсульфонат, 2-гидроксиэтансульфонат, сульфанилат, циклогексиламиносульфонат, альгинат, оксибутират, галактарат, галактуронат, адипат, альгинат, бисульфат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропионат, додецилсульфат, гликогептаонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаонат, гексаноат, никотинат, 2-нафталинсульфонат, 1,5-нафталиндисульфат, оксалат, пальмоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, пикрат, пивалат, тиоцианат, тозилат и ундеканонат. Соединения или соли по настоящему изобретению могут существовать в виде сольватов, где в роли растворителя могут выступать вода (т.е. гидраты) или органические растворители (например, метанол, этанол или ацетонитрил, образующие, соответственно, метанолят, этанолят и ацетонитрилат). Подробное описание свойств таких солей приведено в статье Berge S.M. et al., *Pharmaceutical Salts*, J. Pharm. Set., 1977, 66, 1-19.

Ингибитор формулы 1 или его кристаллическая или поликристаллическая форма или их фармацевтически приемлемая соль по настоящему изобретению может также применяться в виде пролекарств.

Ингибитор формулы 1 или его кристаллическая или поликристаллическая форма или их фармацевтически приемлемая соль по настоящему изобретению может существовать в различных таутомерных формах. Ингибитор формулы 1 или его кристаллическая или поликристаллическая форма или их фармацевтически приемлемая соль по настоящему изобретению не ограничены каким-либо одним конкретным таутомером, а скорее охватывает все таутомерные формы. Ингибитор формулы 1 или его кристалличе-

ская или поликристаллическая форма или их фармацевтически приемлемая соль по настоящему изобретению могут существовать в различных стабильных конформационных формах, которые могут отделяться. Данное изобретение охватывает каждый конформационный изомер ингибитора формулы 1, или его кристаллической или поликристаллической формы, или их фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению.

Предполагается, что если ингибитор формулы 1, или его кристаллическая или поликристаллическая форма, или их фармацевтически приемлемая соль по настоящему изобретению существует в различных таутомерных формах, то это соединение охватывает все таутомерные формы.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает, что определяемое им существительное годится для применения в качестве фармацевтического продукта или в качестве части фармацевтического продукта.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к общему количеству каждого активного вещества, которое является достаточным для того, чтобы продемонстрировать значимую пользу для пациента, например снижение вирусной нагрузки.

Термин "пролекарство" относится к производным соединений по данному изобретению, которые имеют химически или метаболически отщепляемые группы и превращаются в результате реакции сольволиза или изменения физиологических условий в соединения по данному изобретению, которые являются фармацевтически активными *in vivo*. Пролекарство соединения может быть получено общепринятым способом реакцией функциональной группы соединения (такой как аминогруппа, гидроксигруппа или карбоксигруппа). Пролекарства часто имеют преимущества в растворимости, тканевой совместимости или замедленном высвобождении у млекопитающих (см. Bungard, H., *Design of products*, p. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam, 1985). Пролекарства включают производные кислот, хорошо известные практикующим специалистам в данной области техники, такие как, например, сложные эфиры, полученные взаимодействием исходного кислотного соединения с подходящим спиртом, или амиды, полученные взаимодействием исходного кислотного соединения с подходящим амином. Примеры пролекарств включают, но не ограничиваются ими, ацетат, формиат, бензоат или другие ацилированные производные спиртовых или аминных функциональных групп в соединениях по данному изобретению.

Термин "сольват" относится к физической ассоциации соединения по настоящему изобретению с одной или более молекулами органического или неорганического растворителя. Эта физическая ассоциация часто связана с образованием водородных связей. В определенных случаях сольват можно выделить, например, когда кристаллическая решетка кристаллического твердого вещества содержит одну или несколько молекул растворителя. Термин "сольват" включает в себя как растворы, так и выделяемые сольваты. Типичные сольваты включают, но не ограничиваются ими, гидраты, этаноляты и метаноляты.

Термин "N-защитная группа" или "N-защитная" относится к тем группам, которые способны защитить аминогруппу от нежелательных реакций. Общепринятые N-защитные группы описаны в книге Greene and Wuts, *PROTECTING GROUPS IN CHEMICAL SYNTHESIS* (3rd ed., John Wiley & Sons, NY (1999)). Неограничивающие примеры N-защитных групп включают ацильные группы, такие как формил, ацетил, пропионил, пивалоил, трет-бутилацетил, 2-хлорацетил, 2-бромацетил, трифторацетил, фталил, о-нитрофеноксиацетил, бензоил, 4-хлорбензоил, 4-бромбензоил или 4-нитробензоил; сульфонильные группы, такие как бензолсульфонил или *p*-толуолсульфонил; сульфенильные группы, такие как фенилсульфенил (фенил-S-) или трифенилметилсульфенил (тритил-S-); сульфинильные группы, такие как *p*-метилфенилсульфинил (*p*-метилфенил-S(O)-) или трет-бутилсульфинил (*t*-Bu-S(O)-); карбамат-образующие группы, такие как бензилоксикарбонил, *p*-хлорбензилоксикарбонил, *p*-метоксибензилоксикарбонил, *p*-нитробензил оксикарбонил, 2-нитробензилоксикарбонил, *p*-бромбензилоксикарбонил, 3,4-диметоксибензилоксикарбонил, 3,5-диметоксибензилоксикарбонил, 2,4-диметоксибензилоксикарбонил, 4-метоксибензилоксикарбонил, 2-нитро-4,5-диметоксибензилоксикарбонил, 3,4,5-триметоксибензилоксикарбонил, 1-(*p*-бифенилил)-1-метилэтоксикарбонил, диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонил, бензгидрилоксикарбонил, трет-бутилоксикарбонил, диизопропилметоксикарбонил, изопропилоксикарбонил, этоксикарбонил, метоксикарбонил, аллилоксикарбонил, 2,2,2-трихлор-этокси-карбонил, феноксикарбонил, 4-нитро-феноксикарбонил, циклопентилоксикарбонил, адамантилоксикарбонил, циклогексиллоксикарбонил или фенилтиокарбонил; алкильные группы, такие как бензил, *p*-метоксибензил, трифенилметил или бензилоксиметил; *p*-метоксифенил; и силильные группы, такие как триметилсилил. Предпочтительные N-защитные группы включают формил, ацетил, бензоил, пивалоил, трет-бутилацетил, фенилсульфонил, бензил, трет-бутилоксикарбонил (Boc) и бензилоксикарбонил (Cbz).

Представленные ниже примеры осуществления настоящего изобретения не предполагают ограничение его объема. Наоборот, настоящее изобретение охватывает все альтернативные варианты, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в объем формулы изобретения. Так, следующие примеры иллюстрируют одно практическое осуществление настоящего изобретения; при этом понимается, что примеры предназначены для иллюстрации некоторых вариантов осуществления и представлены как наиболее целесообразные и доступные для понимания описания его методик и концептуальных аспектов.

Лучший вариант осуществления изобретения

Данное изобретение иллюстрируется, но не ограничивается следующими примерами.

Пример 1. Синтез метил [(1S)-1-{(2S)-2-[5-(4'-{2-[(2S)-1-{(2S,3R)-3-метокси-2-[(метоксикарбонил)амино]бутаноил]пирролидин-2-ил]-1H-имидазол-5-ил} бифенил-4-ил)-1H-имидазол-2-ил]пирролидин-1-ил}-2-метилпропил]карбамата (1).

Вариант А. Смесь 1 экв. метил [(1S)-2-метил-1-{(2S)-2-[5-(4'-{2-[(2S)-пирролидин-2-ил]-1H-имидазол-5-ил} бифенил-4-ил)-1H-имидазол-2-ил]пирролидин-1-ил} карбонил]пропил]карбамата (2.1) или его тригидрохлорида (2.1·3HCl), 1 экв. N-метоксикарбонил-O-метил-L-треонина (3.1), 1,1 экв. HATU и соответственно 1 экв. или 4 экв. DIPEA в диметилформамиде перемешивают в холодильнике в течение 2 ч, диметилформамид отгоняют с о-ксилолом на роторном испарителе, остаток растворяют в дихлорметане, промывают 5%-ным раствором Na₂CO₃, упаривают в вакууме и методом ВЭЖХ выделяют целевой продукт 1.

Вариант Б. Смесь 1 экв. метил [(1S,2R)-2-метокси-1-{(2S)-2-[5-(4'-{2-[(2S)-пирролидин-2-ил]-1H-имидазол-5-ил} бифенил-4-ил)-1H-имидазол-2-ил]пирролидин-1-ил} карбонил]пропил]карбамата (2.2) или его тригидрохлорида (2.2·3HCl), 1 экв. N-метоксикарбонил-L-валина (3.2), 1,1 экв. HATU и соответственно 1 экв. или 4 экв. DIPEA в диметилформамиде перемешивают в холодильнике в течение 2 ч, диметилформамид отгоняют с о-ксилолом на роторном испарителе, остаток растворяют в дихлорметане, промывают 5%-ным раствором Na₂CO₃, упаривают в вакууме и методом ВЭЖХ выделяют целевой продукт 1, метил [(1S)-1-{(2S)-2-[5-(4'-{2-[(2S)-1-{(2S,3R)-3-метокси-2-[(метоксикарбонил)амино]бутаноил]пирролидин-2-ил]-1H-имидазол-5-ил} бифенил-4-ил)-1H-имидазол-2-ил]пирролидин-1-ил}-2-метилпропил]карбамат (1).

LC-MS (ESI) 771 (M+H)⁺.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 11.70-12.21 (m, 2H), 7.60-7.83 (m, 8.4H), 7.51 (s, 1.4H), 7.27 (m, 1.9H), 6.92 (m, 0.03H), 6.81 (m, 0.1H), 6.70 (d, J=7.6 Hz, 0.17H), 5.38 (m, 0.45H), 5.08 (m, 1.55H), 4.29 (m, 2H), 3.82 (m, 4H), 3.55 (s, 5H), 3.48 (m, 2H), 3.42 (s, 1H), 3.29 (s, 1H), 3.19 (s, 5H), 2.16 (m, 3H), 2.00 (m, 3H), 1.86 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.05-1.12 (m, 6H).

Пример 2. Приготовление фармацевтической композиции в форме капсул.

Метил [(1S)-1-{(2S)-2-[5-(4'-{2-[(2S)-1-{(2S,3R)-3-метокси-2-[(метоксикарбонил)амино]бутаноил]пирролидин-2-ил]-1H-имидазол-5-ил} бифенил-4-ил)-1H-имидазол-2-ил]пирролидин-1-ил}-2-метилпропил]карбамат дигидрохлорид (1·2HCl) и порошок лактозы тщательно смешивали в соотношении 2:1. Полученную порошкообразную смесь упаковывали в желатиновые капсулы подходящего размера по 60-300 мг в каждую.

Пример 3. Приготовление фармацевтической композиции в форме таблетки.

Крахмал (1600 мг), измельченную лактозу (1600 мг), тальк (400 мг) и метил [(1S)-1-{(2S)-2-[5-(4'-{2-[(2S)-1-{(2S,3R)-3-метокси-2-[(метоксикарбонил)амино]бутаноил]пирролидин-2-ил]-1H-имидазол-5-ил} бифенил-4-ил)-1H-имидазол-2-ил]пирролидин-1-ил}-2-метилпропил]карбамат дигидрохлорид (1·2HCl) (1000 мг) смешивали и спрессовывали в виде бруска. Брусок измельчали в гранулы и просеивали через сито, собирая гранулы размером 14-16 меш. Полученные таким образом гранулы таблетировали в таблетки подходящей формы весом по 115-230 мг.

Пример 4. Аналогично примеру 4 получают фармацевтическую композицию в форме таблетки, содержащей 400 мг ингибитора 1·2HCl и 400 мг H027-4289, или 200 мг 1·2HCl и 400 мг H027-4289, или 160 мг 1·2HCl и 400 мг H027-4289, или 80 мг 1·2HCl и 400 мг H027-4289, или 40 мг 1·2HCl и 200 мг H027-4289, или 40 мг 1·2HCl и 400 мг H027-4289.

Пример 5. Аналогично примеру 4 получают фармацевтическую композицию в форме таблетки, содержащей 400 мг ингибитора 1·2HCl и 400 мг софосбувира, или 200 мг 1·2HCl и 400 мг софосбувира, или 160 мг 1·2HCl и 400 мг софосбувира, или 80 мг 1·2HCl и 400 мг софосбувира, или 40 мг 1·2HCl и 200 мг софосбувира, или 40 мг 1·2HCl и 400 мг софосбувира.

Пример 6. Аналогично примеру 4 получают фармацевтическую композицию в форме таблетки, содержащей 300 мг ингибитора 1 и 300 мг глекапревира, 120 мг ингибитора 1 и 300 мг глекапревира, 40 мг ингибитора 1 и 100 мг глекапревира.

Пример 7. Анализ реплика ВГС использовали для определения противовирусной активности соединений общей формулы 2 (тестируемые соединения).

Линией тестируемых клеток, используемой в анализе реплика ВГС, была клеточная линия гепатомы человека Huh7, включающая репликоны ВГС, синтезированные внешним поставщиком. 96-луночные планшеты засеивали клетками с плотностью 7,5×10³ клеток на лунку в 50 мкл аналитической среды. Маточный исходный раствор был свежеприготовлен в среде для анализа (DMEM 1X; источник Cellgro; кат. № 10-013-CV) в виде 2X запаса. Всего было проведено 11 последовательных трехкратных разведений тестируемых соединений из 2X исходного материала в анализируемой среде в пределах от 20 нМ до 0,2 пМ. Спустя по меньшей мере 4 ч после высевания клеток начинают обработку соединением добавлением 50 мкл разведенного соединения в планшеты. Конечные концентрации соединения, таким образом, составляли от 10 нМ до 0,1 пМ при разбавлении 1:1 в культуральной среде. Конечная концентрация ДМСО составляла 0,5%. Клетки и ингибиторы инкубировали в течение 3 дней при 37°C/5% CO₂. Среду удаляли из пластин с помощью легкого постукивания. Клетки фиксировали 100 мкл 1:1 ацетон:метанол в

течение минуты, промывали три раза буфером PBS и затем блокировали 150 мкл/лунку 10%-ной фетальной бычьей сыворотки (FBS) в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки промывали три раза буфером PBS и инкубировали с 100 мкл/лунку моноклональными антителами к кор-антигену ВГС (Affinity BioReagents, кат. #MA1-080, 1 мг/мл, разбавленный 1:4000 в 10% FBS-PBS) в течение 2 ч при 37°C. Затем клетки трижды промывали PBS и инкубировали с 100 мкл/лунку с антителами козы к иммуноглобулинам мыши (конъюгированными с пероксидазой хрена, разведенный 1:3500 в 10%-ной FBS-PBS) в течение 1 ч при 37°C. Затем клетки трижды промывали PBS и обрабатывали раствором OPD, 100 мкл/лунку (1 таблетка ОПД+12 мл цитрат/фосфатного буфера+5 мкл 30% H₂O₂ на пластину) 30 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали с помощью 2 N H₂SO₄ (100 мкл/лунку) и измеряли оптическую плотность при А490 X на многоканальном спектрофотометре Victor³ V 1420 (Perkin Elmer). Значения ЕС₅₀ для всех тестируемых соединений определяли с использованием программного обеспечения XLfit 4.1 (табл. 2).

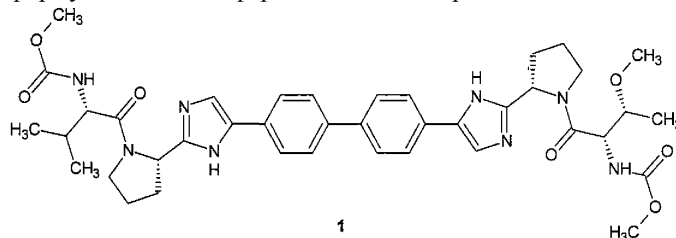
Цитотоксичность исследуемых соединений изучали параллельно, используя ту же клеточную линию Huh7. Жизнеспособность клеток определяли с использованием набора ATPLite (Perkin-Elmer, Бостон, США) в соответствии с инструкциями производителя. 96-луночные черные планшеты с прозрачным дном засеивали клетками с плотностью 7,5×10³ клеток на лунку в 50 мкл среды. Спустя 18 ч начинают обработку соединениями, добавляя 50 мкл разведенного соединения в планшеты. Каждое разбавление соединения тестировали в трех повторностях. Затем клетки и ингибиторы инкубировали в течение 96 ч при 37°C/5% CO₂. Планшеты дважды промывали PBS (0,2 мл/лунку) и затем лизировали добавлением лизирующего буфера, 0,05 мл/лунку (все реагенты входят в комплект ATPLite). После качания в течение 5 мин на качающейся платформе добавляли буфер для субстрата (0,05 мл/лунку). После дополнительной 5-минутной инкубации планшеты выдерживали в темноте в течение 10 мин и измеряли люминесценцию с использованием TopCount NXT (Packard, Perkin Elmer). Значения СС₅₀ для всех тестируемых соединений определяли с использованием программного обеспечения XLfit 4.1. Получены следующие значения для нового ингибитора 1·2HCl СС₅₀>10000 нМ.

Промышленная применимость

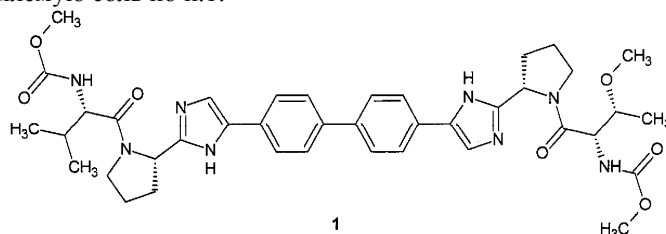
Настоящее изобретение может применяться в медицине, ветеринарии, биохимии.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

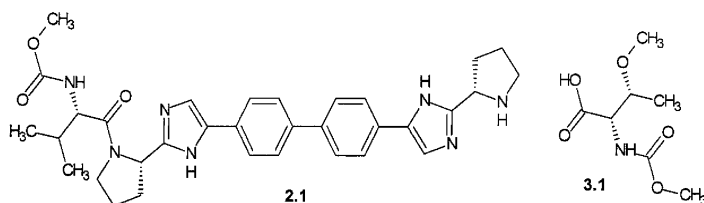
1. Метил [(1S)-1-{(2S)-2-[5-(4'-{2-[(2S)-1-{(2S,3R)-3-метокси-2-[(метоксикарбонил)амино]бута-ноил} пирролидин-2-ил]-1H-имидазол-5-ил} бифенил-4-ил)-1H-имидазол-2-ил]пирролидин-1-ил}-2-метилпропил]карбамат формулы 1 или его фармацевтически приемлемая соль.



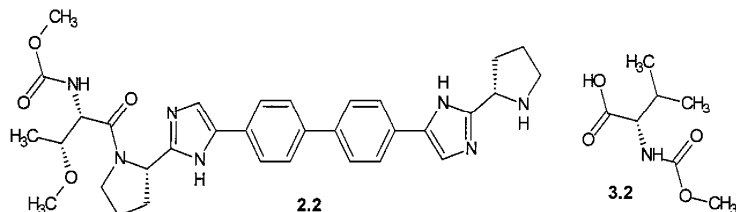
2. Пангенотипичный ингибитор NS5A ВГС, представляющий собой метил [(1S)-1-{(2S)-2-[5-(4'-{2-[(2S)-1-{(2S,3R)-3-метокси-2-[(метоксикарбонил)амино]бута-ноил} пирролидин-2-ил]-1H-имидазол-5-ил} бифенил-4-ил)-1H-имидазол-2-ил]пирролидин-1-ил}-2-метилпропил]карбамат формулы 1 или его фармацевтически приемлемую соль по п.1.



3. Способ получения соединения формулы 1 по п.1 или 2 ацилированием метил [(1S)-2-метил-1-{(2S)-2-[5-(4'-{2-[(2S)-пирролидин-2-ил]-1H-имидазол-5-ил} бифенил-4-ил)-1H-имидазол-2-ил]пирролидин-1-ил} карбонил]пропил]карбамата (2.1) N-метоксикарбонил-O-метил-L-треонином (3.1) в диметилформамиде в присутствии HATU и DIPEA.



4. Способ получения соединения формулы 1 по п.1 или 2 ацилированием метил [(1S,2R)-2-метокси-1-({(2S)-2-[5-(4'-{2-[(2S)-пирролидин-2-ил]-1H-имидазол-5-ил} бифенил-4-ил)-1H-имидазол-2-ил]пирролидин-1-ил} карбонил)пропил]карбамата (2.2) N-метоксикарбонил-L-валином (3.2) в диметилформамиде в присутствии NATU и DIPEA.



5. Фармацевтическая композиция, обладающая свойствами пангенотипичного ингибитора NS5A ВГС, содержащая в терапевтически эффективном количестве соединение формулы 1 или его фармацевтически приемлемую соль по п.1 или 2 в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем и/или вспомогательным веществом.

6. Фармацевтическая композиция по п.5, выполненная в форме таблетки или капсулы.

7. Фармацевтическая композиция по п.5 или 6, дополнительно включающая агент, выбранный из ингибитора протеазы NS3/NS4A ВГС, ингибитора геликазы NS3 ВГС и ингибитора полимеразы NS5B ВГС.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, содержащая соединение HO27-4289 или софосбувир в качестве ингибиторов полимеразы NS5B или глекапревир в качестве ингибитора протеазы NS3/NS4A.

9. Способ лечения или профилактики инфекционных заболеваний, вызванных вирусом гепатита С, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества соединения формулы 1 или его фармацевтически приемлемой соли по п.1 или 2 или фармацевтической композиции по любому из пп.5-8.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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