

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192824 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.25(51) Int. Cl. C07F 9/6558 (2006.01)
A61K 31/662 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.04.01

(54) СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ COVID-19

(31) 63/005,407; 63/038,454; 63/061,628;
63/065,658; 63/073,145; 63/114,289;
63/163,635(32) 2020.04.05; 2020.06.12; 2020.08.05;
2020.08.14; 2020.09.01; 2020.11.16;
2021.03.19

(33) US

(86) PCT/IB2021/052741

(87) WO 2021/205298 2021.10.11

(71) Заявитель:
ПФАЙЗЕР ИНК. (US)

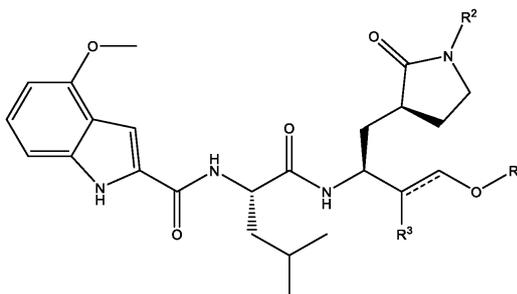
(72) Изобретатель:

Безавада Падмавани (US), Хокинг
Эмма Луиза (GB), Хоффман Роберт
Луис, Джайни Рохит, Каниа Роберт
Стивен, Кулкарни Самир (US),
Лиллис Джонатан Ричард (GB),
Лутра Суман, О'Брайен Ларамы
Мэтью Натан, Оуэн Дэвид Рис (US),
Пенчева Климентина Димитрова
(GB), Петтерссон Мартин Юнджин,
Ране Анил Махадео, Сэммонс Мэтью
Форрест, Салливан Брэдли Пол, Тиль
Эндрю Джон (US), Тайсхерст Мартин
Дэвид (GB), Таттл Джеймисон Брайс
(US)

(74) Представитель:

Суяндукров М.Ж. (KZ)

(57) Изобретение относится к соединениям формулы I



в которых R^1 , R^2 и ----- являются такими, как определяется в настоящем документе, фармацевтическим композициям, содержащим соединения, и способам лечения COVID-19 у пациента путем введения терапевтически эффективных количеств соединений и способам ингибирования или предупреждения репликации SARS-CoV-2 соединения.

A1

202192824

202192824

A1

202192824

A1



IV

202192824
478261707

СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ COVID-19

Предпосылки создания изобретения

Изобретение относится к соединениям и способам ингибирования активности относительно репликации вируса, включающего контактирование 3С-подобной (“3CL”) протеиназы, связанной с SARS-Cov-2 с терапевтически эффективным количеством ингибитора 3С-подобной протеазы, связанной с SARS-Cov-2. Изобретение также относится к способам лечения коронавирусного заболевания 2019 (COVID-19) у пациента путем введения терапевтически эффективного количества ингибитора 3С-подобной протеазы, связанной с SARS-Cov-2, пациенту, который в этом нуждается. Изобретение, кроме того, касается способов лечения COVID-19 у пациента, при этом способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибитора 3С-подобной протеазы, связанной с SARS-Cov-2, пациенту, который в этом нуждается.

Во всем мире вспышка коронавирусного заболевания 2019 (COVID-19) была связана с заражением, возникшим в конце 2019 года в Ухане, провинция Хубэй, Китай (Wuhan, Hubei Province, China). К середине 2020 года вспышка COVID-19 переросла в глобальную пандемию: миллионы людей были подтверждены как инфицированные и, что в результате привело к 50000 смертям и на март 2021 года зафиксировано более 1,5 миллиона смертей во всем мире. Возбудитель заболевания COVID-19 был идентифицирован как новый коронавирус, получивший название как тяжелый острый респираторный синдром, коронавирус 2 (SARS-CoV-2). Геномная последовательность SARS-CoV-2 была секвенирована из изолятов, полученных от девяти пациентов в Ухане, Китай (Wuhan, China) и, как было установлено, относится к подроду Sarbecovirus рода Betacoronavirus. Lu, R. et al. The Lancet, January 29, 2020; [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)). Последовательность SARS-CoV-2, как было установлено, имеет гомологичность 88% с двумя SARS-подобными коронавирусами, произошедшими от летучих мышей, bat-SL-CoVZC45 и bat-SL-CoVZXC21, собранными в 2018 году в Чжоушане (Zhoushan) , восточный Китай. SARS-CoV-2, как также было обнаружено, разделяет примерно 79% гомологичности с тяжелым острым респираторным синдромом коронавируса (“SARS-CoV”), возбудитель заболевания SARS, вспыхнувший в 2002-2003, и примерно 50% гомологичности с коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома (“MERS-CoV”), возбудитель респираторного вирусного заболевания, вспышка которого возникла на Ближнем Востоке в 2012 году. На основе недавнего анализа 103 секвенированных геномов SARS-CoV-2 было предположено, что SARS-CoV-2 может быть разделен на два основных типа (типы L и S), при этом S-тип является анцестральным, тогда как тип L

развился из S- типа. Lu, J.; Cui, J. et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2; *National Science Review*, 7(6), June 2020, 1012-1023, <http://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>. S- и L-типы могут быть четко определены только двумя тесно связанными SNP в положениях 8782 (*orf1ab*:T8517C, синоним) и 28144 (*ORF8*: C251T, S84L). В 103 проанализированных геномах примерно 70% были L-типа, и примерно 30% были S-типа. Неясно, если произошла эволюция L-типа от S-типа у людей или через зоонозный промежуточный продукт, но оказывается, что L-тип более агрессивен, чем S-тип, и вмешательство человека в попытки сдержать вспышку могут изменить относительную распространенность L- и S-типов вскоре после начала вспышки SARS-CoV-2. Открытие предложенных S- и L-подтипов SARS-CoV-2 повышает вероятность того, что индивидуум может быть инфицирован отдельными подтипами последовательно или инфицирован обоими подтипами одновременно. Учитывая такую развивающуюся угрозу, в данной области существует острая потребность в эффективном лечении COVID-19 и в способах ингибирования репликации коронавируса SARS-CoV-2.

Последние данные четко показывают, что недавно появившийся коронавирус SARS-CoV-2, возбудитель COVID-19 (Центры контроля заболеваний (Centers for Disease Control), CDC), приобрел способность передаваться от человека к человеку, что приводит к распространению вируса в общине. Последовательность домена, связывающего рецептор SARS-CoV-2 ("RBD"), включая его рецептор-связывающий мотив (RBM), непосредственно контактирующий с рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2, ACE2, который похож на RBD и RBM SARS-CoV, что уверенно свидетельствует о том, что SARS-CoV-2 использует ACE2 в качестве его рецептора. Yushun Wan, Y.; Shang, J.; Graham, R.; Baric, R.S.; Li, F.; Рецептора recognition by the novel coronavirus from Wuhan: An анализ based on decade-long structural studies of SARS coronavirus; *J. Virol.* 2020; doi:10.1128/JVI.00127-20. Несколько критических остатков в SARS-CoV-2 RBM (в частности, Gln493) обеспечивают благоприятное взаимодействие с ACE2 человека, что соответствует способности SARS-CoV-2 к инфицированию клеток человека. Несколько других критических остатков в RBM SARS-CoV-2 (в частности, Asn⁵⁰¹) совместимы с, но не идеальны для связывания ACE2 человека, что свидетельствует о том, что SARS-CoV-2 использует связывание ACE2 в определенной способности для передачи от человека к человеку.

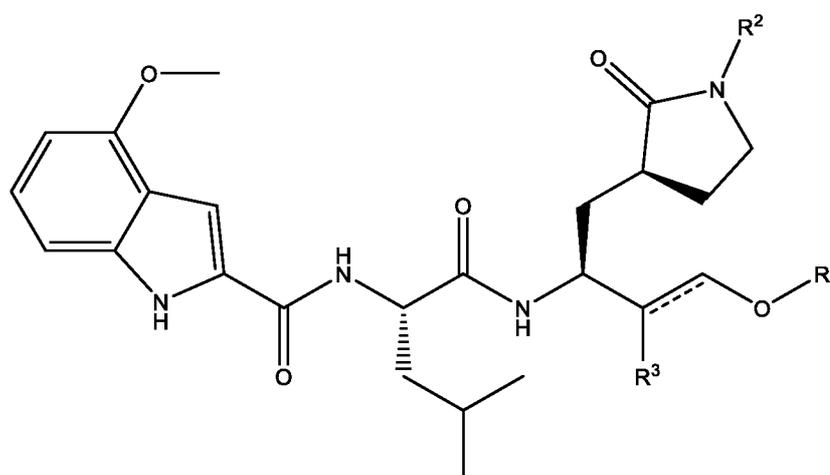
Функция репликации и транскрипции коронавируса кодируется так называемым геном репликазы. (Ziebuhr, J., Snijder, E.J., and Gorbalenya, A.E.; Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the *Nidovirales*. *J. Gen. Virol.* 2000, 81, 853-879; and Fehr, A.R.; Perlman, S.; Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis, *Methods Mol.*

Biol. 2015; 1282: 1–23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1), который состоит из двух перекрывающихся полипротеинов, интенсивно обрабатываемых вирусными протеазами. С-проксимальный участок обрабатывается на одиннадцати консервативных междоменных соединениях основной или 3С-подобной протеазой коронавируса (Ziebuhr, Snijder, Gorbalenya, 2000 and Fehr, Perlman et al., 2015). Название «3С-подобная» протеаза происходит от определенного сходства между ферментом коронавируса и хорошо известными 3С-протеазами пикорнавируса. Они включают преимущества субстратов, использование цистеина в качестве нуклеофила активного центра в катализе и сходство в их предполагаемых общих полипептидных складках. Последовательность 3CL-протеазы SARS-CoV-2 (номер доступа No. YP_009725301.1), как было установлено, имеет гомологичность 96,08% при сравнении с 3CL-протеазой SARS-CoV (номер доступа No. YP_009725301.1). Xu, J.; Zhao, S.; Teng, T.; Abdalla, A.E.; Zhu, W.; Xie, L.; Wang, Y.; Guo, X.; Systematic Comparison of Two Animal-to-Human Transmitted Human Coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV; Viruses 2020, 12, 244; doi:10.3390/v12020244. Совсем недавно, Hilgenfeld и его коллеги опубликовали рентгеновскую структуру высокого разрешения основной протеазы коронавируса SARS-CoV-2 (3CL) Zhang, L.; Lin, D.; Sun, X.; Rox, K.; Hilgenfeld, R.; X-ray Structure of Main Protease of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Enables Design of α -Ketoamide Inhibitors; bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.952879>. Структура указывает, что существуют отличия при сравнении 3CL-протеаз SARS-CoV-2 и SARS-CoV. В SARS-CoV, но не в димерных 3CL-протеазах SARS-CoV-2, существует полярное взаимодействие между двумя доменами III с участием 2,60-Å водородной связи между гидроксильными группами боковой цепи остатка Thr²⁸⁵ каждого протомера и поддерживается гидрофобным контактом между боковой цепью Ile²⁸⁶ и Thr²⁸⁵ C α 2. В SARS-CoV-2 3CL, треонин заменяется на аланин, и изолейцин на лейцин по сравнению с теми же остатками SARS-CoV 3CL. Замещение Thr²⁸⁵Ala, наблюдаемое в протеазе SARS-CoV-2 3CL, позволяет двум доменам III приблизиться друг к другу несколько ближе (расстояние между атомами С остатков 285 в молекулах А и В составляет 6,77 Å в 3CL-протеазе SARS-CoV и 5,21 Å в 3CL-протеазе SARS-CoV-2 3CL и расстояние между центрами масс двух доменов III уменьшается с 33,4 Å до 32,1 Å). В активном сайте SARS-CoV-2 3CL, Cys¹⁴⁵ и His⁴¹ образуют каталитическую диаду, которая вместе со скрытой молекулой воды, которая связана за счет водорода из His⁴¹, как может считаться, формирует каталитическую триаду 3CL-протеазы SARS-CoV-2. Учитывая продолжающееся распространение SARS-CoV-2, вызвавшее нынешнюю мировую вспышку COVID-19, желательно иметь новые способы ингибирования репликации вируса SARS-CoV-2 и лечения COVID-19 у пациентов.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение предусматривает новые соединения, действующие на ингибирование или предупреждение репликации вируса SARS-Cov-2 и, таким образом, приемлемые в лечении COVID-19. Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции, содержащие соединения, и способы лечения COVID-19 и ингибирования репликации вируса SARS-Cov-2 путем введения соединений по изобретению или фармацевтических композиций, содержащих соединения по изобретению.

Первый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение формулы I.

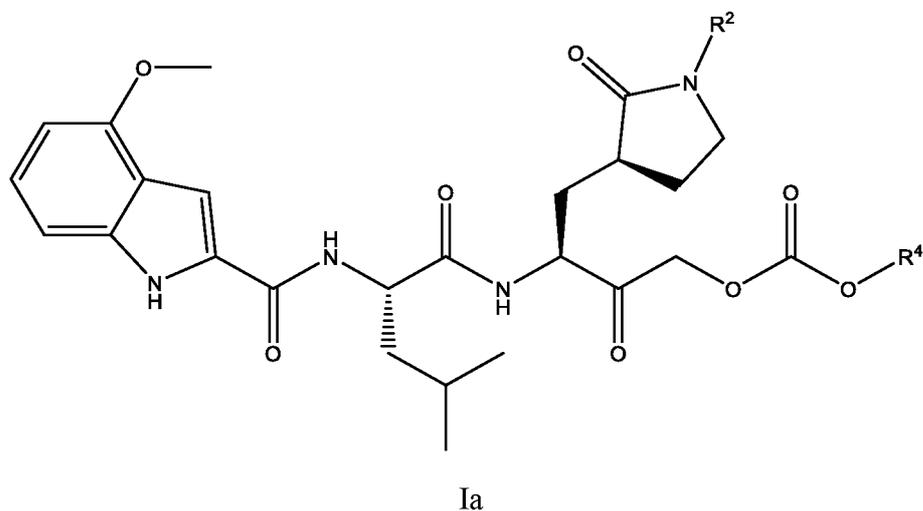


I,

в котором ----- отсутствует или представляет собой связь; R^1 выбирают из группы, состоящей из $-\text{CH}(\text{R}^{4a})-\text{OC}(\text{O})\text{R}^4$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$, $-\text{CH}(\text{R}^{4a})-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^4$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{C}_1-\text{C}_6\text{алкил})(\text{OR}^5)$ и $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^6)_2$; R^2 выбирают из группы, состоящей из водорода, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^7$, $-\text{CO}_2\text{R}^7$ и $-\text{C}_1-\text{C}_6\text{алкил}-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^7$; и когда R^2 представляет собой $-\text{C}(\text{O})\text{R}^7$, $-\text{CO}_2\text{R}^7$ или $-\text{C}_1-\text{C}_6\text{алкил}-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^7$; то R^1 выбирают из группы, состоящей из водорода, $-\text{CH}(\text{R}^{4a})-\text{OC}(\text{O})\text{R}^4$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$, $-\text{CH}(\text{R}^{4a})-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^4$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{C}_1-\text{C}_6\text{алкил})(\text{OR}^5)$ и $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^6)_2$; R^3 представляет собой оксо, когда ----- отсутствует, или когда ----- представляет собой связь, R^3 взятые вместе с R^1 и кислородом, к которому R^1 является присоединенным, представляют собой $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$; R^4 и R^7 каждый независимо выбирают из группы, состоящей из $\text{C}_1-\text{C}_6\text{алкила}$, незамещенного или замещенного от одного до трех R^8 , $\text{C}_3-\text{C}_7\text{циклоалкила}$, незамещенного или замещенного от одного до трех R^8 , $\text{C}_5-\text{C}_{12}\text{бициклоалкила}$, незамещенного или замещенного от одного до трех R^8 , от четырех до семи членного гетероциклоалкила, содержащего от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S, и который является незамещенным или замещенным от одного до трех R^8 , $\text{C}_6-\text{C}_{10}\text{арила}$, незамещенного или замещенного от одного до трех R^8 ,

и от пяти- до десятичленного гетероарила, содержащего от одного до четырех гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S, который является незамещенным или замещенным от одного до трех R⁸; R^{4a} представляет собой водород или C₁-C₆алкил; R⁵ в каждом случае независимо представляет собой водород или C₁-C₆алкил; или обе R⁵ группы, взятые вместе, представляют собой C₂-C₄алкилен, являющийся необязательно замещенным фенилом; R⁶, в каждом случае, является независимо выбранным из водорода и C₁-C₆алкила, который незамещен или замещен от одного до трех R⁸; или обе R⁶ группы, взятые вместе с азотом, к которому они являются присоединенными, представляют собой от четырех до семичленного гетероциклоалкила, который необязательно содержит дополнительные от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S; при этом указанный гетероциклоалкил незамещен или замещен от одного до трех R⁸; и R⁸, в каждом случае, является независимо выбранным из галогена, гидроксид, циано, C₁-C₃алкила, C₁-C₃алкокси, C₁-C₃алкоксиC₁-C₃алкила, C₃-C₆циклоалкила, C₃-C₆циклоалкокси, ди(C₁-C₃алкил)амино, (C₁-C₃алкил)амино, амино, ди(C₁-C₃алкил)амино-C₁-C₃алкила, (C₁-C₃алкил)амино-C₁-C₃алкила, амино- C₁-C₃алкила и от четырех до семи членного гетероциклоалкила, содержащего от одного до трех гетероатов независимо выбранных из N, O и S; или его фармацевтически приемлемую соль.

Второй вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по первому варианту осуществления первого аспекта формулы Ia.

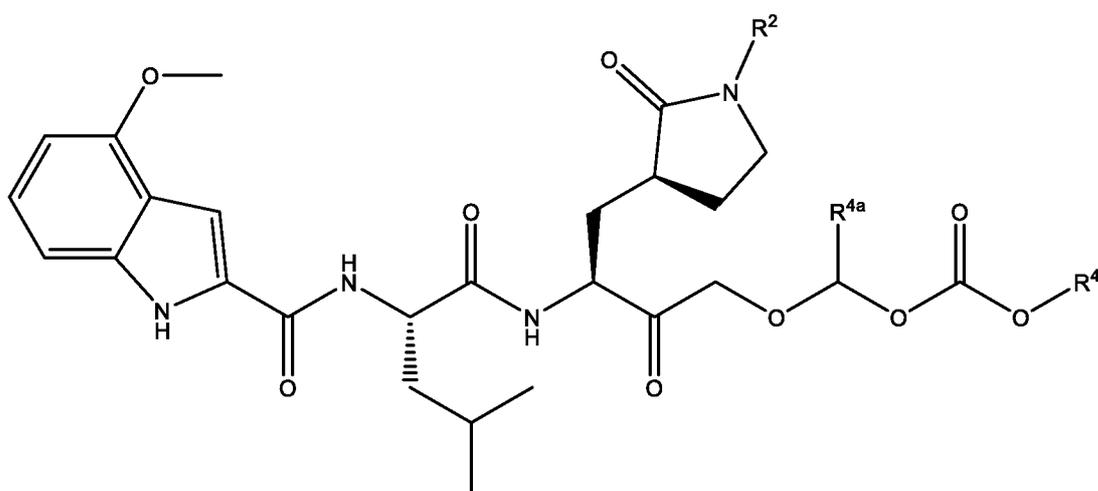


или его фармацевтически приемлемую соль.

Третий вариант осуществления первого аспекта представленного изобретения представляет собой соединение по второму варианту осуществления первого аспекта, в котором R² выбирают из группы, состоящей из водорода, -C(O)OCH₃, -C(O)OC(CH₃)₃, -CH(CH₃)OC(O)OCH₃; и -CH₂OC(O)OCH₃; и R⁴ выбирают из группы, состоящей из метила, этила, изопропила и трет-бутила; или его фармацевтически приемлемой соли. Четвертый

вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по третьему варианту осуществления первого аспекта, в котором R² представляет собой водород; или ее фармацевтически приемлемую соль. Пятый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по третьему варианту осуществления первого аспекта, которое выбирают из группы, состоящей из: (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилметилкарбоната; (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилпропан-2-илкарбоната; (3*S*)-4-[(3*S*)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксобутилметилкарбоната; (3*S*)-4-[(3*S*)-1-[(1*S*)-1-[(метоксикарбонил)окси]этил]-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксобутилметилкарбоната; этил (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилкарбоната; метил (3*S*)-3-[(2*S*)-4-[(метоксикарбонил)окси]-2-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилата; *трет*-бутил (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилкарбоната; и *трет*-бутил (3*S*)-3-[(2*S*)-4-[(*трет*-бутоксикарбонил)окси]-2-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилата; или его фармацевтически приемлемую соль.

Шестой вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по первому варианту осуществления первого аспекта формулы Ib.



Ib

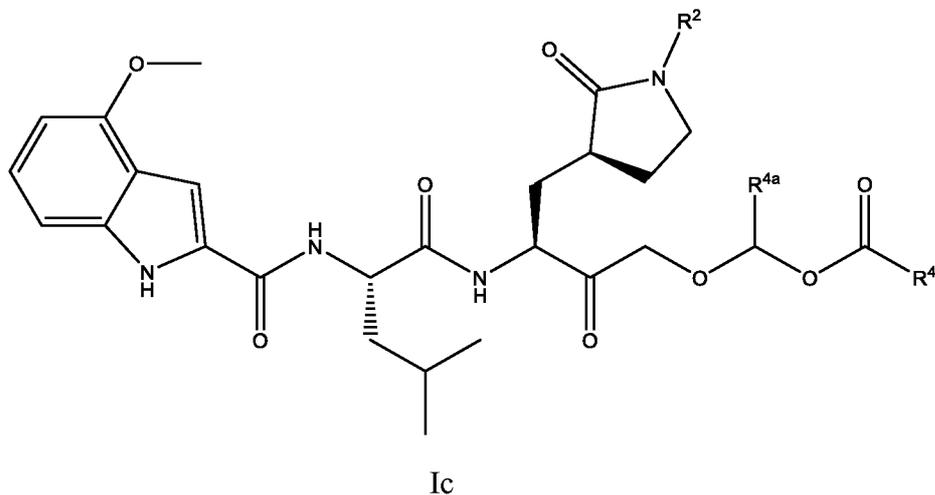
или его фармацевтически приемлемую соль.

Седьмой вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по шестому варианту осуществления первого аспекта, в котором R² выбирают из группы, состоящей из водорода, -C(O)CH₃, -CO₂CH₃, -CH₂OC(O)OCH₃ и -CH(CH₃)OC(O)OCH₃; R⁴ выбирают из группы, состоящей из метила, этила, изопропила и *трет*-бутила; и R^{4a} выбирают из группы, состоящей из водорода, метила и этила; или его фармацевтически приемлемой соли.

Восьмой вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по шестому варианту осуществления первого аспекта, которое выбирают из группы, состоящей из (1R)-1-((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)этил метилкарбоната; (1R)-1-((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)этилпропан-2-илкарбоната; (1R)-1-((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)пропилметил-карбоната; (1R)-1-((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)пропилпропан-2-илкарбоната; ((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)метилметилкарбоната; ((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)метилпропан-2-илкарбоната; этил (1R)-1-((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)этилкарбоната; этил (1R)-1-((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)пропил-карбоната; этил ((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)метилкарбоната; метил (3S)-3-[(2S)-4-{{(метоксикарбонил)окси}метокси}-2-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилата; *трет*-бутил (1R)-1-((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)этилкарбоната; *трет*-бутил (1R)-1-((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)пропилкарбоната; *трет*-бутил ((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)метилкарбоната; ((3S)-3-[(2S)-4-{{(метоксикарбонил)окси}метокси}-2-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-ил} метилметилкарбоната; {{(3S)-4-[(3S)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({N-[(4-метокси-1H-

индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутил]окси}метилметилкарбоната; и
 {[(3S)-4-[(3S)-1-{(1R)-1-[(метоксикарбонил)окси]этил}-2-оксопиролидин-3-ил]-3-({N-[(4-
 метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутил]окси}метилметил-
 карбоната; или его фармацевтически приемлемой соли.

Девятый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по первому варианту осуществления первого аспекта формулы Ic.



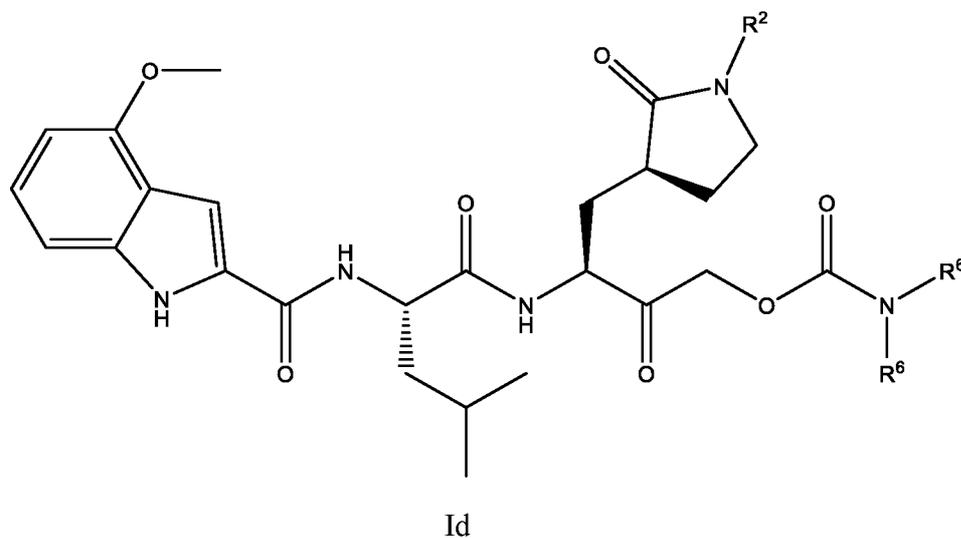
или его фармацевтически приемлемую соль.

Десятый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по девятому варианту осуществления первого аспекта, в котором R² выбирают из группы, состоящей из водорода, -C(O)CH₃, -CO₂CH₃, -CH₂OC(O)OCH₃ и -CH(CH₃)OC(O)OCH₃; R⁴ выбирают из группы, состоящей из 1-амино-2-метилпропила, (диметиламино)метила, этила, изопропила, трет-бутила и 2,6-диметилфенила; и R^{4a} выбирают из группы, состоящей из водорода, метила и этила; или его фармацевтически приемлемую соль.

Одиннадцатый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по девятому варианту осуществления первого аспекта, которое выбирают из группы, состоящей из (1R)-1-({(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопиролидин-3-ил]бутил}окси)этил 2,2-диметилпропаноата; (1S)-1-({(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопиролидин-3-ил]бутил}окси)этил 2-метилпропаноата; (1S)-1-({(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопиролидин-3-ил]бутил}окси)этилпропаноата; (1S)-1-({(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопиролидин-3-ил]бутил}окси)пропил 2,2-диметилпропаноата; (1S)-1-({(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопиролидин-3-

ил]бутил}окси)пропил 2,2-диметилпропаноата; (1S)-1-((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)пропил 2-метилпропаноату; (1S)-1-((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)пропилпропаноата; ((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)метил 2,2-диметилпропаноату; ((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)метил 2,6-диметилбензоата; ((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)метил 2-метилпропаноата; ((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)метил D-валината; ((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)метил N,N-диметилглицината; ((3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил}окси)метилпропаноата; метил (3S)-3-((2S)-2-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксо-4-[(пропанойлокси)метокси]бутил}-2-оксопирролидин-1-карбоксилата; {[(3S)-4-[(3S)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутил]окси} метил пропаноата; и {[(3S)-4-[(3S)-1-((1S)-1-[(метоксикарбонил)окси]этил)-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутил]окси} метил пропаноата; или его фармацевтически приемлемую соль.

Двенадцатый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по первому варианту осуществления первого аспекта формулы Id.

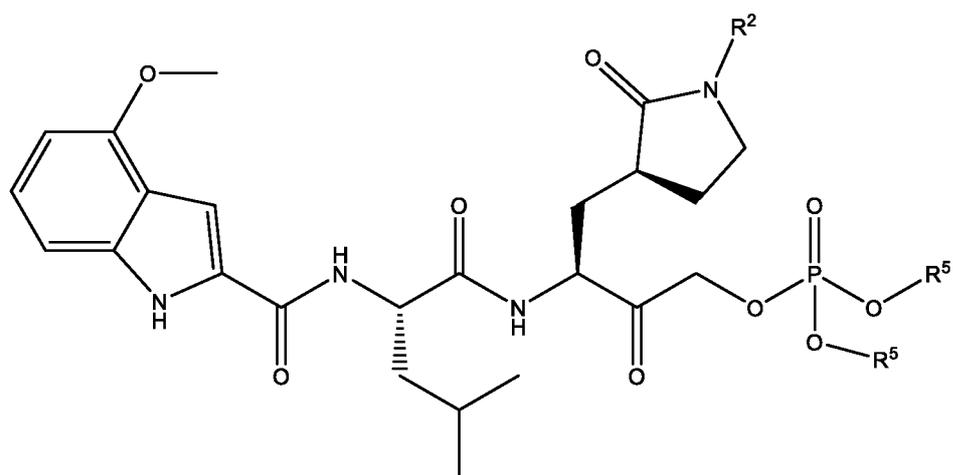


или его фармацевтически приемлемую соль.

Тринадцатый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по пункту 12, в котором R^2 выбирают из группы, состоящей из водорода, $-C(O)CH_3$, $-CO_2CH_3$, $-CH_2OC(O)OCH_3$ и $-CH(CH_3)OC(O)OCH_3$; каждый R^6 является независимо выбранным из водорода, метила, (диметиламино)метила, (диметиламино)этила; или обе группы R^6 , взятые вместе с азотом, к которому они являются присоединенными, представляют собой пиперидиновое кольцо, которое является незамещенным или замещенным пиперидинилом; или его фармацевтически приемлемую соль.

Четырнадцатый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по тринадцатому варианту осуществления первого аспекта, которое выбирают из группы, состоящей из (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил 1,4'-бипиперидин-1'-карбоксилата; (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил [2-(диметиламино)этил]карбамата; (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил [2-(диметиламино)этил]-метилкарбамата; (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилпиперидин-1-карбоксилата; (3S)-4-[(3S)-1-(метоксикарбонил)-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутилпиперидин-1-карбоксилата; (3S)-4-[(3S)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутилпиперидин-1-карбоксилата; и (3S)-4-[(3S)-1-((1S)-1-[(метоксикарбонил)окси]этил)-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутилпиперидин-1-карбоксилата; или его фармацевтически приемлемую соль.

Пятнадцатый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по пункту 1 формулы Ie.



1e

или его фармацевтически приемлемую соль.

Шестнадцатый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по пятнадцатому варианту осуществления первого аспекта, в котором R^2 выбирают из группы, состоящей из водорода, $-C(O)CH_3$, $-CO_2CH_3$, $-CH_2OC(O)OCH_3$ и $-CH(CH_3)OC(O)OCH_3$; и R^5 в каждом случае независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила, изопропила и трет-бутила; или обе R^5 группы, взятые вместе, представляют собой $-CH(Фенил)CH_2CH_2-$; или его фармацевтически приемлемую соль.

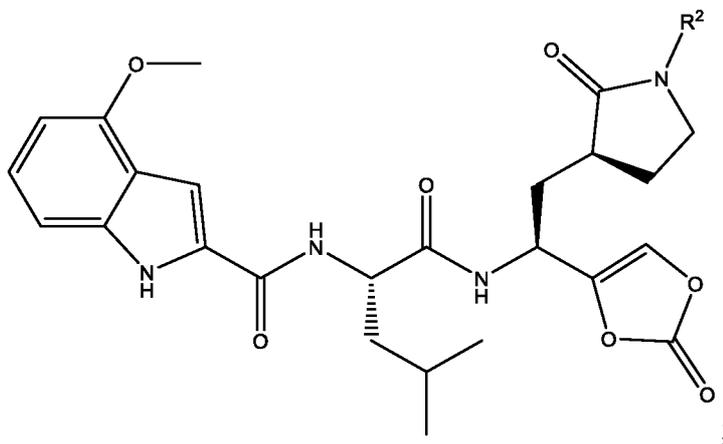
Семнадцатый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по пятнадцатому варианту осуществления первого аспекта, которое выбирают из группы, состоящей из (1S)-1-((3S)-3-((2S)-4-((диметоксифосфорил)окси)-2-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-3-оксобутил)-2-оксопирролидин-1-ил)этилметилкарбоната; (3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-((3S)-2-оксопирролидин-3-ил)бутилдигидрофосфата; (3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-((3S)-2-оксопирролидин-3-ил)бутилдиметилфосфата; (3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-((3S)-2-оксопирролидин-3-ил)бутилдипропан-2-илфосфата; (3S)-4-((3S)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксобутилдиметилфосфата; 4-метокси-N-[(2S)-4-метил-1-((2S)-4-((2-оксидо-4-фенил-1,3,2-диокса фосфинан-2-ил)окси)]-3-оксо-1-((3S)-2-оксопирролидин-3-ил)бутан-2-ил)амино)-1-оксопентан-2-ил]-1H-индол-2-карбоксамид; диэтил (3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-((3S)-2-оксопирролидин-3-ил)бутил-фосфата; и метил (3S)-3-((2S)-4-((диметоксифосфорил)окси)-2-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-

лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилата; или его фармацевтически приемлемую соль.

Восемнадцатый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по первому варианту осуществления первого аспекта, в котором R^1 представляет собой $-P(O)(C_1-C_6\text{алкил})(OR^5)$; или его фармацевтически приемлемую соль.

Девятнадцатый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по восемнадцатому варианту осуществления первого аспекта, которое представляет собой (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилметилметилфосфоната; или его фармацевтически приемлемую соль.

Двадцатый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по первому варианту осуществления первого аспекта формулы If.



If

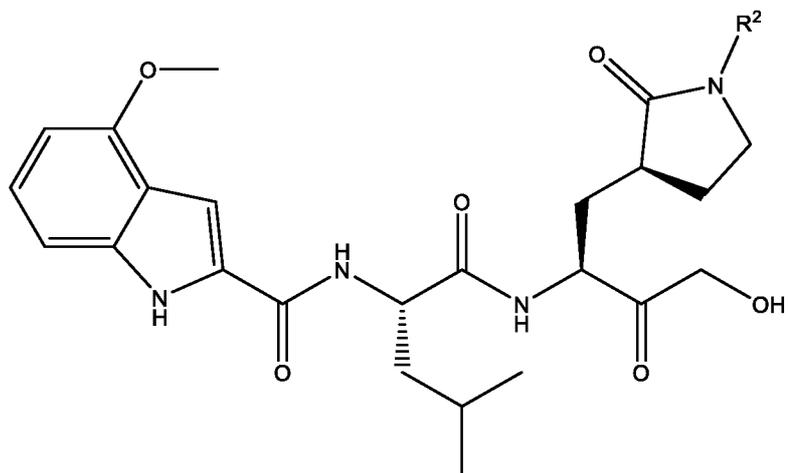
или его фармацевтически приемлемую соль.

Двадцать первый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по двадцатому варианту осуществления первого аспекта, в котором R^2 выбирают из группы, состоящей из водорода, $-C(O)CH_3$, $-CO_2CH_3$, $-CH_2OC(O)OCH_3$ и $-CH(CH_3)OC(O)OCH_3$; или его фармацевтически приемлемую соль.

Двадцать второй вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по двадцатому варианту осуществления первого аспекта, которое выбирают из группы, состоящей из (1*S*)-1-{(3*S*)-3-[(2*S*)-2-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-1,3-диоксол-4-ил)этил]-2-оксопирролидин-1-ил}этилметилкарбоната; 4-метокси-*N*-[(2*S*)-4-метил-1-оксо-1-({(1*S*)-1-(2-оксо-1,3-диоксол-4-ил)-2-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]этил}амино)пентан-2-ил]-1*H*-индол-2-карбоксамид; N -[(2*S*)-1-{(1*S*)-2-[(3*S*)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил]-1-(2-

оксо-1,3-диоксол-4-ил)этил]амино}-4-метил-1-оксопентан-2-ил]-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид; и метил (3S)-3-[(2S)-2-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-(2-оксо-1,3-диоксол-4-ил)этил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилата; или его фармацевтически приемлемую соль.

Двадцать третий вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение формулы Ig.



Ig,

в котором R² выбирают из группы, которая состоит из -C(O)R⁷, -CO₂R⁷ и -C₁-C₆алкил-OC(O)OR⁷; или его фармацевтически приемлемую соль.

Двадцать четвертый вариант осуществления первого аспекта настоящего изобретения представляет собой соединение по двадцать третьему варианту осуществления первого аспекта, которое выбирают из группы, состоящей из (1S)-1-[(3S)-3-[(2S)-4-гидрокси-2-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-ил]этилметилкарбоната; N-[(2S)-1-[(2S)-1-[(3S)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил]-4-гидрокси-3-оксобутан-2-ил]амино)-4-метил-1-оксопентан-2-ил]-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид; метил (3S)-3-[(2S)-4-гидрокси-2-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилата; и {(3S)-3-[(2S)-4-гидрокси-2-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-ил}метилметилкарбоната; или его фармацевтически приемлемую соль.

Первый вариант осуществления второго аспекта представленного изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество соединения по любому одному из первого по двадцать четвертый варианты осуществления первого аспекта, или его фармацевтически приемлемой соли вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Второй вариант осуществления второго аспекта настоящего изобретения представляет собой фармацевтическую композицию по первому варианту осуществления второго аспекта, при

этом композиция находится в виде пероральной дозированной формы. Третий вариант осуществления второго аспекта представленного изобретения представляет собой фармацевтическую композицию по первому варианту осуществления второго аспекта, при этом композиция находится в виде дозированной интраназальной формы или ингаляционной дозированной формы. Четвертый вариант осуществления второго аспекта представленного изобретения представляет собой фармацевтическую композицию по первому варианту осуществления второго аспекта, дополнительно содержащую дополнительный терапевтический агент. Пятый вариант осуществления второго аспекта настоящего изобретения представляет собой фармацевтическую композицию по четвертому варианту осуществления второго аспекта, при этом фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или несколько из хлорохина, гидроксихлорохина, азитромицина и ремдесивира.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ лечения COVID-19 у пациента, где способ включает введение терапевтически эффективного количества соединения по любому одному из первого по двадцать четвертый варианты осуществления первого аспекта или его фармацевтически приемлемой соли пациенту, который в этом нуждается.

Другой вариант осуществления представленного изобретения представляет собой способ лечения COVID-19 у пациента, где способ включает введение фармацевтической композиции по любому одному из первого по пятый варианты осуществления второго аспекта изобретения пациенту, который в этом нуждается.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ ингибирования или предупреждения репликации вируса SARS-CoV-2, который включает контактирование коронавирусной 3CL-протеазы SARS-CoV-2 с терапевтически эффективным количеством соединения по любому одному из первого по двадцать четвертый варианты осуществления первого аспекта. его фармацевтически приемлемой соли, или его фармацевтически приемлемой соли, или метаболита соединения или фармацевтически приемлемой соли.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ ингибирования или предупреждения репликации вируса SARS-CoV-2 у пациента, где способ включает введение пациенту, нуждающемуся в ингибировании или предупреждении репликации вируса SARS-CoV-2, терапевтически эффективного количества соединения по любому одному из первого по двадцать четвертый варианты осуществления первого аспекта или его фармацевтически приемлемой соли.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой применение соединения по любому одному из первого по двадцать четвертого варианта осуществления первого аспекта или его фармацевтически приемлемой соли для лечения COVID-19. Другой вариант осуществления изобретения представляет собой применение соединения по любому одному из первого по двадцать четвертый варианты осуществления первого аспекта или его фармацевтически приемлемой соли, для получения лекарственного средства, приемлемого для лечения COVID-19.

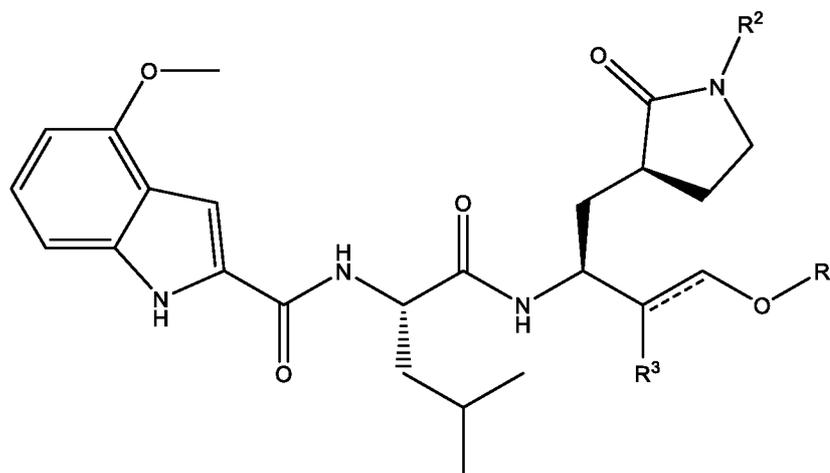
Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ лечения COVID-19 у пациента, где способ включает введение терапевтически эффективного количества (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата или его фармацевтически приемлемой соли пациенту, который в этом нуждается.

Еще другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой непосредственно предварительный вариант осуществления, дополнительно включающий введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов пациенту, который в этом нуждается.

Еще другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой непосредственно предварительный вариант осуществления, в котором дополнительные терапевтические агенты выбраны из ремдесивира и азитромицина.

Следующие варианты осуществления изобретения E1-E49 представляют собой, в частности, предпочтительные варианты осуществления изобретения.

E1 представляет собой соединение формулы I



I,

в котором

----- отсутствует или представляет собой связь;

R^1 выбирают из группы, которая состоит из $-\text{CH}(R^{4a})-\text{OC}(\text{O})R^4$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$, $-\text{CH}(R^{4a})-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^4$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{C}_1-\text{C}_6\text{алкил})(\text{OR}^5)$ и $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^6)_2$;

R^2 выбирают из группы, которая состоит из водорода, $-\text{C}(\text{O})R^7$, $-\text{CO}_2R^7$ и $-\text{C}_1-\text{C}_6\text{алкил}-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^7$;

и, когда R^2 представляет собой $-\text{C}(\text{O})R^7$, $-\text{CO}_2R^7$ или $-\text{C}_1-\text{C}_6\text{алкил}-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^7$; то R^1 выбирают из группы, которая состоит из водорода, $-\text{CH}(R^{4a})-\text{OC}(\text{O})R^4$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$, $-\text{CH}(R^{4a})-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^4$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{C}_1-\text{C}_6\text{алкил})(\text{OR}^5)$ и $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^6)_2$;

R^3 представляет собой оксо, когда ----- отсутствует, или когда ----- представляет собой связь, R^3 , взятые вместе с R^1 и кислородом, к которому R^1 является присоединенным, представляют собой $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$;

R^4 и R^7 каждый независимо выбирают из группы, состоящей из $\text{C}_1-\text{C}_6\text{алкила}$, незамещенного или замещенного от одного до трех R^8 , $\text{C}_3-\text{C}_7\text{циклоалкила}$, незамещенного или замещенного от одного до трех R^8 , $\text{C}_5-\text{C}_{12}\text{бициклоалкила}$, незамещенного или замещенного от одного до трех R^8 , от четырех до семи членного гетероциклоалкила, содержащего от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S, и незамещенного или замещенного от одного до трех R^8 , $\text{C}_6-\text{C}_{10}\text{арила}$, незамещенного или замещенного от одного до трех R^8 , и от пяти до десяти членного гетероарила, содержащего от одного до четырех гетероатомов независимо выбранных из N, O и S, и незамещенного или замещенного от одного до трех R^8 ;

R^{4a} представляет собой водород или $\text{C}_1-\text{C}_6\text{алкил}$;

R^5 в каждом случае независимо представляет собой водород или $\text{C}_1-\text{C}_6\text{алкил}$; или обе R^5 группы, взятые вместе, представляют собой $\text{C}_2-\text{C}_4\text{алкилен}$, являющийся необязательно замещенным фенилом;

R^6 в каждом случае независимо выбран из водорода и $\text{C}_1-\text{C}_6\text{алкила}$, который незамещен или замещен от одного до трех R^8 ;

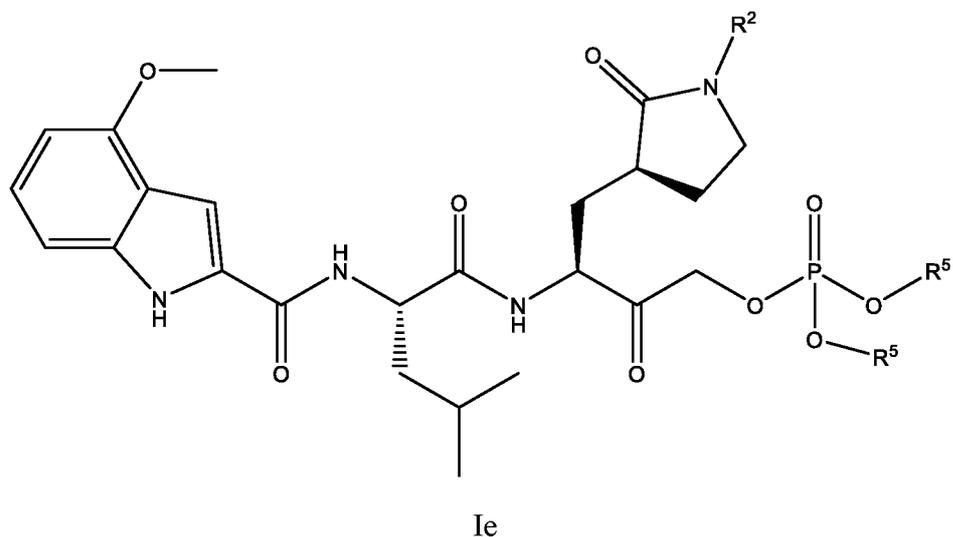
или обе группы R^6 , взятые вместе с азотом, к которому они являются присоединенными, представляют собой от четырех до семичленного гетероциклоалкила, который необязательно содержит дополнительные от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S; при этом указанный гетероциклоалкил незамещен или замещен от одного до трех R^8 ; и

R^8 в каждом случае является независимо выбранным из галогена, гидроксид, циано, $\text{C}_1-\text{C}_3\text{алкила}$, $\text{C}_1-\text{C}_3\text{алкокси}$, $\text{C}_1-\text{C}_3\text{алкокси}\text{C}_1-\text{C}_3\text{алкила}$, $\text{C}_3-\text{C}_6\text{циклоалкила}$, $\text{C}_3-\text{C}_6\text{циклоалкокси}$, ди($\text{C}_1-\text{C}_3\text{алкил}$)амино, ($\text{C}_1-\text{C}_3\text{алкил}$)амино, амино, ди($\text{C}_1-\text{C}_3\text{алкил}$)амино- $\text{C}_1-\text{C}_3\text{алкила}$, ($\text{C}_1-\text{C}_3\text{алкил}$)амино- $\text{C}_1-\text{C}_3\text{алкила}$, амино- $\text{C}_1-\text{C}_3\text{алкила}$ и от четырех до семи членного

гетероциклоалкила, содержащего от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S;

или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат.

E2 представляет собой соединение по E1 формулы Ie.



или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат.

E3 представляет собой соединение по пункту E2, в котором R² выбирают из группы, состоящей из водорода, -C(O)CH₃, -CO₂CH₃, -CH₂OC(O)OCH₃ и -CH(CH₃)OC(O)OCH₃; и R⁵, в каждом случае независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, метила, этила, изопропила и трет-бутила; или обе R⁵ группы, взятые вместе, представляют собой -CH(Фенил)CH₂CH₂-; или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат.

E3 представляет собой соединение по E2, которое выбирают из группы, состоящей из (1S)-1-((3S)-3-((2S)-4-((диметоксифосфорил)окси)-2-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-3-оксобутил)-2-оксопирролидин-1-ил)этилметилкарбоната; (3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-((3S)-2-оксопирролидин-3-ил)бутилдигидрофосфата; (3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-((3S)-2-оксопирролидин-3-ил)бутилдиметил фосфата; (3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-((3S)-2-оксопирролидин-3-ил)бутил дипропан-2-илфосфата; (3S)-4-((3S)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксобутилдиметилфосфата; 4-метокси-N-[(2S)-4-метил-1-((2S)-4-((2-оксидо-4-фенил-1,3,2-диокса фосфинан-2-ил)окси))-3-оксо-1-((3S)-2-оксопирролидин-3-ил)бутан-2-ил]амино)-1-оксопентан-2-ил]-1H-индол-2-карбоксамид;

диэтил (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил фосфата; и метил (3S)-3-[(2S)-4-[(диметоксифосфорил)окси]-2-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилата; или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат.

Е5 представляет собой соединение по Е4, которое представляет собой (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат; или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат.

Е6 представляет собой соединение по Е5, которое находится в форме гидрата.

Е7 представляет собой соединение по Е6, которое представляет собой кристаллический (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат гидрат.

Е8 представляет собой соединение по пункту Е7, которое представляет собой кристаллический (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат гидрат Формы 1, имеющий одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из порошковой рентгеновской дифрактограммы, спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, и спектра комбинационного рассеяния; при этом характеристики порошковой рентгеновской дифрактограммы выбирают из

а) порошковой рентгеновской дифрактограммы, содержащей пики при $4,1 \pm 0,2$ и $7,2 \pm 0,2$ градусов 2-Тета;

б) порошковой рентгеновской дифрактограммы, содержащей пики при $4,1 \pm 0,2$, $7,2 \pm 0,2$ и $10,4 \pm 0,2$ градусов 2-Тета; и

с) порошковой рентгеновской дифрактограммы, содержащей пики при $4,1 \pm 0,2$, $7,2 \pm 0,2$, $10,4 \pm 0,2$ и $14,5 \pm 0,2$ градусов 2-Тета;

при этом характеристики ^{13}C твердотельного ЯМР спектра выбирают из

а) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при 21,7, 153,8 и 172,2 м.д.; каждый пик $\pm 0,2$ м.д.;

б) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при 21,7, 153,8, 172,2 и 118,6 м.д.; каждый пик $\pm 0,2$ м.д.;

с) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при 21,7, 153,8, 172,2, 118,6 и 57,8 м.д.; каждый пик $\pm 0,2$ м.д.; и

при этом характеристики спектра комбинационного рассеяния выбирают из

а) спектра комбинационного рассеяния, содержащего пики комбинационного рассеяния при 1271, 1421 и

1217 см^{-1} ; каждый пик $\pm 2 \text{ см}^{-1}$;

б) спектра комбинационного рассеяния, содержащего пики комбинационного рассеяния при 1271, 1421,

1217 и 1640 см^{-1} ; каждый пик $\pm 2 \text{ см}^{-1}$; и

с) спектра комбинационного рассеяния, содержащего пики комбинационного рассеяния при 1271, 1421,

1217, 1640 и 3074 см^{-1} ; каждый пик $\pm 2 \text{ см}^{-1}$.

E9 представляет собой соединение по E5, которое находится в форме сольвата метилэтилкетона.

E10 представляет собой соединение по E9, которое представляет собой кристаллический (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат, сольват метилэтилкетона.

E11 представляет собой соединение по E10, которое представляет собой кристаллический (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат, сольват метилэтилкетона, имеющий одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из порошковой рентгеновской дифрактограммы, спектра ^{13}C ЯМР и спектра комбинационного рассеяния;

при этом характеристики порошковой рентгеновской дифрактограммы выбирают из:

а) порошковой рентгеновской дифрактограммы, содержащей пики при $7,7 \pm 0,2$, $8,1 \pm 0,2$ и $23,1 \pm 0,2$ градусов 2-Тета;

б) порошковой рентгеновской дифрактограммы, содержащей пики при $7,7 \pm 0,2$, $8,1 \pm 0,2$, $23,1 \pm 0,2$ и $17,0 \pm 0,2$ градусов 2-Тета; и

с) порошковой рентгеновской дифрактограммы, содержащей пики при $7,7 \pm 0,2$, $8,1 \pm 0,2$, $23,1 \pm 0,2$, $17,0 \pm 0,2$ и $25,8 \pm 0,2$ градусов 2-Тета;

при этом характеристики спектра ^{13}C твердотельного ЯМР выбирают из

а) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при 7,2, 206,4 и 215,8 м.д.; каждый $\pm 0,2$ м.д.;

б) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при 7,2, 206,4, 215,8 и 42,2 м.д.; каждый $\pm 0,2$ м.д.; и

с) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при 7,2, 206,4, 215,8, 42,2 и 101,2 м.д.; каждый $\pm 0,2$ м.д.; и

при этом характеристики спектра комбинационного рассеяния выбирают из

а) спектра комбинационного рассеяния, содержащего пики при 1511, 1644 и 3081 см^{-1} ; каждый ± 2 см^{-1} ;

б) спектра комбинационного рассеяния, содержащего пики при 1511, 1644, 3081 и 1265 см^{-1} ; каждый ± 2 см^{-1} ; и

с) спектра комбинационного рассеяния, содержащего пики при 1511, 1644, 3081, 1265 и 446 см^{-1} ; каждый ± 2 см^{-1} .

E12 представляет собой соединение по E5, которое находится в форме сольвата диметилсульфоксида.

E13 представляет собой соединение по E12, которое представляет собой кристаллический (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат, сольват диметилсульфоксида.

E14 представляет собой соединение по E13, которое представляет собой кристаллический (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат, сольват диметилсульфоксида, который имеет одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из порошковой рентгеновской дифрактограммы, спектра ^{13}C твердотельного ЯМР и спектра комбинационного рассеяния;

при этом характеристики порошковой рентгеновской дифрактограммы выбирают из

а) порошковой рентгеновской дифрактограммы, содержащей пики при $7,4 \pm 0,2$, $14,8 \pm 0,2$ и $26,2 \pm 0,2$ градусов 2-Тета;

б) порошковой рентгеновской дифрактограммы, содержащей пики при $7,4 \pm 0,2$, $14,8 \pm 0,2$, $26,2 \pm 0,2$ и $10,8 \pm 0,2$ градусов 2-Тета; и

с) порошковой рентгеновской дифрактограммы, содержащей пики при $7,4 \pm 0,2$, $14,8 \pm 0,2$, $26,2 \pm 0,2$, $10,8 \pm 0,2$ и $22,3 \pm 0,2$ градусов 2-Тета;

при этом характеристики спектра ^{13}C твердотельного ЯМР выбирают из

а) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при $173,4 \pm 0,2$, $210,7 \pm 0,2$ и $26,2 \pm 0,2$ м.д.;

б) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при $173,4 \pm 0,2$, $210,7 \pm 0,2$, $26,2 \pm 0,2$ и $22,8 \pm 0,2$ м.д.; и

с) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при $173,4\pm 0,2$, $210,7\pm 0,2$, $26,2\pm 0,2$, $22,8\pm 0,2$ и $25,5\pm 0,2$ м.д.; и

при этом характеристики спектра комбинационного рассеяния представляют собой

а) спектр комбинационного рассеяния, содержащий пики при 1717 ± 2 и 675 ± 2 cm^{-1} .

E15 представляет собой соединение по пункту E5, которое находится в форме сольвата диметилсульфоксида гидрата.

E16 представляет собой соединение по E15, которое представляет собой кристаллический (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат, сольват диметилсульфоксида гидрата.

E17 представляет собой соединение по E13, которое представляет собой кристаллический (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат, сольват диметилсульфоксида гидрата, имеющий характеристики порошковой рентгеновской дифрактограммы;

при этом характеристики порошковой рентгеновской дифрактограммы выбирают из

а) порошковой рентгеновской дифрактограммы, содержащей пики при $14,5\pm 0,2$, $25,6\pm 0,2$ и $26,6\pm 0,2$ градусов 2-Тета;

б) порошковой рентгеновской дифрактограммы, содержащей пики при $14,5\pm 0,2$, $25,6\pm 0,2$, $26,6\pm 0,2$ и $21,9\pm 0,2$ градусов 2-Тета; and

с) порошковой рентгеновской дифрактограммы, содержащей пики при $14,5\pm 0,2$, $25,6\pm 0,2$, $26,6\pm 0,2$, $21,9\pm 0,2$, $17,8\pm 0,2$ градусов 2-Тета.

E18 представляет собой соединение по E5, которое представляет собой (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат.

E19 представляет собой соединение по E18, которое представляет собой аморфный (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат.

E20 представляет собой соединение по E19, которое представляет собой аморфный (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат, который имеет одну или несколько

характеристик, выбранных из группы, состоящей из спектра ^{13}C твердотельного ЯМР и комбинации спектра ^{13}C твердотельного ЯМР и спектра ^{31}P твердотельного ЯМР;

при этом характеристики спектра ^{13}C твердотельного ЯМР выбирают из

а) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при $175,0 \pm 0,4$, $204 \pm 1,5$ и $181,8 \pm 0,4$ м.д.;

б) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при $175,0 \pm 0,4$, $204 \pm 1,5$, $181,8 \pm 0,4$ и $54,8 \pm 0,2$ м.д.; и

с) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при $175,0 \pm 0,4$, $204 \pm 1,5$, $181,8 \pm 0,4$, $54,8 \pm 0,2$ и $162,9 \pm 0,2$ м. ч.; и

комбинация спектра ^{13}C твердотельного ЯМР и спектра ^{31}P твердотельного ЯМР представляет собой спектр ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащий пики при $175,0 \pm 0,4$ и $204 \pm 1,5$, и спектр ^{31}P твердотельного ЯМР с пиком при $-0,2$ м.д.

E21 представляет собой соединение по E5, которое представляет собой (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат, натриевую соль.

E22 представляет собой соединение по E21, которое представляет собой аморфный (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат, натриевую соль.

E23 представляет собой соединение по пункту E22, которое представляет собой аморфный (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат, натриевую соль, который имеет одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из спектра ^{13}C твердотельного ЯМР и комбинации из спектра ^{13}C твердотельного ЯМР и спектра ^{31}P твердотельного ЯМР;

при этом характеристики ^{13}C твердотельного ЯМР спектра выбирают из

а) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при $126,0 \pm 0,4$ м.д., $181,0 \pm 0,4$ м.д. и $208,0 \pm 1,5$ м.д.;

б) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при $126,0 \pm 0,4$ м.д., $181,0 \pm 0,4$ м.д., $208,0 \pm 1,5$ м.д. и $174,1 \pm 0,4$ м.д. $175,0 \pm 0,4$ м.д.; и

с) спектра ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащего пики при $126,0 \pm 0,4$ м.д., $181,0 \pm 0,4$ м.д., $208,0 \pm 1,5$ м.д., $174,1 \pm 0,4$ м.д. и $163,1 \pm 0,2$ м.д.; и

комбинация из спектра ^{13}C твердотельного ЯМР и спектра ^{31}P твердотельного ЯМР представляет собой спектр ^{13}C твердотельного ЯМР, содержащий пики при $126,0 \pm 0,4$ м.д., $181,0 \pm 0,4$ м.д., и спектр ^{31}P твердотельного ЯМР с пиком при $1,9 \pm 0,2$ м.д.

E24 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфата, или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или гидрата в соответствии с любым одним из пунктов E5-E23 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

E25 представляет собой фармацевтическую композицию по E24, при этом фармацевтическая композиция дополнительно содержит буферный агент.

E26 представляет собой фармацевтическую композицию по E25, в которой:

- a) фармацевтически приемлемую соль выбирают из группы, состоящей из бензатина, кальция, холина, диэтиламина, диоламина, магния, меглюмина, лизина, пиперазина, калия, три(гидроксиметил)аминометана и натрия;
- b) мольное соотношение противоиона соли к (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфату в фармацевтически приемлемой соли составляет от примерно 0,5:1 до примерно 3:1; и
- c) буферный агент выбирают из группы, состоящей из фосфорной кислоты, лимонной кислоты, малеиновой кислоты, винной кислоты, молочной кислоты и уксусной кислоты.

E27 представляет собой фармацевтическую композицию по E26, в которой:

- a) фармацевтически приемлемая соль является натриевой;
- b) мольное соотношение противоиона натрия к (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфату в фармацевтически приемлемой соли составляет от примерно 0,5:1 до примерно 2:1;
- c) буферный агент представляет собой лимонную кислоту; и

d) мольное соотношение (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфата к лимонной кислоте составляет от примерно 2:1 до примерно 10:1.

E28 представляет собой фармацевтическую композицию по любому одному из E25 - E27, при этом композиция находится в форме порошка или лиофилизирована, при этом pH раствора восстановленного препарата находится в диапазоне от 2 до 6.

E29 представляет собой фармацевтическую композицию по E28, при этом pH раствора восстановленного препарата находится в диапазоне от 3 до 5.

E30 представляет собой фармацевтическую композицию по любому одному из E24-E29, при этом фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или несколько стабилизирующих агентов.

E31 представляет собой фармацевтическую композицию по E30, в которой один или несколько стабилизирующих агентов выбирают из группы, состоящей из декстранов, сахарозы, лактозы, трегалозы, маннита, сорбита, глюкозы, рафинозы, глицина, гистидина, поливинилпирролидонов и полиэтиленгликолей.

E32 представляет собой фармацевтическую композицию по E30, в которой один или несколько стабилизирующих агентов выбирают из группы, состоящей из полиэтиленгликоля 300, полиэтиленгликоля 400 и полиэтиленгликоля 3350.

E33 представляет собой фармацевтическую композицию по E32, в которой общее количество одного или нескольких стабилизирующих агентов составляет до примерно 15% масс./масс. препарата.

E34 представляет собой фармацевтическую композицию по любому из пунктов E24 - E33, при этом фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или несколько солюбилизирующих агентов.

E35 представляет собой фармацевтическую композицию по E34, в которой солюбилизирующий агент выбирают из группы, состоящей из полисорбата 20, полиэтиоксилированного касторового масла, полиэтиленгликоля (15)-гидроксистеарата,

гидроксипропил-бета-циклодекстрина, сульфобутилового простого эфира-бета циклодекстрина, гамма циклодекстрина и полисорбата 80.

Е36 представляет собой фармацевтическую композицию по Е35, в которой солубилизирующий агент представляет собой полисорбат 80 и буферный агент представляет собой лимонную кислоту.

Е37 представляет собой фармацевтическую композицию по Е32, при этом композиция представляет собой порошок или лиофилизированной, которая, при восстановлении водой для инъекций, 0,9% физраствором или 5% масс./об., дает водный раствор, в котором концентрация (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфата или его фармацевтически приемлемой соли составляет от примерно 1 до 200 мг/мл.

Е38 представляет собой фармацевтическую композицию по Е37, при этом рН раствора препарата после восстановления находится в диапазоне от примерно 3 до примерно 5.

Е39 представляет собой фармацевтическую композицию по Е38, которая после восстановления имеет концентрацию полисорбата 80, которая составляет до примерно 5% масс./масс.

Е40 представляет собой фармацевтическую композицию по Е37, в которой фармацевтический порошок или лиофилизированный порошок имеет содержание воды менее примерно 1%.

Е41 представляет собой фармацевтическую композицию по любому одному из Е24 - Е40, которая представляет собой водный раствор, приемлемый для парентерального введения или является восстановленной водой для инъекций, 0,9% физраствором или 5% масс./об. декстрозой до формы водного раствора, приемлемого для парентерального введения.

Е42 представляет собой способ лечения коронавирусной инфекции у пациента, где способ включает введение терапевтически эффективного количества (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфата; или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или гидрата в соответствии с любым одним из Е5 - Е23 пациенту, который в этом нуждается.

Е43 представляет собой способ по Е42, в котором коронавирусная инфекция представляет собой COVID-19.

Е44 представляет собой способ по Е43, по которому ежедневно вводится от примерно 0,1 г до примерно 5 г (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфата; или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или гидрата.

Е45 представляет собой способ по Е44, по которому ежедневно внутривенно вводится от примерно 0,1 до примерно 1 г (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфата; или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или гидрата.

Е46 представляет собой способ лечения COVID-19 у пациента, где способ включает введение фармацевтической композиции в соответствии с Е41 пациенту, нуждающемуся в таком лечении.

Е47 представляет собой способ по любому одному из Е42 - Е46, по которому один или несколько дополнительных терапевтических агентов вводят пациенту.

Е48 представляет собой способ по Е47, по которому один или несколько дополнительных терапевтических агентов выбирают из группы, состоящей из ремдесивира, галидесивира, фавилавир/авифавира, молнупиравира (МК-4482/EIDD 2801), АТ-527, АТ-301, В 2660, фавипиравира, камостата, SLV213 эмтриктабина/тенофивура, клевудина, дальцетрапиба, боцепревира, АВХ464, дексаметазона, гидрокортизона, реконвалесцентной плазмы, гелсолина (Rhu-p65N) моноклональных антител, регданвимаба (Regkirona), равулизумаба (Ultomiris), VIR-7831/VIR-7832, BR11-196/BR11-198, COVI-AMG/COVI DROPS (STI-2020), бамланвимаба (LY-CoV555), маврилимаба, леронлимаба (PRO140), AZD7442, лэнзилумаба, инфликсимаба, адалимумаба, JS 016, STI-1499 (COVIGUARD), ланаделумаба (Takhzygo), канакинумаба (Paris), гимсилумаба, отилимаба, казиривимаба/имдевимаба (REGN-Cov2), МК-7110 (CD24Fc/SACCOVID), гепарина, апиксабана, тоцилизумаба (Actemra), сарилумаба (Kevzara), апилимода димезилата, DNL758, PB1046, дапаглифлозинау, абивертиниба, АTR-002, бемцентиниба,

акалабрутиниба, барицитиниба, тофацитиниба, лосмапимода, фамотидина, никлозамида и диминазена.

E49 представляет собой способ по E48, по которому один или несколько дополнительных агентов выбирают из группы, состоящей из ремдесивира, дексаметазона, малнупиравира, бамланивимаба, тофацитиниба и барицитиниба.

Следует понимать, что формула изобретения относительно способа лечения также может толковаться как утверждение о соответствующем типе применения.

Настоящее изобретение также предусматривает способ лечения состояния, опосредованный активностью коронавирусной 3С-подобной протеазы SARS-CoV-2 у пациента, путем введения указанному пациенту фармацевтически эффективного количества ингибитора протеазы SARS-CoV-2, как описывается в настоящем документе.

Настоящее изобретение также предусматривает способ нацеливания на ингибирование SARS-CoV-2 как средства для лечения показаний, вызванных вирусными инфекциями, связанными с SARS-CoV-2.

Настоящее изобретение также предусматривает способ идентификации клеточных или вирусных путей, препятствующих функционированию членов, которые могут использоваться для лечения показаний, вызванных инфекциями SARS-CoV-2 путем введения ингибитора протеазы SARS-CoV-2, как описывается в настоящем документе.

Настоящее изобретение также предусматривает способ применения ингибиторов протеазы SARS-CoV-2, как описывается в настоящем документе, в качестве инструментов для понимания механизма действия других ингибиторов SARS-CoV-2.

Настоящее изобретение также предусматривает способ применения 3С-подобных ингибиторов протеазы SARS-CoV-2 для проведения экспериментов по профилированию генов для мониторинга положительной или отрицательной регуляции генов с целью обнаружения ингибиторов для лечения показаний, вызванных инфекциями SARS-CoV-2, такими как COVID-19.

Представленное изобретение, кроме того, предусматривает фармацевтическую композицию для лечения COVID-19 у млекопитающих, содержащую такое количество ингибитора 3С-подобной протеазы SARS-CoV-2, эффективной в лечении COVID-19, и фармацевтически приемлемый носитель.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения COVID-19 у пациента, согласно которому пациенту вводится примерно 500 мг/день (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфата. Введение может быть внутривенным, например, путем

непрерывной внутривенной инфузии. Введение может производиться в объеме раствора 250 мл или менее в день.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения COVID-19 у пациента путем введения от 0,25 г до 5 г (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата пациенту путем непрерывной внутривенной инфузии. Введение может производиться в объеме внутривенного раствора 250 мл или менее в день. Способ может включать совместное введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов пациенту. Способ может включать совместное введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов, выбирающих из группы, состоящей из ремдесивира, (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(4-аминопироло[2,1-*f*][1,2,4]триазин-7-ил)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)оксолан-2-карбонитрила (GS-441524), натрия (2*S*)-2-((*S*)-2-(((бензилокси)карбонил)амино)-4-метилпентанамидо)-1-гидрокси-3-(2-оксопирролидин-3-ил)пропан-1-сульфоната (GC376), дексаметазона, азитромицина, умифеновира и фавипиравира.

Другой вариант осуществления, F1, изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат или его фармацевтически приемлемую соль вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

Другой вариант осуществления, F2, по изобретению представляет собой фармацевтическую композицию по непосредственно предварительному варианту осуществления F1, при этом фармацевтическая композиция дополнительно содержит буферный агент.

Другой вариант осуществления изобретения, F3, представляет собой фармацевтическую композицию по пункту непосредственно предварительному варианту осуществления, в которой буферный агент выбирают из группы, состоящей из фосфорной кислоты, лимонной кислоты, малеиновой кислоты, винной кислоты, молочной кислоты и уксусной кислоты.

Другой вариант осуществления изобретения, F4, представляет собой фармацевтическую композицию по непосредственно предварительному варианту осуществления, F3, в которой буферный агент представляет собой лимонную кислоту.

Другой вариант осуществления изобретения, F5, представляет собой фармацевтическую композицию по любому одному из трех предыдущих вариантов осуществления, F2-F4, при этом композиция находится в виде водного раствора и pH раствора препарата находится в диапазоне от 2 до 6.

Другой вариант осуществления изобретения, F6, представляет собой фармацевтическую композицию по предыдущему варианту осуществления F5, при этом рН раствора препарата находится в диапазоне от 3 до 5.

Другой вариант осуществления изобретения, F7, представляет собой фармацевтическую композицию по предыдущему варианту осуществления F6, при этом рН раствора препарата находится в диапазоне от 3,5 до 4,5.

Другой вариант осуществления изобретения, F8, представляет собой фармацевтическую композицию по F1-F4, при этом фармацевтическая композиция дополнительно содержит объемообразующий агент.

Другой вариант осуществления изобретения, F9, представляет собой фармацевтическую композицию по F8, в которой объемообразующий агент выбирают из группы, состоящей из сахарозы, лактозы, трегалозы, маннита, сорбита, глюкозы, рафинозы, глицина, гистидина, поливинилпирролидона.

Другой вариант осуществления изобретения, F10, представляет собой фармацевтическую композицию F9, в которой объемообразующий агент выбирают из группы, состоящей из трегалозы, сахарозы, лактозы, маннита и полиэтиленгликоля 400.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию по любому одному из F1-F10, находящуюся в форме лиофилизированного материала или порошка.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию по любому одному из F1-F10, находящуюся в форме водного раствора.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию по любому одному из F1-F10, при этом фармацевтическая композиция дополнительно содержит солюбилизирующий агент.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию по непосредственно предварительному варианту осуществления, в которой солюбилизирующий агент выбирают из группы, состоящей из полисорбата 20, EL Кремфора, Колифора HS-15, гидроксипропил-бета-циклодекстрина, сульфобутилового простого эфира-бета циклодекстрина, гамма-циклодекстрина и полисорбата 80.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию по предыдущему варианту осуществления, в которой солюбилизирующий агент представляет собой полисорбат 80, и буферный агент представляет собой цитрат.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию по предыдущему варианту осуществления, при этом композиция представляет собой водный раствор.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию по непосредственно предварительному варианту осуществления, при этом рН раствора препарата находится в диапазоне от примерно 3,5 до примерно 4,5.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию по предыдущему варианту осуществления, в которой концентрация полисорбата 80 составляет от примерно 5 мг/мл, и концентрация цитратного буфера составляет примерно 40 мМ.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую полисорбат 80, как солюбилизующий агент, и цитрат, как буферный агент, и при этом фармацевтическая композиция представляет собой порошок или лиофилизированный материал.

Другой вариант осуществления изобретения, М1, представляет собой способ лечения коронавирусной инфекции у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата или его фармацевтически приемлемой соли пациенту, который в этом нуждается.

Другой вариант осуществления изобретения, М2, представляет собой способ по М1, в котором коронавирусная инфекция представляет собой инфекцию SARS-CoV-2, MERS-CoV, 229E-CoV-2, NL63-CoV, OC43-CoV или HKU1-CoV.

Другой вариант осуществления изобретения, М3, который представляет собой способ по М2, представляет собой инфекцию SARS-CoV-2.

Другой способ по изобретению, М4, представляет собой способ по пункту М1, в котором (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат или его фармацевтически приемлемая соль вводится как фармацевтическая композиция, содержащая (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфат или его фармацевтически приемлемую соль вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

Другой способ по изобретению, М5, представляет собой способ лечения коронавирусной инфекции у пациента, включающий введение фармацевтической композиции в соответствии с любым одним из пунктов F1 - F10.

Другой способ по изобретению, М6, представляет собой способ по пункту М5, при этом фармацевтическая композиция представляет собой парентеральный раствор, который вводится пациенту внутривенно.

Краткое описание чертежей

Фигура 1: Остаточные различия между SARS-CoV и SARS-CoV-2 с соединением-ингибитором, показанным в активном сайте.

Фигура 2: Сайт связывания гомологичной модели SARS-CoV-2 3CL с лигандом, прикрепленным к ядру (Соединением В, $N-((1S)-1-{\{((1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}}пропил)амино\}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамидом$).

Фигура 3: Картина PXRD Формы 1 $(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфата$ гидрата.

Фигура 4: Спектр ^{13}C твердотельного ЯМР Формы 1 $(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфата$ гидрата.

Фигура 5: Спектр ^{15}N твердотельного ЯМР Формы 1 $(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфата$ гидрата.

Фигура 6: Спектр комбинационного рассеяния Формы 1 $(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфата$ гидрата.

Фигура 7: Репрезентативные данные связывания теплового смещения родительского соединения $N-((1S)-1-{\{((1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}}пропил)амино\}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид$ с 3CLpro SARS-CoV-2.

Фигура 8: Изоболограмма противовирусной активности родительского соединения $N-((1S)-1-{\{((1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}}пропил)амино\}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид$ в комбинации с ремдесивиром относительно SARS-CoV-2.

Фигура 9: PXRD $(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфата$, сольвата метилэтилкетона.

Фигура 10: PXRD $(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата$, сольвата метилэтилкетона после повторной работы.

Фигура 11: Картина PXRD $(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата$, аморфного натриевой соли.

Фигура 12: Спектр ^{13}C твердотельного ЯМР (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, аморфной, натриевой соли.

Фигура 13: Спектр ^{15}N твердотельного ЯМР (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, аморфного, натриевой соли.

Фигура 14: Спектр ^{31}P твердотельного ЯМР (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, аморфного, натриевой соли.

Фигура 15: Спектр комбинационного рассеяния (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, аморфного, натриевой соли.

Фигура 16: Модульированная ДСК для определения перехода стеклования (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат, аморфного, натриевой соли.

Фигура 17: Картина PXRD (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, ДМСО-сольвата.

Фигура 18: Спектр ^{13}C ттЯМР (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, ДМСО-сольвата.

Фигура 19: Спектр комбинационного рассеяния (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, ДМСО-сольвата.

Фигура 20: Картина PXRD (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, ДМСО-сольвата гидрата.

Фигура 21: Картина PXRD смеси из (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, ДМСО-сольвата гидрата и (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, ДМСО-сольвата.

Фигура 22: Репрезентативная дифрактограмма PXRD лиофилизированного продукта лекарственного средства PF-07304814.

Фигура 23: PXRD-характеристика PF-07304814, является лиофилизатом, полученным из 5 мг/мл полисорбата 80.

Фигура 24: PXRD дифрактограмма лиофилизированного продукта лекарственного средства PF-07304814, с калиевым противоионом.

Фигура 25: PXRD дифрактограмма лиофилизированного продукта лекарственного средства PF-07304814, с пиперазиновым противоионом.

Фигура 26: PXRD дифрактограмма лиофилизированного продукта лекарственного средства PF-07304814, из А) 10 мг/мл ПЭГ 400, В) 10 мг/мл ПЭГ 3350, С) 10 мг/мл ПЭГ 400 / 10 мг/3.

Фигура 27: PXRD дифрактограммы показаны для лиофилизированных продуктов лекарственных средств, полученных из 3 различных партий PF-07304814, которые получают из процесса очистки ДМСО. А) PF-07304814 партия 1 (0,12% ДМСО); В) PF-07304814 партия 2 (6% ДМСО); С) PF-07304814 партия 3 (12% ДМСО).

Фигура 28: Спектр ^{13}C твердотельного ЯМР PF-07304814, аморфного, свободной кислоты.

Подробное описание изобретения

Для целей представленного изобретения, как описывается и заявляется в настоящем документе, следующие термины определены следующим образом:

Как используется в настоящем документе, термины "содержащий" и "включающий" используют в их открытом, не ограничительном смысле. Термин "лечение", используемый в настоящем документе, если не указывается иное, означает содействие регрессии, облегчение, ингибирование прогрессирования или предупреждение расстройства или состояния, к которому такой термин применяется, или одного или нескольких симптомов такого расстройства или состояния. Термин "лечение", используемый в настоящем документе, если не указывается иное, касается действия лечения, в смысле "лечения", как определяется непосредственно выше.

Термин "алкил", используемый в настоящем документе, касается углеводородного насыщенного заместителя с линейной или разветвленной цепью (т.е. заместитель, полученный из углеводорода за счет удаления водорода); который, в одном варианте осуществления, содержит от одного до шести атомов углерода. таких заместителей включают метил, этил, пропил (включая *n*-пропил и изопропил), бутил (включая *n*-бутил, изобутил, *втор*-бутил и *трет*-бутил), пентил, изоамил, гексил и подобные.

Термин "алкокси" касается углеводородного насыщенного заместителя с линейной или разветвленной цепью, присоединенного к кислородному радикалу (т.е. заместитель, полученный из углеводородного спирта за счет удаления водорода из ОН); в одном варианте осуществления – содержит от одного до шести атомов углерода. Неограничивающие примеры таких заместителей включают метокси, этокси, пропокси (включая *n*-пропокси и изопропокси), бутокси (включая *n*-бутокси, изобутокси, *втор*-

бутокси и *трет*-бутокси), пентокси, гексокси и подобные. Алкокси-группа, присоединенная к алкильной группе, называется алкоксиалкил. Пример алкоксиалкильной группы представляет собой метоксиметил.

Термин "алкилен" относится к алкандиильной группе (т.е. заместитель, полученный из углеводорода за счет удаления двух атомов водорода); в одном варианте осуществления, содержащем от трех до пяти атомов углерода. Неограничивающие примеры таких групп включают пропилен, бутилен и пентилен.

В некоторых примерах количество атомов углерода в углеводородном заместителе (т.е. алкил, циклоалкил и подобное) обозначается префиксом "C_x-C_y" или "C_{x-y}", при этом x представляет собой минимальное и y представляет собой максимальное количество атомов углерода в заместителе. Таким образом, например, "C₁-C₆ алкил" или "C₁₋₆ алкил" касается алкильного заместителя, содержащего от 1 до 6 атомов углерода. Дополнительно иллюстрируя, C₃-C₆ циклоалкил или C₃₋₆ циклоалкил касается насыщенной циклоалкильной группы, содержащей от 3 до 6 кольцевых атомов углерода.

Термин "циклоалкил" касается карбоциклического заместителя, полученного за счет удаления водорода из насыщенной карбоциклической молекулы, например, молекулы, имеющей от трех до семи атомов углерода. Термин "циклоалкил" включает моноциклические насыщенные карбоциклы. Термин "C₃-C₇ циклоалкил" означает радикал от трех- до семи-членной кольцевой системы, включающей группы циклопропила, циклобутила, циклопентила, циклогексила и циклогептила. Термин "C₃-C₆ циклоалкил" означает радикал от трех- до шести-членной кольцевой системы, включающий группы циклопропила, циклобутила, циклопентила и циклогексила. Термин "C₃₋₆циклоалкокси" относится от трех- до шести-членной циклоалкильной группы, присоединенной к кислородному радикалу. Примеры включают циклопропокси, циклобутокси, циклопентокси и циклогексокси. Термин "C₅-C₁₂бициклоалкил" означает бициклические циклоалкильные фрагменты, такие как бициклопентил, бициклогексил, бициклогептил, бициклооктил, бициклононил, спиропентил, спирогексил, спирогептил, спирооктил и спирононил.

В некоторых примерах количество атомов в циклическом заместителе, содержащем один или несколько гетероатомов (то есть, гетероариллов или гетероциклоалкилов) обозначается префиксом "от x- до y-членный", при этом x представляет собой минимальное, и y представляет собой максимальное количество атомов, образующих циклический фрагмент заместителя. Таким образом, например, "от 4- до 6-членного гетероциклоалкила" касается гетероциклоалкила, содержащего от 4 до 6 атомов, включая от одного до трех гетероатомов, в циклическом фрагменте гетероциклоалкила. Таким образом, фраза "от 5-

до 6-членного гетероарила" касается гетероарила, содержащего от 5 до 6 атомов, и "от 5- до 10-членного гетероарила" касается гетероарила, содержащего от 5 до 10 атомов, при этом каждый включает один или несколько гетероатомов, в циклическом фрагменте гетероарила. Более того, фразы "5-членный гетероарил" и "6-членный гетероарил" относятся к пятичленной гетероароматической кольцевой системе и шестичленной гетероароматической кольцевой системе, соответственно. Гетероатомы, присутствующие в данных кольцевых системах, выбирают из N, O и S.

Термин "гидрокси" или "гидроксил" относится к -ОН. Когда используется в комбинации с другим термином, префикс "гидрокси" указывает на то, что заместитель, к которому присоединен префикс, является замещенным одним или несколькими гидрокси заместителями. Соединения, несущие углерод, к которому присоединяется один или несколько гидрокси заместителей, включают, например, спирты, энолы и фенол. Термин циано относится к группе -CN. Термин "оксо" означает кислород, который присоединен к углероду через двойную связь (то есть, когда R^3 представляет собой оксо, то R^3 вместе с атомом углерода, к которому он присоединен, представляет собой фрагмент C=O).

Термин "галоген" или "атом галогена" относится к фтору (который может быть изображен как -F), хлору (который может быть изображен как -Cl), бромю (который может быть изображен как Br), или йоду (который может быть изображен как -I).

Термин "гетероциклоалкил" относится к заместителю, полученному за счет удаления водорода из насыщенной или частично насыщенной кольцевой структуры, содержащей общее конкретное количество атомов, такое как от 4 до 6 кольцевых атомов, при этом, по меньшей мере, один из кольцевых атомов представляет собой гетероатом (т.е. кислород, азот или серу), при этом остаточные кольцевые атомы независимо выбирают из группы, состоящей из углерода, кислорода, азота и серы. В группе, имеющей гетероциклоалкильный заместитель, кольцевой атом гетероциклоалкильного заместителя, присоединенный к группе, может представлять собой гетероатом азота, или он может представлять собой кольцевой атом углерода. Подобным образом, если гетероциклоалкильный заместитель является, в свою очередь, замещенным группой или заместителем, группа или заместитель может быть присоединен к гетероатому азота, или он может быть присоединен к кольцевому атому углерода.

Термин "гетероарил" касается ароматической кольцевой структуры, содержащей конкретное количество кольцевых атомов, в которой, по меньшей мере, один из кольцевых атомов представляет собой гетероатом (то есть, кислород, азот или серу), при этом остаточные кольцевые атомы независимо выбирают из группы, состоящей из углерода, кислорода, азота и серы. Примеры гетероарильных заместителей включают 6-

членные гетероарильные заместители, такие как пиридил, пиразил, пиримидинил и пиридазинил; и 5-членные гетероарильные заместители, такие как триазолил, имидазолил, фуранил, тиофенил, пиразолил, пирролил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, 1,2,3-, 1,2,4-, 1,2,5- или 1,3,4-оксадиазолил и изотиазолил. Гетероарильная группа может также представлять собой бициклическую гетероароматическую группу, такую как индолил, бензофуранил, бензотиенил, бензимидазолил, бензотиазолил, бензоксазолил, бензоизоксазолил, оксазолопиридинил, имидазопиридинил, имидазопиримидинил и подобные. В группе, имеющей гетероарильный заместитель, кольцевой атом гетероарильного заместителя, присоединенный к группе, может представлять собой один из гетероатомов, или он может представлять собой кольцевой атом углерода. Подобным образом, если гетероарильный заместитель, в свою очередь, замещен группой или заместителем, группа или заместитель может быть присоединен к одному из гетероатомов, или он/она может быть присоединен к кольцевому атому углерода. Термин "гетероарил" также включает пиридил *N*-оксиды и группы, содержащие пиридин-*N*-оксидное кольцо. Кроме того, гетероарильная группа может содержать оксо-группу, такую как группа, присутствующая в пиридоновой группе. Кроме того, примеры включают фурил, тиенил, оксазолил, тиазолил, имидазолил, пиразолил, триазолил, тетразолил, изоксазолил, изотиазолил, оксадиазолил, тиадиазолил, пиридинил, пиридазинил, пиримидинил, пиразин-2(1*H*)-онил, пиримидин-2(1*H*)-онил, пиразин-2(1*H*)-онил, имидазо[1,2-*a*]пиридинил, и пиразол[1,5-*a*]пиридинил. Гетероарил может быть дополнительно замещен, как определяется в настоящем документе.

Примеры однокольцевых гетероариллов и гетероциклоалкилов включают фуранил, дигидрофуранил, тетрагидрофуранил, тиофенил, дигидротиофенил, тетрагидротиофенил, пирролил, изопирролил, пиролинил, пирролидинил, имидазолил, изоимидазолил, имидазолинил, имидазолидинил, пиразолил, пиразолинил, пиразолидинил, триазолил, тетразолил, дитиолил, оксатиолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, тиазолинил, изотиазолинил, тиазолидинил, изотиазолидинил, тиаоксадиазолил, оксатиазолил, оксадиазолил (включая оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил или 1,3,4-оксадиазолил), пиранил (включая 1,2-пиранил или 1,4-пиранил), дигидропирранил, пиридинил, пиперидинил, диазинил (включая пиридазинил, пиримидинил, пиперазинил, триазинил (включая *s*-триазинил, *as*-триазинил и *v*-триазинил), оксазинил (включая 2*H*-1,2-оксазинил, 6*H*-1,3-оксазинил или 2*H*-1,4-оксазинил), изоксазинил (включая *o*-изоксазинил или *n*-изоксазинил), оксазолидинил, изоксазолидинил, оксатиазинил (включая 1,2,5-оксатиазинил или 1,2,6-оксатиазинил), оксадиазинил (включая 2*H*-1,2,4 оксадиазинил или 2*H*-1,2,5 оксадиазинил), морфолинил.

Термин "гетероарил" также может включать, когда указанный как таковой, кольцевые системы, имеющие два кольца, при этом такие кольца могут быть анелированными, и при этом одно кольцо является ароматическим, и другое кольцо не является полной частью конъюгированной ароматической системы (то есть, гетероароматическое кольцо может быть анелировано с циклоалкильным или гетероциклоалкильным кольцом). Неограничивающие примеры таких кольцевых систем включают 5,6,7,8-тетрагидроизохинолинил, 5,6,7,8-тетрагидрохинолинил, 6,7-дигидро-5*H*-циклопента[*b*]пиридинил, 6,7-дигидро-5*H*-циклопента[*c*]пиридинил, 1,4,5,6-тетрагидроциклопента[*c*]пиразолил, 2,4,5,6-тетрагидроциклопента[*c*]пиразолил, 5,6-дигидро-4*H*-пироло[1,2-*b*]пиразолил, 6,7-дигидро-5*H*-пироло[1,2-*b*][1,2,4]триазолил, 5,6,7,8-тетрагидро-[1,2,4]триазоло[1,5-*a*] пиридинил, 4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-*a*]пиридинил, 4,5,6,7-тетрагидро-1*H*-индазолил и 4,5,6,7-тетрагидро-2*H*-индазолил. Следует понимать, что если карбоциклический или гетероциклический фрагмент может быть соединен или другим образом присоединен к назначенному субстрату через различные кольцевые атомы без обозначения конкретной точки присоединения, когда все возможные точки являются назначенными, или через атом углерода или, например, трехвалентный атом азота. Например, термин "пиридил" означает 2-, 3- или 4-пиридил, термин "тиенил" означает 2- или 3-тиенил, и тому подобное.

Если заместители являются описанными как "независимо", которая имеет более одной переменной, каждый пример заместителя выбирают независимо от другого(их) из перечня доступных переменных. Следовательно, каждый заместитель может быть идентичным или отличным от другого(их) заместителя(ей).

Если заместители являются описанными как "независимо выбранные" из группы, каждый пример заместителя выбирают независимо от другого(их). Следовательно, каждый заместитель может быть идентичным или отличным от другого(их) заместителя(ей).

Как используется в настоящем документе, термин "Формула I" может быть указан в настоящем документе далее как "соединение по изобретению", "представленное изобретение" и "соединение формулы I". Такие термины, кроме того, как определяется, включают все формы соединения формулы I, включая их гидраты, сольваты, изомеры, кристаллические и некристаллические формы, изоморфы, полиморфы и метаболиты. Например, соединения по изобретению или их фармацевтически приемлемые соли могут существовать в несольватованной и сольватированной формах. Когда растворитель или вода крепко связаны, комплекс будет иметь хорошо определенную стехиометрию, которая не зависит от влажности. Если, однако, растворитель или вода слабо связаны, как в канальных сольватах и гигроскопичных соединениях, содержание воды/растворителя

будет зависеть от условий влажности и сухости. В таких случаях, нестехиометрическое соотношение будет нормой.

Соединения по изобретению могут существовать как клатраты или другие комплексы. Включенными в пределы объема изобретения являются комплексы, такие как клатраты, комплексы включения лекарственного средства-хозяина, где лекарственное средство и хозяин присутствуют в стехиометрических или нестехиометрических количествах. Кроме того, включенными являются комплексы соединений по настоящему изобретению, содержащие два или более органических и/или неорганических компонентов, которые могут быть в стехиометрических или нестехиометрических количествах. Полученные в результате комплексы могут быть ионизированными, частично ионизированными или неионизированными. Для общего обзора таких комплексов, смотрите J. Pharm. Sci., 64(8), 1269-1288, Haleblan (August, 1975).

Соединения по изобретению имеют асимметричные атомы углерода. Связи углерод-углерод соединений по изобретению могут быть изображены в настоящем документе, используя сплошную линию (—), сплошную клиновидную линию (▲) или пунктирную клиновидную линию (⋯⋯⋯▲). Применение сплошной линии, чтобы изобразить связи с асимметричными атомами углерода, предназначено, чтобы показать, что включены все возможные стереоизомеры (например, конкретные энантиомеры, рацемические смеси и подобное) при таком атоме углерода. Применение либо сплошной, либо пунктирной клиновидной линии, чтобы изобразить связи с асимметричным атомом углерода, предназначено, чтобы показать, что включен только показываемый стереоизомер. Возможно, что соединения формулы I могут содержать более одного асимметричного атома углерода. В таких соединениях применение сплошной линии для изображения связей с асимметричными атомами углерода предназначено, чтобы показать, что включены все возможные стереоизомеры. Например, если не указано иное, предполагается, что соединения формулы I могут существовать как энантиомеры и диастереомеры или как их рацематы и смеси. Применение сплошной линии для изображения связей с одним или несколькими асимметричными атомами углерода в соединении формулы I, и применение сплошной или пунктирной клиновидной линии для изображения связей с другими асимметричными атомами углерода в том же соединении предназначены, чтобы показать, что присутствует смесь диастереомеров.

Стереоизомеры формулы I включают цис и транс изомеры, оптические изомеры, такие как R и S энантиомеры, диастереомеры, геометрические изомеры, ротационные изомеры, конформационные изомеры и таутомеры соединений по изобретению, включая

соединения, демонстрирующие более одного типа изомерии, и их смеси (такие как рацематы и диастереомерные пары). Кроме того, включены кислотные аддитивные или основные аддитивные соли, где противоион является оптически активным, например, D-лактат или L-лизин, или рацемические, например, DL-тарtrat или DL-аргинин.

Когда любой рацемат кристаллизуется, то возможны кристаллы двух разных типов. Первым типом является рацемическое соединение (настоящий рацемат), указанное выше, где получена одна гомогенная форма кристалла, содержащая оба энантиомера в эквимолярных количествах. Второй тип представляет собой рацемическую смесь или конгломерат, где получены две формы кристалла в эквимолярном количестве, где каждая содержит один энантиомер.

Соединения формулы I могут демонстрировать явление таутомерии; такие таутомеры также считаются в качестве соединения по изобретению. Все такие таутомерные формы, и их смеси, включены в пределы объема соединений формулы I. Таутомеры существуют как смеси таутомерных агрегатов в растворе. В твердой форме обычно преобладает один таутомер. Даже если может описываться только один таутомер, представленное изобретение включает все таутомеры соединений формулы I и их солей.

Фраза "фармацевтически приемлемая(ые) соль(соли)", используемая в настоящем документе, если не указывается иное, включает соли кислотных или основных групп, которые могут присутствовать в соединениях, описываемых в настоящем документе. Соединения, используемые в способах по изобретению, являющиеся основными по своей природе способны образовывать широкое разнообразие солей с различными неорганическими и органическими кислотами. Кислоты, которые могут использоваться для получения фармацевтически приемлемых кислотных аддитивных солей таких основных соединений, представляют собой нетоксичные кислотные аддитивные соли, т.е. соли, содержащие фармакологически приемлемые анионы, такие как ацетатные, бензолсульфонатные, бензоатные, бикарбонатные, бисульфатные, битартратные, боратные, бромидные, эдетат-кальциевые, камзилатные, карбонатные, хлоридные, клавуланатные, цитратные, дигидрохлоридные, эдетатные, эдислятные, эстолатные, езилатные, этилсукцинатные, фумаратные, глюцептатные, глюконатные, глютаматные, гликолиларсенатные, гексилрезорцинатные, гидрабаминные, гидробромидные, гидрохлоридные, йодидные, изетионатные, лактатные, лактобионатные, лауратные, малеатные, малонатные, манделатные, мезилатные, метилсульфатные, мукатные, напсилатные, нитратные, олеатные, оксалатные, памоатные (эмбонатные), пальмитатные, пантотенатные, фосфатные/дифосфатные, полигалактуронатные, салицилатные,

стеаратные, субацетатные, сукцинатные, таннатные, тартратные, триэтилоидные и валерантные соли.

Что касается соединений по изобретению, используемых в способах по изобретению, если соединения также существуют как таутомерные формы, то настоящее изобретение касается таких таутомеров и применения всех таких таутомеров и их смесей.

Предмет изобретения также включает соединения и способы лечения COVID-19 и способы ингибирования SARS-CoV-2 изотопно-меченными соединениями, которые идентичны тем, которые приводятся в данном документе, но фактически такие, в которых один или несколько атомов являются замещенными на атом, имеющий атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно встречающегося в природе. Примеры изотопов, которые могут быть введены в соединения по изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора и хлора, такие как ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F и ^{36}Cl , соответственно. Соединения по настоящему изобретению, их пролекарства и фармацевтически приемлемые соли указанных соединений или указанных пролекарств, содержащих вышеуказанные изотопы и/или изотопы других атомов находятся в объеме настоящего изобретения. Конкретные изотопно-меченные соединения по настоящему изобретению, например, те, в которые введены радиоактивные изотопы, такие как ^3H и ^{14}C , полезны в лекарственных средствах и/или исследованиях распределения субстрата в ткани. Меченый тритием, то есть, ^3H и углеродом-14, то есть, ^{14}C , изотопами особенно предпочтительны благодаря легкости их получения и способности к обнаружению. К тому же, замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, то есть, может быть предпочтительным при некоторых обстоятельствах. Изотопно-меченные соединения, используемые в способах по настоящему изобретению и их пролекарства, могут быть получены путем выполнения методик получения соединений, описанных в уровне техники, путем замещения легко доступным изотопно-меченым реагентом неизотопно-меченного реагента.

Настоящее изобретение также включает способы применения фармацевтических композиций и способы лечения COVID-19 путем введения пролекарств соединений по изобретению. Соединения, имеющие свободные амидо или гидроксильные группы, могут быть превращены в пролекарства. Пролекарства включают соединения, в которых аминокислотный остаток, или полипептидная цепь из двух или более (например, двух, трех или четырех) аминокислотных остатков являются ковалентно соединенными через сложноэфирную связь с гидроксильными соединениями, которые используются в способах по настоящему изобретению. Аминокислотные остатки включают, но не ограничиваются

этим, до 20 аминокислот, встречающихся в природе, которые общепринято обозначаются трехбуквенными символами, а также включают 4-гидроксипролин, гидроксизин, десмозин, изодесмозин, 3-метилгстидин, норвалин, бета-аланин, гамма-аминомаслянную кислоту, цитруллин, гомоцистеин, гомосерин, орнитин и метионинсульфон. Дополнительные типы пролекарств также охвачены. Например, свободные гидроксигруппы могут быть получены, используя группы, включая, но не ограничиваясь этим, гемисукцинаты, фосфатные сложные эфиры, диметиламиноацетаты и фосфорилоксиметилкарбонилы, как отмечается в *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1996, 19, 115. Карбаматные пролекарства гидроксигрупп и аминокислот также являются включенными, поскольку представляют собой карбонатные пролекарства, сульфатные сложные эфиры и сульфатные сложные эфиры гидроксигрупп. Охваченной также является дериватизация гидроксигрупп, как (ацилокси)метилы и (ацилокси)этилы простые эфиры, при этом ацильная группа может представлять собой алкиловый простой эфир, необязательно замещенный группами, включая, но не ограничиваясь этим, простоэфирные, аминовые и карбоновокислотные функциональности, или когда ацильная группа представляет собой сложный эфир аминокислоты, как описано выше. Пролекарства данного типа описываются в *J. Med. Chem.*, 1996, 29, 10. Свободные амины могут также дериватизироваться как амиды, сульфонамиды или фосфонамиды. Все из данных фрагментов пролекарства могут включать группы, включая, но не ограничиваясь этим, простоэфирные, аминовые и карбоновокислотные функциональности.

Соединения по настоящему изобретению могут использоваться в способах изобретения в комбинации с другими лекарственными средствами. Например, дозировка пациенту, инфицированному коронавирусом SARS-CoV-2 (т.е. пациенту с COVID-19), ингибитора коронарусной 3CL-протеазы SARS-CoV-2 по изобретению и интерферона, такого как интерферон альфа, или пегиллированного интерферону, такому как PEG-Intron или Pegasus, может обеспечить большие клинические преимущества, чем дозировка или интерферона, пегилированного интерферона или ингибитора коронавируса SARS-CoV-2 самостоятельно. Другие дополнительные агенты, которые могут использоваться в способах по настоящему изобретению, включают хлорохин, гидроксихлорохин, азитромицин и ремдесивир. Примеры больших клинических преимуществ могут включать большее уменьшение симптомов COVID-19, более быстрое время до облегчения симптомов, уменьшенную патологию легких, большее уменьшение количества коронавируса SARS-Cov-2 у пациента (вирусной нагрузки) и уменьшение смертности.

Коронавирус SARS-Cov-2 инфицирует клетки, экспрессирующие Р-гликопротеин. Некоторые из ингибиторов коронарусной 3CL-протеазы SARS-Cov-2 по изобретению

представляют собой р-гликопротеиновые субстраты. Соединения, которые ингибируют коронавирус SARS-Cov-2, также представляющие собой р-гликопротеиновые субстраты, могут быть дозированы с ингибитором р-гликопротеина. Примеры ингибиторов р-гликопротеина представляют собой верапамил, винбластин, кетоконазол, нелфинавир, ритонавир или циклоспорин. Ингибиторы р-гликопротеина действуют путем ингибирования утечки ингибиторов коронавируса SARS-Cov-2 по изобретению из клетки. Ингибирование утечки на основе р-гликопротеина будет предотвращать снижение внутриклеточных концентраций ингибитора коронавируса SARS-Cov-2 благодаря утечке р-гликопротеина. Ингибирование утечки р-гликопротеина в результате приведет к увеличению внутриклеточных концентраций ингибиторов коронавируса SARS-Cov-2. Дозировка пациенту, инфицированного коронавирусом SARS-Cov-2, ингибиторов коронарусной 3CL-протеазы SARS-Cov-2 по изобретению и ингибитора р-гликопротеина может уменьшить количество ингибитора 3CL-протеазы коронавируса SARS-Cov-2, необходимого для достижения эффективности дозы, за счет повышения внутриклеточной концентрации ингибитора 3CL-протеазы коронавируса SARS-Cov-2.

Среди агентов, которые могут использоваться для увеличения воздействия на млекопитающего соединения по настоящему изобретению, могут действовать как ингибиторы, по меньшей мере, одной изоформы ферментов цитохрома P450 (CYP450). Изоформы CYP450, которые могут быть преимущественно ингибированными, включают в себя, но не ограничиваются этим, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4. Соединения, которые используются в способах по изобретению, включают соединения, которые могут представлять собой субстраты CYP3A4 и метаболизируются CYP3A4. Дозировка пациенту, инфицированному коронавирусом SARS-CoV-2, ингибитором коронавируса SARS-CoV-2, который представляет собой субстрат CYP3A4, такой как ингибитор 3CL-протеазы коронавируса SARS-CoV-2, и ингибитор CYP3A4, такой как ритонавир, будут уменьшать метаболизм ингибитора коронавируса SARS-CoV-2 с помощью CYP3A4. Это в результате приведет к снижению клиренса ингибитора коронавируса SARS-CoV-2 и увеличению концентраций ингибитора коронавируса SARS-CoV-2 в плазме крови. Сниженный клиренс и более высокие концентрации в плазме могут привести к более низкой эффективной дозе ингибитора коронавируса SARS-CoV-2.

Дополнительные терапевтические агенты, которые могут использоваться в сочетании с ингибиторами SARS-CoV-2 в способах по настоящему изобретению, включают следующие:

Ингибиторы P1pro: рибавирин, валганцикловир, β -тимидин, аспартам, окспренолол, доксициклин, ацетофеназин, иопромид, рибофлавин, репротерол, 2,2'-циклоцитидин,

хлорамфеникол, хлорфенезина карбамат, леводропрозин, цефамандол, флоксуридин, тигециклин, пеметрексед, L(+)-аскорбиновая кислота, глутатион, гесперетин, адеметионин, мазопрокол, изотретиноин, дантролен, сульфасалазин антибактериальный, силибин, никардипин, силденафил, платикодин, хризин, неогесперидин, байкалин, сугетриол-3,9-диацетат, (-)-эпигалокатехина галат, файтеантрин D, 2-(3,4-дигидроксифенил)-2-[[2-(3,4-дигидроксифенил)-3,4-дигидро-5,7-дигидрокси-2*H*-1-бензопиран-3-ил]окси]-3,4-дигидро-2*H*-1-бензопиран-3,4,5,7-тетрол, 2,2-ди(3-индолил)-3-индолон, (*S*)-(1*S*,2*R*,4*aS*,5*R*,8*aS*)-1-формамидо-1,4*a*-диметил-6-метилен-5-((*E*)-2-(2-оксо-2,5-дигидрофуран-3-ил)этенил)декагидронафтален-2-ил-2-амино-3-фенилпропаноат, пиццеатаннол, розмариновая кислота и магнолол.

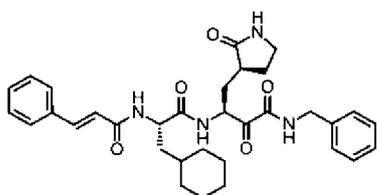
Ингибиторы 3C1rgo: лаймециклин, хлоргексидин, альфузозин, циластатин, фамотидин, алмитрин, прогабид, непафенак, карведилол, ампренавир, тигециклин, монтелукаст, карминовая кислота, мимозин, флавин, лютеин, цефпирамид, фенетициллин, кандоксатрил, никардипин, эстрадиола валерат, пиоглитазон, кониваптан, телмисартан, доксициклин, окситетрациклин, (1*S*,2*R*,4*aS*,5*R*,8*aS*)-1-формамидо-1,4*a*-диметил-6-метилен-5-((*E*)-2-(2-оксо-2,5-дигидрофуран-3-ил)этенил)декагидронафтален-2-ил5-((*R*)-1,2-дитиолан-3-ил)пентаноат, бетулонал, кризин-7-О-β-глюкуронид, андрографизид, (1*S*,2*R*,4*aS*,5*R*,8*aS*)-1-формамидо-1,4*a*-диметил-6-метилен-5-((*E*)-2-(2-оксо-2,5-дигидрофуран-3-ил)этенил)декагидронафтален-2-ил 2-нитробензоат, 2β-гидрокси-3,4-секо-фриделолактон-27-овая кислота, (*S*)-(1*S*,2*R*,4*aS*,5*R*,8*aS*)-1-формамидо-1,4*a*-диметил-6-метилен-5-((*E*)-2-(2-оксо-2,5-дигидрофуран-3-ил)этенил)декагидронафтален-2-ил-2-амино-3-фенилпропаноат, изодекортинол, церевистерол, гесперидин, неогесперидин, андрограпанин, 2-((1*R*,5*R*,6*R*,8*aS*)-6-гидрокси-5-(гидроксиметил)-5,8*a*-диметил-2-метилендекагидронафтален-1-ил)этилбензоат, космозиин, клейстокалтон А, 2,2-ди(3-индолил)-3-индолон, биоробин, гнидидин, филаемблинол, теафлавин 3,3'-ди-О-галлат, розмариновая кислота, куитчензид I, олеанолева кислота, стигмаст-5-ен-3-ол, деацетилцентапикрин и берхемол.

Ингибиторы RdRp: валганцикловир, хлоргексидин, цефтибутен, фенотерол, флударабин, итраконазол, цефуроксим, атоваквон, хенодесоксихолева кислота, кромолин, панкуронию бромид, кортизон, тиболон, новобиоцин, силибин, идпрубицин бромкриптин, дифеноксилат, бензилпеницилоил G, дабигатрана этексилат, бетулонал, гнидидин, 2β,30β-

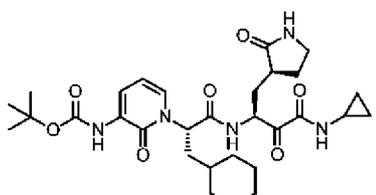
дигидрокси-3,4-секо-фриделолактон-27-лактон, 14-дезоксиде-11,12-дигидроандрографолид, гнидитрин, теафлавин 3,3'-ди-О-галлат, (R)-((1R,5aS,6R,9aS)-1,5a-диметил-7-метилен-3-оксо-6-((E)-2-(2-оксо-2,5-дигидрофуран-3-ил)етенил)декагидро-1H-бензо[с]азепин-1-ил)метил-2-амино-3-фенилпропаноат, 2β-гидрокси-3,4-секо-фриделолактон-27-овая кислота, 2-(3,4-дигидроксифенил)-2-[[2-(3,4-дигидроксифенил)-3,4-дигидро-5,7-дигидрокси-2H-1-бензопиран-3-ил]окси]-3,4-дигидро-2H-1-бензопиран-3,4,5,7-тетрол, филаемблицин В, 14-гидроксициперотундон, андрографизид, 2-((1R,5R,6R,8aS)-6-гидрокси-5-(гидроксиметил)-5,8a-диметил-2-метилендекагидронафтален-1-ил)етилбензоат, андрографолид, сугетриол-3,9-диацетат, байкалин, (1S,2R,4aS,5R,8aS)-1-формамидо-1,4a-диметил-6-метилен-5-((E)-2-(2-оксо-2,5-дигидрофуран-3-ил)етенил)декагидронафтален-2-ил, 5-((R)-1,2-дитиолан-3-ил)пентаноат, 1,7-дигидрокси-3-метоксиксантон, 1,2,6-триметокси-8-[(6-O-β-D-ксилопиранозил-β-D-глюкопиранозил)окси]-9H-ксантен-9-он и 1,8-дигидрокси-6-метокси-2-[(6-O-β-D-ксилопиранозил-β-D-глюкопиранозил)окси]-9H-ксантен-9-он, 8-(β-D-глюкопиранозилокси)-1,3,5-тригидрокси-9H-ксантен-9-он.

Дополнительные терапевтические агенты, которые могут использоваться в способах по изобретению, включают диосмин, гесперидин, МК-3207, венетоклакс, дигидроэргокристин, болазин, R428, дитеркалийный, этопозид, тенипозид, УК-432097, иринотедоксин, люмакафтор, велпатасвир, элюксадолин, ледипасвир, лопинавир / ритонавир + рибавирин, альферон и преднизолон. Другие дополнительные агенты, приемлемые в способах по настоящему изобретению, включают хлорохин, гидроксихлорохин, азитромицин и ремдесивир.

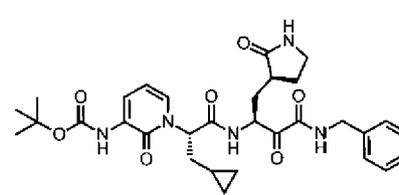
Другие дополнительные агенты, которые могут использоваться в способах по настоящему изобретению, включают □-кетоамидные соединения, обозначенные как 11r, 13a и 13b, показанные ниже, как описано в Zhang, L.; Lin, D.; Sun, X.; Rox, K.; Hilgenfeld, R.; X-ray Структура of Main Protease of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Enables Design of □-Ketoamide Inhibitors; bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.17.952879>



11r



13a



13b

Дополнительные агенты, которые могут использоваться в способах по настоящему изобретению, включают активаторы пути RIG 1, такой как те, которые описываются в патенте США No. 9,884,876.

Дополнительные терапевтические агенты, которые могут использоваться в способах и композициях по изобретению, включают один или несколько агентов, выбирающих из группы, состоящей из ремдесивира, галидесивира, фавилавир/авифавира, молнупиравира (МК-4482/EIDD 2801), АТ-527, АТ-301, BLD-2660, фавипиравира, камостата, SLV213 эмтриктабина/тенофовира, клебудина, дальцетрапиба, боцепревира, ABX464, дексаметазона, гидрокортизона, реконвалесцентной плазмы, гелсолина (Rhu-p65N), моноклональных антител, регданвимаба (Regkirova), равулизумаба (Ultomiris), VIR-7831/VIR-7832, BRII-196/BRII-198, COVI-AMG/COVI DROPS (STI-2020), бамланивимаба (LY-CoV555), маврилимаба, леронлимаба (PRO140), AZD7442, лензилумаба, инфликсимаба, адалимумаба, JS 016, STI-1499 (COVIGUARD), ланаделумаба (Takhzyro), канакинумаба (Paris), гимсилумаба, отилимаба, казиривимаба/имдевимаба (REGN-Cov2), МК-7110 (CD24Fc/SACCOVID), гепарина, аписабана, тоцилизумаба (Actemra), сарилумаба (Kevzara), апилимода димезилата, DNL758, PB1046, дапаглифозина, абивертиниба, АTR-002, бемцентиниба, акалабрутиниба, барицитиниба, тофацитиниба, лосмапимода, фамотидина, никлозамида и диминазена.

Термин "агент ингибирования SARS-CoV-2" означает любой ингибитор 3С-подобной протеазы SARS-CoV-2-опосредованного коронавируса, соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, пролекарство, активный метаболит или сольват, или соединение, которое ингибирует репликацию SARS-CoV-2 любым способом.

Термин "препятствование или предотвращение" репликации вируса, SARS-CoV-2-опосредованного коронавируса ("SARS-CoV-2") в клетке означает уменьшение репликации SARS-CoV-2 или продуцирование компонентов SARS-CoV-2, необходимых для вируса-потомства в клетке по сравнению с клеткой, которая не является временным или стабильно трансдуцированным рибозимом или вектором, кодирующим рибозим. Простые и удобные анализы для определения того, была ли снижена репликация вируса SARS-CoV-2, включают анализ ИФА относительно присутствия, отсутствия или сниженного присутствия анти-SARS-CoV-2 антител в крови субъекта (Nasoff, et al., PNAS 88:5462-5466, 1991), РЧ-ПЦР (Yu, et al., в Viral Hepatitis and Liver Disease 574-577, Nishioka, Suzuki and Mishiro (Eds.); Springer-Verlag, Tokyo, 1994). Такие способы хорошо известны специалистам в данной области. Альтернативно, общая РНК из трансдуцированных и инфицированных «контрольных» клеток может быть выделена и

подвергнута анализу с помощью дот-блоттингу или нозерн-блоттингу и зондированию с использованием SARS-CoV-2-специфической ДНК для того, чтобы определить, уменьшается ли репликация SARS-CoV-2. Альтернативно, снижение экспрессии протеина SARS-CoV-2 может также использоваться как индикатор ингибирования репликации SARS-CoV-2. Уменьшение репликации SARS-CoV-2 более чем на 50% по сравнению с контрольными клетками обычно количественно определяет предотвращение репликации SARS-CoV-2.

Если ингибитор SARS-CoV-2, соединение, используемое в способе по изобретению, представляет собой основание, желаемая соль может быть получена по любому приемлемому способу, известному в данной области, включая обработку свободного основания неорганической кислотой (такой как гидрохлоридная кислота, гидробромидная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и подобные), или органической кислотой (такой как уксусная кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота, миндальная кислота, фумаровая кислота, малоновая кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, гликолевая кислота, салициловая кислота, пираназидиловая кислота (например, глюкуроновая кислота или галактуриновая кислота), альфа-гидроксикислота (например, лимонная кислота или винная кислота), аминокислота (например, аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота), ароматическая кислота (например, бензойная кислота или коричная кислота), сульфоновая кислота (например, п-толуолсульфоновая кислота или этаносульфоновая кислота) и подобные.

Если ингибитор SARS-CoV-2, соединение, используемое в способе по изобретению, представляет собой кислоту, желаемая соль может быть получена по любому приемлемому способу известному в данной области, включая обработку свободной кислоты неорганическим или органическим основанием (такой как амин (первичный, вторичный, или третичный)), гидроксидом щелочного металла, или гидроксидом щелочноземельного металла. Иллюстративные примеры приемлемых солей включают органические соли, полученные из аминокислот (таких как глицин и аргинин), аммиака, первичных аминов, вторичных аминов, третичных аминов и циклических аминов (таких как пиперидин, морфолин и пиперазин), а также неорганические соли, полученные из натрия, кальция, калия, магния, марганца, железа, меди, цинка, алюминия и лития.

В случае ингибитора SARS-CoV-2 соединений, пролекарств, солей или сольватов, представляющих собой твердые вещества, квалифицированному специалисту в данной области известно, что соединение, пролекарства, соли и сольваты, используемые в способе по изобретению, могут существовать в различных полиморфных или кристаллических формах, все из которых должны входить в пределы объема настоящего

изобретения и конкретных формул. Кроме того, соединения, соли, пролекарства и сольваты, используемые в способе по изобретению, могут существовать как таутомеры, все из которых должны входить в пределы широкого объема настоящего изобретения.

Солюбилизирующие агенты могут также использоваться с соединениями по изобретению для повышения растворимости соединений в воде физиологически приемлемых растворов. Данные солюбилизирующие агенты включают циклодекстраны, пропиленгликоль, диэтилацетамид, полиэтиленгликоль, Tween, этанол и мицеллообразующие агенты. Предложенные солюбилизирующие агенты представляют собой циклодекстраны, особенно бета-циклодекстраны и, в частности, гидроксипропил-бета-циклодекстран и простой сульфобутиловый эфир бета-циклодекстрина.

Препараты (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата

Особенно предпочтительно соединение по изобретению, (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат (называется как PF-07304814 в определенных случаях), может поставляться как раствор или препарат на основе порошка с или без эксципиентов для получения фармацевтических композиций, приемлемых для парентерального введения. Концентрация PF-07304814 в препарате-растворе, или концентрация лиофилизированного или порошкового наполнения препарата после восстановления, которое является предпочтительным, находится в диапазоне 25-200 мг/мл. Препарат может быть восстановлен или разбавлен для в.в. введения в стерильной воде для инъекции, 0,9% масс./об. растворе натрия хлорида, или 5% масс./об. растворе декстрозы. К примеру, для целей в.в. введения, суточная доза примерно 3 г PF-0730814 в инфузионном объеме примерно 250 мл или примерно 500 мл, в результате приведет к концентрации в инфузионном растворе 12 мг/мл или 6 мг/мл, соответственно. В качестве дополнительного примера для целей в.в. введения, суточная доза примерно 1 г PF-0730814 в инфузионном объеме примерно 250 мл или примерно 500 мл, в результате приведет к концентрации в инфузионном растворе 4 мг/мл или 2 мг/мл, соответственно. В качестве дополнительного примера для целей в.в. введения, суточная доза примерно 500 мг PF-0730814 в инфузионном объеме примерно 250 мл или примерно 500 мл в результате приведет к концентрации в инфузионном растворе 2 мг/мл или 1 мг/мл, соответственно.

Для PF-07304814 существует несколько продуктов разложения с рН-зависимыми механизмами и рН, что приводит к минимальному разложению, отличается для каждого

продукта разложения. Предпочтительные значения рН для препаратов PF-07304814 (включая любые растворы, растворы перед лиофилизацией, восстановленные растворы после лиофилизации, и разбавленные растворы для в.в. введения) находятся в диапазоне от примерно рН 2,0 до примерно рН 6, 0, и наиболее предпочтительный диапазон рН составляет от примерно рН 3,0 до примерно рН 5,0. Для того чтобы поддерживать необходимый рН, необязательно добавляют буфер, при этом предпочтительные буферы представляют собой молочную кислоту, фосфорную кислоту, уксусную кислоту и винную кислоту, при этом наиболее предпочтительный буфер представляет собой лимонную кислоту. Предпочтительное мольное соотношение PF-07304814 к цитратному буферу составляет от примерно 1:1 до примерно 20:1, более предпочтительное мольное соотношение составляет от примерно 2:1 до примерно 10:1, и наиболее предпочтительное мольное соотношение составляет примерно 4,5:1. рН препарата может регулироваться и контролироваться за счет добавления приемлемого основного эксципиента, предпочтительные основания включают бензатин, гидроксид кальция, холин, диэтиламин, диоламин, магния гидроксид и меглюмин; более предпочтительные основания представляют собой лизин, пиперазин, гидроксид калия и три(гидроксиметил)аминометан; и наиболее предпочтительное основание представляет собой гидроксид натрия (NaOH).

Форма PF-07304814, которая используется в препаратах, может представлять собой свободную кислоту или соответствующую соль. В растворе фосфатная группа PF-07304814, как ожидается, является ионизированной и отрицательно заряженной в целевом диапазоне рН, и, таким образом, катионные вещества в растворе, как ожидается, действуют как противоионы, взаимодействующие с фосфатной группой. Неожиданно, было обнаружено, что противоион существенно не влияет на структуру твердого состояния лиофилизированного порошка, когда измеряется с использованием порошковой рентгеновской дифракции (PXRD) или модулированной дифференциальной сканирующей калориметрии (мДСК), но может в значительной степени повлиять на скорость разложения первичного продукта разложения. Предпочтительные противоионы, образующие соль PF-07304814, включают бензатин, кальций, холин, диэтиламин, диоламин, магний, меглюмин, более предпочтительные противоионы включают лизин, пиперазин, калий и три(гидроксиметил)аминометан, и наиболее предпочтительный противоион представляет собой натрий. Предпочтительное мольное соотношение противоиона к PF-07304814 в препарате фармацевтической композиции (включая любые препараты-растворы, растворы перед лиофилизацией, восстановленные растворы после лиофилизации и разбавленные растворы для в.в. введения) составляет от примерно 0,5:1

до примерно 3:1, и наиболее предпочтительное мольное соотношение составляет от примерно 0,5:1 до примерно 2:1.

Неожиданно, было обнаружено, что добавление одного или нескольких стабилизирующих эксципиентов может обеспечивать лиофилизированные препараты с сопоставимым содержанием влаги, кристалличностью и внешним видом, но может в значительной степени снизить скорость образования Продукта разложения 1 (соединение с отщепленным фосфатом). Предпочтительные стабилизирующие эксципиенты включают сахара, полиспирты, полимеры и аминокислоты; более предпочтительные эксципиенты включают декстран, глицин, лактозу, маннит, поливинилпирролидон, сахарозу и трегалозу; и наиболее предпочтительные эксципиенты включают полиэтиленгликоли (ПЭГи; например, ПЭГ300, ПЭГ400, ПЭГ3350). Подавляющее количество стабилизирующего эксципиента в лиофилизированном порошке составляет до примерно 30% масс./масс., и наиболее предпочтительное количество составляет вплоть до примерно 15% масс./масс. Подавляющее количество общего стабилизирующего эксципиента в восстановленном растворе после лиофилизации составляет вплоть до примерно 50 мг/мл, и наиболее предпочтительное количество составляет до примерно 20 мг/мл. Подавляющее количество общего стабилизирующего эксципиента в разбавленном растворе для в.в. введения составляет до 10 мг/мл, и наиболее предпочтительное количество составляет до 4 мг/мл.

Для PF-07304814 было обнаружено, что добавление небольшого количества солюбилизующего эксципиента может предотвратить выпадение в осадок плохо растворимых примесей. Предпочтительные солюбилизующие эксципиенты включают поверхностно-активные вещества и комплексообразующие эксципиенты (например, циклодекстрины); более предпочтительные солюбилизующие эксципиенты включают полиэтиоксилированное касторовое масло, полиэтиленгликоль-(15)-гидроксистеарат, гидроксипропил- β -циклодекстрин (HP- β -CD), сульфобутиловый простой эфир- β -циклодекстрина (SBE- β -CD), γ циклодекстрин; и наиболее предпочтительные солюбилизующие эксципиенты включают полисорбат 20 (PS20) или полисорбат 80 (PS80). Подавляющее количество солюбилизующих эксципиентов в лиофилизированном порошке составляет вплоть до примерно 15% масс./масс., и наиболее подавляющее количество составляет вплоть до примерно 5% масс./масс. Подавляющее количество общего солюбилизующего эксципиента в восстановленном растворе после лиофилизации составляет вплоть до примерно 20 мг/мл, и наиболее предпочтительное количество составляет вплоть до примерно 5 мг/мл. Подавляющее количество

солюбилизирующих эксципиентов в разбавленном растворе для в.в. введения составляет вплоть до 4 мг/мл, и наиболее предпочтительное количество составляет вплоть до 1 мг/мл. Для PF-07304814 лиофилизированный продукт получают для уменьшения содержания воды в продукте лекарственного средства. Было обнаружено, что оптимизация цикла лиофилизации может в результате привести к низкому содержанию воды, что в значительной степени улучшает химическую стабильность. Предпочтительное содержание воды составляет меньше, чем 2% масс./масс., более предпочтительно меньше, чем 1% масс./масс., и наиболее предпочтительно меньше, чем 0,5% масс./масс. PF-07304814 могут быть получены в качестве препарата-раствора, которым может быть заполнена соответствующая контейнерная закрытая система. Препарат-раствор может храниться и поставляться как раствор, или впоследствии высушиваться при замораживании для получения лиофилизированного препарата. В качестве альтернативы, PF-07304814 может быть получен как порошок в соответствующей закрытой контейнерной системе, со стандартным или специальным растворителем для получения раствора.

В некоторых случаях ингибитор SARS-CoV-2 соединения, соли, пролекарства и сольваты, используемые в способе по изобретению, могут иметь хиральные центры. Когда хиральные центры присутствуют, гидроксаматное соединение, соли, пролекарства и сольваты могут существовать как единичные стереоизомеры, рацематы, и/или смеси из энантиомеров и/или диастереомеров. Все такие единичные стереоизомеры, рацематы и их смеси предназначены находиться в пределах широкого объема представленного изобретения.

Как в общем понимается квалифицированными специалистами в данной области, оптически чистое соединение представляет собой соединение, которое является энантиомерно чистым. Как используется в настоящем документе, термин "оптически чистое", как предполагается, означает соединение, содержащее, по меньшей мере, достаточную активность. Предпочтительно, количество оптически чистого единичного энантиомера, чтобы получить соединение, имеющее желаемое фармакологически чистое соединение по изобретению, составляет, по меньшей мере, 90% единичного изомера (80% энантиомерный избыток), более предпочтительно - по меньшей мере 95% (90% энантиомерный избыток), еще более предпочтительно - по меньшей мере 97,5% (95% энантиомерный избыток), и наиболее предпочтительно - по меньшей мере 99% (98% энантиомерный избыток).

Термин "лечение", используемый в настоящем документе, если не указывается иное, означает реверсирование, облегчение, угнетение прогрессирования, или предупреждение

расстройства или состояния, к которому такой термин применяется, или одного или более симптомов такого расстройства или состояния. Термин "лечение", используемый в настоящем документе, если не указано иное, касается действия лечения, поскольку "лечение" определено непосредственно выше. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения "лечение" или "лечить" означает, по меньшей мере, ослабление болезненного состояния у человека, которое облегчается ингибированием активности 3С-подобной протеазы SARS-CoV-2, которая представляет собой главную протеазу SARS-CoV-2, возбудителя заболевания COVID-19. Следует понимать, что вирус SARS-CoV-2 охватывает первоначально открытый штамм вируса, а также появляющиеся мутантные штаммы, такие как, но не ограничиваясь ими, штаммы такие как В.1.1.7 (вариант в Великобритании), В. 1.351 (южноафриканский вариант) и P.1 (бразильский вариант). Для пациентов, страдающих COVID-19, лихорадка, быстрая утомляемость, сухой кашель представляют собой основные проявления заболевания, тогда как заложенность носа, насморк и другие симптомы со стороны верхних дыхательных путей встречаются редко. Beijing Centers for Diseases Control and Prevention указывал, что типичный случай COVID-19 имеет прогрессирующий процесс обострения. COVID-19 может быть классифицирован на легкий, нормальный, тяжелый и критические типы, основанные на тяжести заболевания. National Health Commission of the People's Republic of China. Diagnosis and Treatment of Pneumonia Caused by 2019-nCoV (Trial Version 4). National Health Commission of the People's Republic of China. Diagnosis and Treatment of Pneumonia Caused by 2019-nCoV (Trial Version 4). Доступна он-лайн: <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3577/202002/573340613ab243b3a7f61df260551dd4/files/c791e5a7ea5149f680fdb34dac0f54e.pdf> (доступна с 6 февраля 2020).: (1) Легкие случаи - клинические симптомы были легкими и никакой пневмонии на компьютерной томографии грудной клетки не выявляется (СТ); (2) нормальные случаи - лихорадка, респираторные симптомы, и пациенты, как обнаружено, имеют визуальные проявления пневмонии; (3) тяжелые случаи – одно из следующих трех состояний: респираторный дистресс, частота дыхания ≥ 30 раз/мин. (в состоянии покоя, относительно насыщения кислородом $\leq 93\%$), парциальное артериальное давление кислорода (P_{aO_2})/ концентрация поглощения кислорода (F_{iO_2}) ≤ 300 мм рт. ст. (1 мм рт. ст. = 0,133 кПа); (4) критические случаи – одно из следующих трех состояний: дыхательная недостаточность и необходимость искусственной вентиляции легких, шок или связанная с этим недостаточность других органов, требующих отделения интенсивной терапии. Современные клинические данные показывают, что большинство смертей приходится на пациентов старшего возраста. Однако тяжелые случаи были задокументированы у молодых взрослых, имеющих

индивидуальные факторы, в частности, у тех, кто страдает хроническими заболеваниями, такими как сахарный диабет или гепатит В. Те, кто длительно принимали гормоны или иммунодепрессанты, и у которых снижена иммунная функция, вероятно, получают тяжелое протекание заболевания.

Способы лечения для облегчения состояния заболевания, такого как COVID-19, включают в себя применение одного или нескольких соединений по изобретению любым общепринятым приемлемым способом. В соответствии с определенными предпочтительными вариантами осуществления изобретения соединение или соединения, используемые в способах по настоящему изобретению, вводятся млекопитающему, такому как человек, нуждающийся в этом. Предпочтительно нуждающееся млекопитающее является инфицированным коронавирусом, таким как возбудитель заболевания COVID-19, в частности SARS-CoV-2.

Настоящее изобретение также включает профилактические способы, включающие введение эффективного количества ингибитора SARS-CoV-2 по изобретению, или его фармацевтически приемлемой соли, пролекарства, фармацевтически активного метаболита или сольвата млекопитающему, такому как человек с риском инфицирования SARS-CoV-2. В соответствии с определенными предпочтительными вариантами осуществления, эффективное количество одного или нескольких соединений по изобретению или их фармацевтически приемлемой соли, пролекарства, фармацевтически активного метаболита или сольвата вводится человеку с риском инфицирования SARS-CoV-2, возбудителем заболевания COVID-19. Профилактические способы по изобретению включают применение одного или нескольких соединений по изобретению любым общепринятым приемлемым способом.

Следующими являются конкретные варианты осуществления изобретения:

Конкретные из соединений, которые используются в способах по изобретению, известны и могут быть получены способами, известным в данной области.

Последние данные указывают на то, что новый коронавирус SARS-Cov-2 представляет собой возбудитель заболевания COVID-19. Недавно была определена и обнародована нуклеотидная последовательность коронавируса SARS-CoV-2, а также недавно определенных L- и S-подтипов.

Активность ингибиторных соединений в качестве ингибиторов вирусной активности SARS-CoV-2 может быть измерена любым из приемлемых способов, доступных в данной области техники, включая *in vivo* и *in vitro* анализы. Активность соединений по настоящему изобретению в качестве ингибиторов активности коронавирусной 3C-подобной протеазы (такой как 3C-подобная коронавирусу SARS-CoV-2) может быть

измерена любым из приемлемых способов, известных квалифицированному специалисту в данной области техники, включая *in vivo* и *in vitro* анализы. Примеры приемлемых анализов для измерений активности включают в себя анализы на противовирусную культуру клеток, описанные в настоящем документе, а также анализы на антипротеазу, описанные в настоящем документе, такие как анализы, описанные в разделе Примеры.

Введение ингибиторов SARS-CoV-2, соединений и их фармацевтически приемлемых пролекарств, солей, активных метаболитов и сольватов может осуществляться в соответствии с любым из приемлемых способов введения, доступных квалифицированному специалисту в данной области техники. Иллюстративные примеры приемлемых способов введения включают пероральный, назальный, легочный, парентеральный, местный, внутривенный, инъекционный, трансдермальный и ректальный. Предпочтительны пероральная, внутривенная и назальная доставка.

Агент ингибирования SARS-CoV-2 может быть введен в качестве фармацевтической композиции в любой приемлемой фармацевтической форме. Подходящие фармацевтические формы включают твердые, полутвердые, жидкие или лиофилизированные препараты, такие как таблетки, порошки, капсулы, суппозитории, суспензии, липосомы и аэрозоли. Агент ингибирования SARS-CoV-2 может быть получен в виде раствора, используя любую из различных методологий. Например, агент ингибирования SARS-CoV-2 можно растворить в кислоте (например, 1 М HCl) и разбавить достаточным объемом раствора 5% декстрозы в воде (D5W) с получением желаемой конечной концентрации агента ингибирования SARS-Cov-2 (например, примерно 15 мМ). В качестве альтернативы, раствор D5W, содержащий примерно 15 мМ HCl, может использоваться для получения раствора агента ингибирования SARS-CoV-2 в соответствующей концентрации. Кроме того, агент ингибирования SARS-Cov-2 может быть получен в виде суспензии, используя, например, 1% раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ).

Приемлемые способы получения соответствующих фармацевтических форм фармацевтических композиций известны или могут быть обычно определены специалистами в данной области техники. Например, фармацевтические препараты могут быть получены по общепринятым технологиям фармацевтической химии, которые включают такие стадии, как смешивание, гранулирование и прессование, когда необходимыми являются таблетированные формы, или смешивание, наполнение и растворение ингредиентов при необходимости, для получения желаемых продуктов для внутривенного, перорального, парентерального, местного, интравагинального,

интраназального, интрабронхиального, внутриглазного, интрааурального и/или ректального введения.

Фармацевтические композиции по изобретению могут также включать приемлемые эксципиенты, разбавители, носители и наполнители, а также другие фармацевтически активные агенты, в зависимости от предполагаемого использования. Твердые или жидкие фармацевтически приемлемые носители, разбавители, наполнители или эксципиенты могут использоваться в фармацевтических композициях. Иллюстративные твердые наполнители включают крахмал, лактозу, кальция сульфат дигидрат, каолин, сахарозу, тальк, желатин, пектин, аравийскую камедь, магния стеарат и стеариновую кислоту. Иллюстративные жидкие наполнители включают сироп, арахисовое масло, оливковое масло, солевой раствор и воду. Наполнитель или разбавитель может включать приемлемый материал для пролонгированного высвобождения, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, самостоятельно или с воском. При использовании жидкого наполнителя препарат может быть в форме сиропа, эликсира, эмульсии, мягкой желатиновой капсулы, стерильной жидкости для инъекций (например, раствора) или неводной или водной жидкой суспензии.

Химическая и физическая стабильность влияет на выбор условий хранения и срока годности фармацевтической композиции и определяет жизнеспособность фармацевтического продукта. Химическая стабильность, как правило, связана с изменением химической природы компонентов в фармацевтической композиции, которая может включать разложение активного фармацевтического ингредиента (API), разложение эксципиентов, реакцию API (или связанных с ним продуктов разложения) с эксципиентами (или связанными с ними продуктами разложения), или реакцию компонентов фармацевтической композиции с контейнерной закрытой системой. Приемлемость продуктов разложения в фармацевтических композициях требует исследования, которое может включать определение структуры продукта разложения, оценку растворимости продукта разложения для парентеральных продуктов и оценку безопасности продукта разложения (*in silico*, *in vitro* и *in vivo*). Химическая стабильность пролекарственных фрагментов, в частности, зависит от идентичности, положения и местной среды пролекарственного фрагмента в активном метаболите, а также от формуляции и условий хранения продукта лекарственного средства. В частности, гидролиз фосфатных сложноэфирных пролекарств чувствителен к стерической и электронной среде вокруг пролекарственного фрагмента, pH препарата и количества воды в препарате. Физическая стабильность, как правило, относится к изменению фазы фармацевтической композиции, которая может включать изменение твердой структуры

порошка, выпадение в осадок плохо растворимых веществ из раствора или изменение структуры дисперсной системы. Для того, чтобы контролировать химическую и физическую стабильность фармацевтических композиций, исследователи могут исследовать способ получения АРІ, дизайн формуляции фармацевтической композиции или способ приготовления фармацевтической композиции.

В дизайне формуляции одним из возможных подходов к контролю проблем, связанных со стабильностью является добавление регулятора рН или буферных агентов для изменения и поддержания рН. Регулирование рН может модифицировать растворимость веществ в растворе (например, АРІ, эксципиентов или продуктов разложения), или может модифицировать скорость образования специфических продуктов разложения. Однако, парентеральные фармацевтические композиции со значениями рН, отклоняющимися от нейтральных, могут вызвать местное раздражение в месте инъекции. Кроме того, оптимизация рН может быть нетривиальной из-за наличия нескольких рН-зависимых механизмов разложения. Следовательно, выбор рН для фармацевтической композиции требует тщательного изучения и рассмотрения.

Другим подходом к дизайну формуляции для контроля стабильности ионизированных АРІ является использование противоионов. Противоионы могут электростатически взаимодействовать с ионизированными группами противоположного заряда и могут быть способны электронно или стерически стабилизировать связи к разложению. Противоионы также могут модифицировать способность АРІ образовывать кристаллические структуры в лиофилизированном или порошковом препарате, что может влиять на химическую и физическую стабильность. Однако, влияние противоионов трудно предсказуемо и требует экспериментального исследования химической и физической стабильности, химической совместимости и оценки безопасности.

Другим подходом к дизайну формуляции для контроля стабильности является добавление стабилизирующих эксципиентов в лиофилизированный препарат. Стабилизирующие эксципиенты могут улучшить химическую и физическую стабильность препаратов на всех стадиях замораживания и высушивания процесса лиофилизации или при хранении лекарственного средства в течение срока его годности. Стабилизирующие эксципиенты могут модифицировать кристалличность и/или температуру стеклования (T_g) лиофилизированного препарата, что может влиять на ориентацию и подвижность веществ в твердом состоянии и, таким образом, влиять на кинетику и термодинамику разложения. Для механизмов деградации, чувствительных к воде (например, гидролиз), стабилизирующие эксципиенты также могут вытеснять воду из взаимодействия с АРІ, и, таким образом, защитить АРІ от разложения или, в качестве альтернативы, могут

эффективно секвестрировать воду и, таким образом, предотвращать ее реакции с API. Выбор и оптимизация стабилизирующего эксципиента требует тщательного учета многих факторов для получения препарата с улучшенной химической стабильностью, включая оценку кристалличности и физической стабильности твердой структуры, сорбционно-десорбционных свойств лиофилизированного продукта, совместимости API и стабилизирующих эксципиентов, и без эксципиентов.

Если химическая и физическая стабильность не может быть улучшена, то альтернативным подходом, управляемым формуляцией, является добавление солюбилизирующих эксципиентов, предотвращающих выпадение в осадок плохо растворимых продуктов разложения в парентеральных композициях. Солюбилизирующие эксципиенты также могут быть полезны для предотвращения выпадения в осадок плохо растворимых примесей, связанных с API, которые трудно удаляются с помощью подходов для выделения и очистки API. Солюбилизирующие эксципиенты могут включать растворители, комплексообразующие эксципиенты, поверхностно-активные вещества или другие эксципиенты. Однако парентеральное введение многих солюбилизирующих эксципиентов может вызвать неблагоприятные эффекты безопасности, которые ограничивают количество эксципиента, которые могут использоваться в конкретной группе пациентов. Например, в «Информации по инструкции по применению в отношении полисорбатов, используемых в качестве эксципиентов в продуктах лекарственных средств для использования человеком» от Европейского агентства по лекарственным средствам от 19 ноября 2018 года (European Medicines Agency as of 19 November 2018), уровни дозы полисорбата для внутривенное введение выше 10 мг/кг на дозу могут иметь неблагоприятные сердечно-сосудистые эффекты и уровни дозы выше 35 мг/кг/день могут иметь неблагоприятные гепатотоксические эффекты. Высокие уровни поверхностно-активных веществ также могут негативно влиять на производство или эффективность продукта лекарственного средства, что может включать образование пены во время производства продукта лекарственного средства или во время получения продуктов лекарственных средств для парентерального введения, или модификацию твердых структур, образующихся во время лиофилизации. Следовательно, количество солюбилизирующего эксципиента должно быть исследовано и оптимизировано, чтобы предотвратить выпадение в осадок плохо растворимых веществ без образования дополнительных рисков для продукта лекарственного средства.

При приготовлении фармацевтической композиции операции производственной единицы (например, компаундирование, лиофилизация) могут подвергать формуляцию воздействию стрессовых факторов, которые в результате приводят к разложению. Кроме

того, препарат может создать фармацевтический продукт с разными композициями или структурами, влияющими на стабильность. Для API, чувствительных к гидролитическому разложению, таких как фосфатные сложноэфирные пролекарства, количество остаточной воды в порошке может в значительной степени влиять на химическую стабильность препарата.

Доза фармацевтической композиции может содержать, по меньшей мере, терапевтически эффективное количество агента, ингибирующего SARS-CoV-2, и предпочтительно состоит из одной или нескольких фармацевтических дозированных единиц. Выбранная доза может вводиться млекопитающему, например пациенту-человеку, нуждающемуся в лечении, опосредованном ингибированием активности коронавируса, связанного с SARS-CoV-2, с использованием любого известного или приемлемого способа введения дозы, включая местное, например, в виде мази или крема; перорально; ректально, например, в виде суппозитория; парентерально посредством инъекции; внутривенно; или непрерывно путем интравагинальной, интраназальной, интрабронхиальной, интраауральной или внутриглазной инфузии.

Фразы «терапевтически эффективное количество» и «эффективное количество», как предполагается, означают количество агента по изобретению, которое, когда вводится млекопитающему, нуждающемуся в лечении, является достаточным для лечения травм или болезненных состояний, которые усугубляются ингибированием репликации вируса SARS-CoV-2. Количество данного агента, ингибирующего SARS-CoV-2, который используется в способе по изобретению, которое будет терапевтически эффективным, будет варьироваться в зависимости от факторов, таких как конкретный агент, ингибирующий SARS-CoV-2, болезненное состояние и его тяжесть, идентичность и характеристики нуждающегося млекопитающего, количество которых может быть обычно определено квалифицированными специалистами в данной области техники.

Следует понимать, что фактические дозировки агентов, ингибирующих SARS-CoV-2, используемых в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, будут выбираться в соответствии со свойствами конкретного используемого агента конкретной сформулированной композиции, способа ввода и конкретного сайта, а также хозяина и состояния, которое лечится. Оптимальные дозировки для данного набора условий могут быть определены специалистами в данной области техники, используя общепринятые исследования определения дозы. Для перорального введения, например, доза, которая может использоваться, составляет от примерно 0,01 до примерно 1000 мг/кг массы тела, предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 500 мг/кг массы тела, и еще более предпочтительно от примерно 1 до примерно 500 мг/кг массы тела, при этом курсы

лечения повторяют через соответствующие интервалы. Для внутривенной дозировки может использоваться доза до 5 граммов в сутки. Внутривенное введение может происходить периодически в течение суток или непрерывно в течение 24-часового периода.

Термины "количество, ингибирующее цитохром P450" и "количество, ингибирующее активность фермента цитохрома P450", как используется в настоящем документе, касаются количества соединения, необходимого для снижения активности ферментов цитохрома P450 или конкретной изоформы фермента цитохрома P450 в присутствии такого соединения. Снижает ли конкретное соединение активность фермента цитохрома P450, и количество такого соединения, необходимое для этого, может быть определено способами, известными квалифицированному специалисту в данной области техники, и способами, описанными в данном документе.

Функции протеина, необходимые для репликации и транскрипции коронавируса, кодируются так называемым геном репликазы. Два перекрывающихся полипротеина транслируются из данного гена и интенсивно обрабатываются вирусными протеазами. С-проксимальный участок обрабатывается на одиннадцати консервативных междоменных соединениях основной или «3С-подобной» протеазой коронавируса. Название «3С-подобная» протеаза происходит от определенного сходства между ферментом коронавируса и хорошо известными 3С-протеазами пикорнавируса. Они включают преимущества субстратов, использование цистеина как нуклеофила активного центра в катализе и схожесть их предполагаемых общих полипептидных складок. Сравнение аминокислотной последовательности 3С-подобной коронарусной протеазы, ассоциированной с SARS-CoV-2, с такой из других известных коронарусов, таких как SARS-CoV, показывает, что аминокислотные последовательности имеют примерно 96% общую гомологичность.

Аминокислоты субстрата в месте расщепления протеазой пронумерованы от N до C конца следующим образом: -P3-P2-P1-P1'-P2'-P3', при этом расщепление происходит между остатками P1 и P1' (Schechter & Berger, 1967). Специфичность субстрата в значительной степени определяется положениями P2, P1 и P1'. Специфичности сайтов расщепления основной протеазы коронавируса высококонсервативны с потребностью в глутамине в P1 и небольшой аминокислоте в P1' (*Journal of General Virology*, 83, pp. 595-599 (2002)).

Соединения, используемые в способах по настоящему изобретению, могут быть получены в соответствии со способами, представленными на схемах реакций 1 – 17, представленных ниже.

Схема 1

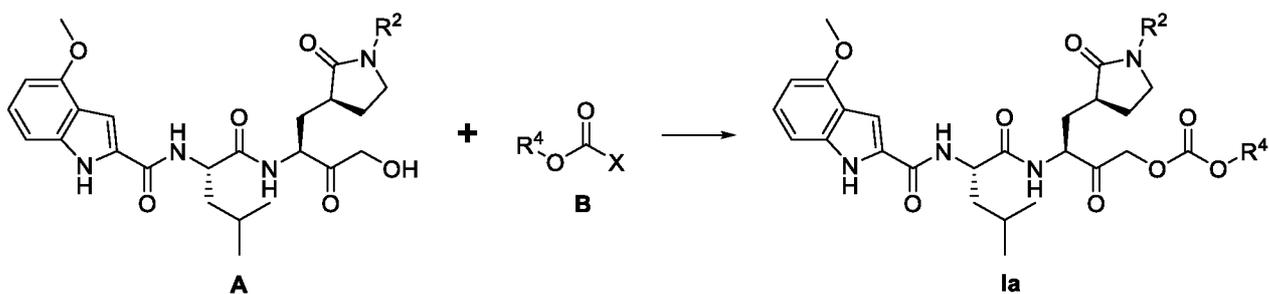


Схема 1 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы Ia, как показано, в котором соединение формулы А обрабатывают соединением формулы В, в котором X представляет атом галогена, чаще всего хлор (смотрите публикацию международной заявки РСТ WO 2005/113580). В данном случае соединение формулы В известно как хлорформат, и такие способы хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники. Реакция проводится в присутствии приемлемого основания для поглощения галогенида водорода НХ, образующегося как побочный продукт реакции. Примеры приемлемого основания включают, но не ограничиваются этим, третичные амины, такие как *N*-метилморфолин (NMM), 2,6-диметилпиридин, или диизопропилэтиламин (DIEA), или неорганические основания, такие как магния оксид (MgO), карбонат натрия (Na₂CO₃) или калия бикарбонат (KHCO₃). Подходящие растворители включают в себя, но не ограничиваются этим, апротонные растворители, такие как дихлорметан (CH₂Cl₂), тетрагидрофуран (ТГФ) или ацетонитрил (CH₃CN). Квалифицированный специалист в данной области оценит, что в случае, когда соединение формулы А имеет R², который представляет собой H, приведенные выше преобразования могут позволить получить продукт - соединение формулы Ia, в котором R² может представлять собой H или может представлять собой ROC(O), в зависимости от выбора параметров реакции, таких как время, температура, растворитель и эквиваленты соединения формулы Е, которые используются.

Схема 2

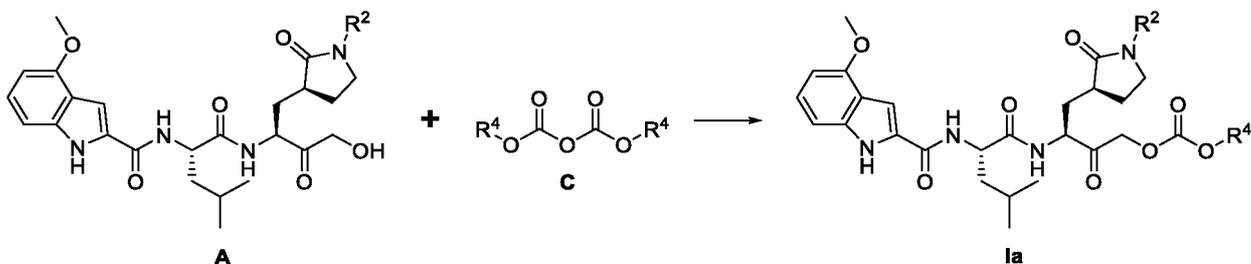


Схема 2 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы Ia, как показано, в которой соединение формулы А обрабатывают соединением формулы

С, которое часто называется квалифицированным специалистом в данной области как пирокарбонат. Реакция часто проводится в присутствии нуклеофильного катализатора для ускорения реакции. Примеры таких нуклеофильных катализаторов включают в себя, но не ограничиваются этим, 4-(диметиламино)пиридин, имидазол или 1,8-дизабицикло[5,4,0]ундек-7-ен (DBU). Приемлемые растворители включают, но не ограничиваются этим, CH_2Cl_2 , ТГФ, пиридин или CH_3CN . Квалифицированный специалист в данной области оценит, что в случае, когда соединение формулы А имеет R^2 , который представляет собой Н, вышеприведенные преобразования могут позволить получить продукт - соединение формулы Ia, в котором R^2 может представлять собой или может представлять собой $\text{R}^4\text{OC}(\text{O})$, в зависимости от выбора параметров реакции, таких как время, температура, растворитель и эквиваленты соединения формулы С, которые используются.

Схема 3

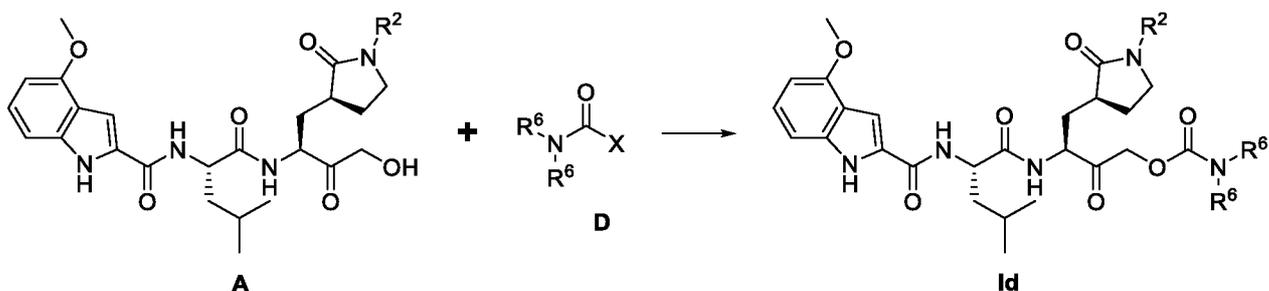


Схема 3 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы Id, как показано, в которой соединение формулы А обрабатывают соединением формулы D, в котором X представляет собой атом галогена, чаще всего хлор. В данном случае соединение формулы D известно, как карбамоилхлорид, и такие способы хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники. Реакция проводится в присутствии основания для поглощения галогенида водорода HX , который образуется как побочный продукт реакции. Примеры приемлемого основания включают, но не ограничиваются этим, третичные амины, такие как N-метилморфолин, 2,6-диметилпиридин или диизопропилэтиламин, или неорганические основания, такие как MgO , Na_2CO_3 или KHCO_3 . Приемлемые растворители включают, но не ограничиваются этим, CH_2Cl_2 , ТГФ или CH_3CN . В другом варианте осуществления, X может представлять собой имидазольное, пиразольное, или триазольное кольцо, соединенное через один из гетероциклических атомов N. Такие реагенты известны квалифицированному специалисту в данной области техники, и, как правило, их получают из соответствующего амина $(\text{R}^6)_2\text{NH}$ и 1,1'-карбонилдиимидазола, 1,1'-карбонилбис-1H-пиразола или 1,1'-карбонилбис-

1*H*-1,2,3-триазола, чаще всего, как предварительная стадия в последовательности синтеза. Квалифицированный специалист в данной области оценит, что в случае, когда соединение формулы А содержит $R^2 = H$, вышеприведенные преобразования могут позволить получить продукт - соединение формулы 1d, в котором R^2 может представлять собой H, или может представлять собой $(R^6)_2NC(O)$, в зависимости от выбора параметров реакции, таких как время, температура, растворитель и эквиваленты соединения формулы D, которые используются.

Схема 4

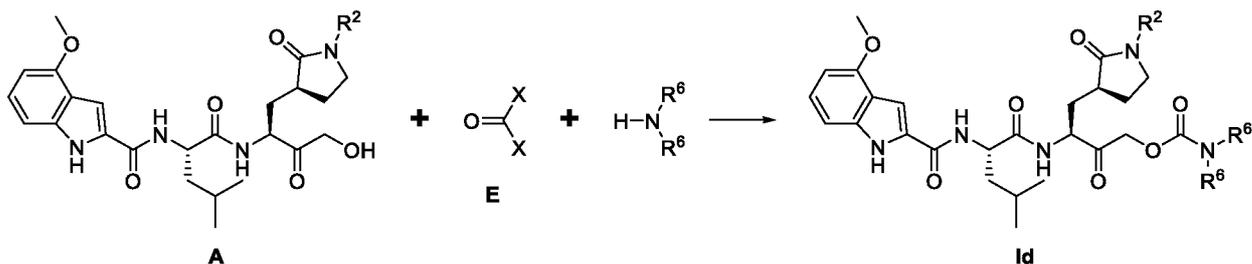


Схема 4 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы 1d, как показано, в какой соединение формулы А обрабатывают соединением формулы Е с последующей через некоторое время обработкой $(R^6)_2NH$. В данном варианте осуществления X может представлять собой имидазольное, пиразольное, или триазольное кольцо, соединенное через один из гетероциклических атомов N, или X может представлять собой *N*-оксимиид, соединенное через атом кислорода O-N. Примеры таких реагентов, общепринято используемых квалифицированным специалистом в данной области, включают 1,1'-карбонилдиимидазол, 1,1'-карбонилбис-1*H*-пиразол, 1,1'-карбонилбис-1*H*-1,2,3-триазол и 1,1'-[карбонилбис(окси)]бис-2,5-пирролидиндион. Реакция может проводиться в присутствии нуклеофильного катализатора для ускорения реакции. Примеры таких нуклеофильных катализаторов включают, но не ограничиваются этим, 4-(диметиламино)пиридин, имидазол или DBU. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются этим, CH_2Cl_2 , ТГФ, ДМФ, ДМСО или CH_3CN . Квалифицированный специалист в данной области оценит, что в случае, когда соединение формулы А содержит $R^2 = H$, вышеприведенные преобразования могут позволить получить продукт - соединение формулы 1d, в котором R^2 может представлять собой H или может представлять собой $(R^6)_2NC(O)$, в зависимости от выбора параметров реакции, таких как время, температура, растворитель и эквиваленты соединения формулы Е, которые используются.

Схема 5

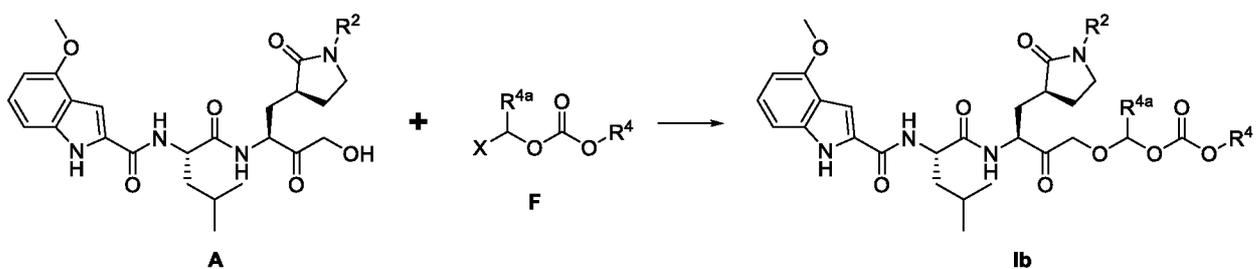


Схема 5 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы 1b, как показано, в которой R^4 представляет собой H, метил или этил, в котором соединение формулы A обрабатывают соединением формулы F, в котором R^{4a} представляет собой H, метил или этил, и X представляет собой атом галогена, часто хлор. Такие соединения F описаны в химической литературе и могут быть коммерчески доступными. Реакция осуществляется путем обработки основанием, например, цезия карбонатом (Cs_2CO_3), в приемлемом растворителе, который может включать, но не ограничивается ими, ТГФ, ДМФ, ДМСО или CH_3CN . Квалифицированный специалист в данной области оценит, что в случае, когда соединение формулы A содержит $R^2 = H$, вышеприведенные преобразования могут позволить получить продукт - соединение формулы 1b, в котором R^2 может представлять собой H и/или может представлять собой $CH(R^{4a})OC(O)OR^4$, в зависимости от выбора параметров реакции, таких как время, температура, растворитель и эквиваленты соединения формулы F, которые используются.

Схема 6

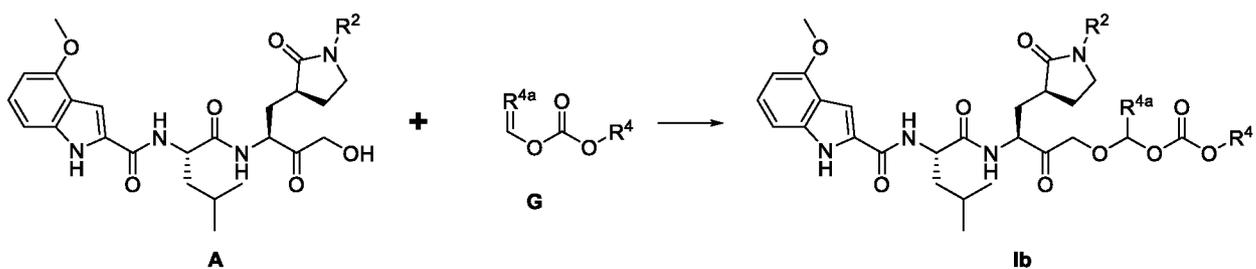


Схема 6 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы 1b, как показано, в которой R^{4a} не является H, в которой соединение формулы A обрабатывают олефиновым соединением формулы G. Такие соединения G являются описанными в химической литературе и могут быть коммерчески доступными. Реакция осуществляется путем обработки катализатором, как известно квалифицированному специалисту в данной области техники, который может включать, но не ограничивается ими, кислоту, соединения палладия или соединения ртути. Подходящие растворители могут включать, но не ограничиваются этим, уксусную кислоту, ТГФ или CH_3CN .

Квалифицированный специалист в данной области оценит, что в случае, когда соединение формулы А содержит $R^2 = H$, вышеприведенные преобразования могут позволить получить продукт соединения формулы 1b, в котором R^2 может представлять собой H, или может представлять собой $CH(R^{4a})OC(O)OR^4$, в зависимости от выбора параметров реакции, таких как время, температура, растворитель и эквиваленты соединения формулы G, которые используются.

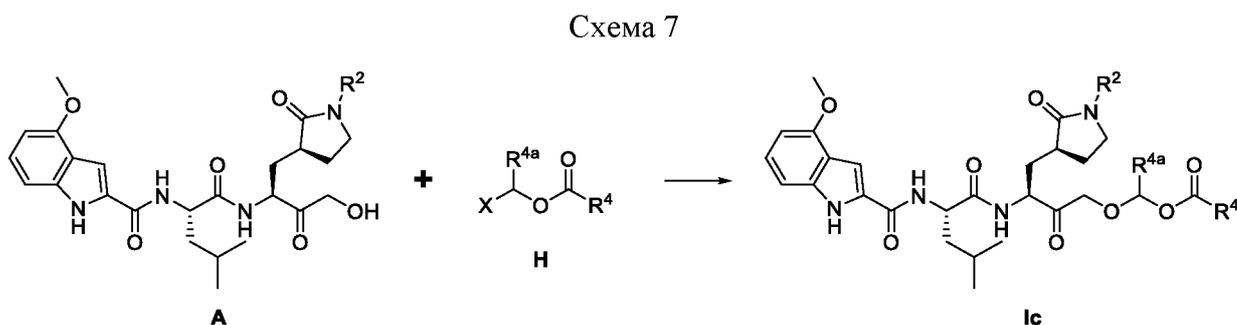


Схема 7 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы 1c, как показано, в которой R^{4a} представляет собой H, метил или этил, в которой соединение формулы А обрабатывают соединением формулы H, в которой R^{4a} представляет собой H, метил или этил, и X представляет собой атом галогена. Реакция проводится в присутствии основания поглощения галогенида водорода HX, который образуется как побочный продукт реакции. Примеры приемлемого основания включают, но не ограничиваются этим, третичные амины, такие как *N*-метилморфолин, 2,6-диметилпиридин или диизопропилэтиламин, или неорганические основания, такие как MgO, CS_2CO_3 или $KHCO_3$. Подходящие растворители могут включать, но не ограничиваются этим, ТГФ, ДМФ, ДМСО или CH_3CN . Квалифицированный специалист в данной области оценит, что в случае, когда соединение формулы А содержит $R^2 = H$, вышеприведенные преобразования могут позволить получить продукт - соединение формулы 1, в котором R^2 может представлять собой H или может представлять собой $CH(R^{4a})OC(O)OR^4$, в зависимости от выбора параметров реакции, таких как время, температура, растворитель и эквиваленты соединения формулы H, которые используются.

Схема 8

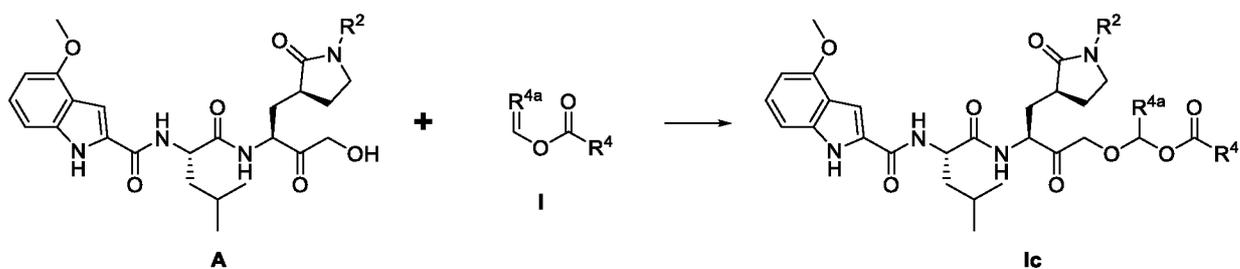


Схема 8 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы 1с, как показано, в которой R^{4a} не представляет H, в которой соединение формулы А обрабатывают олефиновым соединением формулы I. Такие соединения I являются описанными в химической литературе и могут быть коммерчески доступными. Реакция осуществляется путем обработки катализатором, как известно квалифицированному специалисту в данной области техники, который может включать, но не ограничивается ими, кислоту, соединение палладия или соединение ртути. Подходящие растворители могут включать, но не ограничиваются этим, уксусную кислоту, ТГФ или CH_3CN . Квалифицированный специалист в данной области оценит, что в случае, когда соединение формулы А содержит $R^2 = H$, вышеприведенные преобразования могут позволить получить продукт - соединение формулы 1с, в котором R^2 может представлять собой H или может представлять собой $CH(R^{4a})OC(O)OR^4$, в зависимости от выбора параметров реакции, таких как время, температура, растворитель и эквиваленты соединения формулы I, которые используются.

Схема 9

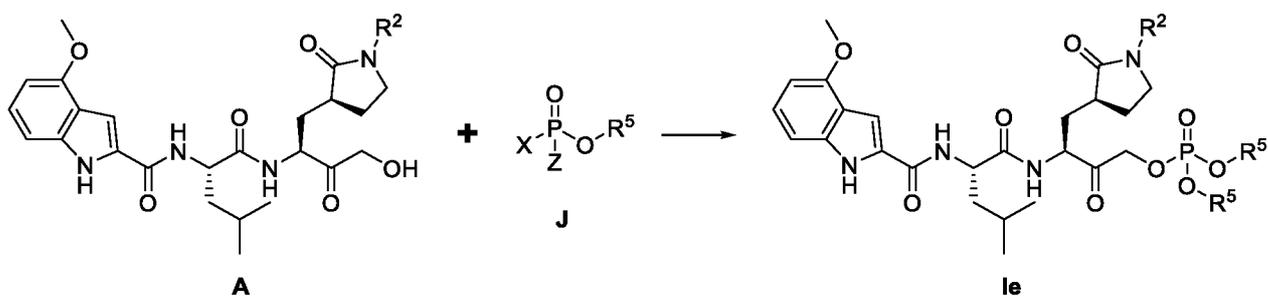


Схема 9 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы 1е, как показано, в которой соединение формулы А обрабатывают соединением формулы J, в которой X обычно представляет собой атом галогена, и Z может представлять собой или C_1 - C_6 алкильную группу непосредственно присоединенную к фосфору, или R^5O группу, присоединенную к фосфору через атом O. Продукт 1е, изображенный выше, существует, когда Z представляет собой R^5O -, но следует понимать, что, когда Z оместь этого представляет собой алкильную группу, то одна из показанных $-OR^5$ групп вместо этого будет алкильная группа. Такие способы хорошо известны квалифицированному

специалисту в данной области техники. Соединения J описаны в химической литературе и могут быть коммерчески доступными. Реакция проводится в присутствии основания поглощения галогенида водорода HX, который образуется как побочный продукт реакции. Примеры приемлемого основания включают в себя, но не ограничиваются этим, третичные амины, такие как N-метилморфолин, пиридин, триэтиламин или диизопропилэтиламин. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются этим, CH₂Cl₂, ДМФ, ТГФ или CH₃CN. Квалифицированный специалист в данной области оценит, что в случае, когда соединение формулы A содержит R² = H, вышеприведенные преобразования могут позволить получить продукт - соединение формулы 1e, в котором R² может представлять собой H или может представлять собой P(O)Z(OR⁵), в зависимости от выбора параметров реакции, таких как время, температура, растворитель и эквиваленты соединения формулы J, которые используются.

Схема 10

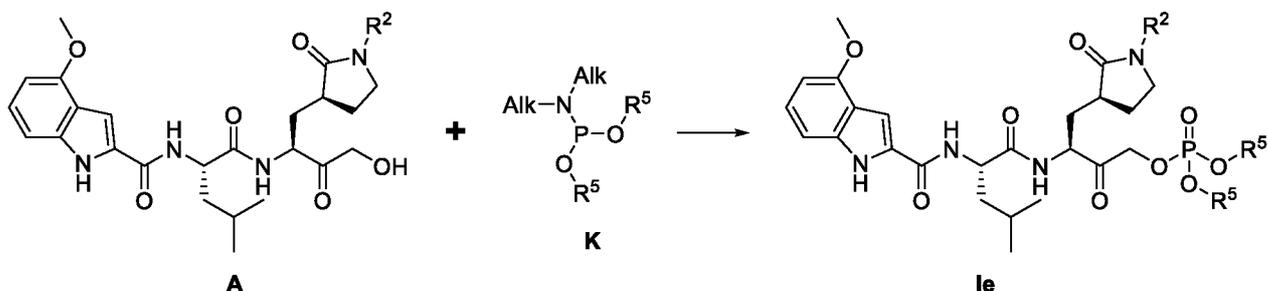


Схема 10 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы 1e, как показано, в которой соединение формулы A обрабатывают соединением формулы K, в котором Alk, как правило, представляет собой алкильную группу, такую как метил, этил, изопропил, *трет*-бутил или бензил. Соединения K являются известными квалифицированными специалистами в данной области, как фосфорамидиты и могут быть коммерчески доступными. Реакция, как правило, проводится в присутствии нуклеофильного катализатора, при этом особенно общепринятым является 1*H*-тетразол. В ходе реакции окислитель, как правило, добавляют перед выделением соединения формулы 1. Типичные окислители включают, но не ограничиваются этим, метахлорпероксибензойную кислоту (*m*CPBA), пероксид водорода (H₂O₂) и *трет*-бутилгидропероксид. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются этим, CH₂Cl₂, ТГФ или CH₃CN. Квалифицированный специалист в данной области оценит, что в случае, когда соединение формулы A содержит R² = H, вышеприведенные преобразования могут позволить получить продукт - соединение формулы 1, в котором R² может представлять собой H или может представлять собой P(O)(OR⁵)₂, в зависимости от выбора

параметров реакции, таких как время, температура, растворитель и эквиваленты соединения формулы К, которые используются.

Схема 11

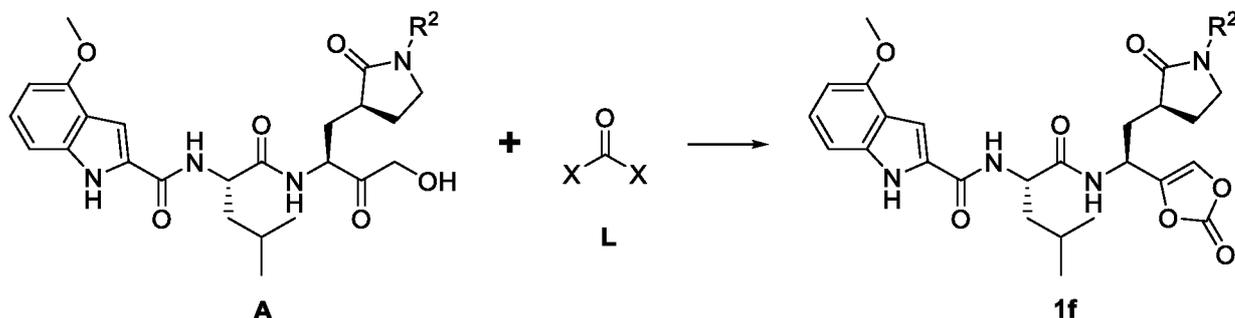


Схема 11 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы 1f, как показано, в которой соединение формулы А обрабатывают соединением формулы L, в котором X представляет собой атом галогена, как правило хлор, или группу OCCl_3 . Соединения O известны в химической литературе как производные фосгена и являются коммерчески доступными. Реакция проводится в присутствии основания поглощения галогенида водорода HX , который образуется как побочный продукт реакции. Примеры приемлемого основания включают в себя, но не ограничиваются этим, третичные амины, такие как *N,N*-диметиланилин, пиридин или *N*-метилморфолин. Приемлемые растворители включают, но не ограничиваются этим, CH_2Cl_2 , ТГФ или CH_3CN .

Схема 12

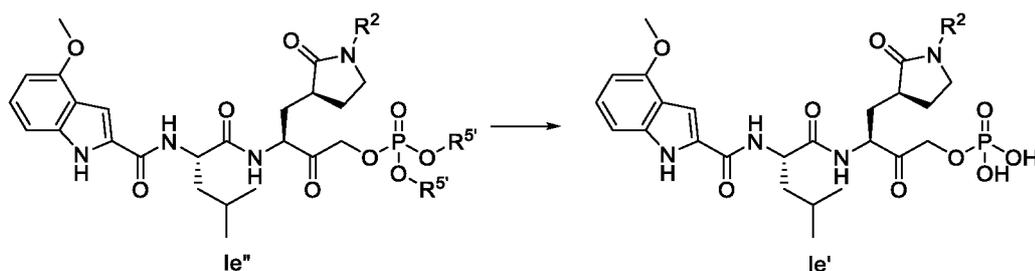


Схема 12 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы 1e', как показано, в которой соединение формулы 1e'', полученное, например, как показано на Схеме 10, обрабатывают реагентом или реагентами, вызывающими отщепление группы R^5O на фосфоре, высвобождая OH -группу, как показано. Такие способы хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники, и выбор условий зависит от природы R^6O -группы, присоединенной к фосфору. Например, когда группа R^5O представляет собой PhCH_2O , реакция может осуществляться путем гидрогенирования над палладиевым катализатором. Альтернативно, когда R^5O -группа представляет собой

PhCH₂O, *трет*-бутил или CH₂CH₂CN, реакция может осуществляться путем подвергания соединения формулы 1e действию кислоты, при этом особенно общепринятой является трифторуксусная кислота. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются этим, CH₂Cl₂, ДМФ, ТГФ или CH₃CN.

Квалифицированный специалист в данной области оценит, что возможно получить соединение по настоящему изобретению, в котором R² может представлять собой некоторую другую группу, чем H. Следующие схемы иллюстрируют, неограниченным способом, как такие другие группы R² могут быть введены для получения соединений формулы A и для получения в конечном итоге соединений по настоящему изобретению, где R² не представляет собой H.

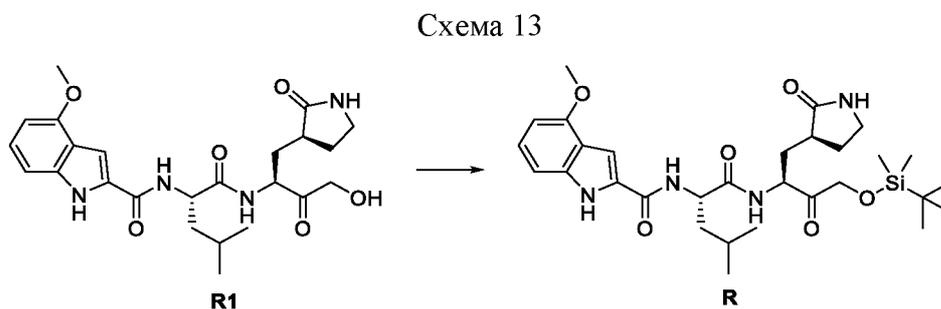


Схема 13 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы R, как показано, в которой соединение формулы R¹ (публикация международной заявки РСТ WO 2005/113580) обрабатывают реагентом, силилирующим ОН-группу, как показано. Такие способы хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники, и проиллюстрированная реакция может быть осуществлена путем подвергания действию соединения формулы R1 *трет*-бутилдиметилхлорсиланом, например, как правило, в присутствии имидазола. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются этим, CH₂Cl₂, ДМФ, ТГФ или CH₃CN. Квалифицированный специалист в данной области оценит, что другие реагенты могут использоваться для введения *трет*-бутилдиметилсилильной группы, и что другие сильные простые эфиры, очень похожие на соединения формулы R, могут быть получены за счет выбора других подходящих агентов силилирования, например, триизопропилсиллил или *трет*-бутилдифенилсилиловые простые эфиры.

Схема 14

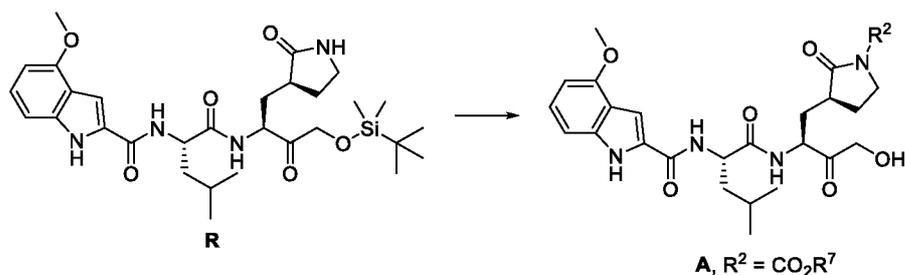


Схема 14 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы А, как показано, в которой соединение формулы R превращается, как правило, путем двух манипуляций синтеза, в соединение формулы А, в котором R² представляет собой C(O)OR⁷, как проиллюстрировано. В первой манипуляции соединение формулы R может быть обработано соединением формулы В (R⁷OC(O)X, Схема 1), в которой X представляет собой атом галогена, чаще всего хлор. В данном случае, соединение формулы В известно, как хлорформат, и такие способы хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники. Реакция проводится в присутствии основания поглощения галогенида водорода HX, который образуется как побочный продукт реакции. Примеры приемлемого основания включают, но не ограничиваются этим, третичные амины, такие как *N*-метилморфолин, 2,6-диметилпиридин, или диизопропилэтиламин, или неорганические основания, такие как MgO, Na₂CO₃ или KHCO₃. Приемлемые растворители включают, но не ограничиваются этим, CH₂Cl₂, ТГФ или CH₃CN. Альтернативно, в первой манипуляции, соединение формулы R может быть обработано соединением формулы С (R⁷OC(O)OC(O)OR⁷, Схема 2), которое часто квалифицированные специалисты в данной области называют как пирокарбонат. Реакция часто производится в присутствии нуклеофильного катализатора для ускорения реакции. Примеры таких нуклеофильных катализаторов включают в себя, но не ограничиваются этим, 4-(диметиламино)пиридин, имидазол или DBU. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются этим, CH₂Cl₂, ТГФ, пиридин или CH₃CN. Во второй манипуляции простой силиловый эфир может быть удален для того, чтобы получить соединения формулы А, как показано. Квалифицированному специалисту в данной области будет понятно, что выбор реагентов и условий для этого преобразования будет зависеть от природы конкретной группы C(O)OR⁷, введенной во время первой манипуляции, так что условия для второй манипуляции не являются несовместимыми с целостностью группы C(O)OR⁷, введенной при первой манипуляции. Обычно условия, используемые для удаления силильного простого эфира, включают подвергание действию кислот, таких как трифторуксусная кислота, уксусная кислота, фтористоводородная кислота или хлороводородная кислота, например, или поочередное влияние источника

иона фтора, при этом особенно общепринятым является тетрабутиламония фторид. Квалифицированный специалист в данной области оценит, что выбор приемлемых растворителей для второй манипуляции будет зависеть от реагентов, выбранных для осуществления такого преобразования, и могут включать, но не ограничиваются CH_2Cl_2 , ТГФ или CH_3CN .

Схема 15

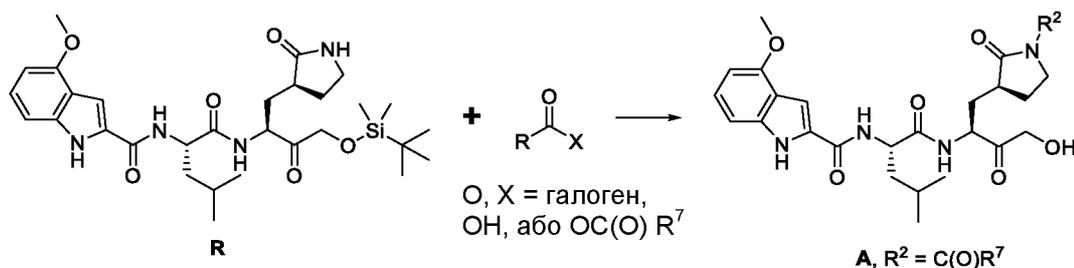


Схема 15 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы А, как показано, в которой соединение формулы R превращается, как правило, путем двух манипуляций синтеза, в соединение формулы А, в котором R² представляет собой C(O)R, как проиллюстрировано. В первой манипуляции соединение формулы R обрабатывают соединением формулы O, в котором X, как правило, представляет собой атом галогена, OH или OC(O)R⁷. Такие способы хорошо известны квалифицированному специалисту в данной области техники. Например, когда X = атом галогена, реакция проводится в присутствии основания для поглощения галогенида водорода HX, который образуется как побочный продукт реакции. Примеры приемлемого основания включают, но не ограничиваются этим, третичные амины, такие как N-метилморфолин, 2,6-диметилпиридин или диизопропилэтиламин, или неорганические основания, такие как MgO, Na₂CO₃ или KHCO₃. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются этим, CH_2Cl_2 , ДМФ, ТГФ или CH_3CN . Когда X = OH, соединение формулы O представляет собой карбоновую кислоту и является общепринятым для использования реагента или комбинации реагентов для ускорения реакции карбоновой кислоты O. Квалифицированный специалист в данной области может выбрать для использования, например, карбодимидный реагент, такой как EDC или DCC, необязательно в присутствии вспомогательного нуклеофила, такого как HOBT или HOPO. Кроме того, когда X = OH, квалифицированный специалист в данной области может выбрать для использования реагенты, которые являются приемлемыми для образования смешанных карбоксильных/карбоновых ангидридов, таких как CDI, изобутил или этилхлорформат, часто в присутствии основания, такого как описывается выше. Подходящие растворители

включают, но не ограничиваются этим, CH_2Cl_2 , ТГФ или CH_3CN . Другой подход, используемый квалифицированным специалистом в данной области, когда $\text{X} = \text{OH}$, заключается в обработке соединения формулы O хлоридангидридом карбоновой кислоты, например, таким как Me_3CCOCl , в присутствии основания, такого как описывается выше для получения смешанного ангидрида карбоновой кислоты формулы $\text{R}^7\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{O})\text{CCMe}_3$. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются этим, CH_2Cl_2 , ТГФ или CH_3CN . Во многих случаях, молящим является применение симметричного ангидрида желательной карбоновой кислоты формулы O для осуществления реакции по Схеме 15, необязательно в присутствии основания, такого как описывается выше, при этом в случае, когда $\text{X} = \text{O}(\text{O})\text{CR}$, и соединение формулы O представляет собой, таким образом, $\text{R}^7\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{O})\text{R}^7$. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются этим, CH_2Cl_2 , ТГФ или CH_3CN .

Во второй манипуляции простой силиловый эфир может быть удален для того, чтобы получить соединения формулы A, как показано. Квалифицированному специалисту в данной области будет понятно, что выбор реагентов и условий для осуществления этого преобразования будет зависеть от природы конкретной группы $\text{C}(\text{O})\text{R}$, введенной во время первой манипуляции, так что условия для второй манипуляции несовместимы с целостностью группы $\text{C}(\text{O})\text{R}$, введенной при первой манипуляции. Обычно условия, используемые для удаления силильного простого эфира, включают подвергание действию кислот, таких как трифторуксусная кислота, уксусная кислота, фтористоводородная, или хлороводородная кислота, например, или поочередное влияние источника иона фтора, при этом особенно общепринятым является тетрабутиламония фторид. Квалифицированный специалист в данной области оценит, что выбор приемлемых растворителей для второй манипуляции будет зависеть от реагентов, выбранных для осуществления такого преобразования, и могут включать, но не ограничиваются CH_2Cl_2 , ТГФ или CH_3CN .

Схема 16

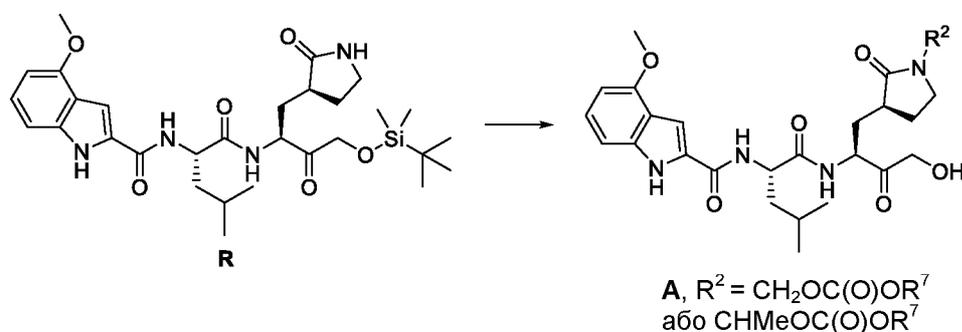


Схема 16 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы A, как показано, в какой соединение формулы R превращается, как правило путем двух

манипуляций синтеза, в соединение формулы А, в которой R² представляет собой CH₂OC(O)OR⁷ или CHMeOC(O)OR⁷, как проиллюстрировано. В первой манипуляции соединение формулы R может быть обработано соединением формулы F (XCH₂OC(O)OR⁷ или XCHMeOC(O)OR⁷, Схема 5), в которой X представляет собой атом галогена. Такие соединения формулы F описаны в химической литературе и могут быть коммерчески доступными. Реакция осуществляется путем обработки основанием, например, KOtBu или Cs₂CO₃, в приемлемом растворителе, который может включать, но не ограничивается ими, ТГФ, ДМФ, ДМСО или CH₃CN.

Во второй манипуляции простой силиловый эфир может быть удален для того, чтобы получить соединения формулы А, как показано. Квалифицированному специалисту в данной области будет понятно, что выбор реагентов и условий для этого преобразования будет зависеть от природы конкретной группы CH₂OC(O)OR⁷ или CHMeOC(O)OR⁷, введенной во время первой манипуляции, так что условия для второй манипуляции не являются несовместимыми с целостностью группы CH₂OC(O)OR⁷ или CHMeOC(O)OR⁷, введенной во время первой манипуляции. Сильный простой эфир может быть удален путем подвергания действию фторидного иона, при этом особенно принят тетрабутиламмония фторид. Подходящие растворители для второй манипуляции могут включать, но не ограничиваются этим ДМФ, CH₂Cl₂, ТГФ или CH₃CN.

Схема 17

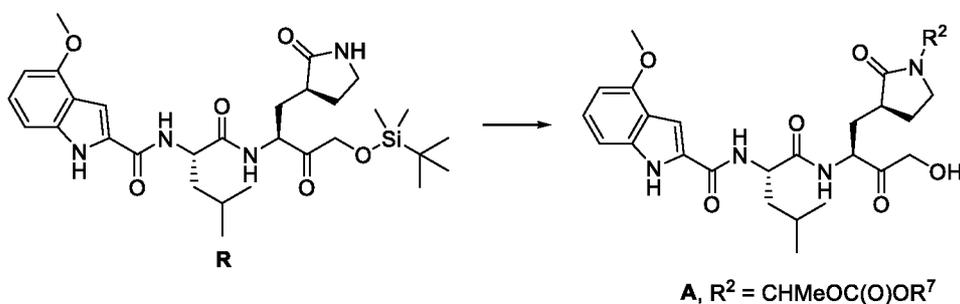


Схема 17 иллюстрирует последовательность синтеза для получения соединений формулы А, как показано, в какой соединение формулы R превращается, как правило, путем двух манипуляций синтеза, в соединение формулы А, в котором R² представляет собой CHMeOC(O)OR⁷, как проиллюстрировано. В первой манипуляции соединение формулы R может быть обработано олефиновым соединением формулы G (CH₂=CHOC(O)OR⁷, Схема 6). Такие соединения формулы G описаны в химической литературе и могут быть коммерчески доступными. Реакция осуществляется путем обработки катализатором, как известно квалифицированному специалисту в данной области техники, который может включать, но не ограничивается этим, кислоту, соединение палладия или соединение

ртути. Подходящие растворители могут включать, но не ограничиваются этим, CH_2Cl_2 , ТГФ или CH_3CN .

Во второй манипуляции простой силиловый эфир может быть удален для того, чтобы получить соединения формулы А, как показано. Квалифицированному специалисту в данной области будет понятно, что выбор реагентов и условий для этого преобразования будет зависеть от природы конкретной группы CHMeOC(O)OR^7 , введенной во время первой манипуляции, так что условия для второй манипуляции не являются несовместимыми с целостностью группы CHMeOC(O)OR^7 , введенной при первой манипуляции. Силильный простой эфир может быть удален путем подвергания действию фторидного иона, при этом особенно приемлемым является тетрабутиламония фторид. Приемлемые растворители для второй манипуляции могут включать, но не ограничиваются этим, ДМФ, CH_2Cl_2 , ТГФ или CH_3CN .

ПРИМЕРЫ

Следующие Примеры могут быть получены в соответствии со способами, описанными на Схемах 1-17 в настоящем документе, и для примеров 1, 2, 5, 7, 8, 43, 44, 49, 57, 64 и 65, которые могут быть получены, как конкретно указываются ниже.

Экспериментальные процедуры

Следующее иллюстрирует синтез различных соединений по настоящему изобретению. Дополнительные соединения в пределах объема настоящего изобретения могут быть получены с использованием способов, проиллюстрированных в данных примерах, либо самостоятельно, либо в комбинации с методиками, как правило, известными в данной области по уровню техники. Все исходные материалы в данных Получениях и Примерах либо коммерчески доступны, либо могут быть получены способами, известными в данной области, либо как описывается в настоящем документе.

Все реакции производились, используя постоянное перемешивание в атмосфере газообразного азота или аргона, если не отмечается иное. Когда это уместно, реакционные устройства сушили под динамическим вакуумом, используя тепловую пушку, и использовались безводные растворители (Sure-SealTM продукты от Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin или DriSolvTM продукты от компании EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). В некоторых случаях коммерческие растворители пропускали через колонки, заполненные 4Å молекулярными ситами для того, чтобы достичь следующих стандартов QC по содержанию воды: а) <100 м.д. для дихлорметана, толуола, N,N-диметилформамида и тетрагидрофурана; б) <180 м.д. для метанола, этанола, 1,4-диоксана и диизопропиламина. Для очень чувствительных реакций растворители дополнительно обрабатывают металлическим натрием, гидридом кальция или молекулярными ситами и

дистиллируют непосредственно перед применением. Другие коммерческие растворители и реагенты использовали без дополнительной очистки. Для синтеза по процедурам ссылки в других Примерах или Способах, условия реакции (время и температура реакции) могут варьировать. Продукты, как правило, сушили в вакууме перед тем, как осуществлять последующие реакции или подвергать биологическим исследованиям.

Когда указывается, реакции нагревали микроволновым облучением, используя микроволновые устройства Biotage Initiator или Personal Chemistry Emrys Optimizer. Прохождение реакции контролировали, используя анализы тонкослойной хроматографии (ТСХ), жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), и/или газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС). ТСХ проводили на предварительно покрытых силикагелем пластинах при помощи индикатора флуоресценции (длина волны возбуждения 254 нм) и визуализировали под УФ-освещением и/или с использованием окрашивания I₂, KMnO₄, CoCl₂, фосфомолибденовой кислоты и/или церия. Данные ЖХ-МС были получены на приборе Agilent серии 1100 с автосамплером Leap Technologies, колонками Gemini C18, градиентами ацетонитрил/вода, и модификаторами или трифторуксусной кислотой, муравьиной кислотой, или гидроксидом аммония. Элюат колонки анализировали, используя масс-спектрометр Waters ZQ, сканируя как в режимах положительных, так и отрицательных ионов от 100 до 1200 Да. Остальные подобные инструменты также использовались. Данные ВЭЖХ, как правило, были получены на приборе Agilent серии 1100, используя указанные колонки, градиенты ацетонитрил/вода, и модификаторы или трифторуксусную кислоту, или гидроксид аммония. Данные ГХ-МС были получены, используя печь Hewlett Packard 6890 с инжектором HP 6890, колонкой HP-1 (12 м × 0,2 мм × 0,33 мкм) и гелий, как газ-носитель. Образец анализировали на масс-селективном детекторе HP 5973, сканируя от 50 до 550 Да с использованием электронной ионизации. Очистки проводили с использованием среднеэффективной жидкостной хроматографии (СЕРХ), используя инструменты Isco CombiFlash Companion, AnaLogix IntelliFlash 280, Biotage SP1 или Biotage Isolera One и предварительно упакованные силикагелевые картриджи Isco RediSep или Biotage Snap. Хиральную очистку проводили с использованием хиральной сверхкритической жидкостной хроматографии (SFC), как правило, используя инструменты Berger или Thar; колонки, такие как колонки ChiralPAK-AD, -AS, -IC, Chiralcel-OD, или -OJ; и смеси CO₂ с метанолом, этанолом, 2-пропанолом, или ацетонитрилом, самостоятельно или модифицированные с использованием трифторуксусной кислоты или пропан-2-амина. УФ-детектирование использовалось для инициирования сбора фракций. Для синтезов, ссылающихся на процедуры в других

Примерах или Способах, очистки могут варьировать: в общем, растворители и соотношение растворителей, используемых для элюентов/градиентов, выбирали для обеспечения соответствующих R_f или времени содержания.

Данные масс-спектрометрии представлены с применением анализа РХМС (жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии). Масс-спектрометрию осуществляли с использованием источников химической ионизации при атмосферном давлении (APCI), электроспрейе ионизации (ESI), ионизации электронным ударом (EI) или ионизации рассеяния электронов (ES). Химические смещения протонной ядерно-магнитной спектроскопии (^1H ЯМР) приводятся в миллионных долях слабого поля от тетраметилсилана и регистрировались на спектрометрах Varian, Bruker, или Jeol 300, 400, 500 или 600 МГц. Химические оползны выражаются в миллионных долях (м.д., δ) по отношению к остаточным пикам дейтерированного растворителя (хлороформ, 7,26 м.д.; CD_2HOD , 3,31 м.д.; ацетонитрил- d_2 , 1,94 м.д.; диметилсульфоксид- d_6 , 2,50 м.д.; D_2O , 4,79 м.д.). Формы пиков описываются следующим образом: с, синглет; д, дублет; т, триплет; кв, квартет; квин., квинтет; м, мультиплет; ш с, широкий синглет; оч., очевидный. Аналитические данные SFC, как правило, были получены на аналитическом приборе Berger, как описано выше. Данные вращения поляризации площади были получены на поляриметре PerkinElmer модели 343, используя ячейки 1 дм. Микроанализы производились с использованием Quantitative Technologies Inc. и находились в пределах 0,4% от рассчитанных значений.

Если не отмечается иное, химические реакции проводились при комнатной температуре (около 23 градусов Цельсия).

Если не указывается иное, все реагенты получались коммерчески и использовались без дополнительной очистки или получались с использованием способов, известных в литературе.

Термины "концентрировали", "испаряли" и "концентрировали в вакууме" касаются удаления растворителя при пониженном давлении на роторном испарителе с температурой бани менее 60 °С. Сокращение "мин." и "ч." означают "минуты" и "часы", соответственно. Термин "ТСХ" касается тонкослойной хроматографии, "комнатная температура или температура окружающей среды" означает температуру от 18 до 25 °С, "ГХ-МС" касается газовой хроматографии-масс-спектрометрии, "ЖХ-МС" касается жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии, "УЭЖХ" касается ультра-эффективной жидкостной хроматографии, "ВЭЖХ" касается высокоэффективной жидкостной хроматографии, и "СЖХ" касается сверхкритической жидкостной хроматографии.

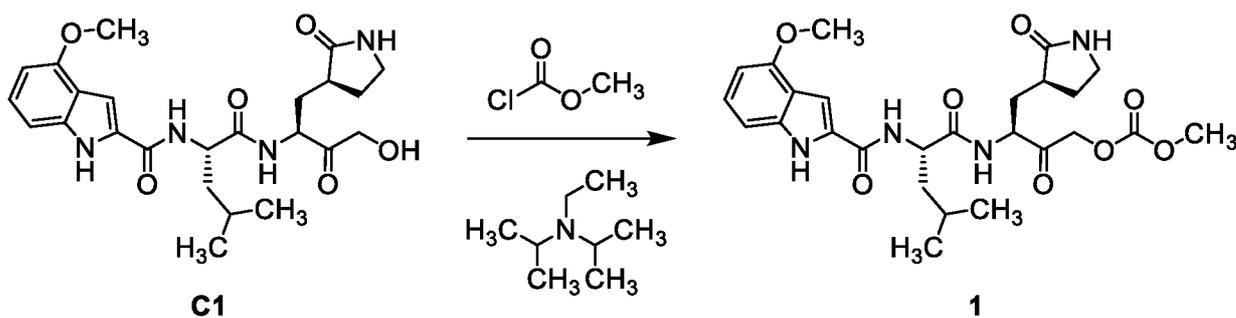
Гидрогенирование может проводиться в шейкере Парра под давлением газообразного водорода или в гидрогенированном аппарате в потоке Thales-nano H-Cube с полным содержанием водорода и скоростью потока 1–2 мл/мин. при заданной температуре.

Время удержания по ВЭЖХ, УЭЖХ, ЖХ-МС, ГХ-МС, и СЖХ измеряли с использованием способов, указанных в процедурах.

В некоторых примерах осуществляли хиральное разделение, чтобы разделить энантиомеры или диастереомеры конкретных соединений по изобретению (в некоторых примерах разделенные энантиомеры обозначаются как ENT-1 и ENT-2, согласно их порядку элюирования; подобным образом, разделенные диастереомеры обозначаются как DIAST-1 и DIAST-2, согласно их порядку элюирования). В некоторых примерах оптическое вращение для энантиомера измеряли, используя поляриметр. Согласно его данным вращения, которые наблюдались (или его конкретных данных вращения), энантиомер с вращением по часовой стрелке был обозначен как (+)-энантиомер, и энантиомер с вращением против часовой стрелки обозначался как (-)-энантиомер. Рацемические соединения обозначаются либо отсутствием начерченной или описанной стереохимии, либо наличием (+/-) соседних со структурой; в этом последнем случае указанная стереохимия представляет собой лишь один из двух энантиомеров, составляющих рацемическую смесь.

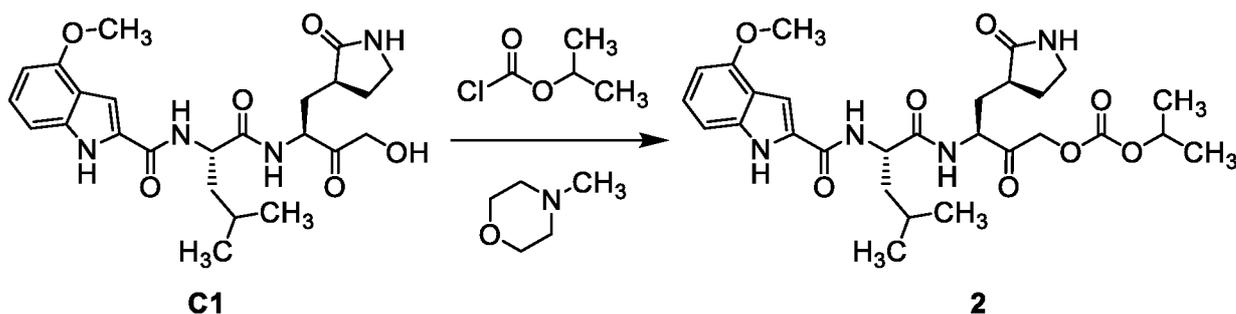
Соединения и промежуточные продукты, описанные ниже, были названы, используя соглашение о присвоении названий, представленное в ACD/ChemSketch 2019.1.1, File Version C05H41, Build 110712 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Ontario, Canada). Соглашение о присвоении названий, представленное в ACD/ChemSketch 2019.1.1 хорошо известно квалифицированному специалисту в данной области техники, и считается, что соглашение о присвоении названий, представленное в ACD/ChemSketch 2019.1.1, в целом соответствует рекомендациям IUPAC for Pure and Applied Chemistry) по номенклатуре органической химии и правилам индекса CAS.

Пример 1: (3*S*)-3-({N-[(4-Метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилметилкарбонат (1)



При 0 °С раствор *N*-[(2*S*)-1-((2*S*)-4-гидрокси-3-оксо-1-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутан-2-ил)амино)-4-метил-1-оксопентан-2-ил]-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид (**C1**) (смотрите Hoffman, RL et al., PCT Int. Appl. 2005113580, December 1, 2005; 30 мг, 63 мкмоль) в тетрагидрофуране (0,64 мл) обрабатывали *N,N*-диизопропилэтиламино (11 мкл, 63 мкмоль), после чего метилхлорформиатом (4,91 мкл, 63,5 мкмоль). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры в течение ночи, после чего прибавляли дополнительный эквивалент метилхлорформиата. Через три дня, поскольку реакция все еще не завершилась, добавляли *N,N*-диметилформамид (0,2 мл); через 4 часа реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и промывали 1 М хлороводородной кислотой. Органический слой сушили над натрия сульфатом, фильтровали и концентрировали в вакууме. Очистка с использованием силикагелевой хроматографии (Градиент: от 0% до 10% метанола в дихлорметане) давала (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил} амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилметилкарбонат (**1**) в виде твердого вещества. Выход: 24 мг, 45 мкмоль, 71%. ЖХ-МС *m/z* 531,4 [M+H]⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, метанол-*d*₄) δ 7,28 (ш с, 1H), 7,14 (дд, компонент системы АВХ, *J* = 8, 8 Гц, 1H), 7,02 (д, половина квартета АВ, *J* = 8,3 Гц, 1H), 6,50 (д, *J* = 7,7 Гц, 1H), 4,91 (квартет АВ, *J*_{АВ} = 17,4 Гц, Δ□_{АВ} = 10,1 Гц, 2H), 4,66 – 4,57 (м, 2H), 3,92 (с, 3H), 3,76 (с, 3H), 3,29 – 3,20 (м, 2H), 2,61 – 2,50 (м, 1H), 2,33 – 2,22 (м, 1H), 2,09 (ддд, *J* = 14,2, 11,2, 4,7 Гц, 1H), 1,88 – 1,66 (м, 5H), 1,03 (д, *J* = 6,1 Гц, 3H), 0,99 (д, *J* = 6,2 Гц, 3H).

Пример 2: (3*S*)-3-({*N*-[(4-Метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил пропан-2-ил карбонат (**2**)



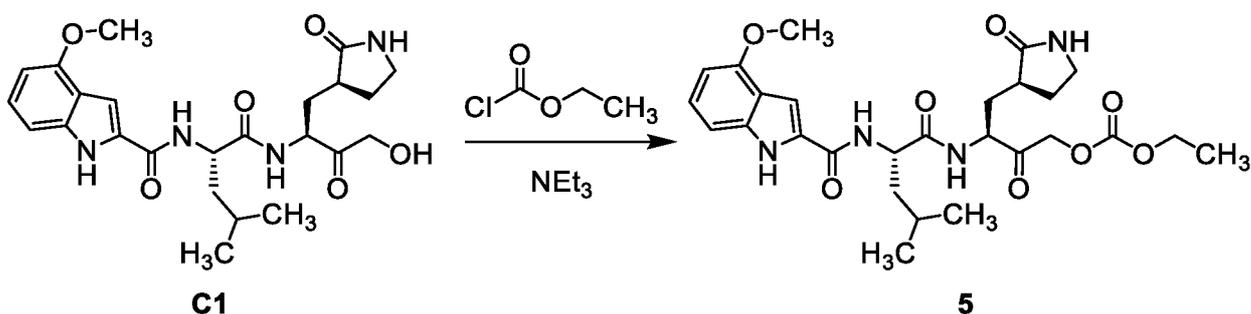
При 0 °С раствор **C1** (15 мг, 32 мкмоль) в тетрагидрофуране (0,32 мл) обрабатывали 4-метилморфолином (4,2 мкл, 38 мкмоль), после этого раствором 2-пропилхлорформиата в толуоле (1,0 М; 34 ,8 мкл, 34,8 мкмоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры; через 5 часов применяли нагревание и перемешивание продолжали при 40 °С в течение ночи, после чего реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и обрабатывали 10% водным раствором гидросульфата калия. После того, как органический слой сушили над натрия сульфатом, его фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. Очистка с использованием ВЭЖХ с оберной фазой (Колонка: Waters Sunfire C18,

19 × 100 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты; Подвижная фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты; Градиент: от 5% до 95% В свыше 8,54 минуты, затем 95% В в течение 1,46 минуты; метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилпропан-2-ил-карбонат (2). Выход: 14,5 мг, 26,0 мкмоль, 81%. РХ-ТС m/z 559,5 $[M+H]^+$. Время удержания: 2,73 минуты (Аналитические условия. Колонка: Waters Atlantis dC18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.) Градиент: от 5,0% до 95% В, линейный свыше 4,0 минуты, затем 95% В в течение 1,0 минуты; Скорость потока: 2 мл/минуту).

Пример 3: (3S)-4-[(3S)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутилметилкарбонат

Пример 4: (3S)-4-[(3S)-1-((1S)-1-[(метоксикарбонил)окси]этил)-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутилметил-карбонат

Пример 5: Этил (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилкарбонат (5)



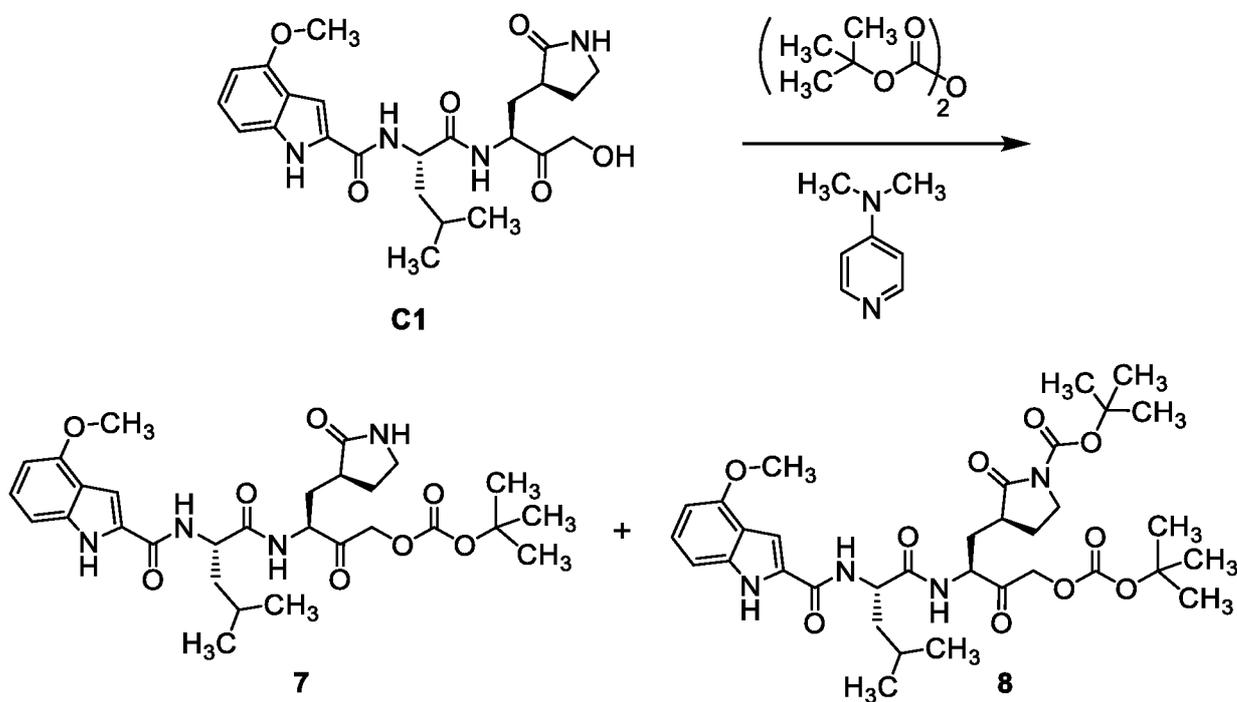
Этилхлорформиат (29,9 мг, 0,276 ммоль) и триэтиламин (42,8 мг, 0,423 ммоль) добавляли к раствору C1 (100 мг, 0,212 ммоль) в дихлорметане (4,0 мл) при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 2 часов, после чего разбавляли водой (3 мл) и экстрагировали дихлорметаном (3 × 3 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над натрия сульфатом, концентрировали в вакууме, и объединяли с продуктом с аналогичной реакции, которую осуществляли с использованием C1 (50,0 мг, 0,106 ммоль). Очистка с использованием ВЭЖХ с обратной фазой (Колонка: Agela Durashell C18, 40 × 150 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: 0,225% муравьиной кислоты в воде; Подвижная фаза В: ацетонитрил; Градиент: от 26% до 66 потока: 50 мл/минуту) давала этил (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил карбонат (5) в виде белого твердого вещества. Объединенный выход: 48,0 мг, 88,1 мкмоль, 28%. ЖХ-МС m/z 545,3 $[M+H]^+$. 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 11,59 (д, $J = 2,4$ Гц, 1H), 8,59 (д, $J = 7,9$

Гц, 1H), 8,46 (д, $J = 7,7$ Гц, 1H), 7,66 (с, 1H), 7,37 (д, $J = 2,4$ Гц, 1H), 7,09 (дд, компонент системы АВХ, $J = 8, 8$ Гц, 1H), 7,00 (д, половина квартета АВ, $J = 8,2$ Гц, 1H), 6,50 (д, $J = 7,6$ Гц, 1H), 4,89 (квартет АВ, $J_{AB} = 17,3$ Гц, $\Delta\nu_{AB} = 21,6$ Гц, 2H), 4,52 – 4,37 (м, 2H), 4,13 (кв., $J = 7,1$ Гц, 2H), 3,88 (с, 3H), 3,19 – 3,03 (м, 2H), 2,37 – 2,25 (м, 1H), 2,13 – 2,03 (м, 1H), 1,98 (ддд, $J = 14, 11, 4$ Гц, 1H), 1,79 – 1,50 (м, 5H), 1,21 (т, $J = 7,1$ Гц, 3H), 0,94 (д, $J = 6,2$ Гц, 3H), 0,89 (д, $J = 6,2$ Гц, 3H).

Пример 6: метил (3*S*)-3-[(2*S*)-4-[(метоксикарбонил)окси]-2-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилат

РХ-ТС m/z 589,5 $[M+H]^+$. Время удержания: 2,77 минуты (Аналитические условия. Колонка: Waters Atlantis dC18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); Градиент: от 5,0% до 95% В, линейный более 4,0 минут, затем 95% В в течение 1,0 минут; Скорость потока: 2 мл/минуту).

Примеры 7 и 8: *трет*-бутил (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил карбонат (7) и *трет*-бутил (3*S*)-3-[(2*S*)-4-[(*трет*-бутоксикарбонил)окси]-2-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилат (8)



4-(Диметиламино)пиридин (0,13 мг, 1,10 мкмоль) добавляли к раствору **C1** (26,8 мг, 56,7 мкмоль) и ди-*трет*-бутилдикарбоната (12 мг, 55 мкмоль) в тетрагидрофуране (0, 55 мл). После перемешивания реакционной смеси в течение 1 часа и 40 минут ее концентрировали в вакууме и чистили с использованием силикагелевой хроматографии (Градиент: от 0% до 100% этилацетата в гептане), получая *трет*-бутил (3*S*)-3-({*N*-[(4-

метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилкарбонат (7) в виде твердого вещества. Выход: 7,4 мг, 13 мкмоль, 24%. ЖХ-МС m/z 573,4 [M+H]⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-*d*), характеристические пики: δ 9,53 (ш с, 1H), 8,64 (д, $J = 5,9$ Гц, 1H), 7,17 (дд, компонент системы АВХ, $J = 8, 8$ Гц, 1H), 7,10 (ш д, $J = 2$ Гц, 1H), 6,99 (д, половина квартета АВ, $J = 8,3$ Гц, 1H), 6,83 (ш д, $J = 8,2$ Гц, 1H), 6,48 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H), 6,10 (ш с, 1H), 4,84 (Квартет АВ, $J_{AB} = 17,2$ Гц, $\Delta\nu_{AB} = 41,0$ Гц, 2H), 4,83 – 4,74 (м, 1H), 4,55 – 4,46 (м, 1H), 3,93 (с, 3H), 3,34 – 3,16 (м, 2H), 2,47 – 2,25 (м, 2H), 1,48 (с, 9H), 1,01 – 0,94 (м, 6H).

Выделенным таким образом было соединение **8**, в виде твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-*d*), характеристические пики: δ 8,04 (ш с, 1H), 7,76 (ш д, $J = 6,5$ Гц, 1H), 7,09 (д, половина квартета АВ, $J = 8,3$ Гц, 1H), 6,70 (ш с, 1H), 6,49 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H), 4,78 (Квартет АВ, $J_{AB} = 17,8$ Гц, $\Delta\nu_{AB} = 33,3$ Гц, 2H), 4,38 – 4,28 (м, 1H), 3,94 (с, 3H), 3,82 – 3,69 (м, 1H), 3,38 – 3,28 (м, 1H), 3,27 – 3,15 (м, 1H), 2,30 – 2,17 (м, 1H), 2,04 – 1,88 (м, 2H), 1,63 (с, 9H), 1,61 (с, 9H), 1,03 (д, $J = 6,6$ Гц, 3H), 0,96 (д, $J = 6,5$ Гц, 3H).

Данную партию **8** дополнительно чистили с использованием ВЭЖХ с обернутой фазой (Колонка: Waters Sunfire C18, 19 × 100 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты; Подвижная фаза В: содержащий ацетонитрил 0,05% трифторуксусной кислоты Градиент: от 45% до 85% В свыше 8,5 минут, затем от 85% до 95% В свыше 0,5 минуты, затем 95% В в течение 1,0 минуты; Скорость потока: 25 мл/минуту), получая *трет*-бутил (3S)-3-[(2S)-4-[(*трет*-бутоксикарбонил)окси]-2-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилат (**8**). Выход: 13,5 мг, 20,1 мкмоль, 36%. РХ-ТС m/z 673,7 [M+H]⁺. Время удержания: 3,43 минуты (Аналитические условия. Колонка: Waters Atlantis dC18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.) Градиент: от 5,0% до 95% В, линейный свыше 4,0 минуты, затем 95% В в течение 1,0 минуты; Скорость потока: 2 мл/минуту).

Данная ВЭЖХ с обратной фазой очистка также давала три-*трет*-бутилоксикарбонильную производную *трет*-бутил 2-{[(2S)-1-({(2S)-1-[(3S)-1-(*трет*-бутоксикарбонил)-2-оксопирролидин-3-ил]-4-[(*трет*-бутоксикарбонил)окси]-3-оксобутан-2-ил}амино)-4-метил-1-оксопентан-2-ил]карбамоил}-4-метокси-1H-индол-1-карбоксилат. Выход: 6,2 мг, 8,0 мкмоль, 14%. ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-*d*) δ 7,70 (ш д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 7,55 (д, $J = 8,5$ Гц, 1H), 7,33 – 7,25 (м, 1H, допускается; частично затеняется пиком растворителя), 6,95 (с, 1H), 6,77 – 6,66 (м, 1H), 6,67 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 4,90 (квартет АВ, $J_{AB} = 17,5$ Гц, $\Delta\nu_{AB} = 41,3$ Гц, 2H), 4,72 – 4,62 (м, 2H), 3,93 (с, 3H), 3,71 – 3,61 (м, 1H), 3,54

– 3,43 (м, 1H), 2,54 – 2,42 (м, 1H), 1,63 (с, 9H), 1,48 (с, 9H), 1,48 (с, 9H), 1,00 (д, $J = 6,4$ Гц, 6H). ЖХ-МС другого (не-8) пика в предварительно очищенном образце: m/z 773,8 $[M^+H]^+$.

Пример 9: (1R)-1-((3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил)окси)этилметилкарбонат

Пример 10: (1R)-1-((3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил)окси)этилпропан-2-илкарбонат

Пример 11: (1R)-1-((3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил)окси)пропилметилкарбонат

Пример 12: (1R)-1-((3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил)окси)пропилпропан-2-илкарбонат

Пример 13: ((3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил)окси)метилметилкарбонат

Пример 14: ((3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил)окси)метилпропан-2-илкарбонат

Пример 15: этил (1R)-1-((3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил)окси)этилкарбонат

Пример 16: этил (1R)-1-((3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил)окси)пропил карбонат

Пример 17: этил ((3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил)окси)метилкарбонат

Пример 18: метил (3S)-3-[(2S)-4-[[метоксикарбонил)окси]метокси]-2-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилат

Пример 19: *трет*-бутил (1R)-1-((3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил)окси)этилкарбонат

Пример 20: *трет*-бутил (1R)-1-((3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил)окси)пропилкарбонат

Пример 21: *трет*-бутил ((3S)-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил)окси)метилкарбонат

Пример 22: ((3S)-3-[(2S)-4-[[метоксикарбонил)окси]метокси]-2-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-ил)метилметилкарбонат

Пример 23: ((3S)-4-[(3S)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил]-3-((N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил)амино)-2-оксобутил)окси)метилметилкарбонат

Пример 40: {[*(3S)*-4-[[*(3S)*-1-{{*(1S)*-1-[(метоксикарбонил)окси]этил}-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({*N*-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутил]окси]-метилпропаноат

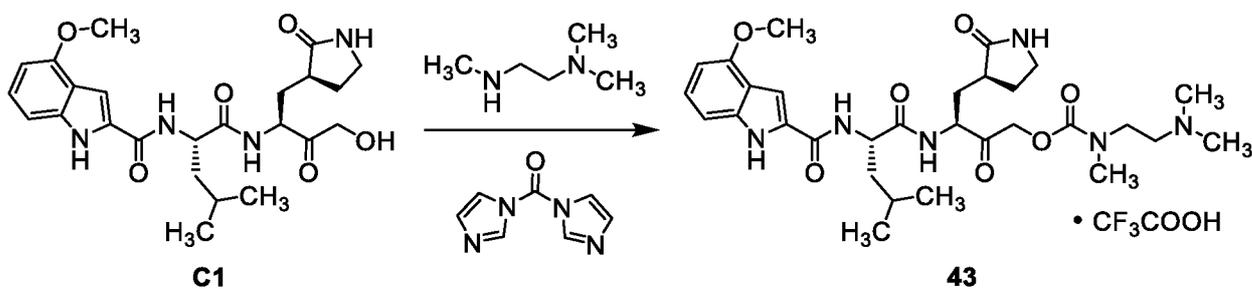
Пример 41: (*3S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[[*(3S)*-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-1,4'-бипиперидин-1'-карбоксилат

РХ-ТС m/z 667,6 $[M^+H]^+$. Время удержания: 2,16 минуты (Аналитические условия. Колонка: Waters Atlantis dC18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); Градиент: от 5,0% до 95% В, линейный свыше 4,0 минуты, затем 95% В в течение 1,0 минуты; Скорость потока: 2 мл/минуту).

Пример 42: (*3S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[[*(3S)*-2-оксопирролидин-3-ил]бутил [2-(диметиламино)этил]карбамат

РХ-ТС m/z 587,6 $[M+H]^+$. Время удержания: 1,96 минуты (Аналитические условия. Колонка: Waters Atlantis dC18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); Градиент: от 5,0% до 95% В, линейный свыше 4,0 минуты, затем 95% В в течение 1,0 минуты; Скорость потока: 2 мл/минуту).

Пример 43: (*3S*)-3-({*N*-[(4-Метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[[*(3S)*-2-оксопирролидин-3-ил]бутил [2-(диметиламино)этил]метилкарбамат, трифторацетатная соль (**43**)



1,1'-карбонилдиимидазол (6,86 мг, 42,3 мкмоль) добавляли к раствору **C1** (20 мг, 42 мкмоль) в дихлорметане (0,42 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего добавляли *N,N,N'*-триметилетан-1,2-диамин (5,50 мкл, 42,3 мкмоль) и перемешивание продолжали в течение ночи. После того, как реакционную смесь концентрировали *in vacuo*, остаток чистили с использованием хроматографии с обратной фазой (Колонка: Waters Sunfire C18, 19 × 100 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты; Подвижная фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты, Градиент: от 5% до 95% В более 8,54 минут, затем 95% В в течение 1,46 минут; Скорость потока: 25 мл/минуту), получая (*3S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-

[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил[2-(диметиламино)этил]метилкарбамат, трифторацетатную соль (**43**). Выход: 16,5 мг, 23,1 мкмоль, 55%. РХ-ТС *m/z* 601,6 [M+H]⁺. Время удержания: 2,05 минуты (Аналитические условия. Колонка: Waters Atlantis dC18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); Градиент: от 5,0% до 95% В, линейный свыше 4,0 минуты, затем 95% В в течение 1,0 минуты; Скорость потока: 2 мл/минуту).

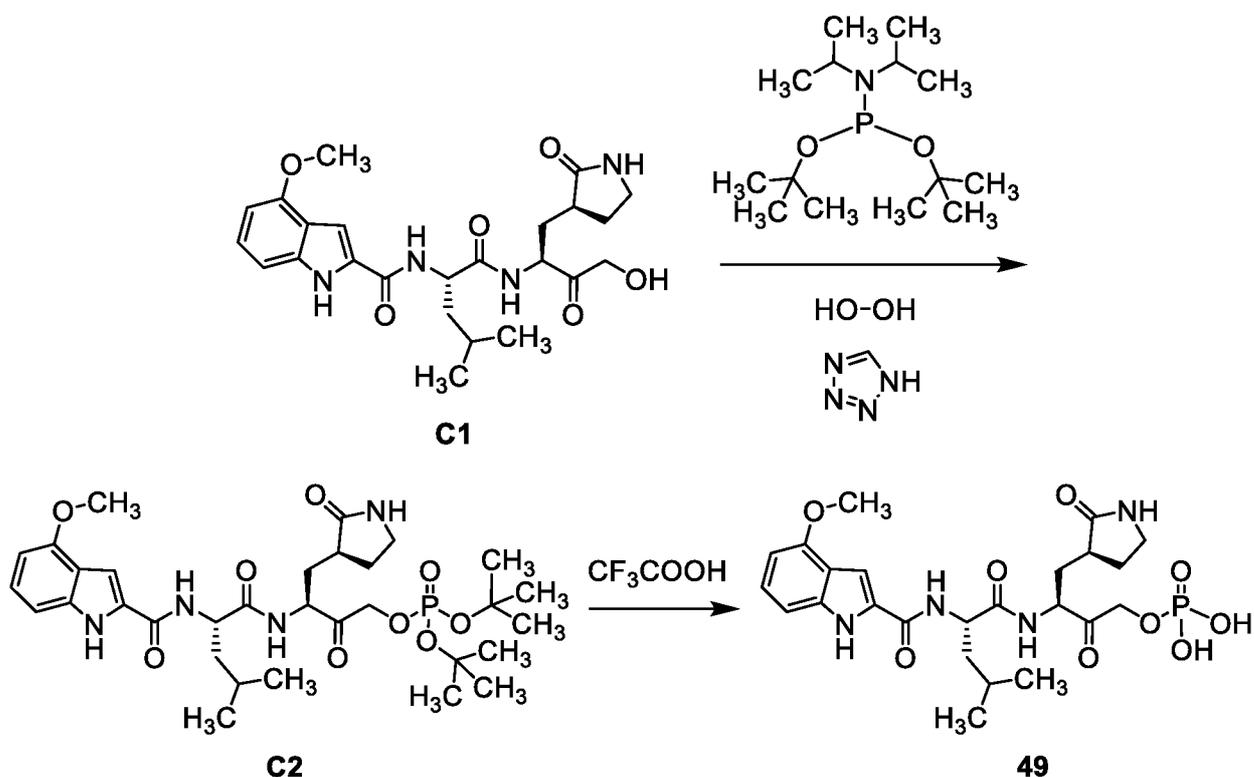
Пример 45: (3*S*)-4-[(3*S*)-1-(метоксикарбонил)-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({*N*-[(4-метокси-1Н-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутил пиперидин-1-карбоксилат

Пример 46: (3*S*)-4-[(3*S*)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({*N*-[(4-метокси-1Н-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутилпиперидин-1-карбоксилат

Пример 47: (3*S*)-4-[(3*S*)-1-{(1*S*)-1-[(метоксикарбонил)окси]этил}-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({*N*-[(4)-метокси-1Н-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутил-пиперидин-1-карбоксилат

Пример 48: (1*S*)-1-{(3*S*)-3-[(2*S*)-4-[(диметоксифосфорил)окси]-2-({*N*-[(4-метокси-1Н-индол-2-ил))карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-ил}этилметилкарбонат

Пример 49: (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1Н-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфат (**49**)



Стадия 1. Синтез ди-*трет*-бутил (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилфосфат (**C2**).

При 0 °С к раствору *N*-[(2*S*)-1-((2*S*)-4-гидрокси-3-оксо-1-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутан-2-ил}амино)-4-метил-1-оксопентан-2-ил]-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид (**C1**) (смотрите Hoffman, RL et al., PCT Int. Appl. 2005113580, December 1, 2005 2,82 г, 5,97 ммоль) и 1*H*-тетразола (1,25 г, 17,9 ммоль) в тетрагидрофуране (60 мл) добавляли раствор ди-*трет*-бутил *N,N*-дипропан-2-илфосфорамидоита (7,53 мл, 6,62 г, 23,9 ммоль) в тетрагидрофуране (0,5 мл). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры в течение 30 минут и затем охлаждали до 0 °С. Добавляли водный раствор пероксида водорода (50 масс./масс., 0,80 мл, 11,9 ммоль), и перемешивание продолжали в течение 1 часа. Реакционную смесь разбавляли водой (30 мл) и экстрагировали в дихлорметан (3 × 20 мл). Объединенные органические слои промывали водным раствором тиосульфата натрия (1 М, 20 мл) и водой (20 мл), затем сушили над магния сульфатом, фильтровали и концентрировали в вакууме. Силикагелевая хроматография (Градиент: от 0% до 15% метанола в дихлорметане) давала **C2** в виде твердого вещества. Выход: 3,60 г, 5,42 ммоль, 91%. РХ-ТС m/z 663,5 [M-H]⁻. ¹H ЯМР данные для данного соединения получали с использованием из партии по пилотной реакции меньшего масштаба, проходившей при тех же условиях.

¹H ЯМР (400 МГц, метанол-*d*₄, ³¹P-расщепленные) δ 7,27 (с, 1H), 7,15 (т, *J* = 8,1 Гц, 1H), 7,02 (д, *J* = 8, 3 Гц, 1H), 6,51 (д, *J* = 7,6 Гц, 1H), 4,75 (Квартет АВ, *J* АВ = 17,3 Гц, ААВ = 26,3 Гц, 2H), 4,70 (дд, *J* = 10,3 Гц, 3,7 Гц, частично перекрывается с квартетом АВ при 4,75 м.д., 1H), 4,64 (дд, *J* = 9,3 Гц, 5,1 Гц, 1H), 3,93 (с, 3H), 3,33-3,20 (м, 2H, допускается; частично затеняется с пиком метанолом), 2,62-2,53 (м, 1H), 2,34-2,25 (м, 1H), 2,11-2,01 (м, 1H), 1,90-1,65 (м, 5H), 1,51-1,43 [мультиплет (1H) перекрытие двух уширенных синглетов при 1,49(18H), 1,9H всего], 1,03(д, *J* = 6,1 Гц, 3H), 1,00 (д, *J* = 6,1 Гц, 3H).

Стадия 2. Синтез (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата (**1**)

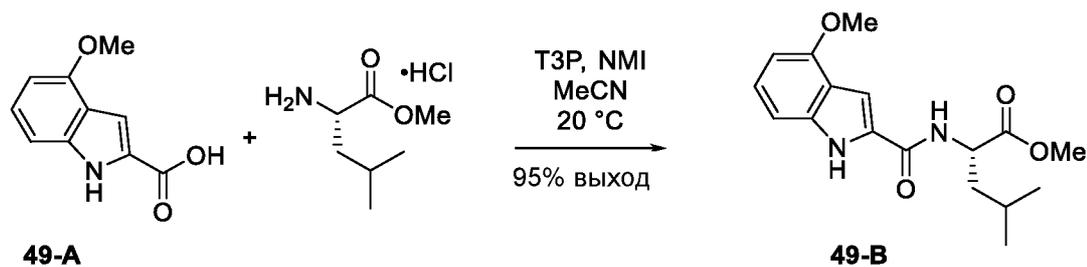
Трифторуксусную кислоту (2,07 мл, 27,1 ммоль) добавляли к раствору при 0 °С **C2** (3,60 г, 5,42 ммоль) в дихлорметане (54 мл). После перемешивания в течение 1 часа реакционную смесь концентрировали в вакууме. ЖХ-МС анализ в данный момент показал преобразование в **49**: ЖХ-МС m/z 553,3 [M+H]⁺. Остаток суспендировали в этаноле (15 мл) при 75 °С в течение 30 минут и затем при комнатной температуре в течение 2 часов. Твердое вещество собирали фильтрованием, получая (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат (**49**) в виде твердого вещества. Выход: 1,60 г, 2,90 ммоль, 54%. ¹H

ЯМР (400 МГц, метанол- d_4 , ^{31}P -расщепленные) δ 7,27 (с, 1H), 7,15 (т, $J = 8,0$ Гц, 1H), 7,03 (д, $J = 8, 3$ Гц, 1H), 6,51 (д, $J = 7,7$ Гц, 1H), 4,80-4,56 (м, 3H), {4,25-4,19 (м) и 4,02-3,81 [мультиплет, который перекрывается с синглетом при 3,93(3H)], 4H в общем}, 3,31-3,18 (м, 2H, допускается; частично затеняется с пиком метанолом), [2,63-2,52 (м) и 2,51-2,38 (м), 1H в целом], 2,36-2,24 (м, 1H), 2,10-1,98 (м, 1H), 1,94-1,65 (м, 5H), 1,04 (д, $J = 5,6$ Гц, 3H), 1,00 (д, $J = 5,9$ Гц, 3H). Время удержания: 6,48 минут (Аналитические условия. Колонка: Waters XBridge C18, $4,6 \times 150$ мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,1% трифторуксусной кислоты; Подвижная фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,1% трифторуксусной кислоты, Градиент: 5% В в течение 1,5 минут, затем от 5% до 100% В свыше 8,5 минут; Скорость потока: 1,5 мл/минуту).

Соединение по Примеру 49 также может быть получено в качестве гидрата (назначенной в Форме 1) как описано ниже.

Синтез (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата моногидрата

Стадия 1: Синтез метил (4-метокси-1H-индол-2-карбонил)-L-лейцината, (49-B)



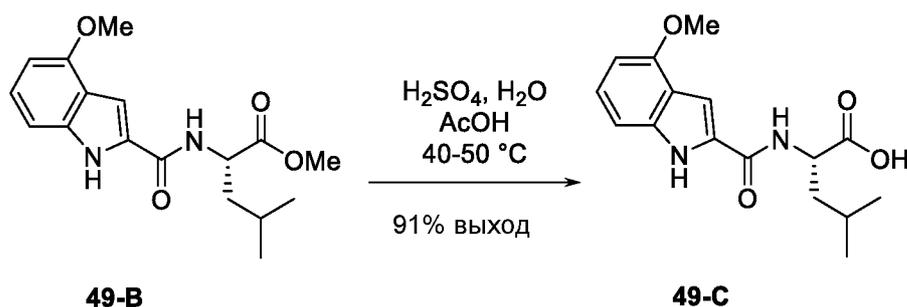
В реактор с рубашкой при 20 °С загружали 4-метокси-1H-индол-2-карбоновую кислоту (49-A) (1,0 экв., 100 г), ацетонитрил (7 мл/г, 700 мл), *N*-метилимидазол (3,5 экв., 145,8 мл) и L-лейцинметилового сложного эфира гидрохлорид (1,15 экв., 109 г). Циклический ангидрид 1-пропанфосфоновой кислоты (ТЗР) в ацетонитриле (50 масс.%, 1,25 экв., 457 мл) загружали по каплям, поддерживая температуру ниже 30 °С. Полученную в результате смесь перемешивали в течение 2 часов или пока не осталось <1% 4-метокси-1H-индол-2-карбоновой кислоты по УЭЖХ-анализу. Реакционную смесь фильтровали через слой целита, промывая ацетонитрилом (2 мл/г, 200 мл), и полученный в результате фильтрат концентрировали до ~10 мл/г при пониженном давлении, поддерживая температуру менее 50 °С. Загружали воду (1,5 мл/г, 150 мл), и смесь перемешивали, пока твердые вещества не начали оседать. Дополнительную воду (8 мл/г, 800 мл) загружали по каплям и полученную в результате суспензию гранулировали в течение 4 часов перед фильтрованием. Твердые вещества промывали водой (5 мл/г, 500 мл) и сушили при 50 °С,

получая метил (4-метокси-1H-индол-2-карбонил)-L-лейцинат (49-B) (158 г) с 95 % выходом в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 11,57 (с, 1H), 8,62 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H), 7,35 (д, $J = 1,7$ Гц, 1H), 7,10 (т, $J = 7,9$ Гц, 1H), 7,01 (д, $J = 8,2$ Гц, 1H), 6,51 (д, $J = 7,6$ Гц, 1H), 4,58 – 4,44 (м, 1H), 3,89 (с, 3H), 3,65 (с, 3H), 1,85 – 1,62 (м, 2H), 1,64 – 1,53 (м, 1H), 0,93 (д, $J = 6,4$ Гц, 3H), 0,89 (д, $J = 6,4$ Гц, 3H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО- d_6) δ 173,14, 161,20, 153,65, 137,88, 129,54, 124,57, 118,05, 105,41, 101,16, 99,26, 55,09, 51,91, 50,51, 39,38, 24,44, 22,85, 21,16.

Стадия 2: Синтез (4-метокси-1H-индол-2-карбонил)-L-лейцина, (49-C)

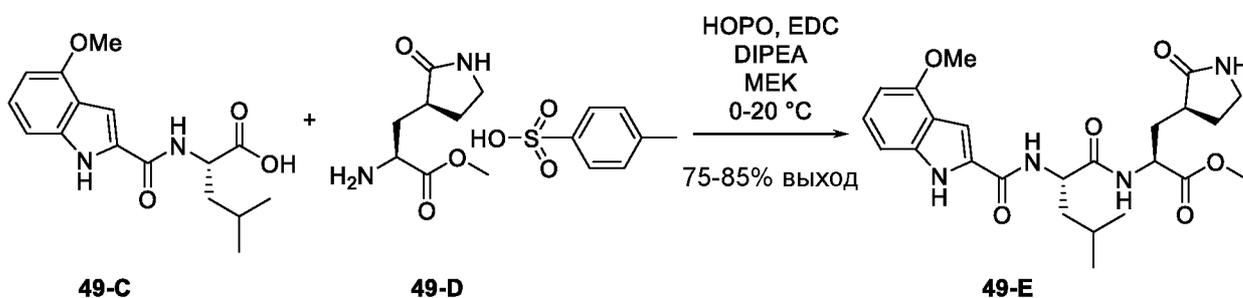


В реактор с рубашкой загружали метил (4-метокси-1H-индол-2-карбонил)-L-лейцинат (49-B) (1,0 экв., 158 г), уксусную кислоту (5 мл/г, 790 мл) и воду (1 мл/г, 158 мл). Серную кислоту (1,5 экв., 39,7 мл) загружали в течение 30 минут. Смесь нагревали до $50\text{ }^\circ\text{C}$ и выдерживали в течение 18-24 часов, или пока реакционная смесь не содержала примерно 5% остаточного метил (4-метокси-1H-индол-2-карбонил)-L-лейцината. Реакционную смесь дистиллировали при пониженном давлении для того, чтобы удалить побочные продукты: метанол или метилацетат. Когда реакция достигала завершения (менее 1% остаточного метил (4-метокси-1H-индол-2-карбонил)-L-лейцината), воду (7 мл/г, 1106 мл) загружали в течение 2 часов. После перемешивания в течение 1 часа смесь охлаждали до $20\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 30 минут, затем выдерживали при $20\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 3 часов. Твердые вещества выделяли фильтрованием, промывая водой (2×2 мл/г, 316 мл). Твердые вещества сушили на фильтре, затем в вакуумном шкафу при $50\text{ }^\circ\text{C}$, получая (4-метокси-1H-индол-2-карбонил)-L-лейцин, (49-C) (137 г) в виде белого твердого вещества из 91 % выходом.

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 11,55 (с, 1H), 8,50 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 7,34 (д, $J = 1,6$ Гц, 1H), 7,10 (т, $J = 7,9$ Гц, 1H), 7,01 (д, $J = 8,2$ Гц, 1H), 6,51 (д, $J = 7,6$ Гц, 1H), 4,54 – 4,36 (м, 1H), 3,89 (с, 3H), 1,81 – 1,66 (м, 2H), 1,63 – 1,53 (м, 1H), 0,93 (д, $J = 6,3$ Гц, 3H), 0,89 (д, $J = 6,3$ Гц, 3H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО- d_6) δ 174,22, 161,11, 153,63, 137,82, 129,80, 124,43, 118,06, 105,40, 100,96, 99,22, 55,07, 50,41, 24,51, 22,96, 21,13. (пик примерно 39,5 под пиком ДМСО).

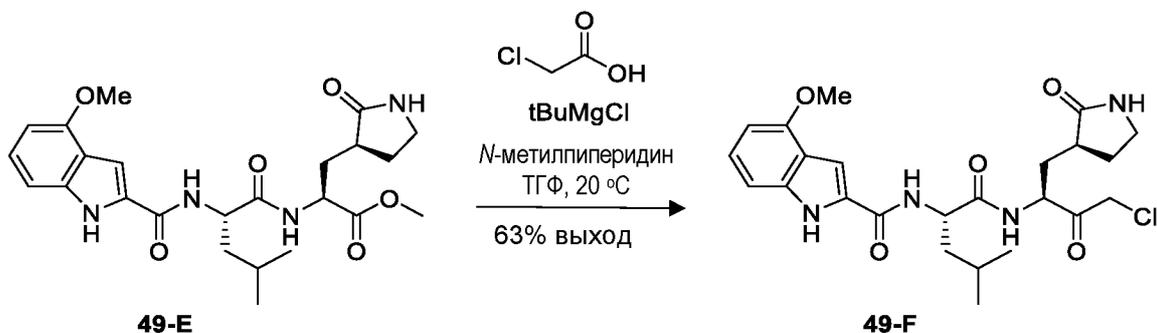
Стадия 3: Синтез метил (*S*)-2-((*S*)-2-(4-метокси-1Н-индол-2-карбоксамидо)-4-метилпентанамидо)-3-((*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)пропаноат, (**49-E**)



В реактор с рубашкой загружали (4-метокси-1Н-индол-2-карбонил)-L-лейцин (**49-C**) (1,0 экв., 10,0 г), метил (*S*)-2-амино-3-((*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)пропаноат 4-метилбензолсульфонат (**49-D**) (1,05 экв., 12,4 г), 2-гидроксипиридин N-оксид (0,025 экв., 0,91 г) и метилэтилкетон (5 мл/г, 50 мл). Полученную в результате суспензию охлаждали до 0 °С и загружали *N,N*-диизопропилэтиламин (2,25 экв., 12,9). 1-(3-Диметиламинопропил)-3-этил-карбодиимида гидрохлорид (1,2 экв., 7,86 г) загружали одной порцией, и смесь перемешивали в течение 20 минут, затем нагревали до 20 °С и перемешивали в течение по меньшей мере 8 часов или пока не оставалось меньше, чем 1% (4-метокси-1Н-индол-2-карбонил)-L-лейцина (**49-C**) при УЭЖХ. Водный раствор насыщенного солевого раствора (23,5 масс.%, 3,5 мл/г, 35 мл) добавляли к реакционной смеси, с последующим добавлением раствора фосфорной кислоты (1,5 экв., 5,68 г) в воде (3 мл /г, 30 мл). Полученную в результате двухфазную смесь перемешивали в течение 15 минут, затем слои разделяли. Органический слой промывали водным насыщенным солевым раствором (23,5 масс.%, 3,5 мл/г, 35 мл). Органический слой концентрировали при пониженном давлении (250 мбар, 50 °С) до 5 мл/г, затем загружали метил-трет-бутиловый простой эфир (5 мл/г, 50 мл) и повторяли дистиллирование. Дополнительные загружали метил-трет-бутиловый простой эфир (5 мл/г, 50 мл), и смесь охлаждали до 35°С в течение 15 минут. Затем медленно загружали другую порцию метил-трет-бутилового простого эфира (2,5 мл/г, 25 мл), получая в результате осадок. Суспензию гранулировали в течение 30 минут перед тем, как загружали последнюю порцию метил-трет-бутилового эфира (2,5 мл/г, 25 мл), чтобы достичь конечное соотношение растворителей примерно 4:1 метил-трет-бутиловый простой эфир:метилэтилкетон. Конечную суспензию гранулировали в течение 30 минут, затем охлаждали до 10 °С со скоростью 0,25 °С/мин. и выдерживали в течение 4 часов. Конечную суспензию фильтровали, промывая простым

метил-*трет*-бутиловым эфиром (2,5 мл/г, 25 мл) и сушили на фильтре, затем в вакуумном шкафу при 25 °С. Продукт метил (*S*)-2-(((*S*)-2-(4-метокси-1Н-индол-2-карбоксамидо)-4-метилпентанамидо)-3-(((*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)пропаноат, (**49-E**) выделяли в виде сольвата с метил-*трет*-бутиловым простым эфиром с 75-85% выходом.

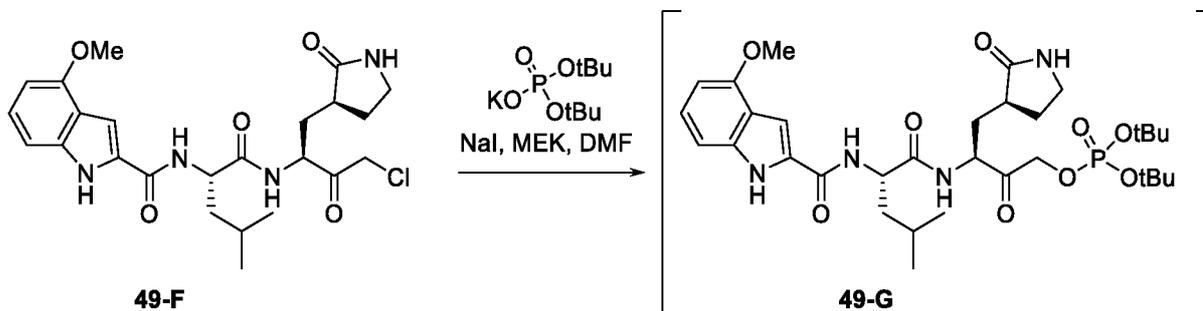
Стадия 4: Синтез *N*-(((*S*)-1-(((*S*)-4-хлор-3-оксо-1-(((*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)бутан-2-ил)амино)-4-метил-1-оксопентан-2-ил)-4-метокси-1Н-индол-2-карбоксамид, (**49-F**)



В реактор с рубашкой при 20 °С загружали *трет*-бутилмагния хлорид в тетрагидрофуране (1М, 21 экв., 32 г) и *N*-метилпиперидин (10,5 экв., 1,71 г). Смесь из метил (*S*)-2-(((*S*)-2-(4-метокси-1Н-индол-2-карбоксамидо)-4-метилпентанамидо)-3-(((*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)пропаноата, (**49-E**) (1,0 экв., 1,0 г), хлоруксусной кислоты (2,5 экв., 0,40 г) и ТГФ (10 мл/г, 10 мл) добавляли в реактор с использованием капельной лейки, поддерживая температуру ниже 25 °С. После того, как добавление завершилось, смесь выдерживали до тех пор, пока реакция не завершилась (98% использования (**49-E**)). Реакционную смесь затем концентрировали при пониженном давлении (150 мбар, температура выдерживалась ниже 30 °С) до ~20 мл/г, затем охлаждали до 20 °С. Во второй реактор загружали водный раствор лимонной кислоты (25 масс.%, 20 мл/г, 20 мл) и 2-метилтетрагидрофуран (10 мл/г, 10 мл) и охлаждали до 10 °С. Реакционную смесь медленно добавляли к лимонной кислоте и 2-метилтетрагидрофурану, поддерживая температуру реакции ниже 15 °С. После завершения смесь нагревали до 20 °С и разделяли слои. Органический слой промывали водным раствором бикарбоната натрия (1,14 М, 10 мл/г, 10 мл), затем более разбавленным водным раствором натрия бикарбоната (0,6 М, 10 мл/г, 10 мл), затем насыщенным солевым раствором (12 массовых %, 10 мл/г, 10 мл). Органический раствор концентрировали при атмосферном давлении 10 мл/г и вытеснили 2-метилтетрагидрофураном. Смесь охлаждали до 20 °С в течение 4 часов. и гранулировали при 20 °С перед фильтрованием и промыванием 2-метилтетрагидрофураном (3 мл/г, 3 мл). Твердые вещества сушили при 50 °С в вакуумном шкафу, получая *N*-(((*S*)-1-(((*S*)-4-хлор-3-оксо-1-(((*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)бутан-2-

ил)амино)-4-метил-1-оксопентан-2-ил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид, (**49-F**) в виде сольвата с 2-метилтетрагидрофураном (~10 массовых %) с 63% выходом.

Стадия 5: Синтез ди-*трет*-бутил ((*S*)-3-((*S*)-2-(4-метокси-1H-индол-2-карбоксамидо)-4-метилпентанамидо)-2-оксо-4-((*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)бутил)фосфата, (**49-G**)

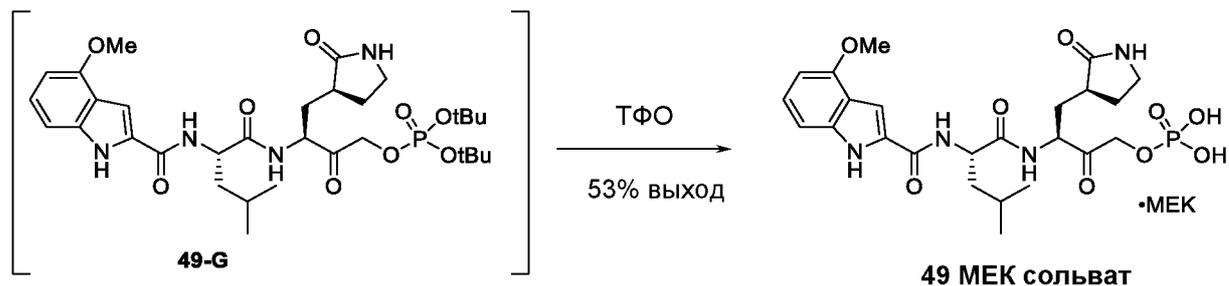


В реактор с рубашкой при 25 °С загружали *N*-((*S*)-1-(((*S*)-4-хлор-3-оксо-1-((*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)бутан-2-ил)амино)-4-метил-1-оксопентан-2-ил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид, (**49-F**) (1,0 экв., 7,30 г) метилэтилкетон (12,5 мл/г, 91 мл) и *N,N*-диметилформамид (2,5 мл/г, 18 мл). Затем, загружали калия ди-*трет*-бутилфосфат (2,0 экв., 7,5 г) и йодид натрия (0,20 экв., 0,45 г). Смесь перемешивали в течение 48-72 часов пока как *N*-((*S*)-1-(((*S*)-4-хлор-3-оксо-1-((*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)бутан-2-ил)амино)-4-метил-1-оксопентан-2-ил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид, (**49-F**), так и соответствующее йодидное соединение не присутствовало в количестве менее 2% по УЭЖХ. Загружали воду (10 мл/г, 73 мл) с последующим добавлением метил-*трет*-бутилового эфира простого (5 мл/г, 37 мл). Двухфазную смесь перемешивали в течение 5 минут, затем водный слой отбрасывали. Органический слой дважды промывали водой (2 × 10 мл/г, 73 мл), затем концентрировали при пониженном давлении до 5 мл/г, поддерживая температура ниже 35 °С. Метилэтилкетон (15 мл/г, 110 мл) загружали в реактор и смесь концентрировали снова при пониженном давлении до 5 мл/г, поддерживая температуру ниже 35 °С. Это повторяли трижды или пока содержание воды не составляло >0,5%. Смесь разбавляли метилэтилкетон (5 мл/г, 36 мл) и переносили на следующую стадию.

¹НЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 11,55 (д, *J* = 1,8 Гц, 1H), 8,59 (д, *J* = 8,0 Гц, 1H), 8,43 (д, *J* = 8,0 Гц, 1H), 7,63 (с, 1H), 7,36 (д, *J* = 1,6 Гц, 1H), 7,09 (т, *J* = 7,9 Гц, 1H), 7,00 (д, *J* = 8,2 Гц, 1H), 6,50 (д, *J* = 7,6 Гц, 1H), 4,74 (дд, *J* = 17,5, 7,9 Гц, 1H), 4,61 (дд, *J* = 17,5, 7,2 Гц, 1H), 4,53–4,43 (м, 2H), 3,88 (с, 3H), 3,15–3,03 (м, 2H), 2,32 (м, 1H), 2,06 (м, 1H), 1,97 (м, 1H), 1,72 (м, 2H), 1,62 (м, 2H), 1,52 (м, 1H), 1,40 (с, 9H), 1,39 (с, 9H), 0,94 (д, *J* = 6,2 Гц, 3H), 0,90 (д, *J* = 6,2 Гц, 3H).

¹³СЯМР (101 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 203,1 (д, *J* = 7,4 Гц), 178,8, 173,4, 161,6, 154,1, 138,3, 130,3, 124,9, 118,5, 105,9, 101,7, 99,7, 82,6 (дд, *J* = 7,2, 4,4 Гц), 68,7 (д, *J* = 5,8 Гц), 55,5, 54,0, 51,9, 49,1, 37,7, 31,8, 29,9, 29,8, 27,6, 27,3, 24,9, 23,5, 21,9.

Стадия 6: Синтез (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфата, сольвата с метилэтилкетон



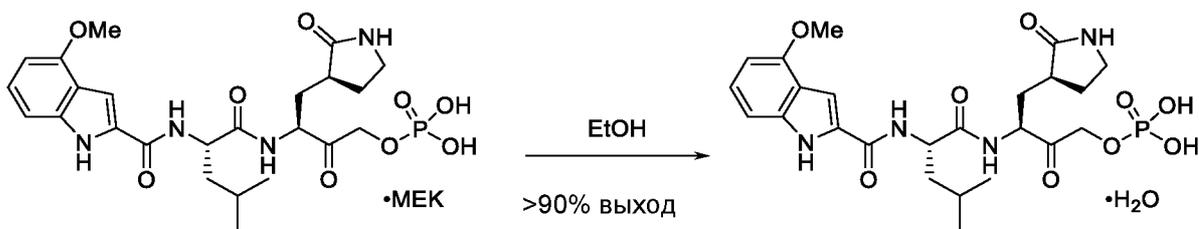
К раствору ди-*трет*-бутил ((*S*)-3-((*S*)-2-(4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамидо)-4-метилпентанамидо)-2-оксо-4-((*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)бутил)фосфата, (**49-G**) в метилэтилкетоне с предыдущей стадии, загружали трифторуксусную кислоту (20 экв., 23 мл). Смесь нагревали до 30 °С, или пока не произошло >98% использования ди-*трет*-бутил ((*S*)-3-((*S*)-2-(4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамидо)-4-метилпентанамидо)-2-оксо-4-((*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)бутил)фосфата, (**49-G**) (или соответствующего моно-*трет*-бутилфосфонатного сложного эфира). Смесь охлаждали до 20 °С и гранулировали в течение 1 часа, затем фильтровали и промывали метилэтилкетон (3 мл/г, 22 мл). Продукт сушили при 40 °С в течение 5 часов, получая (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат, сольват из метилэтилкетона в виде белого твердого вещества (4,9 г) с 53% выходом.

¹НЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 11,57 (д, *J* = 1,8 Гц, 1H), 8,52 (д, *J* = 8,0 Гц, 1H), 8,42 (д, *J* = 8,0 Гц, 1H), 7,63 (с, 1H), 7,36 (д, *J* = 1,6 Гц, 1H), 7,09 (т, *J* = 7,8 Гц, 1H), 7,00 (д, *J* = 8,2 Гц, 1H), 6,50 (д, *J* = 7,6 Гц, 1H), 4,68 (дд, *J* = 17,6, 8,1 Гц, 1H), 4,57 (дд, *J* = 17,6, 7,2 Гц, 1H), 4,53–4,43 (м, 2H), 3,88 (с, 3H), 3,15–3,03 (м, 2H), 2,42 (кв., *J* = 7,3 Гц, 2H), 2,32 (м, 1H), 2,06 (с и м, 4H), 1,95 (м, 1H), 1,77–1,51 (м, 5H), 0,94 (д, *J* = 6,2 Гц, 3H), 0,90 (т, *J* = 7,1 Гц, 3H), 0,89 (д, *J* = 6,2 Гц, 3H).

¹³СЯМР (101 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 209,3, 203,9 (д, *J* = 7,4 Гц), 178,8, 173,3, 161,6, 154,1, 138,3, 130,4, 124,9, 118,5, 105,9, 101,6, 99,7, 68,2 (д, *J* = 4,8 Гц), 55,5, 54,0, 51,9, 37,8, 36,3, 31,2, 29,8, 27,6, 24,9, 23,5, 21,9, 8,1.

Порошковая рентгеновская дифрактограмма (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, сольвата с метилэтилкетон приведена на Фигуре 9.

Стадия 7: Синтез (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата гидрата



49 МЕК сольват

49 - моногидрат

К реактору с рубашкой добавляли (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат, сольват метилэтилкетон (1,0 экв., 35,7 г) и безводный этанол (15 мл/г, 536 мл). Суспензию нагревали до 40 °С в течение 30 минут и выдерживали в течение по меньшей мере 1 часа. Образец суспензии был взят для того чтобы подтвердить присутствие желаемого полиморфа. Если преобразование было незавершенным, выдерживали суспензию в течение дополнительного времени. Суспензию охлаждали до 10 °С в течение 2 часов и гранулировали в течение 2 часов, затем фильтровали, промывали этанолом (4 мл/г, 140 мл). Твердые вещества сушили при 50 °С в течение ночи, получая (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата моногидрат с 98% выходом.

(3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата гидрат, полученный выше, обозначенный Формой 1, был охарактеризован с использованием порошковой рентгеновской дифракции, твердотельного ЯМР и спектроскопии комбинационного рассеяния, как описано ниже.

Порошковая рентгеновская дифракция

Порошковую рентгеновскую дифрактограмму получали, используя дифрактометр Bruker AXS D8 Endeavor, оборудованный источником излучения Cu. Напряжение и сила тока рентгеновской трубки были установлены на 40 кВ и 40 мА соответственно. Моторизованные расходящиеся щели устанавливали при постоянном освещении на 11 мм. Дифракционное излучение детектировалось с использованием рентгеновского энергодисперсионного детектора LYNXEYE XE-T, с позиционно-чувствительным детектором (PSD) открывается на 4,00°. Данные собирали в тета-тета гониометре на длину волны Cu от 2,0 до 55,0 градусов 2-Тета (°2θ) с использованием размера шага 0,019 °2θ и времени в шаге 0,2 секунды. Образцы для анализа получали, располагая их в силиконовом низкофоновом небольшом держателе образцов, и вращали со скоростью 15 об/минуту при сборе данных. Данные анализировали с использованием программного обеспечения DIFFRAC.EVA V5.0. Перечень пиков получали с использованием отражений относительной интенсивностью ≥ 5% от наиболее интенсивной полосы на каждой

соответствующей дифрактограмме. Типичная ошибка, $\pm 0,2^\circ 2\theta$ в положениях (USP-941) применима к этим данным. Незначительная погрешность, связанная с этим измерением, может возникнуть из-за ряда факторов включая: (а) получение образца (*например*, высота образца), (b) характеристики прибора, (с) калибровку прибора, (d) ввод оператора (*например*, в определении положений пиков), и (е) природа материала (*например*, предпочтительные эффекты ориентации и прозрачности).

Для того чтобы получить абсолютные положения пиков, порошковая картина должна быть выровнена с референтной. Это может быть либо смоделированной порошковой картиной из кристаллической структуры такой же формы, решенной при комнатной температуре, либо внутренним стандартом, *например*, диоксидом углерода или корундом. Полученная порошковая картина Формы 1 (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата гидрата выравнивалась к порошковой картине такого же материала, который содержит внутренний стандарт, Si (SRM 640e).

Профиль PXRD для Формы 1 (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата гидрата приведен на Фигуре 3, и перечень соответствующих пиков 2-тета и относительная интенсивность приведена в Таблице PXRD-1 ниже (значения представляют собой $\pm 0,2$ 2-тета).

Таблица PXRD-1: перечень пиков PXRD для Формы 1.

Угол, градусы 2-Тета ($^\circ 2\theta$) $\pm 0,2^\circ 2\theta$	Относительная интенсивность, %	Угол, градусы 2-Тета ($^\circ 2\theta$) $\pm 0,2^\circ 2\theta$	Относительная интенсивность, %	Угол, градусы 2-Тета ($^\circ 2\theta$) $\pm 0,2^\circ 2\theta$	Относительная интенсивность, %
4,1	100,0	19,1	10,0	23,6	8,5
7,2	39,4	19,6	8,8	24,0	9,6
10,4	10,2	20,4	10,1	24,3	5,3
12,4	8,0	20,7	9,6	24,9	8,1
12,6	5,9	21,3	7,4	25,3	8,2
14,3	19,0	21,5	6,9	26,4	5,6
14,5	27,9	22,0	8,7	27,0	7,0
17,2	6,5	22,8	9,3		
17,7	11,1	23,1	6,6		

Характеристические пики PXRD для формы 1 представляют собой пики в положениях 4,1 и 7,2; в положениях 4,1, 7,2 и 10,4; и в положениях 4,1, 7,2, 10,4 и 14,5 2-тета (где каждый представляет собой $\pm 0,2$ 2-Тета) соответственно.

Твердотельный ЯМР

Твердотельный ЯМР (тТЯМР) анализ проводился на спектрометре Bruker-BioSpin Avance Neo 400 МГц (^1H частота) ЯМР. Спектры ^{13}C тямра собирали на 4 мм MAS зонде на скорости вращения под магическим углом 12,5 кГц. Температура регулировалась до 20 °С. Спектры перекрестной поляризации (СР) регистрировали со временем контактирования СР 3 мс и задержкой повторного цикла 3,5 секунды. Фазово-модулированное поле развязки протонов ~ 100 кГц применялось во время спектрального сбора. Углеродное спектральное отнесение производили по отношению к чистому тетраметилсилану, которое осуществляли путем установки высокочастотного сигнала от внешнего образца α -глицина на 176,5 м.д. ^{15}N тямр-спектры собирали с использованием такого же прибора и зонда ^{13}C -спектры, со скоростью вращения 12,5 кГц и температурой, регулируемой до 20 °С. Спектры перекрестной поляризации (СР) регистрировали с течением времени контактирования СР 10 мс и задержкой повторного цикла 3,5 секунды. Азотное спектральное отнесение производили по отношению к чистому нитрометану, которое осуществляли путем установки сигнала от внешнего образца глицина -346,8 м.д. Спектры ^{13}C и ^{15}N твердотельного ЯМР приведены на Фигурах 4 и 5, соответственно.

Автоматический выбор пиков производился с использованием программного обеспечения ACD Labs 2017 Spectrus Processor с пороговым значением 3% относительной интенсивности, которое используется для предварительного выбора пиков. Выход автоматизированного подбора пиков был визуально проверен, чтобы обеспечить действительность, и корректировки были сделаны вручную при необходимости. Хотя конкретные пиковые значения ^{13}C и ^{15}N тТЯМР сообщаются в данном документе, существует диапазон для данных значений пиков из-за различий в приборах, образцах и получении образцов. Типичная вариабельность для значений по оси x химического смещения ^{13}C и ^{15}N составляет примерно плюс или минус 0,2 м.д. для кристаллического твердого вещества Высоты пиков тТЯМР, представленные в данном документе, представляют собой относительные интенсивности. Интенсивности тТЯМР могут изменяться в зависимости от фактической установки экспериментальных параметров и истории образца.

Таблица ЯМР-1: Перечень пиков ^{13}C тТЯМР для Формы 1.

$^{13}\text{C } \delta$ (м.д.) $\pm 0,2$ м.д.	Относительная интенсивность, %						
20,1	94,0	41,4	27,7	102,2	40,4	153,8	73,0
21,7	100,0	51,4	31,8	108,1	33,0	164,7	48,0
25,0	66,2	53,0	42,4	118,6	60,2	172,2	55,4
27,2	17,6	57,8	67,8	126,9	38,7	184,2	43,9
36,8	44,7	68,8	40,4	129,8	41,2	198,4	41,1
37,7	34,7	100,5	37,6	138,6	39,7		

Характеристические ^{13}C - пики для Формы 1 находятся при 21,7, 153,8 и 172,2 м.д.; при 21,7, 153,8, 172,2 и 118,6 м.д.; и при 21,7, 153,8, 172,2, 118,6 и 57,8 м.д. (каждый $\pm 0,2$ м.д.).

Таблица ЯМР-2: Перечень пиков ^{15}N тТЯМР для Формы 1.

$^{15}\text{N } \delta$, (м.д.) $\pm 0,2$ м.д.	Относительная интенсивность, %
-260,8	100,0
-256,9	100,0
-252,1	51,0
-248,0	61,3

Характеристические ^{15}N пики для Формы 1 находятся при -260,8 и -256,9 м.д.; при -260,8, -256,9 и -248,0 м.д.; и при -260,8, -256,9, -248,0 и -252,1 м.д. (каждый $\pm 0,2$ м.д.).

Спектроскопия комбинационного рассеяния

Спектры комбинационного рассеяния собирали с использованием модуля комбинационного рассеяния с Фурье преобразованием RAM II, подключенного к спектрометру Vertex 70 (Bruker Optik GmbH). Прибор оснащен твердотельным лазером (Nd:YAG) 1064 нм и германиевым детектором, охлаждаемым жидким азотом. Перед сбором данных, проверки функционирования и калибровки прибора проводились с использованием источника белого света и эталонных материалов из полистирола и нафталина.

Образцы получали и анализировали в усеченных пробирках ЯМР. Вращающийся механизм образца (Ventacon, UK) использовался при измерении, чтобы максимизировать объем материала, подверженного воздействию лазера при сборе данных. Обратный

рассеянный сигнал комбинационного рассеяния образца был оптимизирован, и данные собирали со спектральным разрешением 2 см^{-1} с использованием лазера с мощностью 500 мВт. 4-членная функция аподизации Блэкмана-Гарриса использовалась для минимизации спектральных aberrаций. Спектры генерировались от 3500 до 50 см^{-1} с соответствующим количеством сканирований, настроенных в соответствии с обеспечением адекватного соотношения сигнал/шум.

Спектры нормализовали, устанавливая интенсивность наиболее интенсивного пика на 2,00. Пики затем были идентифицированы с использованием функции автоматического выбора пиков в программном обеспечении OPUS v8.2 (Bruker Optik GmbH) с набором чувствительности 2%. Положения пиков и относительное интенсивность пиков экстрагировали и сводили в таблицу. Вариабельность в положениях пиков с данной экспериментальной конфигурацией находится в пределах $\pm 2 \text{ см}^{-1}$.

Ожидается, что поскольку комбинационное рассеяние с Фурье преобразованием и дисперсионное комбинационное рассеяние представляют собой подобные способы, положения пиков, представленные в данном документе для спектров комбинационного рассеяния с Фурье преобразованием будут согласовываться с теми, которые наблюдались бы с использованием измерения дисперсионного комбинационного рассеяния, при условии соответствующей калибровки прибора.

Таблица комбинационного рассеяния -1: Перечень пиков выделяли в спектре комбинационного рассеяния по Фурье преобразованиям, получаемым от Формы 1.

Волновое число (см^{-1}) $\pm 2 \text{ см}^{-1}$	Относительная интенсивность	Волновое число (см^{-1}) $\pm 2 \text{ см}^{-1}$	Относительная интенсивность	Волновое число (см^{-1}) $\pm 2 \text{ см}^{-1}$	Относительная интенсивность %
409	8,1	1168	12,4	1552	52,7
465	9,8	1217	42,9	1584	14,8
545	10,0	1244	20,3	1620	31,4
631	10,5	1271	29,6	1640	100,0
704	12,9	1299	18,1	1749	6,0
818	9,3	1320	11,4	2726	5,3
859	8,4	1360	19,9	2843	9,5
905	9,0	1381	40,5	2872	14,2
989	35,0	1421	31,4	2968	25,9
1056	20,5	1431	35,4	3074	9,7
1100	10,8	1452	22,3		

1132	11,3	1517	62,9		
------	------	------	------	--	--

Характеристические пики комбинационного рассеяния для Формы 1 находятся при 1271, 1421 и 1217 см^{-1} ; при 1271, 1421, 1217 и 1640 см^{-1} ; при 1271, 1421, 1217, 1640 и 3074 см^{-1} (каждый $\pm 2 \text{ см}^{-1}$).

Способы порошковой рентгеновской дифракции, твердотельного ЯМР и спектроскопии комбинационного рассеяния, как описывалось выше, также использовались для характеристики (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, сольвата с метилэтилкетонем, который был повторно обработан для улучшения его кристалличности. Повторную обработку (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, сольвата с метилэтилкетонем осуществляли для улучшения кристалличности образца перед характеристикой твердого состояния. Это осуществлялось за счет повторяющихся циклов суспендирования нагрева – охлаждения от 40 °С до 10 °С (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, сольвата с метилэтилкетонем в метилэтилкетоне, используя скорости нагревания и охлаждения 0,5 °С/минуту с 10-минутным периодом содержания при каждой температуре в течение 24 часов. Полученный в результате кристаллический (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат, сольват с метилэтилкетонем затем был охарактеризован.

Порошковая рентгеновская дифракция (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, сольвата с метилэтилкетонем

Получена порошковая рентгеновская дифрактограмма (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, сольвата с метилэтилкетонем выравнивалась к порошковой картине такого же материала, который содержит внутренний стандарт, Si (SRM 640e). Профиль PXRD для данного материала приведен на Фигуре 10, и перечень соответствующих пиков приведен в Таблице PXRD-2. Характеристические пики для МЕК-сольвата представляют собой пики в положениях при 7,7, 8,1, 17,0, 23,1 и 25,8 2-тета.

Таблица PXRD-2: перечень пиков PXRD для МЕК-сольвата.

Характеристические пики PXRD для МЕК-сольвата включают, но не ограничиваются

Угол, градусы 2-Тета (°2θ) ± 0,2 °2θ	Относительная интенсивность, %	Угол, градусы 2-Тета (°2θ) ± 0,2 °2θ	Относительная интенсивность, %	Угол, градусы 2-Тета (°2θ) ± 0,2 °2θ	Относительная интенсивность, %	Угол, градусы 2-Тета (°2θ) ± 0,2 °2θ	Относительная интенсивность, %
7,7	100,0	16,2	9,7	21,0	12,2	25,2	13,0
8,1	58,0	17,0	31,6	21,5	11,6	25,8	83,2
9,8	5,1	18,3	8,9	21,8	11,5	28,0	18,1
13,5	16,6	18,9	22,8	22,4	24,5	29,6	5,2
14,3	33,9	19,7	8,8	23,1	73,8		
15,4	18,9	20,5	11,3	24,2	14,1		

этим, 7,7, 8,1 и 23,1; 7,7, 8,1, 17,0 и 23,1; и 7,7, 8,1, 17,0, 23,1 и 25,8 (каждый градусов 2-Тета ± 0,2 градусов 2-Тета).

Таблица ЯМР-3: перечень пиков ¹³C ттЯМР для МЕК-сольвата.

¹³ C □ (м.д.) ± 0,2 м.д.	Относительная интенсивность, %	¹³ C □ (м.д.) ± 0,2 м.д.	Относительная интенсивность, %	¹³ C □ (м.д.) ± 0,2 м.д.	Относительная интенсивность, %	¹³ C □ (м.д.) ± 0,2 м.д.	Относительная интенсивность, %
7,2	77,9	36,3	65,8	101,2	54,5	161,9	39,7
21,1	79,3	38,8	75,8	106,0	55,2	172,9	53,4
23,0	87,4	42,2	100,0	118,4	36,1	183,2	48,3
25,1	75,6	52,3	78,4	128,3	54,1	206,4	57,1
27,0	62,6	57,0	74,5	129,6	40,9	215,8	38,5
27,7	82,9	69,3	64,2	139,0	38,0		
34,0	47,9	98,9	64,7	153,7	44,8		

Характеристические пики ¹³C ттЯМР для МЕК-сольвата включают 7,2, 206,4 и 215,8; 7,2, 206,4, 215,8 и 42,2; 7,2, 206 и,4, 215,8, 42,2 и 101,2 (каждый м.д. ± 0,2 м.д.).

Таблица ЯМР-4: перечень пиков ¹⁵N ттЯМР для МЕК-сольвата.

¹⁵ N □ (м.д.)	Относительная интенсивность, %
-272,9	96,5

-266,4	100,0
-251,8	93,7
-244,6	93,1

Таблица комбинационного рассеяния -2: Список пиков выделенных в спектре комбинационного рассеяния с Фурье преобразованием, получаемым от МЕК-сольвата.

Волновое число (см^{-1}) $\pm 2 \text{ см}^{-1}$	Относительная интенсивность, %	Волновое число (см^{-1}) $\pm 2 \text{ см}^{-1}$	Относительная интенсивность, %	Волновое число (см^{-1}) $\pm 2 \text{ см}^{-1}$	Относительная интенсивность, %
446	23,9	1077	16,5	1511	100,0
511	20,8	1099	25,3	1558	36,9
568	19,2	1125	18,1	1585	26,9
596	19,6	1170	25,7	1620	47,7
628	22,0	1216	37,5	1644	90,6
705	29,8	1230	31,8	1679	17,2
780	18,4	1253	45,1	1699	16,9
802	20,2	1265	59,0	1736	16,6
819	20,2	1298	27,7	2721	6,1
861	17,5	1322	21,8	2894	26,4
909	17,0	1359	29,7	2939	26,6
956	18,4	1379	64,8	2958	18,9
988	40,3	1433	61,9	3081	13,3
1058	32,9	1467	26,6		

Характеристические пики комбинационного рассеяния для МЕК-сольвата включают, но не ограничиваются этим, те, которые при 1511 , 1644 и 3081 см^{-1} ; 1511 , 1644 , 3081 и 1265 см^{-1} ; и 1511 , 1644 , 3081 и 1265 и 446 см^{-1} ; каждый $\pm 2 \text{ см}^{-1}$.

Получение аморфной свободной кислотной формы (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфата; (аморфной свободной кислотной формы PF-07304814)

Аморфную свободную кислоту PF-07304814-00 производят путем добавления 220 мл воды к 1 г (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино) -2-оксо-4-

[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата (PF 07304814) в колбу Дюран со стержнем для перемешивания. Образец перемешивали при 500 об./минуту в условиях окружающей среды в течение 1 часа, затем фильтровали раствор с использованием шприцевого фильтра. Воду из фильтрованного раствора затем удаляли в течение 18 часов путем испарения с центрифугированием в вакууме с использованием испарителя Genevac EZ-2 Elite. Приблизительно 0,9 г твердого вещества было выделено.

Порошковая рентгеновская дифракция

Порошковую рентгеновскую дифрактограмму получали, используя дифрактометр Bruker AXS D8 Endeavor, оборудованный источником излучения Cu. Напряжение и сила тока рентгеновской трубки были установлены на 40 кВ и 40 мА соответственно. Моторизованные расходящиеся щели устанавливали при постоянном освещении на 11 мм. Дифракционное излучение детектировалось с использованием энергодисперсионного рентгеновского детектора LYNXEYE XE-T с позиционно-чувствительным детектором (PSD), который открывается на $4,00^\circ$. Данные собирали в тета-тета гониометре на длину волны Cu от 2,0 до 55,0 градусов 2-Тета ($^\circ 2\theta$) с использованием размера шага $0,019^\circ 2\theta$ и времени в шаге 0,2 секунды. Образцы для анализа получали, располагая их в силиконовом низкофоновом небольшом держателе образцов и вращали со скоростью 15 об./минуту при сборе данных. Данные анализировали с использованием DIFFRAC.EVA V5.0 программного обеспечения. Профиль PXRD собирали для API, приведенный на фигуре 1, является типичным для аморфного материала.

Твердотельный ЯМР

Твердотельный ЯМР (тТЯМР) анализ проводился на ЯМР-спектрометре Bruker Avance III HD 400 МГц (^1H частота) с использованием 4 мм MAS-зонда на скорости вращения под магическим углом 8 кГц с регулировкой температуры до 20°C . ^{13}C -спектры перекрестной поляризации (CP) с угнетением вращающейся боковой полосы TOSS регистрировали со временем контактирования CP 1 мс и задержкой повторного цикла 2 секунды. Фазово-модулированное поле развязки протонов ~ 100 кГц применялось во время спектрального сбора. Углеродное спектральное отнесение производили по отношению к чистому тетраметилсилану, осуществляемому путем установки высокочастотного сигнала от внешнего образца адамантана на 38,5 м.д. ^{15}N CP-спектры регистрировали со временем контактирования HC 1 мс и задержкой повторного цикла 2 секунды. Азотное спектральное отнесение производили по отношению к чистому нитрометану, которое осуществляли путем установки сигнала от внешнего образца глицина -346,8 м.д. ^{31}P -спектры собирали с использованием такого же MAS-зонда как ^{13}C - и ^{15}N -спектров, со скоростью вращения 10 кГц. ^{31}P CP спектры регистрировали со временем

контактирования НС 4 мс и задержкой повторного цикла 2 секунды. Фосфорное спектральное отнесение производили по отношению к внешнему образцу 85% Н₃Р₀₄.

Выбор пиков производился с использованием программного обеспечения ACD Labs 2019 Spectrus Processor. Высоты пиков тТЯМР, сообщенные в данном документе, представляют собой относительные интенсивности. Интенсивности тТЯМР могут изменяться в зависимости от фактической установки экспериментальных параметров и истории образца. Из-за относительно высокой ширины линии и шума для ряда пиков ¹³С существует оцениваемый диапазон ±0,4-0,5 м.д. для указанных положений пиков для некоторых линий. Резонанс при 204 м.д. особенно широк, и указанное положение пика, вероятно, составляет ±1,5 м.д. Погрешность, как оценивается, составляет ±0,2 м.д. для остаточных пиков. Погрешность, как оценивается, составляет ±0,2 м.д. для пика ³¹Р. Информация о химическом смещении ¹⁵Н является полученной на основе деконволюции наблюдаемого спектра и информацию о интенсивности следует использовать только как ориентир. Оцениваемая погрешность ¹⁵Н составляет ±1,5 м.д.

Перечень пиков ¹³С тТЯМР для аморфной свободной кислоты PF-07304814. Оцениваемая погрешность составляет ±0,2 м.д., если не указывается иное.

¹³ С δ (м.д.)	Относительная интенсивность, %	¹³ С δ (м.д.)	Относительная интенсивность, %	¹³ С δ (м.д.)	Относительная интенсивность, %
24,6	100,0	105,3 ± 0,5	33,9	162,9	39,9
40,2 ± 0,5	59,4	118,9	61,0	175,0 ± 0,4	29,8
54,8	79,5	128,8	56,2	181,8±0,4	33,1
69,5	22,2	138,9	62,6	204±1,5	12,5
100,4 ± 0,5	34,2	154,3	55,1		

Характеристические ¹³С тТЯМР-пики для аморфной свободной кислотной формы (3*S*)-3-((*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил)амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата представляют собой ¹³С тТЯМР-пики при 175,0 ± 0,4, 204 ± 1,5 и 181,8 ± 0,4 м.д.; пики при 175,0±0,4, 204±1,5, 181,8±0,4 и 54,8±0,2 м.д.; и пики при 175,0±0,4, 204±1,5, 181,8±0,4, 54,8±0,2 и 162,9±0,2 м.д.; и комбинации с ¹³С тТЯМР пиков при 175,0±0,4 и 204±1,5 и пика ³¹Р при -0,8±0,2 м.д.

Пики ¹⁵Н тТЯМР для аморфной свободной кислоты были найдены при -264 ± 1,5 м.д. с относительной интенсивностью 100% и -249±1,5 м.д.

Пик ³¹Р тТЯМР аморфной свободной кислоты был найден при -0,8±0,2 м.д.

Спектроскопия комбинационного рассеяния

Спектры комбинационного рассеяния собирали с использованием модуля комбинационного рассеяния с Фурье преобразованием RAM II, подключенным к спектрометру Vertex 70 (Bruker Optik GmbH). Прибор оснащен твердотельным лазером (Nd:YAG) 1064 нм и германиевым детектором, охлаждаемым жидким азотом. Перед сбором данных, проверки функционирования и калибровки прибора проводились с использованием источника белого света и эталонных материалов из полистирола и нафталина.

Образцы получали и анализировали в усеченных пробирках ЯМР. Вращающийся механизм образца (Ventacon, UK) использовался при измерении для того, чтобы максимизировать объем материала, подверженного воздействию лазера при сборе данных. Обратный рассеянный сигнал комбинационного рассеяния образца был оптимизирован, и данные собирали со спектральным разрешением 2 см^{-1} с использованием лазера с мощностью 500 мВт. 4-членная функция аподизации Блэкмана-Гарриса использовалась для минимизации спектральных aberrаций. Спектры генерировались от 3500 до 50 см^{-1} с соответствующим количеством сканирований, сконфигурированных соответственно для обеспечения адекватного соотношения сигнал/шум.

Спектры нормализовали по интенсивности до наиболее интенсивного пика на $2,00$. Пики затем были идентифицированы с использованием функции автоматического выбора пиков в программном обеспечении OPUS v8.2 (Bruker Optik GmbH) с набором чувствительности до 3%. Положения и относительные интенсивности пиков выделяли и сводили в таблицу. Вариабельность в положениях пиков с данной экспериментальной конфигурацией находится в пределах $\pm 2 \text{ см}^{-1}$.

Ожидается, что поскольку комбинационное рассеяние с Фурье преобразованием и дисперсионное комбинационное рассеяние представляют собой подобные способы, положения пиков, представленные в данном документе, для спектров комбинационного рассеяния с Фурье преобразованием будут согласовываться с теми, которые наблюдались бы с использованием измерения дисперсионного комбинационного рассеяния, при условии соответствующей калибровки прибора.

Волновое число (см^{-1}) $\pm 2 \text{ см}^{-1}$	Относитель ная интенсивнос ть, %	Волновое число (см^{-1}) $\pm 2 \text{ см}^{-1}$	Относитель ная интенсивно сть, %	Волновое число (см^{-1}) $\pm 2 \text{ см}^{-1}$	Относитель ная интенсивн ость, %
336	30,6	1101	25,5	1518	99,8
630	24,3	1125	25,6	1549	62,8

706	31,2	1166	35,2	1623	79,5
861	22,1	1216	45,0	1742	12,9
907	17,5	1247	42,7	2718	17,0
956	22,9	1272	47,7	2847	27,7
990	46,8	1380	65,5	2933	44,4
1055	43,8	1431	100,0	3078	17,2

Модулированная ДСК

Температуру стеклования аморфной свободной кислоты измеряли, используя модулированную дифференциальную сканирующую калориметрию (МДСК). Образец, весящий 1,6 мг, располагали в алюминиевом тигле T Zero прибора TA, осторожно прижали, чтобы улучшить контакт с дном тигля и обеспечить лучший поток тепла через образец. Тигель закрывали алюминиевой крышкой T Zero. Анализ производили с использованием приборов TA Discovery DSC, используя следующую процедуру. Для того, чтобы удалить любую остаточную воду из образца, температура уравнивалась при 25 °С и затем повышалась линейно со скоростью 10 °С/минуту до 115 °С и затем снижали со скоростью 10 °С/минуту до 25°С. Температуру выдерживали изотермически при 25 °С в течение 10 минут и затем повышали со скоростью 2 °С/минуту при применении модуляции температуры 0,636°С в течение 60 секунд.

Анализ осуществляли с использованием Trios (версия 4.5.0.42498). Стеклование с серединой точкой (половина высоты) наблюдалось при 132,2 °С в обратном тепловом потоке.

Получение аморфной натриевой соли (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата:

Аморфная натриевая соль (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата

производится путем лиофилизации с использованием следующей процедуры. 2,577 г (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата (эквивалент 2,5 г, откорректирован с учетом содержания действующего вещества (Содержимое действующего вещества = 0,97, 2,5/0,97 = 2,577 г)) взвешивали на аналитических/микро весах и добавляли в соответствующее размера емкости. Добавляли около 12 мл воды для инъекции (WFI) и перемешивали. Добавляли 4,575 мл 1*M* NaOH и перемешивали до полного растворения. Раствор доводили до объема 25 мл, используя WFI и перемешивали. Раствор фильтровали с использованием стерилизующего фильтра 0,2 мкм и загружали в стеклянные флаконы (целевой объем 10,9

мл). Флаконы помещали на лоток и лоток загружали в лиофилизатор (LyoStar). Лيوфилизатор герметично загружали и температуру полки охлаждали до $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту и выдерживали в течение 1 часа. Вакуумное давление было установлено на 150 мТорр, и лиофилизатор выдерживали в течение 1 часа. Температуру полки затем нагревали до $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту и выдерживали в течение 20 часов. После завершения первичной сушки температуру полки нагревали до $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту и выдерживали в течение 10 часов. После окончания вторичной сушки камеру снова заполняли азотом, и температуру полки охлаждали до $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Образцы закупоривали внутри лиофилизатора, вакуум сбрасывали, образцы удаляли, надели колпачки и маркировали.

После лиофилизации образец выглядел как таблетка порошка от белого до почти белого/желтого/коричневого цвета. Лيوфилизированные образцы демонстрируют минимальные признаки обратной плавки, разрушения и усадки.

Порошковая рентгеновская дифракция

Порошковую рентгеновскую дифрактограмму получали, используя дифрактометр Bruker AXS D8 Endeavor, оборудованный медным (Cu) источником излучения. Напряжение и сила тока рентгеновской трубки были установлены на 40 кВ и 40 мА соответственно. Моторизованные расходящиеся щели устанавливали при постоянном освещении на 11 мм. Дифракционное излучение детектировалось с использованием энергодисперсионного рентгеновского детектора LYNXEYE XE-T с позиционно-чувствительным детектором (PSD) открывается на $4,00^{\circ}$. Данные собирали в тета-тета гониометре на длине волны Cu от $2,0$ до $55,0$ градусов 2-Тета ($^{\circ}2\theta$) с использованием размера шага $0,019\text{ }^{\circ}2\theta$ и времени в шаге $0,2$ секунды. Образцы для анализа получали, располагая их в силиконовом низкофоновом небольшом держателе образцов и вращали со скоростью 15 об./минуту при сборе данных. Данные анализировали с использованием программного обеспечения DIFFRAC.EVA V5.0. Профиль PXRD, собираемый для API, приведен на фиг. 1 и состоит из аморфного гало с одним широким пиком, наблюдаемым при малых углах при $3,3^{\circ}2\theta$.

Твердотельный ЯМР

Твердотельный ЯМР (ттЯМР) анализ проводился на спектрометре Bruker AVANCE NEO 400 МГц (^1H частота) ЯМР с использованием 4 мм MAS-зонда на скорости вращения под магическим углом $12,5\text{ кГц}$ с регулировкой температуры до $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^{13}C -спектры перекрестной поляризации (CP) регистрировали со временем контактирования CP 3 мс и задержкой повторного цикла 3 секунды . Фазово-модулированное поле развязки протонов $\sim 100\text{ кГц}$ применялось во время спектрального сбора. Углеродное спектральное отнесение производили по отношению к чистому тетраметилсилану, которое осуществляли путем

установки высокочастотного сигнала от внешнего образца L-аланина на 177,8 м.д. Спектры СР ^{15}N регистрировали со временем контактирования СР 10 мс и задержкой повторного цикла 3 секунды. Азотное спектральное отнесение производили по отношению к чистому нитрометану, которое осуществляли путем установки сигнала от внешнего образца глицина -346,8 м.д. Спектры ^{31}P СР регистрировали со временем контактирования СР 4 мс и задержкой повторного цикла 3 секунды. Фосфорное спектральное отнесение производили по отношению к внешнему образцу аммония дигидрофосфата путем установления сигнала на 0,8 м.д.

Выбор пиков производился с использованием программного обеспечения ACD Labs 2019 Spectrus Processor. Высоты пиков тТЯМР, сообщенные в данном документе, представляют собой относительные интенсивности. Интенсивности тТЯМР могут изменяться в зависимости от фактической установки экспериментальных параметров и истории образца. Из-за относительно большой ширины линии для ряда пиков ^{13}C в сочетании с резонансными перекрытиями и уровнями шума существует оцениваемый диапазон $\pm 0,4$ - $0,5$ м.д. для указанных положений пиков для некоторых пиков. Резонанс при ~ 208 м.д. особенно широк и шумен, поэтому указанное положение пика, вероятно, составляет $\pm 1,5$ м.д. Погрешность, как оценивается, составляет $\pm 0,2$ м.д. для остаточных пиков ^{13}C . Погрешность, как оценивается, составляет $\pm 0,2$ м.д. для пика ^{31}P . Информация о химическом смещении ^{15}N получается на основе деконволюции наблюдаемого спектра, и информацию о интенсивности следует использовать только как ориентир. Оцениваемая погрешность ^{15}N составляет $\pm 1,5$ м.д.

Характеристические пики для аморфной натриевой соли (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфата составляют $126,0 \pm 0,4$ м.д., $181,0 \pm 0,4$ м.д., $208,0 \pm 1,5$ м.д., $174,1 \pm 0,4$ м.д. и $163,1 \pm 0,2$ м.д. для ^{13}C и $1,9 \pm 0,2$ м.д. для ^{31}P .

Спектроскопия комбинационного рассеяния

Спектры комбинационного рассеяния собирали с использованием модуля комбинационного рассеяния с Фурье преобразованием RAM II, подключенным к спектрометру Vertex 70 (Bruker Optik, GmbH). Прибор оснащен твердотельным лазером (Nd:YAG) 1064 нм и германиевым детектором, охлаждаемым жидким азотом. Перед сбором данных, проверки функционирования и калибровки прибора проводились с использованием источника белого света и эталонных материалов из полистирола и нафталина.

Образец анализировали непосредственно из стеклянного флакона, на котором он был поставлен. Обратный рассеянный сигнал комбинационного рассеяния из образца

оптимизирован, и данные собирали со спектральным разрешением 2 см^{-1} с использованием лазера с мощностью 750 мВт. 4-членная функция аподизации Блэкмана-Гарриса использовалась для минимизации спектральных aberrаций. Спектры генерировались от 3500 до 50 см^{-1} с соответствующим количеством сканирований, настроенных в соответствии с обеспечением адекватного соотношения сигнал/шум. Было проведено три отдельных измерения для того, чтобы убедиться, что измерения репрезентативны для сыпучего материала.

Три измерения усредняли с использованием функции усреднения в программном обеспечении OPUS v8.2 и данный спектр нормализовали, установив интенсивность наиболее интенсивного пика на 2,00. Пики затем идентифицировали с использованием функции автоматического выбора пиков в программном обеспечении OPUS v8.2 (Bruker Optik GmbH) с набором чувствительности до 2%. Положения и относительные интенсивности пиков выделяли и сводили в таблицу. Вариабельность в положениях пиков с данной экспериментальной конфигурацией находится в пределах $\pm 2 \text{ см}^{-1}$.

Ожидается, что поскольку комбинационное рассеяние с Фурье преобразованием и дисперсионное комбинационное рассеяние представляют собой подобные способы, положения пиков, представленные в данном документе для спектров комбинационного рассеяния с Фурье преобразованием, будут согласовываться с теми, которые наблюдались бы с использованием измерения дисперсионного комбинационного рассеяния, при условии соответствующей калибровки прибора.

Модулированная ДСК

Температуру стеклования аморфной натриевой соли (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфат измеряли с использованием модулированной дифференциальной сканирующей калориметрии (МДСК). Образец, который весил 1,8 мг, располагали в алюминиевом тигле T Zero прибора TA, осторожно прижимали, чтобы улучшить контакт с дном тигля и обеспечить лучший поток тепла через образец. Тигель закрывали алюминиевой крышкой T Zero. Анализ производили с использованием приборов TA Discovery DSC, используя следующую процедуру. Температуру выдерживали изотермической при $25 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 5 минут и затем повышали со скоростью $2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{минуту}$ до $200 \text{ }^\circ\text{C}$ при применении модуляции температуры $0,636 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 60 секунд.

Анализ осуществляли с использованием Tgios (версия 4.5.0.42498). Стеклоение с серединой точкой (половина высоты) наблюдалось при $152,8 \text{ }^\circ\text{C}$ в обратном тепловом потоке.

Таблица ЯМР-5: перечень пиков ^{13}C тТЯМР для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, аморфной натриевой соли.

^{13}C δ (м.д.)	Относительная интенсивность, %	^{13}C δ (м.д.)	Относительная интенсивность, %	^{13}C δ (м.д.)	Относительная интенсивность, %
24,8 ± 0,2	100,0	105,3 ± 0,4	41,0	154,3 ± 0,2	23,4
40,6 ± 0,4	90,0	119,1 ± 0,2	19,8	163,1 ± 0,2	18,1
54,6 ± 0,2	83,5	126,0 ± 0,4	32,4	174,1 ± 0,4	17,2
69,2 ± 0,2	31,0	129,1 ± 0,5	27,9	181,0 ± 0,4	20,4
100,0 ± 0,4	43,2	139,0 ± 0,2	26,4	208 ± 1,5	7,6

Характеристические ^{13}C тТЯМР-пики для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, аморфной натриевой соли включают пики при 126,0±0,4 м.д., 181,0±0,4 м.д. и 208,0±1,5 м.д.; пики при 126,0±0,4 м.д., 181,0±0,4 м.д., 208,0±1,5 м.д. и 174,1±0,4 м.д.; и пики при 126,0±0,4 м.д., 181,0±0,4 м.д., 208,0±1,5 м.д., 174,1±0,4 м.д. и 163,1±0,2 м.д.

^{15}N тТЯМР (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, аморфной натриевой соли, давали в результате пики ^{15}N при δ -263 м.д. с относительной интенсивностью 100% и δ 248 м.д. с относительной интенсивностью 37%.

Из-за плохого соотношения сигнал/шум (S/N) и широких перекрывающихся сигналов нет достаточной разницы в пределах указанной ошибки, чтобы выбрать диагностические пики ^{15}N тТЯМР для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, аморфной натриевой соли по сравнению с другими формами (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат.

^{31}P тТЯМР (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, аморфной натриевой соли, давали в результате характеристический пик ^{31}P при δ 1,9 м.д. ±0,2 м.д. с относительной интенсивностью 100%.

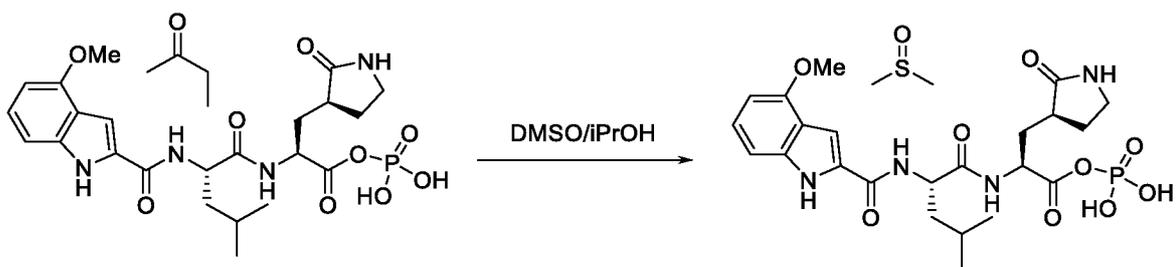
Характеристические пики ^{13}C тТЯМР и ^{31}P тТЯМР для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-

дигидрофосфата, аморфной натриевой соли, включают ^{13}C -пики при $126,0 \pm 0,4$ м.д., $181,0 \pm 0,4$ м.д. и ^{31}P -пик при $1,9$ м.д. $\pm 0,2$ м.д.

Таблица комбинационного рассеяния -3: Перечень пиков, которые выделяли в спектре комбинационного рассеяния с Фурье преобразованием, регистрировавшимся от (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, аморфной натриевой соли

Волновое число (см ⁻¹)	Относительная интенсивность, %	Волновое число (см ⁻¹)	Относительная интенсивность, %	Волновое число (см ⁻¹)	Относительная интенсивность, %
706	84,4	1215	70,2	1542	81,2
990	75,6	1271	69,6	1623	77,5
1055	73,6	1379	80,7	2934	26,2
1125	61,4	1431	100,0	3078	11,4
1165	66,3	1518	94,2		

Получение (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата сольвата с диметилсульфоксидом (ДМСО): В реактор с рубашкой при 20 °С загружали (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат сольват с метилэтилкетон (1,0 экв., 50 г), диметилсульфоксид (100 мл, 2 мл/г) и 2-пропанол (100 мл, 2 мл/г). Смесь перемешивали при 20 °С, пока не получали прозрачный раствор. Раствор нагревали до 30 °С и добавляли изопропанол (800 мл, 16 мл/г). Полученную в результате суспензию охлаждали до 10 °С в течение 2 часов и гранулировали в течение, по меньшей мере, 1 часа перед фильтрованием и промыванием 2-пропанолом (200 мл, 4 мл/г). Твердые вещества сушили при 60 °С в вакуумном шкафу в течение ночи, получая (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфат в виде сольвата с диметилсульфоксидом (~12 массовых %) с 83% выходом. Сольват с диметилсульфоксидом изолируют по влажности окружающей среды <30% RH. Более высокая влажность окружающей среды в результате приводит к выделению диметилсульфоксидного сольвата гидрата.



Подвержение действию диметилсульфоксидного сольвата (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата 50% относительной влажности давало диметилсульфоксидный сольват гидрат.

Порошковая рентгеновская дифракция

Порошковую рентгеновскую дифрактограмму для ДМСО-сольвата (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата получали с использованием дифрактометра Bruker AXS D8 Endeavor, оборудованного медным (Cu) источником излучения, длина волны 1,5406 Å. Напряжение и сила тока рентгеновской трубки были установлены на 40 кВ и 40 мА, соответственно. Моторизованные расходящиеся щели устанавливали при постоянном освещении на 11 мм. Дифракционное излучение детектировалось с использованием энергодисперсионного рентгеновского детектора LYNXEYE XE-T с позиционно-чувствительным детектором (PSD), который открывается на 4,00°. Данные собирали в тета-тета гониометре на длину волны Cu от 2,0 до 55,0 градусов 2-Тета (°2θ) с использованием размера шага 0,019 °2θ и времени в шаге 0,2 секунды. Образцы для анализа получали, располагая их в силиконовом низкофоновом небольшом держателе образцов, и вращали со скоростью 15 об./минуту при сборе данных. Относительная влажность окружающей среды лаборатории в ходе данной характеристики составляла 13,6%.

Порошковую рентгеновскую дифрактограмму для ДМСО-сольвата гидрата получали с использованием дифрактометра Bruker AXS D8 Discover, оборудованного камерой для образца Anton-Paar CHC+ и источником излучения Cu с длиной волны 1,5406 Å. Напряжение и сила тока рентгеновской трубки были установлены на 40 кВ и 40 мА, соответственно. Моторизованные расходящиеся щели устанавливали при постоянном освещении на 10 мм. Дифракционное излучение детектировалось с использованием рентгеновского энергодисперсионного детектора LYNXEYE XE, с PSD, который открывается на 2,95°. Данные собирали в тета-тета гониометре на длину волны Cu от 5,0 до 40,0 градусов °2θ с использованием размера шага 0,01 °2θ и времени на шаг 0,2 секунды. Образцы для анализа получали, располагая их в силиконовом низкофоновом

небольшом держателе образцов, и уравнивали в течение по меньшей мере 2 часов при 25 °С и 50% относительной влажности (RH) перед сбором данных.

Данные анализировали с использованием DIFFRAC.EVA V5.0 программного обеспечения. Перечень пиков получали с использованием отражений относительной интенсивностью $\geq 5\%$ от наиболее интенсивной полосы на каждой соответствующей дифрактограмме. Типичная ошибка, $\pm 0,2^\circ$ в положениях (USP-941) применима к этим данным. Незначительная погрешность, связанная с данным измерением, может возникнуть из-за ряда факторов включая: (а) получение образца (*например*, высота образца), (b) характеристики прибора, (с) калибровку прибора, (d) ввод оператора (*например*, в определении положений пиков), и (е) природа материала (*например*, предпочтительные эффекты ориентации и прозрачности).

Для того чтобы получить абсолютные положения пиков, порошковая картина должна быть выровнена с референтной. Это может быть либо смоделированной порошковой картиной из кристаллической структуры такой же формы, решенной при комнатной температуре, либо внутренним стандартом, *например*, кремнеземом или корундом. Полученная порошковая картина ДМСО-сольвата (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата выравнивалась к порошковой картине такого же материала, который содержит внутренний стандарт, Si (SRM 640e). Полученная порошковая картина ДМСО-сольвата гидрата (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата выравнивалась до смоделированной порошковой картины кристаллической структуры. Спектры PXRD для ДМСО-сольвата и ДМСО-сольвата гидрата приведены на фигурах 17 и 20, соответственно, и перечень соответствующих пиков приведены в Таблице PXRD-3 и Таблица PXRD-4 соответственно. Характеристические пики для ДМСО-сольвата представляют собой пики при 7,4, 10,8, 14,8, 22,3 и 26,2 2-Тета положениях (градусов 2-Тета $\pm 0,2$ градусов 2-Тета). Характеристические пики для ДМСО-сольвата гидрата представляют собой пики при 14,5, 17,8, 21,9, 25,6 и 26,6 2-тета положениях (градусов 2-Тета $\pm 0,2$ градусов 2-Тета). Возможным может быть материал, характеризующийся комбинацией характеристических пиков ДМСО-сольвата и ДМСО-сольвата гидрата, когда присутствует смесь из двух твердых форм. Пример картины PXRD для смеси ДМСО-сольвата и ДМСО-сольвата гидрата показан на фигуре 21.

Таблица PXRD-3: перечень пиков PXRD для (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат ДМСО-сольвата.

Угол, градусы 2-Тета (°2θ) ± 0,2 °2θ	Относительная интенсивность, %	Угол, градусы 2-Тета (°2θ) ± 0,2 °2θ	Относительная интенсивность, %	Угол, градусы 2-Тета (°2θ) ± 0,2 °2θ	Относительная интенсивность, %	Угол, градусы 2-Тета (°2θ) ± 0,2 °2θ	Относительная интенсивность, %
7,4	32,9	17,1	74,0	22,3	80,0	26,2	89,9
7,7	37,1	17,4	37,4	22,8	8,3	26,5	8,3
10,6	54,1	17,9	59,9	23,2	15,6	27,4	5,5
10,8	33,0	18,3	19,3	23,5	100,0	28,4	5,7
11,6	17,1	19,2	23,2	23,7	51,9	28,9	7,0
14,8	44,7	19,6	49,8	24,5	46,6	29,5	15,7
15,4	42,3	20,2	46,2	25,0	28,5		
15,7	18,7	21,3	41,8	25,4	6,2		
16,9	25,1	21,6	37,6	25,7	5,5		

Таблица PXRD-4: PXRD перечень пиков для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат ДМСО-сольвата гидрат.

Угол, градусы 2-Тета (°2θ) ± 0,2 °2θ	Относительная интенсивность, %	Угол, градусы 2-Тета (°2θ) ± 0,2 °2θ	Относительная интенсивность, %	Угол, градусы 2-Тета (°2θ) ± 0,2 °2θ	Относительная интенсивность, %	Угол, градусы 2-Тета (°2θ) ± 0,2 °2θ	Относительная интенсивность, %
7,7	26,4	17,8	100,0	23,3	83,0	26,8	13,9
10,6	64,2	18,2	20,0	23,5	12,0	27,2	17,0
11,6	9,1	18,6	8,2	24,1	8,1	27,3	10,3
14,5	52,2	19,6	30,7	24,3	15,4	27,6	14,4
15,5	10,7	20,3	13,5	24,5	63,8	29,2	9,6
16,4	15,4	21,2	51,8	25,6	58,2	30,0	5,6
17,0	9,0	21,9	50,1	26,6	57,9		

Твердотельный ЯМР

Твердотельный ЯМР (тТЯМР) анализ проводился на CPMAS-зонде, расположенном в спектрометре Bruker-BioSpin Avance III 500 МГц (¹H частота) ЯМР. Материал был

упакован в ротор ZrO_2 и закрыт крышкой кольца. Использовалась скорость вращения под магическим углом – 15,0 кГц.

^{13}C тТЯМР-спектры собирали, используя эксперимент по вращению под магическим углом перекрестной поляризации расщепленных протонов (CPMAS). Фазово-модулированное поле развязки протонов 80-100 кГц применялось при спектральном сборе. Время контакта с перекрестной поляризацией было установлено на 2 мс. Спектры собирали с задержкой повторного цикла 3,5 секунды. Количество сканирования регулировали таким образом, чтобы получить адекватное соотношение сигнал/шум. Шкала химического сдвига ^{13}C основывалась, используя эксперимент ^{13}C CPMAS на внешнем стандарте кристаллического адамантана, устанавливая его резонанс в сильном поле 29,5 м.д. (как определено от чистого TMS).

Автоматический выбор пиков производился с использованием программного обеспечения Bruker-BioSpin TopSpin версия 3.6. Как правило, пороговое значение 5% относительной интенсивности использовалось для предварительного выбора пиков. Выход автоматизированного подбора пиков был визуально проверен, чтобы обеспечить действительность, и корректировки были произведены вручную при необходимости. Хотя конкретные пиковые значения пиков твердотельного ЯМР, которые докладываются в данном документе, существует диапазон для этих значений пиков из-за различий в приборах, образцах и получении образцов. Это является распространенной практикой в области твердотельного ЯМР из-за вариации, свойственной положениям пиков. Типичная вариабельность для значений по оси x химического сдвига ^{13}C составляет примерно 0,2 м.д. для кристаллического твердого вещества и $\pm 0,5$ м.д. для аморфного твердого вещества. Высоты пиков твердотельного ЯМР, представленные в данном документе, представляют собой относительные интенсивности. Интенсивности твердотельного ЯМР могут изменяться в зависимости от фактической установки экспериментальных параметров и истории образца.

Таблица ЯМР-6: перечень пиков ^{13}C тТЯМР для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфата ДМСО-сольвата

^{13}C □ (м.д.) ± 0,2 м.д.	Относительна я интенсивност ь, %	^{13}C □ (м.д.) ± 0,2 м.д.	Относительна я интенсивност ь, %	^{13}C □ (м.д.) ± 0,2 м.д.	Относительна я интенсивност ь, %
210,7	30	119,5	48	41,6	72

201,0	30	106,6	29	40,3	81
184,8	31	105,1	31	39,5	68
183,5	31	102,2	52	39,0	100
174,1	33	99,7	44	38,3	74
173,4	31	99,5	43	34,2	30
163,3	24	69,9	50	26,2	72
161,6	25	69,6	52	25,5	59
154,5	54	56,5	40	25,0	53
139,2	47	55,4	54	22,8	44
129,7	51	55,0	43	21,8	43
126,3	39	52,1	89	19,4	50
126,1	40	42,2	68	19,0	51

Спектроскопия комбинационного рассеяния

Спектры комбинационного рассеяния собирали с использованием модуля комбинационного рассеяния с Фурье преобразованием RAM II, подключенного к спектрометру Vertex 70 (Bruker Optik GmbH). Прибор оснащен твердотельным лазером (Nd:YAG) 1064 нм и германиевым детектором, охлаждаемым жидким азотом. Перед сбором данных, проверки функционирования и калибровки прибора проводились с использованием источника белого света и эталонных материалов из полистирола и нафталина.

Образец анализировали непосредственно из стеклянных флаконов, в которых они были поставлены; два отдельных измерения проводились для каждого образца в разных положениях, чтобы максимизировать объем материала, подверженного воздействию лазера при сборе данных. Обратный рассеянный сигнал комбинационного рассеяния от образца был оптимизирован и данные собирали со спектральным разрешением 2 см^{-1} с использованием лазера с мощностью 1000 мВт. 4-членная функция аподизации Блэкмана-Гарриса использовалась для минимизации спектральных aberrаций. Спектры генерировались от 3500 до 50 см^{-1} с соответствующим количеством сканирований, настроенных в соответствии с обеспечением адекватного соотношения сигнал/шум.

Спектры нормализовали, установив интенсивность наиболее интенсивного пика на 2,00. Пики затем идентифицировали с использованием функции автоматического выбора пиков в программном обеспечении OPUS v8.2 (Bruker Optik GmbH) с набором чувствительности до 2%. Положения и относительные интенсивности пиков выделяли и сводили в таблицу.

Вариабельность в положениях пиков с данной экспериментальной конфигурацией находится в пределах $\pm 2 \text{ см}^{-1}$.

Ожидается, что поскольку комбинационное рассеяние с Фурье преобразованием и дисперсионное комбинационное рассеяние представляют собой подобные способы, положения пиков, представленные в данном документе для спектров комбинационного рассеяния с Фурье преобразованием, будут согласовываться с теми, которые наблюдались бы с использованием измерения дисперсионного. комбинационного рассеяния, при условии соответствующей калибровки прибора.

Спектр комбинационного рассеяния, который регистрировали для ДМСО-сольвата, представлен на Фигуре 19. Отмечается, что данные комбинационного рассеяния для ДМСО-сольвата и ДМСО-сольвата гидрата представляют собой эквивалентные положения в пределах заявленной погрешности $\pm 2 \text{ см}^{-1}$.

Таблица комбинационного рассеяния -4: Перечень пиков выделяли в спектре комбинационного рассеяния с Фурье превращением, получаемым от (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата ДМСО-сольвата

Волновое число (см^{-1}) $\pm 2 \text{ см}^{-1}$	Относительная интенсивность, %	Волновое число (см^{-1}) $\pm 2 \text{ см}^{-1}$	Относительная интенсивность, %	Волновое число (см^{-1}) $\pm 2 \text{ см}^{-1}$	Относительная интенсивность, %
334	43,0	1078	30,0	1434	68,5
446	39,8	1101	32,4	1513	100,0
588	34,7	1125	34,0	1563	39,3
631	35,7	1169	35,2	1636	71,4
675	44,6	1217	47,5	1717	24,4
705	47,9	1230	44,6	1751	23,1
817	33,6	1253	51,0	2871	16,5
863	30,9	1266	58,9	2919	37,3
958	31,4	1300	36,3	3004	11,6
991	49,1	1359	40,4	3081	10,4
1058	44,3	1380	69,9		

Характеристические пики PXRD для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата ДМСО-

сольвата включают пики при $7,4 \pm 0,2$, $14,8 \pm 0,2$ и $26,2 \pm 0,2$ градусов 2-Тета; пики при $7,4 \pm 0,2$, $10,8 \pm 0,2$, $14,8 \pm 0,2$ и $26,2 \pm 0,2$ градусов 2-Тета; и пики при $7,4 \pm 0,2$, $10,8 \pm 0,2$, $14,8 \pm 0,2$, $22,3 \pm 0,2$ и $26,2 \pm 0,2$ градусах 2-Тета.

Характеристические ^{13}C тТЯМР пики для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата ДМСО-сольвата включают ^{13}C пики при $173,4 \pm 0,2$, $210,7 \pm 0,2$ и $26,2 \pm 0,2$ м.д.; пики при $173,4 \pm 0,2$, $210,7 \pm 0,2$, $26,2 \pm 0,2$ и $22,8 \pm 0,2$ м.д.; и пики при $173,4 \pm 0,2$, $210,7 \pm 0,2$, $26,2 \pm 0,2$, $22,8 \pm 0,2$ и $25,5 \pm 0,2$ м.д.

Характеристические пики комбинационного рассеяния для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата ДМСО-сольвата включают пики комбинационного рассеяния при 1717 ± 2 и 675 ± 2 см^{-1} .

Характеристическая комбинация пиков PXRD и пиков ^{13}C ТЯМР для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата ДМСО-сольвата включают пики PXRD при $7,4 \pm 0,2$, $14,8 \pm 0,2$ и $26,2 \pm 0,2$ градусах 2-Тета и пики ^{13}C тТЯМР при $173,4 \pm 0,2$, $210,7 \pm 0,2$ и $26,2 \pm 0,2$ м.д.

Характеристическая комбинация пиков PXRD пики и пиков комбинационного рассеяния для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата ДМСО-сольвата включают пики PXRD при $7,4 \pm 0,2$, $14,8 \pm 0,2$ и $26,2 \pm 0,2$ градусах 2-Тета и пики комбинационного рассеяния при 1717 ± 2 и 675 ± 2 см^{-1} .

Характеристическая комбинация пиков ^{13}C тТЯМР и пиков комбинационного рассеяния для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат ДМСО-сольвата включают пики ^{13}C тТЯМР при $173,4 \pm 0,2$, $210,7 \pm 0,2$ и $26,2 \pm 0,2$ м.д. и пики комбинационного рассеяния при 1717 ± 2 и 675 ± 2 см^{-1} .

Характеристические пики PXRD для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата ДМСО-сольвата гидрата включают пики при $14,5 \pm 0,2$, $25,6 \pm 0,2$ и $26,6 \pm 0,2$ градусах 2-Тета; пики при $14,5 \pm 0,2$, $21,9 \pm 0,2$, $25,6 \pm 0,2$ и $26,6 \pm 0,2$ градусах 2-Тета; и пики при $14,5 \pm 0,2$, $17,8 \pm 0,2$, $21,9 \pm 0,2$, $25,6 \pm 0,2$ и $26,6 \pm 0,2$ градусах 2-Тета.

Примеры препаратов для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата

Лиофилизированные препараты (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата:

(3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат предпочтительно формулируют путем образования раствора, затем осуществляя процесс высушивания при замораживании с образованием лиофилизированного продукта. Форма (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата может существовать как свободная кислота или как приемлемая соль. Предпочтительные противоионы, образующие соль (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат (т.е. фрагмент фосфатной соли) включают холин, меглюмин, бензатин, диэтиламин, три(гидроксиметил)аминометан, диоламин, пиперазин, более предпочтительные противоионы включают калий, магний и кальций; и наиболее предпочтительный противоион представляет собой натрий. Лиофилизированный раствор предпочтительно формулируют в диапазоне от рН 2 до рН 6, более предпочтительно от рН 3 до рН 5 и наиболее предпочтительно в диапазоне от рН 3,5 до рН 4,5. Для того чтобы поддерживать необходимый рН препарата является буферным, при этом предпочтительные буферы представляют собой молочную кислоту, фосфорную кислоту, уксусную кислоту и винную кислоту, при этом наиболее предпочтительный буфер представляет собой лимонную кислоту. рН препарата может регулироваться и контролироваться за счет добавления приемлемого основного эксципиента, предпочтительные основания включают холин, меглюмин, бензатин, диэтиламин, три(гидроксиметил)аминометан, диоламин, пиперазин, более предпочтительные основы представляют собой калия гидроксид, магния гидроксид и гидроксид кальция, наиболее предпочтительное основание представляет собой натрия гидроксид.

Включенными могут быть объемобразующий агент, модификатор тоничности или эксципиент, который удаляет воду, при этом предпочтительные эксципиенты включают сахара, полиспирты, полимеры и аминокислоты, более предпочтительные эксципиенты включают декстран, поливинилпирролидон и глицин, сахарозу, лактозу, маннит, полиэтиленгликоль 400 и полиэтиленгликоль 3350. Кроме того, препарат может включать солюбилизующий агент, при этом предпочтительные эксципиенты включают поверхностно-активные вещества и комплексообразующие агенты (например, циклодекстрины), более предпочтительны. Колифор HS-15, гидроксипропил-бета-циклодекстрин, простой сульфобутиловый эфир-бета циклодекстрин, гамма-циклодекстрин, и наиболее предпочтительным является полисорбат 80.

Содержание воды в лиофилизированном составе после изготовления предпочтительно составляет <2% масс./масс., более предпочтительно <1% масс./масс., и наиболее

предпочтительно < 0,5% масс./масс. Концентрация (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата перед лиофилизацией и после восстановления предпочтительно находится в диапазоне 10-300 мг/мл, более предпочтительно 25-150 мг/мл, и наиболее предпочтительно в диапазоне 50-125 мг/мл. Препарат может быть восстановлен и разбавлен в стерильной воде для инъекции, 0,9% масс./об. растворе хлорида натрия (нормальном физиологическом растворе), или 5% масс./об. растворе декстрозы.

Порошковый препарат во флаконе:

(3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат также может быть сформулирован как порошок. В данном случае флакон может быть заполнен (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфатом в виде порошка и восстановлен до приемлемого рН. (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат может добавляться как свободная кислота или как приемлемая соль. Предпочтительные противоионы, образующие соль (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфата включают холин, меглюмин, бензатин, диэтиламин, три(гидроксиметил)аминометан, диоламин, пиперазин, более предпочтительные противоионы включают калий, магний и кальций, и наиболее предпочтительный противоион представляет собой натрий. После восстановления раствора предпочтительный диапазон от рН 2 до рН 6, более предпочтительно от рН 3 до рН 5 и наиболее предпочтительно в диапазоне от рН 3,5 до рН 4,5. Для того чтобы поддерживать необходимый рН, препарат является буферным, при этом предпочтительные буферы представляют собой молочную кислоту, фосфорную кислоту, уксусную кислоту и винную кислоту, при этом наиболее предпочтительный буфер представляет собой лимонную кислоту. рН препарата регулируется и контролируется за счет введения приемлемого основания, предпочтительные основания включают холин, меглюмин, бензатин, диэтиламин, три(гидроксиметил)аминометан, диоламин, пиперазин, более предпочтительные основания представляют собой калия гидроксид, магния гидроксид, и кальций гидроксид, и наиболее предпочтительное основание представляет собой натрия гидроксид.

Включенными могут быть объемобразующий агент, модификатор тоничности или эксципиент, который удаляет воду, при этом предпочтительные эксципиенты включают сахара, полиспирты, полимеры и аминокислоты, более предпочтительные эксципиенты

включают декстран, поливинилпирролидон и глицин, сахарозу, лактозу, маннит, полиэтиленгликоль 400 и полиэтиленгликоль 3350. Кроме того, препарат может включать солюбилизирующий агент, при этом предпочтительные эксципиенты включают поверхностно-активные вещества и комплексообразующие агенты (например, циклодекстрины), более предпочтительные эксципиенты включают полисорбат 20, Кремофор EL, Колифор HS-15, гидроксипропил-бета-циклодекстрин, простой сульфобутиловый эфир-бета циклодекстрин, гамма-циклодекстрин, и наиболее предпочтительным является полисорбат 80.

Концентрация (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат после восстановления предпочтительно находится в диапазоне 10-300 мг/мл, более предпочтительно 25-150 мг/мл, и наиболее предпочтительно в диапазоне 50-125 мг/мл. Препарат может быть восстановлен и разбавлен в стерильной воде для инъекции, 0,9% масс./об. растворе натрия хлорида (нормальном физиологическом растворе), или 5% масс./об. растворе декстрозы.

Общие методологии для примеров препарата PF-07304814

Оценка содержания воды по Карлу Фишеру

Содержимое влаги в лиофилизированных образцах определяли по кулометрическому методу с использованием титратора Карла Фишера (Karl Fisher (KF)) (Mettler Toledo C30), оснащенного двухштыревым платиновым электродом DM143-SC, подключенным к аналитическим весам (Mettler Toledo). В качестве раствора для емкости KF использовался Hydranal Coulomat AD (Fluka). Прибор кондиционировали до тех пор, пока фоновый дрейф не был ниже 20 мг/минуту. Образцы были проанализированы после первоначальной проверки воды на предмет критериев пригодности системы в соответствии с инструкциями. Коротко, 100 мг образца размещали в пробирке для исследования и помещали на аналитические весы. Весы затем таровали и образец быстро переносили в емкость KF и закупоривали. Пустую пробирку снова взвешивали на весах, чтобы проверить наличие остаточного образца, если он есть. Образец был автоматически титрован и результаты эксперимента были распечатаны как размер образца и содержание воды. Образцы измеряли в двух повторах и % содержание влаги сообщалось как усредненное значение.

Оценка чистоты с использованием ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УЭЖХ).

Определение анализа и чистоты PF-07304814 осуществляли с использованием градиентного метода УЭЖХ с УФ-детектированием. Колонка, используемая для анализа,

содержит пентафторфенил в стационарной фазе с блокировкой остаточных групп TMS. Подвижную фазу получали путем смешения водного аммония формиата и аммония формиата в метаноле. Примеси определяли по их относительному времени содержания (RRT), основываясь на пике PF-07304814. Анализ количественно определили путем сравнения соответствующей площади пика из хроматограммы раствора образца с пиком PF-07304814 из стандартного раствора известной концентрации. Процент площади (%) каждого пика примеси рассчитывали путем сравнения площади пика примеси с площадью общего пика и примесей).

Характеристика модулированной дифференциальной сканирующей калориметрии (мДСК) Лифофильные образцы анализировали с использованием прибора TA Instruments DSC Q1000. Программное обеспечение, используемое для анализа, является Universal Analysis 2000 (версия 4.5 А, конфигурация 4.5.0.5). Коротко говоря, образец герметично загружали в алюминиевый тигель и температуру повышали от -20 до 200 °С со скоростью 2 °С/минуту, модулирование $\pm 0,53$ °С каждые 100 секунд. Проанализированы были T_g и другие тепловые события.

Характеристика по порошковой рентгеновской дифракции (PXRD)

Лифофилизированные образцы анализировали с использованием PXRD для оценки структуры лифофилизированного продукта с использованием дифрактометра Rigaku Miniflex 600. Дифрактометр использовался с электронно-лучевой трубкой 40 кВ/15 мА и сцинтилляционным детектором. Состоянием щели, которая использовалась, была система Varied + Fixed (Варирование + Фиксирование), с настройками траектории падающего луча 5,0°, 10,0 мм для IHS, и 1,25° для DS, и настройками дифрагированного луча 0,3 мм для RS. Образцы анализировали стадийным способом, начиная с $2\theta - 2^\circ$ и заканчивая при 40° с шагом $0,02^\circ$ в течение 1 секунды продолжительности. Необработанные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Rigaku PDXL (версия 1.8.0.3).

Примеры препарата для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата (PF-07304814): рН, буфер и концентрация PF-07304814 в препаратах PF-07304814

рН препарата

Для того, чтобы оценить возможные диапазоны рН для препаратов PF-07304814, препараты PF-07304814 получали при рН от 1 до рН 7, и химическую стабильность оценивали с использованием ВЭЖХ в течение длительного времени.

Приблизительно 1,35 мг PF-07304814 взвешивали в 20 мл сцинтилляционных флаконах с 2 повторами на значение рН. К каждому флакону добавляли 7 мл чистой воды, с последующим добавлением предполагаемого количества 0,01 М, 0,1 М, или 1 М HCl или

NaOH. Измеряли рН каждого препарата, и если он был снижен более чем на +/- 0,2 единицы, рН корректировали с использованием 0,01 М HCl или NaOH, пока не было достигнуто целевое значение рН. Затем добавляли очищенную воду в целевой объем 10 мл. Затем флаконы закрывали крышками, перемешивали и ставили в стабильность при комнатной температуре. Через 1, 3 и 6 дней аликвоты по 150 мкл каждого препарата удаляли и переносили во флакон ВЭЖХ для анализа чистоты.

Из экспериментальных данных в таблице стабильности рН ниже, предпочтительный диапазон рН составляет от примерно рН 2 до примерно рН 6 и наиболее предпочтительно диапазон рН составляет от примерно рН 3 до примерно рН 5. Данный предпочтительный рН относится к раствору перед лиофилизацией, восстановленному раствору после лиофилизации и разбавленного раствора для в.в. введения.

Таблица стабильности рН: Химическая стабильность раствора PF-07304814 концентрацией примерно 0,13 мг/мл оценивалась как функция рН в течение 6 дней при комнатной температуре, чтобы понять оптимальный диапазон рН. Сообщено общее количество примесей, определенное путем определения УЭЖХ хроматографической чистоты.

Таблица стабильности при рН

рН	Общие примеси (%)		
	1 день	3 дня	6 дней
1,0	12,6	25,8	44,9
1,9	3,2	5,4	8,9
2,9	2,0	2,5	3,0
4,2	3,0	3,8	6,5
5,1	4,8	8,8	16,0
5,9	7,9	15,3	25,0
6,9	13,6	24,9	32,7

Буферная композиция

Для того, чтобы оценить возможные буферные композиции для композиций PF-07304814, препараты PF-07304814 получали без буфера, с цитратным буфером и лактатным буфером. Для каждого из данных препаратов химическую стабильность и рН оценивали с использованием ВЭЖХ в течение длительного времени.

Концентрированные исходные растворы получали в мерных колбах объемом 250 мл, таким образом, что конечной рН составлял бы 3, 4 или 5 после добавления PF-07304814 к концентрации примерно 25 мг/мл. Для исходных растворов без буфера добавляли

определенное количество 1 М NaOH, затем колбу заполняли до определенного объема очищенной водой. Для цитратных буферов в каждую колбу добавляли приблизительно 1471 мг дигидрата цитрата натрия вместе с указанным количеством 1 М NaOH, затем колбу заполняли до определенного объема очищенной водой. Для лактатных буферов в каждой колбе добавляли примерно 1868 мг лактата натрия (60% масс./масс.) вместе с указанным количеством 1 М NaOH, и затем колбу заполняли до определенного объема очищенной водой.

Приблизительно 75 мг PF-07304814 взвешивали в 3 мл стеклянные флаконы. К каждому флакону добавляли 1,2 мл очищенной воды, с последующим добавлением 1,5 мл концентрированного исходного раствора. рН каждого препарата затем измеряли, и если он был снижен более чем на +/- 0,2 единицы, рН корректировали с использованием 0,1 М HCl или NaOH, пока не достигали целевого рН. Очищенную воду затем добавляли в целевой объем 3 мл. Полученные в результате препараты должны либо не иметь никакого буфера, либо иметь 10 мМ цитратный буфер, либо 20 мМ лактатный буфер с конечными значениями рН 3, 4 и 5 для каждого препарата. Флаконы затем закупоривали, закрывали колпачками, перемешивали и ставили на стабильность при 25 °С. Через 4 дня измеряли рН раствора и 50 мкл аликвоты каждого препарата переносили во флакон для ВЭЖХ для анализа относительно чистоты.

Из экспериментальных данных в Таблице буферной композиции, приведенной ниже, не наблюдалось значительных различий в общем количестве примесей в различных препаратах при конкретном рН, что свидетельствует о том, что не существует никаких проблем с химической совместимостью между изучаемыми буферами и PF-07304814. Не существовало существенных тенденций в качественном профиле примесей, который образовался как функция используемого буфера (данные не показаны). Однако включение цитратного буфера в концентрации 10 мМ, кажется, обеспечивает лучший контроль рН при значениях рН примерно 3 и 4, по сравнению с образцами без буфера. Следовательно, для того чтобы содержать лекарственный продукт в пределах целевого значения рН и, в свою очередь, чтобы ограничить нежелательное рН-зависимое разложение, цитратный буфер выбирали в мольном соотношении 4,5:1 для PF-07304814 до буфера. Предпочтительная буферная композиция касается раствора перед лиофилизацией, лиофилизированного порошка, восстановленного раствора после лиофилизации, и разбавленного раствора для в.в. введения.

Таблица буферных композиций: Химическую стабильность препаратов PF-07304814 с концентрацией 25 мг/мл при 45 мМ оценивали при 3 разных уровнях рН (3, 4 и 5) без буфера, с 10 мМ цитратного буфером и с 20 мМ лактатным буфером для того, чтобы

понять оптимальную буферную композицию Сообщается об увеличении общего количества примесей как разницу между исходным общим содержанием примесей и измеренным общим содержанием примесей через 4 дня при 25 °С.

Таблица буферных композиций

Целевой рН	Буфер	Концентрация буфера (мМ)	Мольное соотношение PF-07304814 : Буфер	Увеличение общих примесей (%) – 4 дня	Изменение рН – 4 дня
3	никакого	0	-	0,8	0,4
	Цитрат	10	4,5:1	1,2	0,1
	Лактат	20	2,3:1	1,2	0,3
4	никакого	0	-	1,4	0,2
	Цитрат	10	4,5:1	1,5	0,0
	Лактат	20	2,3:1	1,6	-0,1
5	никакого	0	-	4,3	0,1
	Цитрат	10	4,5:1	4,1	-0,2
	Лактат	20	2,3:1	3,6	-0,1

Концентрация PF-07304814

Для того, чтобы оценить возможные концентрации PF-07304814 в растворе перед лиофилизацией и в восстановленных растворах лиофилизированного продукта, препараты PF-07304814 получали в концентрации примерно 50, примерно 100 и примерно 200 мг/мл, при этом сохраняя фиксированное соотношение 4 буфера – 4,5:1. Для каждого из данных препаратов химическую стабильность и рН оценивали с использованием ВЭЖХ в течение времени.

Концентрированные буферные растворы первоначально получали в мерных колбах объемом 250 мл, таким образом, что конечное значение рН составляло бы 4 после добавления PF-07304814 до концентрации приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 100 мг/мл или приблизительно 200 мг/мл. Для препарата PF-07304814 концентрацией 50 мг/мл, 40 мМ цитратный буфер получали путем добавления 2,94 г дигидрата натрия и 27,4 мл 1 н. NaOH и разбавление до объема очищенной водой. Для препарата PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл, 80 мМ цитратный буфер получали путем добавления 5,88 г цитрата натрия дигидрата и 55,5 мл 1 н. NaOH и разбавление до объема очищенной водой. Для препарата PF-07304814 концентрацией 200 мг/мл PF-07304814, 160 мМ цитратный

буфер получали путем добавления 11,76 г цитрата натрия дигидрата и 112,5 мл 1 н. NaOH и разбавление до объема очищенной водой.

Приблизительно 200 мг, примерно 400 мг или примерно 800 мг PF-07304814 взвешивали в 10 мл стеклянные флаконы. К каждому флакону добавляли 2 мл соответствующего концентрированного буферного раствора, с последующим добавлением 2 мл очищенной воды. Затем измеряли рН каждого препарата, и если он был снижен больше, чем на +/- 0,2 единицы, рН корректировали с использованием 0,1 М HCl или NaOH, пока не достигали целевого рН. Полученные в результате препараты должны иметь концентрации PF-07304814 примерно 50 мг/мл, примерно 100 мг/мл, или примерно 200 мг/мл с 20 мМ, 40 мМ, или 80 мМ цитратного буфера соответственно. Флаконы затем закупоривали, закрывали колпачками, перемешивали и ставили на стабильность при 25 °С. Через 3, 6 и 13 дней измеряли рН растворов, и аликвоты каждого препарата переносили во флаконы для ВЭЖХ для анализа на чистоту.

Из экспериментальных данных в Таблице относительно химической стабильности для нижеследующих препаратов химическая стабильность препаратов PF-07304814 была сопоставимой во всех концентрациях PF-07304814 от 50 мг/мл до 200 мг/мл. Поведение исследуемых концентраций было сопоставимо. Предпочтительный диапазон концентраций PF-07304814 поддерживается в возможных растворах перед лиофилизацией и восстановленных растворах после лиофилизации. Препараты с низшими концентрациями PF-07304814 от примерно 1 мг/мл до примерно 25 мг/мл также имеют приемлемую химическую стабильность, как показано в примерах таблицы стабильности при рН и таблице буферных композиций, приведенных выше, которые могут дополнительно покрывать возможные разбавленные растворы для в.в. введения.

Таблица химической стабильности препаратов: Химическую стабильность препаратов PF-07304814 оценивали в 3 различных концентрациях PF-07304814 (50 мг/мл, 100 мг/мл и 200 мг/мл) с фиксированным мольным соотношением 4,5:1 PF-073 . Сообщается об увеличении общего количества примесей как разности между начальным общим содержанием примесей и измеренным общим содержанием примесей через 3, 6 или 13 дней при 25 °С.

Таблица химической стабильности препаратов

рН на день 0	Концентрация PF-07304814 (мг/мл)	Концентрация цитратного буфера (мМ)	Мольное соотношение PF-07304814:Буфер	увеличение общего количества примесей (%)		
				День	День	День

				3	6	13
4,0	200	80	4,5:1	0,9	1,8	4,2
4,0	100	40	4,5:1	1,0	1,7	4,2
4,0	50	20	4,5:1	0,7	1,7	3,8

Пример препарата 1: Получение 100 мг/мл (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата в качестве раствора в цитратном буфере

Стадия 1: Получение 250 мл препарата 80 мМ натрий-цитратного буфера

5,89 г натрия цитрата дигидрата (класса USP) добавляют в мерную колбу объемом 250 мл. 125 мл очищенной воды добавляют к мерной колбе, с последующим добавлением 55,5 мл 1 н. раствора гидроксида натрия. Раствор разбавляли в целевой объем очищенной водой и переворачивали для перемешивания до однородности. Раствор вакуумированно фильтровали через нейлоновый фильтр 0,2 мкм.

Пример препарата лекарственного продукта 1А

5 мл 80 мМ буферного раствора цитрата натрия добавляли к 20 мл мензурки с магнитной „блохой“. 1,03 г (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата (в виде гидрата Формы 1) добавляли в мензурку с образованием раствора и перемешивали в течение 25 минут. 3 мл очищенной воды добавляли в мензурку и перемешивали в течение 5 минут. Раствор титровали до целевого рН 4, используя 1 н. раствор гидроксида натрия или 1 н. раствор хлороводородной кислоты (Fisher Chemical). Раствор разбавляли до целевого объема в мерной колбе или до целевой массы, основываясь на плотности очищенной воды и переворачивали для перемешивания до однородности. Раствор фильтровали со шприцем через PVDF фильтр 0,2 мкм. Конечная композиция препарата составляла 10 мл с рН раствора 4 с концентрацией ~100 мг/мл (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфата гидрата формы 1 и 40 мМ цитратного буфера (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5:1).

Пример препарата лекарственного продукта 1В

5 мл охлажденного 80 мМ буферного раствора цитрата натрия добавляли к 20 мл мензурки с магнитной „блохой“. Мензурку размещали на водяной бане с контролируемой температурой до 2-8 °С. 1,03 г (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфата (в виде гидрата Формы 1) добавляли к мензурке с образованием раствора и перемешивали в течение 25 минут. 3 мл охлажденной очищенной воды добавляли в мензурку и

перемешивали в течение 5 минут. Раствор титровали до целевого pH 4, используя 1 н. раствор гидроксида натрия или 1 н. раствор хлороводородной кислоты (Fisher Chemical). Раствор разбавляли до целевого объема в мерной колбе или целевой массе, основываясь на плотности очищенной воды и переворачивают для перемешивания до однородности. Раствор фильтровали со шприцем через PVDF фильтр 0,2 мкм. Конечная композиция препарата составляла 10 мл с pH раствора 4 с концентрацией ~100 мг/мл (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата гидрата формы 1 и 40 мМ цитратного буфера (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5:1).

Пример препарата лекарственного продукта 1C

3 мл охлажденной очищенной воды добавляли к 20 мл мензурки с магнитной "блехой". Мензурку размещали на водяной бане с контролируемой температурой до 2-8°C. 1,03 г (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата гидрата формы 1 добавляли к мензурке с образованием суспензии и перемешивали в течение 5 минут. 5 мл охлажденного 80 мМ буферного раствора цитрата натрия добавляли к мензурке с образованием раствора и перемешивали в течение 25 минут. Раствор титровали до целевого pH 4, используя 1 н. раствор гидроксида натрия или 1 н. раствор хлороводородной кислоты (Fisher Chemical). Раствор разбавляли до целевого объема в мерной колбе или целевой массе, основываясь на плотности очищенной воды и переворачивают для перемешивания до однородности. Раствор фильтровали со шприцем через PVDF фильтр 0,2 мкм. Конечная композиция препарата составляла ~100 мг/мл (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата гидрата формы 1, 40 мМ цитратного буфера, и pH 4 (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5:1).

Пример препарата лекарственного продукта 1D

5 мл очищенной воды добавляли к 20 мл мензурке с магнитной "блехой". 77,1 мг безводной лимонной кислоты (класса USP, Fisher Chemical) добавляли к мензурке, с последующим добавлением 0,92 мл 1 н. раствора гидроксида натрия, и перемешивали в течение 5 минут. 0,517 г (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата гидрата формы 1 добавляли к мензурке с образованием раствора и перемешивали в течение 5 минут. 1,12 мл 1 н. раствора гидроксида натрия добавляли в мензурку и перемешивали в течение 5 минут. 0,556 г (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата гидрата

формы 1 добавляли в мензурку с образованием раствора и перемешивали в течение 5 минут. Раствор титровали до целевого pH 4, используя 0,29 мл 1 н. раствора гидроксида натрия. Раствор разбавляли до целевого объема в мерной колбе или целевой массе, основываясь на плотности очищенной воды и переворачивают для перемешивания до однородности. Раствор фильтровали со шприцем через PVDF фильтр 0,2 мкм. Конечная композиция препарата составляла 10 мл с pH раствора 4 с концентрацией ~100 мг/мл (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфата гидрата формы 1 и 40 мМ цитратного буфера (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5:1).

Препарат лекарственного продукта 1E

Получение раствора 100 мг/мл (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата (PF-07304814) с 5 мг/мл полисорбата 80

Для предупреждения осаждения плохо растворимых примесей, связанных с PF-07304814, или продуктов разложения, исследовалось получение препаратов с солюбилизующими эксципиентами, и в частности с полисорбатом 80. Состав препарата соответствовал Примерам 1A-1D, с концентрацией PF-07304814, pH = 4,0, цитратным буфером концентрацией 40 мМ (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату - примерно 4,5:1), и приблизительным соотношением натрия к PF-07304814 примерно 1,3:1. Раствор также содержал 5 мг/мл полисорбата 80. Для дополнительного подтверждения, что такие растворы могли быть лиофилизированными без существенного разложения с получением лиофилизированного продукта, разработка цикла лиофилизации продолжалась. Содержание полисорбата 80 в лиофилизированном порошке составляло примерно 4% масс./масс.

Получение 80 мМ натрий-цитратного буфера

5,89 г натрия цитрата дигидрата (класса USP) добавляли в мерную колбу объемом 250 мл. 125 мл очищенной воды добавляли в мерную колбу, с последующим добавлением 55,5 мл 1 н. раствора гидроксида натрия. Раствор разбавляли в целевой объем очищенной водой и переворачивали для перемешивания до однородности. Раствор вакуумированно фильтровали через нейлоновый фильтр 0,2 мкм.

Получение раствора полисорбата 80 концентрацией 250 мг/мл.

2,50 г полисорбата 80 (класс NF, Spectrum) добавляли в 10 мл мерную колбу. Раствор разбавляли в целевой объем очищенной водой и переворачивали для перемешивания до однородности.

Получение препарата лекарственного продукта – раствор PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл из 5 мг/мл полисорбата 80.

5,0 мл охлажденного 80 мМ буферного раствора цитрата натрия добавляли к 20 мл мензурки с магнитной „блохой“. Мензурку размещали на водяной бане с контролируемой температурой до 2-8 °С. Приблизительно 1,04 г (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата гидрата формы 1 добавляли в мензурку с образованием раствора и перемешивали в течение примерно 25 минут. 3,0 мл охлажденной очищенной воды добавляли в мензурку и перемешивали в течение 5 минут. Раствор разбавляли в целевой массе 10,35 г очищенной водой и перемешивали с использованием мешалки до однородного состояния. Раствор фильтровали со шприцем через PVDF фильтр 0,2 мкм. Конечная композиция препарата составляла примерно 10 мл раствор pH 4 с примерно 100 мг/мл (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата гидрата формы 1, 40 мМ цитратного буфера, и 5 мг/мл полисорбата 80. (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5: 1).

Разбавленный препарат лекарственного продукта

Для того, чтобы подтвердить присутствие солюбилизующего эксципиента, который может помочь предотвратить осаждение плохо растворимых примесей или продуктов разложения, препараты получали из полисорбата 80 и без него, разбавляли в соответствии со способом их получения для внутривенного введения и контролировали образование видимых и невидимых частиц. Важно, что небольшое количество полисорбата 80 (5 мг/мл) в фармацевтической композиции (перед и после восстановления) может существенно уменьшить образование частиц в разбавленных растворах для внутривенного (в.в.) введения.

Препараты с содержанием 0 и 5 мг/мл полисорбата 80 получали, как описано выше в препаратах лекарственного продукта 1D и 1E, соответственно. Препараты затем разбавляли до 25 мг/мл (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфатц или в 0,9% масс./об. Раствор натрия хлорида для инъекций (USP, B. Braun) или 5% масс./об. Раствор декстрозы для инъекций (USP, B. Braun). Для разбавлений 25 мг/мл (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S) -2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, 3,0 мл 0,9% масс./об. раствора хлорида натрия для инъекций или 5% масс./об. Растворы декстрозы для инъекций добавляли в емкость с последующим добавлением 1,0 мл препарата. Все растворы укупоривают, переворачивают для перемешивания и хранили при комнатной температуре в течение двух дней. Полученные в

результате разбавления затем анализировали на наличие видимых частиц в соответствии с USP<790> и суб-видимые частицы через динамическое изображение потока через 0, 1 и 2 дня.

Анализ видимых частиц

Визуальный осмотр осуществляли на образцах разбавленных препаратов и плацебо-разбавителя для контроля видимого образования частиц. Во время исследования согласно способу USP<790> образцы с полисорбатом 80 были «по существу свободными от частиц» в течение 2 дней. Образцы без полисорбата 80 имели >10 видимых частиц сразу после разбавления. Частицы ассоциируются с примесями, связанными с API.

25 мг/мл разбавленные образцы и разбавленные образцы плацебо были проанализированы с помощью визуализации динамического потока в течение двух дней. Используя FlowCam 8100 с калиброванным объективом 10x, дозировали 1,00 мл раствора из каждой емкости и пропускать через чистую жидкостную проточную кювету. Во время процесса получения изображения применяли предварительный фильтр с 4-100 мкм эквивалентным сферическим диаметром (ESD) для согласования с ограничениями размера, определенными проточной ячейкой. Результаты исследования были экспортированы из FlowCam 8100 в программное обеспечение Lumetics Link для дальнейшей обработки. Используя Lumetics Link, всю многочисленность частиц каждого цикла отфильтровывали в диапазонах субвидимого размера (4-10 мкм, 10-25 мкм, 25-50 мкм и 50-100 мкм). По результатам данного анализа большинство наблюдаемых частиц имели размер от 4 до 10 мкм. Более 90% частиц имеют размер менее 25 мкм с использованием ESD. Важно, что данные показали значительно меньше частиц в образцах лекарственного продукта, содержащего полисорбат 80, по сравнению с лекарственными продуктами без полисорбата 80. Уменьшение частиц через полисорбат 80 согласуется с результатами визуального осмотра и демонстрирует, что полисорбат 80 растворяет примеси, связанные с API, которые вызывают образование видимых и субвидимых частиц. Количество субвидимых частиц является сопоставимым с плацебо. Результаты сообщаются в таблице данных частиц для дня 0, но постоянные тенденции наблюдаются на день 1 и день 2.

Таблица данных относительно частиц: количество субвидимых частиц на мл 100 мг/мл препаратов (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата из 0 или 5 мг/мл полисорбата 80, разбавленного в физиологическом растворе или декстрозе до концентрации 25 мг/мл (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата. Анализ проводили посредством

визуализации динамического потока. Сообщенные данные представляют собой данные в день 0, в течение нескольких часов после разбавления.

Размер частиц (мкм)	Количество частиц на мл при разбавлении физиологическим раствором		
	Плацебо	Без полисорбата 80	С полисорбатом 80
4-10	37	378	65
10-25	10	226	13
25-50	3	63	11
50-100	0	10	0
Размер частиц (мкм)	Количество частиц на мл при разбавлении декстрозой		
	Плацебо	Без полисорбата 80	С полисорбатом 80
4-10	307	629	65
10-25	72	220	10
25-50	10	37	3
50-100	0	7	0

Пример препарата 2: Лиофилизация раствора 100 мг/мл (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата гидрата формы 1

10 мл фильтрованного раствора 100 мг/мл (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата гидрата формы 1 (как получали в Примере препарата 1D выше) наполняли в 20 мл флаконы с диаметром горловины 20 мм и частично закупоривали. Наполненные и частично закупоренные флаконы ставили в лоток и лоток загружали в лиофилизатор (LyoStar). Лиофилизатор герметично закрывали и температуру полки охлаждали до -45 °C со скоростью 0,5 °C в минуту и выдерживали в течение 1 часа. Вакуумное давление было установлено на 150 мТорр, и лиофилизатор выдерживали в течение 1 часа. Температуру полки затем нагревали до 25 °C со скоростью 0,5 °C в минуту и выдерживали в течение 27 часов. После окончания первичной сушки камеру снова заполняли азотом и температуру полки охлаждали до 5 °C. Образцы закупоривали внутри лиофилизатора, вакуум сбрасывали и образцы удаляли, получая продукт, лиофилизированный во флаконе.

Характеристика лиофилизированного PF-07304814

После лиофилизации образец имел вид от коржа до порошка от белого до почти белого/желтого/коричневого цвета. Лиофилизированные образцы демонстрируют минимальные признаки обратной плавки, разрушения и усадки. Содержание воды в лиофилизированном порошке, как измерялось по Карлу Фишеру, составляло примерно 0,6% масс./масс. Хроматографическая чистота образцов, как измерено с использованием УЭЖХ, изменялась примерно на 0,1% между до и после лиофилизации. Один T_g наблюдали с использованием мДСК с температурой 109,4 °С. Лиофилизированные образцы, как было обнаружено, предпочтительно имели аморфную структуру, как измерялось по PXRD, с одним широким пиком, наблюдавшимся при примерно $3,0^\circ 2\theta$ (смотрите фигуру 22).

Пример препарата 2А: Лиофилизация раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл из 5 мг/мл полисорбата 80 с объемом наполнения 10,9 мл.

Для предупреждения осаждения плохо растворимых примесей, связанных с PF-07304814 или продуктов разложения, исследовалось получение препаратов с солюбилизующими эксципиентами, и, в частности, с полисорбатом 80. Композиция препарата соответствовала Примеру 2, с 100 мг/мл PF-07304814, рН = 4,0, цитратным буфером при 40 мМ (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату – примерно 4,5:1), и приблизительным соотношением натрия к PF-07304814 примерно 1,3:1. Раствор также содержал 5 мг/мл полисорбата 80. Для дополнительного подтверждения, что такие растворы могли быть лиофилизированными без существенного разложения с получением лиофилизированного продукта, продолжалась разработка цикла лиофилизации. Содержание полисорбата 80 в лиофилизированном порошке составляло примерно 4% масс./масс.

Лиофилизация раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл из 5 мг/мл полисорбата 80 с объемом наполнения 10,9 мл

10,9 мл фильтрованного раствора 100 мг/мл PF-07304814 (из указанного выше Препарата 1Е) наполняли в 20 мл флакона с диаметром горловины 20 мм и частично закупоривали. Наполненные и частично закупоренные флаконы ставили в лоток и лоток загружали в лиофилизатор. Лиофилизатор герметично закрывали и температуру полки охлаждали до -45 °С со скоростью 0,5 °С в минуту и выдерживали в течение 1 часа. Вакуумное давление было установлено на 150 мТорр, и лиофилизатор выдерживали в течение 1 часа. Температуру полки затем нагревали до 25 °С со скоростью 0,5 °С в минуту и выдерживали в течение 27 часов. После окончания вторичной сушки камеру снова заполняли азотом и температуру полки охлаждали до 5 °С. Образцы закупоривали внутри лиофилизатора, вакуум сбрасывали и образцы удаляли.

Характеристика лиофилизированного PF-07304814, получаемого из 5 мг/мл полисорбата 80 с объемом наполнения 10,9 мл

После лиофилизации образец имел вид от коржа до порошка от белого до почти белого/желтого/коричневого цвета. Лиофилизированные образцы демонстрируют минимальные признаки обратной плавки, разрушения и усадки. Содержание воды в лиофилизированном порошке, как измерялось по Карлу Фишеру, составляло примерно 0,5% масс./масс. Хроматографическая чистота образцов, как измерено с использованием УЭЖХ, изменялась примерно на 0,1% между до и после лиофилизации. Один T_g наблюдали с использованием мДСК с температурой 101,2 °С.

Лиофилизированные образцы, как было обнаружено, предпочтительно имели аморфную структуру, как измерялось по PXRD, с одним широким пиком, наблюдавшимся при примерно $3,0^\circ 2\theta$ (смотрите фигуру 23).

Пример препарата 2В: Лиофилизация раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл из 5 мг/мл полисорбата 80 с объемом наполнения 5,45 мл.

5,45 мл фильтрованного раствора 100 мг/мл PF-07304814 наполняли в 20 мл флаконы с диаметром горловины 20 мм и частично закупоривали. Наполненные и частично закупоренные флаконы ставили в лоток и лоток загружали в лиофилизатор. Лиофилизатор герметично закрывали и температуру полки охлаждали до -45 °С со скоростью 0,5 °С в минуту и выдерживали в течение 1,5 часов. Вакуумное давление было установлено на 150 мТорр, и лиофилизатор выдерживали в течение 1 часа. Температуру полки затем нагревали до 25 °С со скоростью 0,5 °С в минуту и выдерживали в течение 16,7 часов. Температуру полки затем нагревали до 40 °С со скоростью 0,2 °С в минуту и выдерживали в течение 6,7 часов. После окончания вторичной сушки камеру снова заполняли азотом и температуру полки охлаждали до 5 °С. Образцы закупоривали внутри лиофилизатора, вакуум сбрасывали и образцы удаляли.

Пример препарата 3: Восстановление лиофилизированного (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфат и разбавление полученного в результате раствора

9,2 мл стерильной воды для инъекции вводили через пробку во флакон с лиофилизированным продуктом из Примера препарата 2, приведенного выше, для восстановления лекарственного продукта до водного раствора с целевым объемом 10 мл. Флакон затем переворачивали для перемешивания, пока лиофилизированный продукт полностью не восстановится, что занимало менее одной минуты. рН восстановленного раствора составлял в пределах +/- 0,2 единицы рН перед лиофилизацией.

После восстановления раствор затем извлекали из флакона и разбавляли 0,9% масс./об. раствором натрия хлорида (нормальным физиологическим раствором) или 5% масс./об. раствором декстрозы, получая раствор (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата желаемой концентрации (например, до концентрации 25 мг/мл). Полученный в результате разбавленный раствор может затем использоваться для парентерального введения, такого как внутривенное введение и в частности для внутривенной инфузии.

Пример препарата 3А: Восстановление лиофилизированного PF-07304814, полученного из 5 мг/мл полисорбата 80 с объемом наполнения 10,9 мл

10,0 мл стерильной воды для инъекции вводили через пробку во флакон с лиофилизированным продуктом, из примера 2А, приведенного выше, для восстановления лекарственного продукта до целевого объема 10,9 мл. Флакон затем переворачивали для перемешивания, пока лиофилизированный продукт полностью не восстановится, что занимало примерно две-три минуты. рН восстановленного раствора составлял в пределах +/- 0,2 единицы рН перед лиофилизацией.

Пример препарата 4: Получение и лиофилизация раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл с калийным противоионом

Для того, чтобы исследовать целесообразность получения растворов с альтернативным противоионом, вспомогательные вещества с натрием были удалены или заменены из препарата раствора на вспомогательные вещества, которые не содержали противоион или содержали калий как противоион. В частности, лимонная кислота была замещена на натрия цитрата дигидрат, и калия гидроксид был замещен на NaOH. Полученная в результате композиция препарата составляла 100 мг/мл PF-07304814, рН = 4,0, 40 мМ цитратный буфер и приблизительное соотношение калия к PF-07304814 - примерно 1,3:1. Для дополнительного подтверждения, что такие растворы могли быть лиофилизированными без существенного разложения с получением лиофилизированного продукта, продолжалась разработка цикла лиофилизации. Характеристика получаемых в результате лиофилизированных продуктов демонстрирует приемлемый внешний вид и структуру.

Получение 80 мМ буфера лимонной кислоты с калийным противоионом

1,54 г безводной лимонной кислоты прибавляли в 100 мл мерную колбу. Приблизительно 50 мл очищенной воды добавляли к мерной колбе, с последующим добавлением 5,17 мл 50% масс./об. раствора калия гидроксида. Раствор разбавляли к целевому объему очищенной водой и переворачивали для перемешивания до однородности. Раствор вакуумированно фильтровали через фильтр PVDF 0,2 мкм.

Получение раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл с калийным противоионом 15,0 мл охлажденного 80 мМ буферного раствора лимонной кислоты добавляли в 50 мл мензурки с магнитной "блохой". Мензурку размещали на водяной бане с контролируемой температурой до 2-8 °С. Приблизительно 3,12 г PF-07304814 добавляли в мензурку с образованием раствора и перемешивали в течение примерно 25 минут. 9,0 мл охлажденной очищенной воды добавляли в мензурку и перемешивали в течение 5 минут. Раствор разбавляли до целевой массы 31,05 г очищенной водой и перемешивали с использованием мешалки до однородного состояния. Раствор фильтровали со шприцем через фильтр PVDF 0,2 мкм. Окончательная композиция препарата составляла примерно 30 мл раствора с рН 4,0 концентрацией примерно 100 мг/мл PF-07304814 и 40 мМ цитратного буфера (молярное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5:1). Данный препарат содержал калий как противоион, благодаря гидроксиду калия, который использовался для получения цитратного буфера.

Лиофилизация раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл с калийным противоионом 5 мл фильтрованного раствора 100 мг/мл PF-07304814 наполняли в 6 мл флаконы с диаметром горловины 20 мм и частично закупоривали. Наполненные и частично закупоренные флаконы ставили в лоток и лоток загружали в лиофилизатор. Лиофилизатор герметично закрывали и температуру полки охлаждали до -45 °С со скоростью 0,5 °С в минуту и выдерживали в течение 1 часа. Вакуумное давление было установлено на 150 мТорр, и лиофилизатор выдерживали в течение 1 часа. Температуру полки затем нагревали до 25 °С со скоростью 0,5 °С в минуту и выдерживали в течение 20 часов. После окончания вторичной сушки камеру снова заполняли азотом, и температуру полки охлаждали до 5 °С. Образцы закупоривали внутри лиофилизатора, вакуум сбрасывали, и образцы удаляли.

Характеристика лиофилизированного PF-07304814, полученного с калийным противоионом

После лиофилизации образец имел вид от коржа до порошка от белого до почти белого/желтого/коричневого цвета. Лиофилизированные образцы демонстрируют минимальные признаки обратной плавки, разрушения и усадки. Содержание воды в лиофилизированном порошке, как измерялось по Карлу Фишеру, составляло примерно 0,5% масс./масс. Хроматографическая чистота образцов, как измерено с использованием УЭЖХ, изменялась примерно на 0,1% между до и после лиофилизации. Один T_g наблюдали с использованием мДСК с температурой 108,9 °С. Лиофилизированные образцы, как было обнаружено, предпочтительно имели аморфную структуру, как

измерялось по PXRD, с одним широким пиком, который наблюдался при примерно $3,0^\circ 2\theta$ (смотрите фигуру 24).

Пример препарата 5: Получение и лиофилизация раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл с пиперазиновым противоионом

Для того, чтобы исследовать влияние противоиона PF-07304814 на химическую стабильность препарата, вспомогательные вещества с натрием были удалены или заменены на вспомогательные вещества, не содержащие противоион или пиперазин как противоион. В частности, лимонная кислота была замещена на натрия цитрата дигидрат, и пиперазин был замещен на NaOH. Полученная в результате композиция препарата составляла 100 мг/мл PF-07304814, pH = 4,0, 40 mM цитратный буфер (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5:1), и приблизительное соотношение пиперазина к PF-07304814 - приблизительно 0,6:1. Для дополнительного подтверждения, что такие растворы могли быть лиофилизированными без существенного разложения с получением лиофилизованного продукта, продолжалась разработка цикла лиофилизации. Лиофилизированные образцы затем закладывались на ускоренную стабильность и неожиданно наблюдалось существенное уменьшение разложения по сравнению с разложением Продукта 1.

Получение 160 mM буфера лимонной кислоты

3,07 г безводной лимонной кислоты и 4,03 г пиперазина добавляли в 100 мл мерную колбу. Раствор разбавляли до целевого объема очищенной водой и переворачивали для перемешивания до однородности. Раствор вакуумированно фильтровали через фильтр PVDF 0,2 мкм.

Получение раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл с пиперазиновым противоионом

25 мл охлажденной очищенной воды добавляли в 100 мл мензурку с магнитной "блехой" и перемешивали с использованием мешалки. Мензурку размещали на водяной бане с контролируемой температурой до 2 – 8 °C. Приблизительно 6,24 г PF-07304814 добавляли в мензурку с образованием суспензии и перемешивали в течение примерно 5 минут. 15 мл охлажденного 160 mM буферного раствора лимонной кислоты (содержащий пиперазин) добавляли в мензурку и перемешивали с использованием мешалки до однородного состояния. Раствор разбавляли до целевого объема 60 мл очищенной водой и перемешивали с использованием мешалки до однородного состояния. Проверяли pH раствора. pH корректировали до целевого с использованием 1 N HCl. Раствор фильтровали со шприцем через фильтр PVDF 0,2 мкм. Конечная/Окончательная композиция препарата составляла примерно 60 мл раствора с pH 4,0 концентрацией

примерно 100 мг/мл PF-07304814 и 40 мМ цитратного буфера (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5:1). Данный раствор содержал пиперазин как противоион благодаря пиперазину, который использовался для получения цитратного буфера.

Лиофилизация раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл с пиперазиновым противоионом

5 мл фильтрованного раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл с пиперазиновым противоионом наполняли в 6 мл флаконы с диаметром горловины 20 мм и частично закупоривали. Наполненные и частично закупоренные флаконы ставили в лоток и лоток загружали в лиофилизатор (LyoStar). Лиофилизатор герметично закрывали и температуру полки охлаждали до $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту и выдерживали в течение 1 часа. Вакуумное давление было установлено на 150 мТорр, и лиофилизатор выдерживали в течение 1 часа. Температуру полки затем нагревали до $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту и выдерживали в течение 20 часов. Температуру полки затем нагревали до $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту и выдерживали в течение 10 часов. После окончания вторичной сушки камеру снова заполняли азотом, и температуру полки охлаждали до $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Образцы закупоривали внутри лиофилизатора, вакуум сбрасывали и образцы удаляли.

Характеристика лиофилизированного PF-07304814, полученного с пиперазиновым противоионом

После лиофилизации образец имел вид от коржа до порошка от белого до почти белого/желтого/коричневого цвета. Лиофилизированные образцы демонстрируют минимальные признаки обратной плавки, разрушения и усадки. Содержание воды в лиофилизированном порошке, как измерялось по Карлу Фишеру, составляло примерно $0,3\%$ масс./масс. Один T_g наблюдали с использованием мДСК с температурой $102,7\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Лиофилизированные образцы, как было обнаружено, предпочтительно имели аморфную структуру, как измерялось по PXRD, с одним широким пиком, наблюдавшимся при примерно $3,0^{\circ} 2\theta$ (смотрите фигуру 24).

Ускоренная стабильность лиофилизированного PF-07304814, полученного с пиперазиновым противоионом

Лиофилизированные препараты получали с разными противоионами, как описывается в Примере препарата 3 (натрий) и Примере препарата 5 (пиперазин), были заложены на ускоренную стабильность при $40\text{ }^{\circ}\text{C}/75\%$ относительной влажности (RH). По два флакона для каждой формы проверялись после 0 и 4 недель хранения. Первый флакон хранили как твердое вещество, второй флакон восстанавливали 4,6 мл воды. Данные этого исследования на ускоренную стабильность, приведенные в таблице относительно ускоренной стабильности, ниже. Эти данные показывают, что использование

пиперазинового противоиона уменьшает общее разложение и разложение до Продукта разложения 1 (соединения с отщепленным фосфатом, т.е. родительского соединения *N*-((1*S*)-1-[[((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-[[((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид) при ускоренной стабильности (через 4 недели) .

Таблица ускоренной стабильности: Лиофилизированные препараты PF-07304814, полученные с натриевым или пиперазиновым противоионом, были заложены на ускоренную стабильность. Результаты предоставляются на начало исследования ускоренной стабильности, чтобы продемонстрировать, что лиофилизированные продукты лекарственного средства сопоставимы с точки зрения содержания воды и pH после восстановления. Предоставляются изменения относительно общих примесей и Продукта разложения 1, как измерялось с использованием ВЭЖХ.

Противоион	pH – 0 недель	Содержание воды (% масс./масс.) – 0 недели	Изменение общих примесей (%) – 4 недели	Изменение продукта разложения 1 (%) – 4 недели
Натрий	3,8	0,2	0,9	0,7
Пиперазин	4,0	0,3	0,5	0,2

Пример препарата 6: Получение и лиофилизация раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл с полиэтиленгликолями (ПЭГи)

Для улучшения химической стабильности лиофилизированного препарата исследовалось получение препаратов со стабилизирующими вспомогательными веществами, в частности, с ПЭГ400 и ПЭГ3350. Композиции препаратов соответствовали Примеру препарата 1D, со 100 мг/мл PF-07304814, pH = 4,0, 40 mM цитратным буфером (молярное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5:1), и приблизительным соотношением натрия 4 - примерно 1,3:1. Для дополнительного подтверждения, что такие растворы могли быть лиофилизированными без существенного разложения с получением лиофилизированного продукта, продолжалась разработка цикла лиофилизации. Содержание ПЭГ400 или ПЭГ3350 в лиофилизированном порошке составляло примерно 8% масс./масс., когда было включено в него, и общее содержание ПЭГ в лиофилизированном порошке, когда оба были включены, составляло примерно 15% масс./масс. Лиофилизированные образцы затем закладывались на ускоренную стабильность, и неожиданно наблюдалось существенное снижение общего разложения и разложения до Продукта разложения 1.

Получение 160 mM цитратного буфера

11,77 г цитрата натрия дигидрата и 111 мл 1 н. NaOH добавляли в 250 мл мерную колбу. Раствор разбавляли до целевого объема очищенной водой и переворачивали для перемешивания до однородности. Раствор вакуумированно фильтровали через фильтр PVDF 0,2 мкм.

Получение объемного препарата

280 мл охлажденной очищенной воды добавляли в 500 мл мензурку с магнитной "блохой". Мензурку размещали на водяной бане с контролируемой температурой до 2-8 °С. Приблизительно 68,6 г PF-07304814 добавляли в мензурку с образованием суспензии и перемешивали в течение примерно 5 минут. 165 мл 160 мМ буферного раствора лимонной кислоты добавляли в мензурку и перемешивали с использованием мешалки до однородного состояния.

Получение раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл из 10 мг/мл ПЭГ400

52 мл объемного препарата добавляли в 100 мл мензурку с магнитной "блохой". Добавляли примерно 700 мг ПЭГ 400 по массе и перемешивали до однородности. Раствор разбавляли до общего объема 70 мл и фильтровали со шприцем через фильтр PVDF 0,2 мкм. Конечная композиция составляла примерно 70 мл раствора с pH 4,0, концентрацией примерно 100 мг/мл PF-07304814, 40 мМ цитратным буфером (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5:1) и 10 мг/мл ПЭГ400.

Получение раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл из 10 мг/мл ПЭГ3350

52 мл объемного препарата добавляли в 100 мл мензурку с магнитной "блохой". Добавляли примерно 700 мг ПЭГ 3350 по массе и перемешивали до однородности. Раствор разбавляли до общего объема 70 мл и фильтровали со шприцем через фильтр PVDF 0,2 мкм. Конечная композиция составляла примерно 70 мл раствора с pH 4,0, концентрацией примерно 100 мг/мл PF-07304814, 40 мМ цитратным буфером (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5:1), и 10 мг/мл ПЭГ3350.

Получение раствора PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл из 10 мг/мл ПЭГ400 и 10 мг/мл ПЭГ3350

52 мл объемного препарата добавляли в 100 мл мензурку с магнитной "блохой". Добавляли примерно 700 мг ПЭГ400 и примерно 700 мг ПЭГ3350 по массе и перемешивали до однородности. Раствор разбавляли до общего объема 70 мл и фильтровали со шприцем через фильтр PVDF 0,2 мкм. Окончательная/Конечная композиция составляла примерно 70 мл раствора с pH 4,0, концентрацией примерно 100 мг/мл PF-07304814, 40 мМ цитратным буфером (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5:1), 10 мг/мл ПЭГ400 и 10 мг/мл ПЭГ3350.

Лиофилизация растворов 100 мг/мл PF-07304814, полученных с ПЭГами

5 мл фильтрованного раствора 100 мг/мл PF-07304814 с ПЭГами загружали в 6 мл флаконы диаметром горловины 20 мм и частично закупоривали. Наполненные и частично закупоренные флаконы ставили в лоток и лоток загружали в лиофилизатор (LyoStar). Лيوфилизатор герметично закрывали и температуру полки охлаждали до $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту и выдерживали в течение 1 часа. Вакуумное давление было установлено на 150 мТорр и лиофилизатор выдерживали в течение 1 часа. Температуру полки затем нагревали до $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту и выдерживали в течение 20 часов. Температуру полки затем нагревали до $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ в минуту и выдерживали в течение 10 часов. После окончания вторичной сушки камеру снова заполняли азотом и температуру полки охлаждали до $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Образцы закупоривали внутри лиофилизатора, вакуум сбрасывали и образцы удаляли.

Характеристика лиофилизированных PF-07304814 концентрацией 100 мг/мл, полученных с ПЭГами

После лиофилизации все образцы имели вид от коржа до порошка от белого до почти белого/желтого/коричневого цвета. Содержание воды в лиофилизированном порошке, как измерялось по Карлу Фишеру, составляло примерно $0,2\%$ масс./масс. для всех трех образцов. Хроматографическая чистота всех трех образцов, как измерено с использованием УЭЖХ, изменялась примерно на $0,1\%$ между до и после лиофилизации. Один T_g наблюдали с использованием мДСК для всех трех образцов с 10 мг/мл ПЭГ400, 10 мг/мл ПЭГ3350 и 10 мг/мл ПЭГ400/10 мг/мл ПЭГ3350 и температурой $91,8$, $92,4$, и $76,3\text{ }^{\circ}\text{C}$, соответственно. Лيوфилизированные образцы, как было обнаружено, предпочтительно имели аморфную структуру, как измерялось по PXRD, с одним широким пиком, наблюдавшимся при примерно $3,0^{\circ} 2\theta$ (смотрите фигуру 26).

Ускоренная стабильность лиофилизированного PF-07304814, полученного с ПЭГами

Лيوфилизированные препараты, полученные с различными комбинациями ПЭГ400, ПЭГ3350 и PS80, как описано в Примере 3 (PS80) и Примере 7 (ПЭГи), были заложены на ускоренную стабильность при $40^{\circ}\text{C}/75\%$ относительной влажности (RH). По два флакона для каждой формы проверялись после 0 и 4 недель хранения. Первый флакон хранили как твердое вещество, второй флакон восстанавливали $4,6$ мл воды. Данные исследования данной ускоренной стабильности показаны в Таблице ускоренной стабильности с ПЭГ, ниже. Экспериментальные данные показывают, что включение ПЭГов снижает как общее разложение, так и разложение Продукта разложения 1 относительно стабильности (через 4 недели), с наибольшей выгодой от включения как ПЭГ400, так и ПЭГ3350. Лيوфилизированные препараты PF-07304814, получавшие с PS80, ПЭГ400 или ПЭГ3350, были заложены на ускоренную стабильность. Результаты предоставляются на начало

исследования ускоренной стабильности, чтобы продемонстрировать, что лиофилизированные продукты лекарственного средства сопоставимы с точки зрения pH и содержания воды. Изменение общих примесей и Продукта разложения 1, как измерялось с использованием ВЭЖХ, предоставляется как средние значения измерений из двух флаконов.

Таблица ускоренной стабильности по ПЭГ

Препарат	pH – 0 неделя	Содержание воды (% масс./масс.) – 0 неделя	Изменение общих примесей (%) – 4 недели	Изменение продукта разложения 1 (%) – 4 недели
5 мг/мл PS80	3,8	0,2	0,9	0,7
10 мг/мл ПЕГ400	3,9	0,2	0,7	0,5
10 мг/мл ПЕГ3350	3,9	0,2	0,8	0,6
10 мг/мл ПЕГ400 10 мг/мл ПЕГ3350	3,9	0,2	0,5	0,4

Пример препарата 7: Получение и лиофилизация раствора 100 мг/мл PF-07304814 с использованием PF-07304814, который чистили путем перекристаллизации диметилсульфоксидного (ДМСО) сольвата

Для того, чтобы исследовать влияние применения PF-07304814, полученного из альтернативной схемы очистки, как исходного материала, препараты лекарственных продуктов, показанных в Таблице исходные API, ниже, получали из PF-07304814 гидрата получали путем превращения PF-07304814 ДМСО-сольвата (PF-07304814 партия 1) в ДМСО-сольват, который является изоструктурным к гидрату (PF-07304814 Lot 2), или из непревращенного PF-07304814 ДМСО-сольвата (PF-07304814 партия 3). Композиции препаратов соответствовали Препарату лекарственного продукта 1E, со 100 мг/мл PF-07304814, pH = 4,0, 40 mM цитратным буфером (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5:1), приблизительным соотношением натрия приблизительно 1,3:1, и приблизительно 5 мг/мл полисорбата 80. Для того чтобы подтвердить, влияет ли присутствие ДМСО на способность получать лиофилизированный препарат, продолжалась разработка цикла лиофилизации. Содержание полисорбата 80 в лиофилизированном порошке составляло приблизительно 4% масс./масс.

Таблица выходные API: Описание партий PF-07304814, полученных способом очистки из ДМСО.

Партия PF-07304814	Форма PF-07304814 за PXRD	Остаточный ДМСО в PF-07304814 (% масс./масс.)
1	PF-07304814 Гидрат	0,1
2	PF-07304814 ДМСО- сольват изоструктурный к гидрату	6,0
3	PF-07304814 ДМСО-сольват	12,0

Получение 160 мМ цитратного буфера

Приблизительно 47,04 г натрия цитрата дигидрата, 44,4 мл 10 н. NaOH, и 700 мл очищенной воды добавляли в контейнер и перемешивали до тех пор, пока все ингредиенты не растворились. Раствор доводили до конечного объема 1,0 л очищенной водой, и раствор вакуумированно фильтровали через фильтр PVDF 0,2 мкм.

Получение раствора 100 мг/мл полисорбата.

Приблизительно 10 г полисорбата 80 добавляли в контейнер и доводили до конечного объема 100,0 мл по массе. Жидкость перемешивали до тех пор, пока не достигали гомогенизированного раствора.

Получение раствора 100 мг/мл PF-07304814 с использованием PF-07304814, который чистили путем перекристаллизации диметилсульфоксидного (ДМСО) сольвата

Препараты лекарственных продуктов получали аналогично способу Примера лекарственного продукта 1С. В частности, 8,5 мл охлажденной очищенной воды добавляли в 20 мл мензурки с магнитной "блохой" и перемешивали. Мензурку размещали на водяной бане с контролируемой температурой до 2-8°C. Для каждого получения, примерно 2,0 г PF-07304814 (корректировали по содержанию ДМСО), добавляли в мензурку и перемешивали, пока не достигали однородной увлажненной суспензии. Увлажненный PF-07304814 в каждой суспензии растворяли путем добавления примерно 5,0 мл охлажденного 160 мМ цитратного буфера, с последующим добавлением примерно 1,0 мл раствора 100 мг/мл полисорбата 80. Раствор перемешивали, разбавляли до целевого объема 20 мл очищенной водой, перемешивали и фильтровали через шприцевый фильтр PVDF 0,2 мкм. Окончательная композиция препарата составляла примерно 20 мл раствора с рН 4,0 концентрацией примерно 100 мг/мл PF-07304814, 40 мМ цитратного буфера (мольное соотношение PF-07304814 к цитрату - 4,5:1), и 5 мг/мл полисорбата 80.

Лиофилизация раствора 100 мг/мл PF-07304814 с использованием PF-07304814, который чистили путем перекристаллизации ДМСО-сольвата

5,45 мл фильтрованного раствора 100 мг/мл PF-07304814 лекарственного продукта, как описано выше, наполняли в 20 мл флаконы с диаметром горловины 20 мм и частично закупоривали. Наполненные и частично закупоренные флаконы ставили в лоток и лоток загружали в лиофилизатор (LyoStar). Лيوфилизатор герметично закрывали и температуру полки охлаждали до -45 °С со скоростью 0,5 °С в минуту и выдерживали в течение 90 минут. Вакуумное давление было установлено на 150 мТорр, и лиофилизатор выдерживали в течение 1 часа. Температуру полки затем нагревали до 25 °С со скоростью 0,5 °С в минуту и выдерживали в течение 1000 минут. Температуру полки затем нагревали до 40 °С со скоростью 0,2 °С в минуту и выдерживали в течение 400 минут. После окончания вторичной сушки камеру снова заполняли азотом и температуру полки охлаждали до 5 °С. Образцы закупоривали внутри лиофилизатора, вакуум сбрасывали, и образцы удаляли.

Характеристика лиофилизированного PF-07304814, получали с использованием PF-07304814, чистили путем перекристаллизации ДМСО-сольвата.

После лиофилизации образец имел вид от коржа до порошка от белого до почти белого/желтого/коричневого цвета. Лيوфилизированные образцы демонстрируют минимальные признаки обратной плавки, разрушения и усадки. Хроматографическая чистота образцов изменялась примерно на 0,1% между до и после лиофилизации анализа. Один T_g наблюдали в каждом образце с использованием мДСК, как показано в Таблице с T_g и уровнем ДМСО, ниже.

Таблица T_g и уровень ДМСО: T_g лиофилизированных продуктов лекарственных средств, полученных из PF-07304814, полученных по способу очистки из ДМСО.

Партия PF-07304814, которая использовалась в лиофилизации	Уровень ДМСО в PF-07304814 (% масс./масс.)	T_g лиофилизированного продукта
1	0,12%	103,9°C
2	6%	74,2°C
3	12%	68,8°C

Лيوфилизированные образцы, как было обнаружено, предпочтительно имели аморфную структуру, как измерялось по PXRD, с одним широким пиком, наблюдавшимся при примерно $3,0^\circ 2\theta$ (смотрите фигуру 27).

Пример 50: (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдиметилфосфат

РХ-ТС m/z 581,5 $[M+H]^+$. Время удержания: 2,36 минуты (Аналитические условия. Колонка: Waters Atlantis dC18, $4,6 \times 50$ мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); Градиент: от 5,0% до 95% В, линейный свыше 4,0 минуты, затем 95% В в течение 1,0 минуты; Скорость потока: 2 мл/минуту).

Пример 51: (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдипропан-2-илфосфат

Пример 52: (3*S*)-4-[(3*S*)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксобутилдиметилфосфат

Пример 53: 4-метокси-*N*-[(2*S*)-4-метил-1-((2*S*)-4-[(2-оксидо-4-фенил-1,3,2-диокса фосфинан-2-ил)окси]-3-оксо-1-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутан-2-ил}амино)-1-оксопентан-2-ил]-1*H*-индол-2-карбоксамид

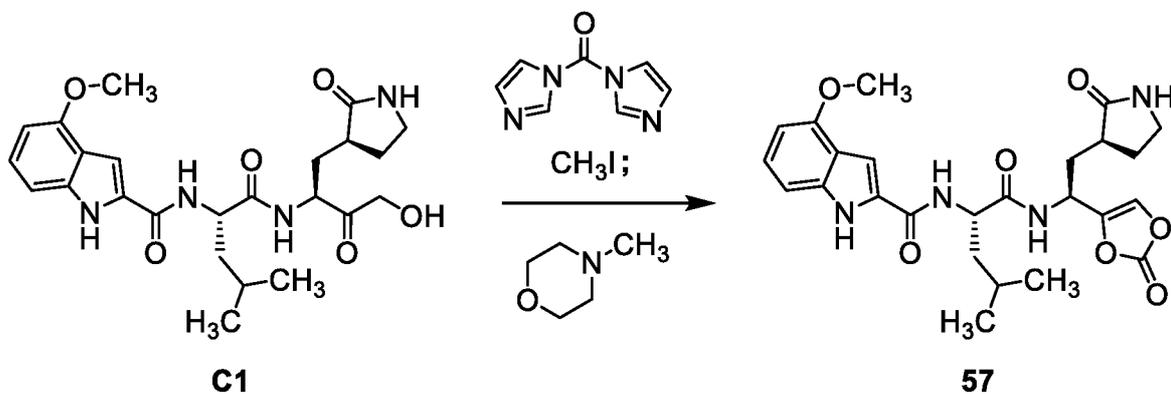
Пример 54: диэтил (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилфосфат

РХ-ТС m/z 609,5 $[M+H]^+$. Время удержания: 2,53 минуты (Аналитические условия. Колонка: Waters Atlantis dC18, $4,6 \times 50$ мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); Градиент: от 5,0% до 95% В, линейный свыше 4,0 минуты, затем 95% В в течение 1,0 минуты; Скорость потока: 2 мл/минуту).

Пример 55: метил (3*S*)-3-[(2*S*)-4-[(диметоксифосфорил)окси]-2-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилат.

Пример 56: (1*S*)-1-{(3*S*)-3-[(2*S*)-2-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-(2-оксо-1,3-диоксол-4-ил)этил]-2-оксопирролидин-1-ил}этилметилкарбонат

Пример 57: 4-метокси-*N*-[(2*S*)-4-метил-1-оксо-1-((1*S*)-1-(2-оксо-1,3-диоксол-4-ил)-2-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]этил}амино)пентан-2-ил]-1*H*-индол-2-карбоксамид (57)



Йодметан (10,5 мкл, 0,169 ммоль) добавляли к раствору 1,1'-карбонилдиимидазола (13,7 мг, 84,5 мкмоль) в 1,2-дихлорэтаноле (0,84 мл). Полученную в результате смесь перемешивали в течение 30 минут, после чего добавляли С1 (40 мг, 85 мкмоль) с последующим добавлением 4-метилморфолина (18,5 мкл, 0,168 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре, пока превращение в активированный сложный эфир не завершилось по ЖХ-МС анализу; затем нагревали при 80 °С в течение ночи. После объединения с аналогичной реакцией, осуществляемой с использованием С1 (20 мг, 42 мкмоль), реакционную смесь распределяли между этилацетатом и 10% водным раствором гидросульфата калия. Органический слой сушили над натрием сульфатом, фильтровали, концентрировали *in vacuo* и чистили с использованием ВЭЖХ с обращенной фазой (Колонка: Waters Sunfire C18, 19 × 100 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты Подвижная фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты; 1,0 минуты; Скорость потока: 25 мл/минуту), получая 4-метокси-*N*-[(2*S*)-4-метил-1-оксо-1-((1*S*)-1-(2-оксо-1,3-диоксол-4-ил)-2-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]этил)амино]пентан-2-ил]-1*H*-индол-2-карбоксамид (57). Объединенный выход: 3,5 мг, 7,0 мкмоль, 6%. РХ-ТС *m/z* 499,4 [M+H]⁺. Время удержания: 2,47 минуты (Аналитические условия. Колонка: Waters Atlantis dC18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); Градиент: от 5,0% до 95% В, линейный свыше 4,0 минуты, затем 95% В в течение 1,0 минуты; Скорость потока: 2 мл/минуту).

Пример 58: *N*-[(2*S*)-1-[[1*S*)-2-[(3*S*)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил]-1-(2-оксо-1,3-диоксол-4-ил)этил]амино]-4-метил-1-оксопентан-2-ил]-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид

Пример 59: метил (3*S*)-3-[(2*S*)-2-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-(2-оксо-1,3-диоксол-4-ил)этил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилат

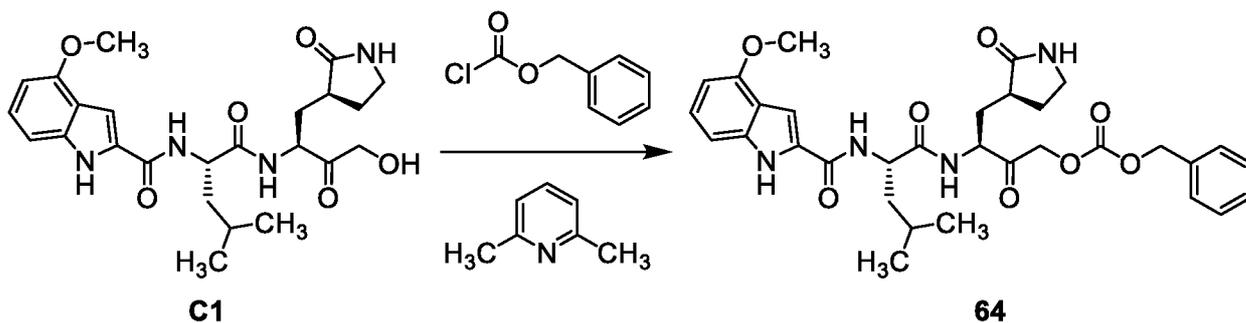
Пример 60: (1*S*)-1-[(3*S*)-3-[(2*S*)-4-гидрокси-2-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-ил]этилметилкарбонат

Пример 61: *N*-[(2*S*)-1-((2*S*)-1-[(3*S*)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил]-4-гидрокси-3-оксобутан-2-ил)амино]-4-метил-1-оксопентан-2-ил]-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид

Пример 62: метил (3*S*)-3-[(2*S*)-4-гидрокси-2-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилат

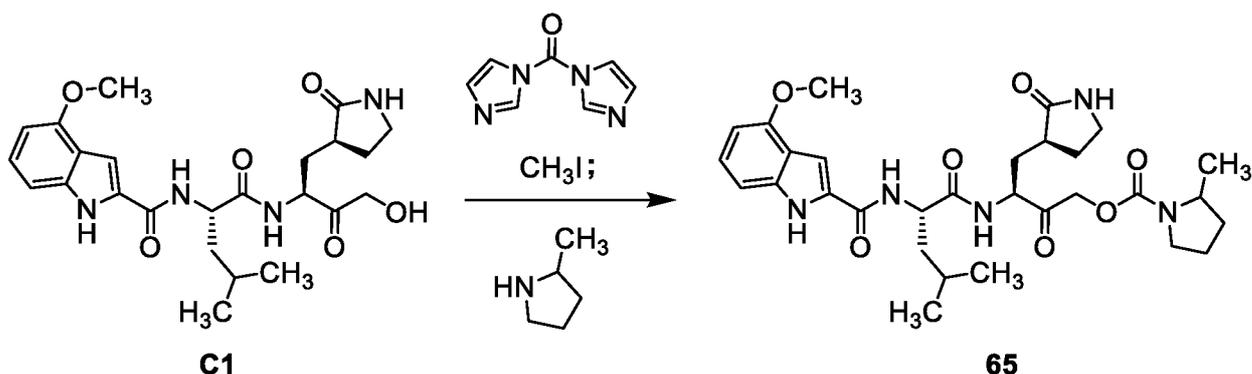
Пример 63: [(3*S*)-3-[(2*S*)-4-гидрокси-2-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-ил]метилметилкарбонат

Пример 64: Бензил (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил карбонат (**64**)



При 0 °С раствор **C1** (15 мг, 32 мкмоль) в тетрагидрофуране (0,32 мл) обрабатывали 2,6-диметилпиридином (4,4 мкл, 38 мкмоль), с последующим добавлением бензилхлорформиата (4,98 мкл, 34,9 мкмоль). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 28 часов, после чего добавляли дополнительный эквивалент бензилхлорформиата и повышали температуру до 40 °С. После того, как реакцию смесь перемешивали в течение ночи при 40 °С, ее нагревали до 60 °С в течение 2 часов, затем разбавляли дихлорметаном и промывали 10% водным раствором гидросульфата калия. Органический слой сушили над натрия сульфатом, фильтровали и концентрировали *in vacuo*; очистка остатка с использованием ВЭЖХ с обращенной фазой (Колонка: Waters Sunfire C18, 19 × 100 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты; Подвижная фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты Градиент: от 30% до 70% В свыше 8,5 минут, затем от 70% до 95% В свыше 0,5 минуты, затем 95% В в течение 1,0 минуты; Скорость потока: 25 мл/минуту) давала бензил (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилкарбонат (**64**). Выход: 11,6 мг, 19,1 мкмоль, 60%. РХ-ТС m/z 607,5 [M+H]⁺. Время удержания: 2,92 минуты (Аналитические условия. Колонка: Waters Atlantis dC18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); Градиент: от 5,0% до 95% В, линейный свыше 4,0 минуты, затем 95% В в течение 1,0 минуты; Скорость потока: 2 мл/минуту).

Пример 65: (3*S*)-3-({*N*-[(4-Метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил 2-метилпирролидин-1-карбоксилат (**65**)



Йодметан (2,63 мкл, 42,2 мкмоль) добавляли к раствору 1,1'-карбонилдиимидазола (3,43 мг, 21,2 мкмоль) в дихлорметане (0,21 мл). После того, как полученную в результате смесь перемешивали в течение 30 минут, добавляли **C1** (10 мг, 21 мкмоль). После дополнительного часа перемешивания, реакционную смесь обрабатывали 2-метилпирролидином (2,16 мкл, 21,2 мкмоль) и перемешивали в течение 2,5 часов, после чего концентрировали *in vacuo*. Очистка с использованием ВЭЖХ с обращенной фазой (Колонка: Waters Sunfire C18, 19 × 100 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты; Подвижная фаза В: ацетонитрила, содержащий 0,05% трифторо кислоты; Градиент: от 5% до 95% В свыше 8,54 минуты, затем 95% В в течение 1,46 минуты; Скорость потока: 25 мл/минуту) давала (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил 2-метилпирролидин-1-карбоксилат (**65**). Выход: 7,6 мг, 13 мкмоль, 61%. РХ-ТС *m/z* 584,6 [M+H]⁺. Время удержания: 2,70 минут (Аналитические условия. Колонка: Waters Atlantis dC18, 4,6 × 50 мм, 5 мкм; Подвижная фаза А: вода, содержащая 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); фаза В: ацетонитрил, содержащий 0,05% трифторуксусной кислоты (об./об.); Градиент: от 5,0% до 95% В, линейный свыше 4,0 минуты, затем 95% В в течение 1,0 минуты; Скорость потока: 2 мл/минуту).

Докинг-эксперименты

Способы:

Моделирование гомологии. Последовательность 3С-подобной протеиназы в SARS и COVID-19 может быть найдена в ссылках RCSB (например, 3IWM)¹ и NCBI (например, Reference Sequence: YP_009725301,1NCBI)².

Последовательность протеазы SARS 3С (PDB 3IWM):

SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDTVYCPRHVICTAEDMJNPNYEDL
LIRKSNHSFLVQAGNVQLRVI

GHSMQNCLLRLKVDTSNPKTPKYKFVRIQPGQTFSVLACYNGSPSGVYQCAMRPNHTIK
GSFLNGSCGSVGFNIDYDCV
SFCYMHHMELPTGVHAGTDLEGKFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITLNVLAWLYAAVIN
GDRWFLNRFTTTLNDFNLVA
MKYNYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCAALKELLQNGMNGRTILGSTILEDEFTP
FDVVRQCSGVTFQ

Новая последовательность уханьского коронавируса SARS-CoV-2 (такая же секция, 6Y84):

SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCGTTTLNGLWLDDVVYCPRHVICTSEDMJINPNYEDL
LIRKSNHNFLVQAGNVQLRVI
GHSMQNCVLKLVDTANPKTPKYKFVRIQPGQTFSVLACYNGSPSGVYQCAMRPNFTI
KGSFLNGSCGSVGFNIDYDCV
SFCYMHHMELPTGVHAGTDLEGNFYGPFVDRQTAQAAGTDTTITVNVLAWLYAAVIN
GDRWFLNRFTTTLNDFNLVA
MKYNYEPLTQDHVDILGPLSAQTGIAVLDMCASLKELLQNGMNGRTILGSALLEDEFTP
FDVVRQCSGVTFQ

Гомологическая модель была построена из кристаллической структуры 3С-подобной протеазы SARS в базе данных Pfizer с использованием PRIME³ Schrödinger. Минимизация гомологичной модели в комплексе с лигандами использовалась для устранения столкновений с лигандами, содержащими бензотиазолкетоны или бензильные боковые цепи, после исследования протеиновых конформаций других 3С-подобных кристаллических структур SARS с этими лигандными частями. Релаксация остатков в петле 185-190, His41 и Met49 приводила к трем по разным минимизированным версиям гомологической модели. Каталитический Cys был мутирован на Gly (C145G), чтобы облегчить докинг ядра AGDOCK и последующую оценку без столкновения с каталитическим Cys.

Докинг: соединения прикрепляются к гомологичным моделям с использованием докинга ядра⁴ из AGDOCK⁵. Докинг производится без образования ковалентной связи протеин-лиганд. Общее ядро, включающее боковую цепь лактама и реакционноспособный кетон, идентифицировали в лигандах и удерживали зафиксированным в ориентации кристаллической структуры как имитация ковалентного докинга (смотрите фигуру 2). Показателем аффинности для докинга ядра AGDOCK является показатель HT Score⁶.

Ссылки относительно способа:

1. <http://www.rcsb.org/structure/3IWM>
2. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/YP_009725301.1
3. Schrödinger Release 2019-1: Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
4. Daniel K. Gehlhaar, Gennady M. Verkhivker, Paul A. Rejto, Christopher J. Sherman, David R. Fogel, Lawrence J. Fogel, Stephan T. Freer, Molecular recognition of inhibitor AG-1343 по HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming, Chemistry & Biology, Volume 2, Issue 5, 1995, Pages 317-324.
5. Daniel K. Gehlhaar, Djamel Bouzida, и Paul A. Rejto, снисходительность Dimensionality in Ligand—Protein Structure Prediction: Covalent Inhibitors of Serine Proteases and Design of Site-Directed Combinatorial Libraries Rational Лекарственное средство Design. July 7, 1999, 292-311.
6. Tami J. Marrone, Brock A. Luty, Peter W. Röse, Discovering high-affinity ligands от computationally predicted structures и affinities из маленьких molecules bound to a target: A virtual screening approach. Perspectives in Drug Discovery and Design 20, 209-230 (2000).

Результаты:

Гомологическая модель Гомологичность последовательности между SARS-CoV и SARS-CoV-2 составляет 96,1%. Существует 12 из 306 остатков, которые являются разными (T35V, A46S, S65N, L86V, R88K, S94A, H134F, K180N, L202V, A267S, T285A и I286L, выделенные голубым цветом на фигуре 1), что означает 96,1% идентичности.

Лиганд, связанный с кристаллической структурой, используемой для построения гомологичной модели, представляет собой соединение В, *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил}метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид. Аминокислотный остаток, ближайший к соединению В, *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил}метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид, отличающийся между 3С-подобной протеазой SARS и моделью 3С-подобной протеазы SARS-CoV-2 представляет собой A46S, и минимальное расстояние от C_{alpha} до лиганда составляет 8,3 Å. Остальные остатки находятся от 11 Å до 38 Å от ближайшего атома в соединении В.

Таблица 1. Приблизительные расстояния от C_{alpha} атомов в SARS-CoV-2 до Соединения В, *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил}метил}пропил)амино]-карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид

SARS-CoV-2 Аминокислотные остатки	Расстояние до ближайшего атома в
-----------------------------------	----------------------------------

	Соединения В (Ангстремы)
T35V	~19
A46S	~8
S65N	~16
L86V	~11
R88K	~15
S94A	~24
H134F	~14
K180N	~13
L202V	~27
A267S	~38
T285A	~34
I286L	~31

Фигура 1 изображает отличия в остатках между SARS-CoV и SARS-CoV-2. Изменения остатков выделены голубым цветом на данной ленте гомологичной модели SARS-CoV-2. Расположение соединения В, *N*-((1*S*)-1-{(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид, является показанным пурпурным цветом. Приблизительное расстояние между С-альфа аминокислотным остатком SARS-CoV-2 и ближайшим атомом в соединении В, *N*-((1*S*)-1-{(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид, показано в Таблице 1, приведенной выше.

Результаты докинга:

Приблизительно 96% гомологичность SARS-CoV-2 3CL к SARS-CoV 3CL и сходство между лигандами позволяет сравнить RMSD между пептидным остовом лиганда xtal в SARS-CoV (смотрите фигуру 2) и прикрепленным лигандом в модели SARS-CoV-2. Лиганд, прикрепленный к ядру RMSD к пептидному скелету, не отличался более чем на 0,32Å (в среднем 0,28Å). Смотрите фигуру 2 для примера. В случае соединения В, *N*-((1*S*)-1-{(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид, RMSD для всей молекулы составлял 0,37Å.

Фигура 2. Сайт связывания гомологичной модели SARS-CoV-2 3CL с лигандом, прикрепленным к ядру (соединение В, *N*-((1*S*)-1-[[[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-[[[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил]пропил)амино]карбонил]-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид), представленный (пурпурным – углерод, красным – кислород, голубым – азот). Часть кристаллической структуры соединения В, *N*-((1*S*)-1-[[[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-[[[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил]пропил)амино]карбонил]-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид; (пептидный скелет, лактамная боковая цепь и атакуемый кетон) использовали для измерения RMSD разных лигандов до такого скелета (серым - углерод, толстая палочка). Ядро, используемое для докинга ядра, показано как 11 тяжелых атомов, представленное шариками (светло-голубым - углероды) и во встроенной химической структуре. Расстояния представлены в ангстремах.

Результат(ы) докинга в таблице 2 ниже указывают на то, что соединение(ы) имеют предполагаемую аффинность (ΔG -связи, ккал/моль), которая, как правило, сопоставима с распознаванием и связыванием цели. Эффективное содержание действующего вещества может отличаться от сроков связывания ΔG в зависимости от нескольких факторов, таких как поглощение клетками, вытекание, конкуренция кофактора или конкуренция субстрата.

Таблица 2:

Соединение	Прогнозируемый $\Delta G_{\text{связи}}$ (ккал/моль)	Химическое название прикрепленных соединений
В	-9,5	<i>N</i> -((1 <i>S</i>)-1-[[[(1 <i>S</i>)-3-гидрокси-2-оксо-1-[[[(3 <i>S</i>)-2-оксопирролидин-3-ил]метил]пропил)амино]карбонил]-3-метилбутил)-4-метокси-1 <i>H</i> -индол-2-карбоксамид

Соединения, описанные выше, проанализированы с помощью биохимического анализа FRET и с использованием вирусологических анализов *in vitro* с использованием способов культивирования клеток.

Защита от инфекции SARS: нейтральная красная конечная точка

Способность соединений защищать клетки от инфекции коронавируса SARS измеряется с помощью анализа жизнеспособности клеток, аналогичного описанному в Bogenfreund, E.,

и Puerner, J. 1985. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption Toxicology Letters. 24:119-124, используя нейтральный красный цвет как конечную точку. Коротко говоря, среда, содержащая соответствующие концентрации соединения или только среда, добавляется к клеткам Vero. Клетки являются инфицированными вирусом, ассоциированным с SARS, или имитационно инфицированы только средой. Через один - семь дней среду удаляют и в исследуемые планшеты добавляют среду, содержащую нейтральный красный. После инкубирования при 37 °С в течение двух часов клетки дважды промывают PBS и добавляют 50% EtOH, 1% раствор уксусной кислоты. Клетки встряхивают в течение 1-2 минут и инкубируют при 37 °С в течение 5-10 минут. Количество нейтрального красного количественно определяется спектрофотометрически при 540 нм. Данные выражаются как процент нейтрального красного в лунках с клетками, обработанными соединениями, по сравнению с нейтральным красным в лунках с неинфицированными клетками, не содержащими соединений. Пятидесятипроцентная эффективная концентрация (EC₅₀) рассчитывается как концентрация соединения, увеличивающая процент образования нейтрального красного в инфицированных клетках, обработанных соединением, до 50% от производимого неинфицированными клетками без соединений. 50% цитотоксическая концентрация (CC₅₀) рассчитывается как концентрация соединения, уменьшающая процент нейтрального красного, образующегося в неинфицированных, обработанных соединениями клетках до 50% от содержания, производимого в неинфицированных клетках без соединений. Терапевтический индекс рассчитывается путем деления цитотоксичности (CC₅₀) на противовирусную активность (EC₅₀).

Защита от инфекции SARS-CoV-2: конечная точка Glo

Способность соединений защищать клетки от инфекции коронавирусом SARS-CoV-2 также может измеряться анализом жизнеспособности клеток с использованием люциферазы для измерения внутриклеточной АТФ в качестве конечной точки. Коротко говоря, среда, содержащая соответствующие концентрации соединения или только среда, добавляется к клеткам Vero. Клетки являются инфицированными вирусом SARS-CoV-2 или имитационно инфицированы только средой. Через один – семь дней среду удаляют и измеряют количество внутриклеточного АТФ в соответствии с Promega Technical Bulletin No. 288: CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI). Реагент CellTiter-Glo® добавляют к исследуемым планшетам и после инкубирования при 37 °С в течение 1,25 часов количественно определяют количество сигнала с использованием

люминометра при 490 нм. Данные выражаются как процент люминесцентного сигнала из лунок с клетками, обработанными соединениями, по сравнению с люминесцентным сигналом из лунок с неинфицированными клетками, не обработанными соединениями. Пятидесятипроцентная эффективная концентрация (EC_{50}) рассчитывается как концентрация соединения, увеличивающая процент люминесцентного сигнала в инфицированных клетках, обработанных соединением, до 50% от люминесцентного сигнала в неинфицированных клетках, необработанных соединением. 50% цитотоксическая концентрация (CC_{50}) рассчитывается как концентрация соединения, уменьшающая процент люминесцентного сигнала в неинфицированных клетках, обработанных соединением, до 50% от люминесцентного сигнала в неинфицированных клетках, необработанных соединением. Терапевтический индекс рассчитывается делением цитотоксичности (CC_{50}) на противовирусную активность (EC_{50}).

Цитотоксичность

Способность соединений вызывать цитотоксичность в клетках измеряется посредством анализа жизнеспособности клеток, аналогичного описанному в Weislow, O.S., Kiser, R., Fine, D.L., Bader, J., Shoemaker, R.H., and Boyd, M. R, 1989. New Soluble-Formazan Assay for HIV-1 Cytopathic Effects: Application to High-Flux Screening of Synthetic and Natural Products for AIDS-Antiviral Activity. *Journal of the National Cancer Institute* 81(08): 577-586, используя формазан как конечную точку. Коротко говоря, клетки Vero повторно суспендируют в среде, содержащей соответствующие концентрации соединения или только среду. Через один - семь дней ХТТ и PMS добавляют к исследуемым планшетам и после инкубирования при 37 °С в течение двух часов количество образованного формазана количественно определяют спектрофотометрически при 540 нм. Данные выражаются как процент формазана, который образуется в клетках, обработанных соединениями, по сравнению с формазаном, который образуется в лунках с клетками, необработанными соединениями. 50% цитотоксическая концентрация (CC_{50}) рассчитывается как концентрация соединения, уменьшающая процент формазана, образующегося в неинфицированных клетках, обработанных соединением, до 50% от того, что образуется в неинфицированных клетках, необработанных соединениями.

Защита от коронавирусной инфекции SARS-CoV-2

Способность соединений защищать клетки от инфекции SARS-CoV-2 измеряется с помощью анализа жизнеспособности клеток, аналогичного описанному в Weislow, O.S.,

Kiser, R., Fine, D.L., Bader, J., Shoemaker, R.H., и Boyd, M.R., 1989. New Soluble-Formazan Assay for HIV-1 Cytopathic Effects: Application to High-Flux Screening of Synthetic и Natural Products for AIDS-Antiviral Activity. Journal of the National Cancer Institute 81(08): 577-586, используя формазан как конечную точку. Коротко говоря, среду, содержащую соответствующие концентрации соединения, или только среду добавляют к клеткам MRC-5. Клетки являются инфицированными человеческим коронавирусом SARS-CoV-2 или имитационно инфицированы только средой. Через один - семь дней ХТИ и PMS добавляют к исследуемым планшетам, и после инкубирования при 37 °C в течение двух часов количество образованного формазана количественно определяют спектрофотометрически при 540 нм. Данные выражаются как процент формазана в лунках с клетками, обработанными соединениями, по сравнению с формазаном в клетках с неинфицированными клетками, не обработанными соединениями. Пятидесятипроцентная эффективная концентрация (EC₅₀) рассчитывается как концентрация соединения, увеличивающая процент образования формазана в инфицированных клетках, обработанных соединением, до 50% от образующегося неинфицированными клетками, необработанными соединениями. 50% цитотоксическая концентрация (CC₅₀) рассчитывается как концентрация соединения, уменьшающая процент формазана, образующегося в неинфицированных клетках, обработанных соединением, до 50% от того, что образуется в неинфицированных клетках, необработанных соединениями. Терапевтический индекс рассчитывается делением цитотоксичности (CC₅₀) на противовирусную активность (EC₅₀).

Исследование и анализ FRET протеазы относительно 3C коронавируса SARS-CoV-2

Протеолитическая активность 3CL-протеазы коронавируса SARS-CoV-2 измеряется с использованием непрерывного анализа резонансного переноса энергии флуоресценции. Анализ FRET SARS-CoV-2 3CL^{pro} измеряет катализируемое протеазой расщепление TAMRA-SITSAVLQSGFRKMK-(DABCYL)-OH до TAMRA-SITSAVLQ и SGFRKMK(DABCYL)-OH. Флуоресценцию расщепленного пептида TAMRA (возбуд. 558 нм / излуч. 581 нм) измеряли с использованием планшетного ридера флуоресценции TECAN SAFIRE в течение 10 минут. Типичные реакционные растворы содержали 20 мМ HEPES (pH 7,0), 1 мМ ЭДТО, 4,0 мкМ субстрата FRET, 4% ДМСО и 0,005% Tween-20. Исследования инициировали добавлением 25 нМ SARS 3CL^{pro} (нуклеотидная последовательность 9985-10902 штамма Urbani полной последовательности генома коронавируса SARS (NCBI номер доступа AY278741)). Процент ингибирования

определяли в двух повторениях с уровнем ингибитора 0,001 мМ. Данные анализировали с помощью программы нелинейного регрессионного анализа Kalidagraph с использованием уравнения:

$$FU = \text{offset} + (\text{limit})(1 - e^{-(k_{\text{obs}})t})$$

где «offset» равно сигналу флуоресценции нерасщепленного пептидного субстрата, и «limit» равно флуоресценции полностью расщепленного пептидного субстрата. «kobs» представляет собой константу скорости первого порядка для данной реакции, а при отсутствии какого-либо ингибитора представляет собой использование субстрата. В реакции запуска фермента, содержащей необратимые ингибиторы, и где рассчитанный «limit» составляет менее 20% от теоретического максимального ограничения, рассчитанный kobs представляет скорость инактивации 3С-протеазы коронавируса. Наклон (kobs/I) графика kobs по отношению к [I] представляет собой степень авидности ингибитора для фермента. Для очень быстрых необратимых ингибиторов kobs/I рассчитывается на основании наблюдений только на одном или двух [I], а не как наклон.

Альтернативно, соединения могут быть оценены с использованием анализа FRET SARS CoV-2, ниже.

Исследование и анализ FRET протеазы SARS CoV-2

Протеолитическая активность основной протеазы, 3CL^{pro}, SARS-CoV-2, контролировали с использованием непрерывного анализа резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Анализ SARS-CoV-2 3CL^{pro} измеряет активность полнодлинной 3CL-протеазы SARS-CoV-2 для расщепления синтетического флуорогенного субстратного пептида с последующей последовательностью Dabcyl-KTSAVLQ-SGFRKME-Edans, смоделированной на основе консенсусного пептида. Флуоресценцию расщепленного пептида Edans (возбуждение 340 нм/излучение 490 нм) измеряют с использованием протокола интенсивности флуоресценции на ридере Flexstation (Molecular Devices). Флуоресцентный сигнал снижается в присутствии *N*-((1*S*)-1-[[[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-[[[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил]пропил]амино]карбонил]-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид, мощного ингибитора SARS-CoV-2 3CL^{pro}. Реакционный буфер для анализа содержал 20 мМ Tris-HCl (pH 7,3), 100 нМ NaCl, 1 мМ ЭДТО, 5 мМ ТСЕР и 25 мкМ пептидного субстрата. Ферментные реакции инициировали добавлением 15 нМ 3CL протеазы SARS-CoV-2 и давали состояться в течение 60 минут при 23 °С. Процент ингибирования или активности рассчитывали на основе контрольных лунок, не

содержащих соединения (0% ингибирования/100% активности), и контрольного соединения (100% ингибирования/0% активности). Значения IC₅₀ были сгенерированы с использованием четырехпараметрической логистической модели подгонки ABASE с использованием программного обеспечения (IDBS). Значения K_i соответствовали уравнению Моррисона с параметром концентрации фермента, фиксированным на 15 нМ, параметром K_m, фиксированным на 14 мкМ, и параметром концентрации субстрата, фиксированным на уровне 25 мкМ, с использованием программного обеспечения Activity Base (IDBS).

Соединение по Примеру 49, (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат, когда оценивали в приведенном выше анализе, имели IC₅₀ 350 нМ (95% доверительный интервал от 330 нМ до 380 нМ с n=7) и K_i 137 нМ (95% доверительный интервал 137 нМ с n = 7).

Исходное соединение, *N*-((1*S*)-1-[[[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил]-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид, которая образуется *in vivo* после введения (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат, было оценено в различных клеточных анализах и было обнаружено, что он демонстрирует противовирусную активность против SARS-CoV-2. Клеточные анализы, которые используют клетки A549-ACE2 (легкие человека) и USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 и NYU Langone, первичные эпителиальные клетки дыхательных путей человека (HAE) (легкие человека) и Вашингтонский SARS-CoV-2 в NYU Langone и HeLa-ACE2 (цервикальные клетки человека) и USA-WA1/2020 SARS-CoV-2 в Scripps.

Противовирусная активность *N*-((1*S*)-1-[[[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил]-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид и ремдесивира оценивали по SARS-CoV-2 в клетках A549-ACE2 с использованием анализа визуализации высокого содержания, что количественно оценивает вирусный N протеин с mAb. Цитотоксичность обоих соединений оценивали в неинфицированных клетках путем контроля клеточной жизнеспособности на основе количественного определения АТФ. В клетках A549-ACE2, *N*-((1*S*)-1-[[[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил]-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид ингибировал вирусную репликацию SARS-CoV-2 со значением EC₅₀/EC₉₀ 0,221/0,734 мкМ через 24 часа после инфицирования и 0,158/0,439 мкМ через 48 часов. *N*-((1*S*)-1-[[[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-

ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид демонстрировал значение $CC_{50} > 10$ мкМ в обеих точках времени, получая в результате ПИ > 46 через 24 часа и > 65 через 48 часов после инфицирования вирусом. Для сравнения, ремдесивир ингибировал вирусную репликацию SARS-CoV-2 со значением EC_{50}/EC_{90} 0,442/1,19 мкМ через 24 часа после инфицирования и 0,238/0,592 мкМ через 48 часов.

Противовирусная активность исходного соединения, *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид в отношении SARS-CoV-2 оценивали в поляризованных клетках HAE, где кинетику образования вируса при отсутствии или в присутствии различных концентраций лекарственных средств оценивали путем количественного определения инфекционных вирионов в культуральных средах, собранных с интервалом от 12 часов до 3 дней после инфицирования, используя анализ вирусных бляшек в клетках Vero. Благодаря использованному подходу значения EC_{50}/EC_{90} не были получены, однако результаты имеют схожие тенденции, что и для противовирусной эффективности в анализе A549-ACE2, что подтверждает потенциальную активность *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид в физиологически релевантном типе клеток. При всех испытанных концентрациях исходное соединение *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид эффективно ингибировал продуцирование вируса SARS-CoV-2 в разные моменты времени с наиболее значительным снижением через 48 часов после инфицирования. При 0,025 мкМ, 0,5 мкМ и 10 мкМ *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид приводил в результате к приблизительно 22,5, 31,3 и 2590-кратному снижению репликации вириона, тогда как ремдесивир приводил в результате к 5,09, 93,1 и 2590-кратному снижению репликации вириона во время исследования в тех же концентрациях.

Эффективность исходного соединения *in vitro* *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид, самостоятельно и в комбинации с ремдесивиром, оценивали относительно SARS-CoV-2 в клетках HeLa-ACE2 рака шейки матки человека. Клетки HeLa-ACE2 инфицировали SARS-CoV-2 и инкубировали с *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-

метокси-1H-индол-2-карбоксамидом, содержащим среды. Через 24 часа после инфицирования и обработки лекарственным средством клетки фиксировали, и вирусные протеины детектировали с использованием реконвалесцентных поликлональных сывороток человека от пациентов COVID-19 и вторичного mAb, и количественно определяли с использованием визуализации высокого содержания. Результаты показали, что

N-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)метил)пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид самостоятельно ингибировал репликацию SARS-CoV-2 со средним значением EC₅₀ 0,144 мкМ и EC₉₀ 0,398 мкМ, что соответствует такому же эффекту, что и в клетках A549-ACE2. Цитотоксичности клеток-хозяев не наблюдалось.

Исходное соединение, *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)метил)пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид, оценивали относительно 3CL^{pro} из ряда других коронавирусов, представляющих альфа-, бета- и гамма-группы коронавирусов, с использованием анализов резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) относительно биохимических активностей протеазы.

Анализ является аналогичным анализу FRET, приведенному выше, и могут использовать полнотелесные последовательности протеаз из указанных вирусов. Исходное соединение, *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-

ил)метил)пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид, демонстрировало мощную ингибирующую активность по всем исследуемым коронавирусам 3CL^{pro}, включая членов альфа-коронавирусов (NL63-CoV, PEDV-CoV-2, FIPV-CoV-2), бета-коронавирусов (HKU4-CoV, HKU5-CoV, HKU9-CoV, MHV-CoV, OC43-CoV, HKU1-CoV) и гамма-коронавируса (IBV-CoV-2), со значениями K_i и исследуемыми концентрациями ферментов, приведенными в Таблице 3. Данная ингибиторная активность ограничивается 3CL-протеазами коронавируса, поскольку *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-

ил)метил)пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид был неактивен против группы протеаз человека и протеазы ВИЧ. *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)метил)пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид обнаружил заметную активность против катепсина В человека, но с 1000-кратным допуском по сравнению с 3CL^{pro} (Таблица 4). Эти данные вместе подтверждают *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)метил)пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид, как ингибитор 3CL-протеазы пан-коронавируса.

Таблица 3. Активность исходного соединения, *N*-((1*S*)-1-{[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил}метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид, относительно 3CL^{pro} коронавируса

Вирус	K _i (нМ)	[E] _T (нМ)
Alpha-CoV		
NL63-CoV	0,8 ± 0,5	170 ± 4
229E-CoV-2	1,5 ± 0,8	118 ± 3
PEDV-CoV-2	0,3 ± 0,1	40 ± 1
FIPV-CoV-2	0,1 ± 0,1	37 ± 1
Бета-CoV		
HKU1-CoV	0,9 ± 0,2	57 ± 1
HKU4-CoV	0,03 ± 0,08	60 ± 1
HKU5-CoV	0,03 ± 0,1	75 ± 1
HKU9-CoV	0,8 ± 0,6	264 ± 5
MHV-CoV	1,2 ± 0,9	75 ± 4
OC43-CoV	0,5 ± 0,1	52 ± 1
Гамма-CoV		
IBV-CoV-2	4,0 ± 0,4	30 ± 1

Таблица 4: Активность исходного соединения, *N*-((1*S*)-1-{[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил}метил}пропил)амино] карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид, относительно протеаз человека и ВИЧ-протеаз

Протеаза	IC ₅₀ мкМ
SAR-Cov2 3CL ^{pro}	0,00692
Катепсин В человека	6,12
Эластаза человека	>33,3
Химотрипсин человека	>100
Тромбин человека	>100
Каспаза человека 2	>33,3
Катепсин D человека	>11,1
ВИЧ-1 протеаза	>11,1

Данные связывания с термическим смещением исходного соединения *N*-((1*S*)-1-{[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил}метил}}пропил)амино]карбонил}-3-

метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид из SARS-CoV-2 3CL^{pro} указывает на плотное и специфическое связывание SARS-CoV-2 3CL *in vitro*.

Учитывая способность *N*-((1*S*)-1-{((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид мощно ингибировать SARS-CoV-2 3CL^{pro} со значением K_i 0,27 нМ, были проведены дальнейшие исследования. Исследование рентгеновским способом сокристаллической структуры *N*-((1*S*)-1-{((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид и SARS-CoV-2 3CL^{pro} согласуется со связыванием соединения с ферментом 3CL посредством ковалентного и обратимого взаимодействия на каталитическом цистеиновом остатке активного сайта, таким образом, ингибируя активность 3CL^{pro}. Анализ термического сдвига также использовался для оценки прямого связывания между *N*-((1*S*)-1-{((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамидом и его целевым протеином, SARS-CoV-2 3CL^{pro}. Температура плавления SARS-CoV-2 3CL^{pro} была смещена на 14,6 °C после связывания *N*-((1*S*)-1-{((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид, от 55,9±0,11 °C ($n = 16$) до 70,5±0,12 °C ($n = 8$). Температуру плавления (T_m) рассчитывали как средний логарифм фазы перехода от нативного денатурированного протеина с использованием модели Больцмана с использованием программного обеспечения Protein Thermal Shift v1.3. Указанные данные подтверждают плотное и специфическое связывание исходного соединения *N*-((1*S*)-1-{((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид с SARS-CoV-2 3CL^{pro} (смотрите фигуру 7) и, таким образом, предоставляют дополнительные доказательства молекулярного механизма данного исходного соединения как ингибитора SARS-CoV-2 3CL^{pro}.

Клеточная противовирусная активность SARS-CoV-2 ингибируется (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-дигидрофосфатом и его исходным соединением *N*-((1*S*)-1-{((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамидом *in vitro*.

Противовирусная активность (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата и его исходного соединения, *N*-((1*S*)-1-{((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-

ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид, относительно SARS-CoV-2 в клеточной культуре дополнительно оценивали посредством анализа цитопатического эффекта (CPE) с использованием или клеток VeroE6, обогащенных относительно ACE2 рецептора (VeroE6-enACE2), или клеток VeroE6, которые конститутивно экспрессируют EGFP (VeroE6-EGFP). Данные клеточные линии были инфицированы Вашингтонским штаммом 1 SARS-CoV-2 1 или штаммом Бета-Cov GNB-03021/2020, соответственно, имеющими идентичные аминокислотные последовательности 3CL^{pro}. *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид защищал клетки от вирусного CPE при 39,7 мкМ и 88,9 мкМ соответственно (EC₅₀, Таблица 6). Однако клетки Vero экспрессируют высокие уровни эффлюксного транспортера P-gp (также известного как MDR1 или ABCB1), из которых *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид является известным субстратом. Поэтому анализы повторяли в присутствии ингибитора вытекания P-gp, CP-100356, 4-(3,4-дигидро-6,7-диметокси-2(1H)-изохинолинил)-*N*-2[2-(3,4-диметоксифенил)этил]-6,7-диметокси-2-хиназолинамин. *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид демонстрировал от 117 до 173-кратное увеличение активности в присутствии 2 мкМ ингибитора P-gp, со значением EC₅₀ 0,23 мкМ в клетках VeroE6-enACE2 и 0,76 мкМ в клетках VeroE6-EGFP (Таблица 6). Ингибитор P-gp самостоятельно не обладал противовирусной или цитотоксической активностью при данных концентрациях и не вызывал цитотоксичности в присутствии ингибитора протеазы. Существовал резкий ответ на увеличение доз исходного соединения, *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид, с ~2-3 кратной разницей между EC₅₀ и EC₉₀ в обоих типах клеток (EC₉₀ = 0,48 мкМ в клетках VeroE6 -enACE2 и EC₉₀= 1,6 мкМ в клетках VeroE6-EGFP в присутствии ингибитора P-gp). Когда легочные клеточные линии исследовали против противовирусной активности в присутствии и при отсутствии ингибитора P-gp (A549-ACE2 и MRC5) существенной разницы в противовирусной активности не наблюдалось (Таблица 6). Кроме того, значения EC₅₀ и EC₉₀ в обеих клеточных линиях veroE6 с 2 мкМ P-gp являются подобными тем, которые получали с использованием различных способов анализа с разными типами клеток, включая путем обнаружения вирусного протеина в

клетках A549-ACE2, а также с использованием анализов на бляшки в поляризованных эпителиальных клетках, в которых экспрессия P_g-p ниже.

Таблица 5: *In vitro* противирусная активность, цитотоксичность и терапевтический индекс (ТИ) (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата

Клетки	Вирус	Ингибитор вытекания	EC ₅₀ мкМ Среднее геометрическое (95% CI)	CC ₅₀ мкМ Среднее геометрическое (95% CI)	ТИ CC ₅₀ / EC ₅₀
Vero E6- enACE2	SARS2 Вашингтонский 1	0	86,7 (71, 106) n = 12	>100 (ND) n = 6	>1,0
		0,5 мкМ	26,6 (7,6, 93,6) n = 8	>100 (ND) n = 6	>4,82
		2 мкМ	3,8 (1,6, 8,8) n = 7	>100 (ND) n = 6	>22,5
Vero E6- EGFP	SARS2 БераCov GHB-03021/2020	0	>50 (ND) n = 4	>50 (ND) n = 4	ND
		0,5 мкМ	27 (6,3, 116) n = 4	>50 (ND) n = 4	>1,9
		2 мкМ	0,83 (0,50, 1,37) n = 4	>50 (ND) n = 4	>61,2
MRC-5	HCoV-229E	0	0,074 (0,013, 0,417) n = 3	>100 n = 3	>1500
		0,5 мкМ	0,058 (0,023, 0,15) n = 3	>100 n = 3	>1800

Таблица 6: *In vitro* противовирусной активности, цитотоксичность и терапевтический индекс (ТИ) исходного соединения, *N*-((1*S*)-1-{[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин]-3-ил]метил} пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамида

Клетки	Вирус	Ингибитор вытекания	EC50 мкМ	Ингибитор вытекания	EC50 мкМ
Vero E6-enACE2	SARS2 Вашингтонский 1	0	38,7 (29,8, 52,9) n = 12	>100 (ND) n = 9	>2,5
		0,5 мкМ	3,0 (1,13, 7,67) n = 7	>100 (ND) n = 9	>42
		2 мкМ	0,23 (0,13, 0,41) n = 6	>100 (ND) n = 6	>436
Vero E6-EGFP	SARS2 БетаCov GHB-03021/2020	0	88,9 (76,8, 103) n = 10	>100 (ND) n = 8	>2,6
		0,5 мкМ	10,0 (3,93, 25,7) n = 10	>100 (ND) n = 1	>20,6
		2 мкМ	0,76 (0,45, 1,14) n = 4	>50 (ND) n = 4	>69
MRC-5	HCoV-229E	0	0,069 (0,056, 0,085) n = 7	>100 (ND) n = 5	>510
		0,5 мкМ	0,080 (0,017, 0,37) n = 3	>100 (ND) n = 3	>770

Эффективность исходного соединения, *N*-((1*S*)-1-{[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин]-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамида в комбинации с либо азитромицином, либо ремдесивиром для

противовирусной активности в отношении SARS-CoV-2 в клетках VeroE6. Коротко говоря, VeroE6 клетки, обогащенные относительно экспрессии hACE2, были инокулированы по партиям из SARS-CoV-2 (USA_WA1/2020) с кратностью инфекции 0,002 в лаборатории BSL-3. Клетки, инокулированные вирусом, затем добавляют в планшеты с готовыми соединениями для анализа с плотностью 4000 клеток/лунку. После 3-дневного инкубирования, когда индуцированный вирусом цитопатический эффект составляет 95% в необработанных, инфицированных контрольных условиях, жизнеспособность клеток оценивали с использованием Cell Titer-Glo (Promega) согласно протоколу производителя, который количественно определяет уровни АТФ. Цитотоксичность соединений оценивали в параллельных неинфицированных клетках.

Для того чтобы проверить, имеют ли комбинированные лечения синергетический или аддитивный эффект, каждое соединение исследуют в концентрациях в матрице доз. Для расчета моделей аддитивности и излишка Loewe использовался Chalice Analyzer. Избыток Loewe обычно используется для обозначения избыточного процента ингибирования; избыточный процент ингибирования рассчитывается путем вычитания ожидаемых процентных значений ингибирования различных комбинаций, предполагая несинергичное спаривание в разных моделях, от экспериментальных значений процента ингибирования. Такие данные позволили рассчитать изоболограмму, оценку синергизма и индекс наилучшей комбинации (CI) для каждой пары. В общем, показатели синергизма >1 и $CI < 1$ указывают на то, что комбинированное лечение оказывает синергический эффект; показатель синергизма 1 и $CI = 1$ указывают на то, что комбинированное лечение оказывает только аддитивный эффект. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Apr; 59(4): 2086-2093. doi: [10.1128/AAC.04779-14](https://doi.org/10.1128/AAC.04779-14)

Для того, чтобы оценить, может ли достигаться синергизм при высоких уровнях ингибирования, уровень, уровень изоболограммы был установлен на 0,9, чтобы охватить значимый синергизм с 90% снижением вируса (эквивалент к уменьшению $1 - \log_{10}$).

Комбинация исходного соединения *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-(((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)метил)пропил)амино]карбонил)-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид плюс азитромицин генерировали синергизм с показателем синергизма 3,76 и $CI = 0,4$. Наблюдаемый синергизм не был обусловлен цитотоксичностью, поскольку не было значительной цитотоксичности для всех исследуемых комбинаций. Комбинация с *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-(((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)метил)пропил)амино]карбонил)-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид и ремдесивира демонстрировала аддитивность с показателем синергизма 5,1 и $CI = 0,21$. Наблюдаемый синергизм потенциально может использоваться для снижения доз и, таким

образом, для увеличения предела безопасности ингибиторов для достижения терапевтического окна *in vivo*. Кроме того, для минимизации резистентности к лекарственным средствам может использоваться комбинированная терапия.

Дополнительные исследования осуществлялись для дальнейшей оценки потенциала относительно преимущества противовирусной комбинации исходного соединения, *N*-((1*S*)-1-[[[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-[[[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил]пропил)амино]карбонил]-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид в комбинация с ремдесивиром.

Комбинации противовирусных агентов, особенно тех, которые направлены на разные стадии цикла репликации вируса, представляют собой терапевтическую стратегию, часто используемую в лечении вирусных заболеваний. Как *N*-((1*S*)-1-[[[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-[[[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил]пропил)амино]карбонил]-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид и ремдесивир, нуклеозидный РНК-зависимый ингибитор РНК-полимеразы, нацеленные на разные стадии в цикле репликации вируса, противовирусную активность двух соединений оценивали самостоятельно и в комбинации с использованием клеток HeLa-ACE2. Вирусные протеины детектировали в данном анализе с использованием реконвалесцентных поликлональных сывороток человека от двух разных пациентов с COVID-19. *N*-((1*S*)-1-[[[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-[[[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил]пропил)амино]карбонил]-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид (помеченный как соединение 1 в Таблице 6) самостоятельно ингибировал репликацию SARS-CoV-2 со средним значением EC₅₀ 0,14 мкМ и EC₉₀ 0,40 мкМ; тогда как ремдесивир имел среднее значение EC₅₀ 0,074 мкМ и EC₉₀ 0,17 мкМ (Таблица 7).

Таблица 7: *In vitro* активность *N*-((1*S*)-1-[[[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-[[[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил]пропил)амино]карбонил]-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид (соединение 1) и ремдесивир в клетках HeLa-ACE2

Соединение	EC ₅₀ (мкМ)	EC ₉₀ (мкМ)	n
Соединение 1	0,144 (0,0738-0,280)	0,398 (0,143-1,11)	3
Ремдесивир	0,0739 (0,629-0,0867)	0,168 (0,110-0,256)	4

Исследования комбинации проводили с использованием матрицы исследования лекарственных средств, и данные о комбинации лекарственных средств анализировали с помощью эталонных моделей (Loewe, Bliss, HSA) для классификации эффектов

комбинации лекарственных средств как аддитивных, синергических или антагонистических (изоболограмма, показатели синергизма и комбинационные индексы). В общем, показатель синергизма >1 и комбинационный индекс <1 указывают на то, что комбинированное лечение оказывает синергетический эффект (Yeо et al, 2015). Для того, чтобы оценить, может ли достигаться синергизм при высоких уровнях ингибирования, уровень изоболограммы был установлен на уровне 0,9, чтобы охватить значимый синергизм с 90% снижением вируса (эквивалент к снижению $1\log_{10}$).

Как подитожено в Таблице 8, комбинация исходного соединения, *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)метил)пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид, и ремдесивир демонстрировала синергизм сыворотки пациента №1 в 2 независимых экспериментах и аддитивность в одном эксперименте с сыворотками пациента №2 (Таблица 8). Различная классификация, скорее всего, связана с разной реконвалесцентной сывороткой, которая используется как реагенты для обнаружения. Такие же противовирусные данные были также проанализированы с использованием программы Synergyfinder, которая также показала, что 2 лекарственных средства были от аддитивного до синергетического, с репрезентативным графиком, показанным на фигуре 5. Антагонизм не был продемонстрирован для комбинации *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)метил)пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид и ремдесивир в данных исследованиях. Серийные разбавления *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)метил)пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид (помеченный как PF-00835231 на Фигуре 8) и ремдесивира (концентрации показаны вдоль оси на Фигуре 8) были объединены в формат матрицы. Трехмерный ландшафт взаимодействия лекарственных средств, графически представляющий показатели синергизма, проанализированные с использованием программы GeneData для всех исследуемых концентраций (средние показатели в трех повторах), показаны на фигуре 5. Площадь показателей, приведенных выше выравнивания на трехмерном графике указывает на синергизм, тогда как под выравниванием указывает на антагонизм. Наблюдаемая аддитивность/синергизм не была обусловлена цитотоксичностью, поскольку не было заметной цитотоксичности в клетках-хозяевах, инфицированных вирусом, для всех исследуемых комбинаций.

Таблица 8: Показатель синергизма комбинации исходного соединения *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)метил)пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид с ремдесивиром

Сыворотки пациента	Показатель синергизма Loewe	Показатель синергизма Bliss	Показатель синергизма HSA	Комбинационный индекс	n
1	1,60 (1,18; 2,02)	1,60 (1,59; 1,60)	2,51 (2,12; 2,89)	0,860 (0,837; 0,882)	2
2	(-0,0776)	(0,366)	(0,830)	(1,04)	1

HSA = самый высокий единственный агент; n = количество определений; Данные показывают среднее значение; (индивидуальное значение)

Благоприятный доклинический ADME и фармакокинетический профиль *N*-((1*S*)-1-{((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамида

Метаболическая стабильность *N*-((1*S*)-1-{((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамида оценивали *in vitro* с использованием объединенных микросом печени человека (HLM) и гепатоцитов. Было показано, что лекарственное средство, как показано, метаболизируется ферментами цитохрома P450, которые демонстрируют несвязанный Cl_{int} 14 мкл/мин/мг. С использованием химических ингибиторов и рекомбинантных гетерологически экспрессированных ферментов, CYP3A4 идентифицировали как основной CYP, участвующий в метаболизме данного соединения. Также было отмечено, что полиморфно экспрессированный CYP3A5 может также метаболизировать *N*-((1*S*)-1-{((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамида и такой клиренс может быть несколько больше в экспрессаторах CYP3A5. Эффективность соединения оборотно ингибировать ферменты цитохрома P450 человека (CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 и 3A) оценивали с использованием зонда субстратов (дополнительных) в объединенном HLM и времени ингибирования CYP3A4/5, что указывает на то, что *N*-((1*S*)-1-{((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамида обеспечивает низкий риск возникновения лекарственного средства-лекарственное средство (DDI) при совместном введении с другими лекарственными средствами. Эффективность *N*-((1*S*)-1-{((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамида ингибировали ряд транспортеров (BCRP, Pgp, OATP1B1/1B3, OCT1/2, OAT1/3 и MATE1/2K) оценивали с использованием *in vitro* систем. Значения $IC_{50} > 20$ мкМ указывают на низкий риск возникновения DDI из-за ингибирования транспортера при

прогнозируемом клиническом воздействии. Связывание *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид с протеинами плазмы измеряли для разных видов с использованием равновесного диализа, что показало умеренное связывание с протеинами плазмы со свободными фракциями плазмы от 0,26 до 0,46 для разных видов.

N-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид внутривенно вводили крысам, собакам и обезьянам (1 или 2 мг/кг) и демонстрировали умеренные плазменные клиренсы (35-60% кровотока в печени), низкие объемы распределения (<1 л/кг) и короткие периоды полувыведения (<1,5 часа) у разных видов в соответствии с его нейтральной физиохимией и липофильностью ($SFLogD_{7,4}=1,7$). После перорального введения крысам (2 мг/кг) и обезьянам (5 мг/кг) *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид демонстрировал низкую биодоступность (<2%), вероятно, из-за комбинации низкого всасывания из-за его низкую проницаемость (явная проницаемость MDCK-LE $1,3 \times 10^{-6}$ см/сек.), низкую растворимость, возможность активного вытекания в кишечник с помощью P-гр и BCRP, а также возможность гидролиза амида пищеварительными ферментами в желудочно-кишечном тракте. У крыс, собак и обезьян примерно 10% *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид выводилось в неизменном виде с мочой, что указывает на то, что почечная элиминация также может играть незначительную роль в клиренсе *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид у людей.

Фармакокинетические прогнозы человека, приемлемые для в.в. введение – с учетом данных метаболизма человека *in vitro* и фармакокинетических данных *in vivo* (ПК) у крыс, собак и обезьян *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид, как предполагается, демонстрирует плазменный клиренс (CL_p) ~6 мл/мин/кг (основной СУР, незначительные почечные пути), объем распределения в равновесном состоянии (V_{dss}) 1 л/кг и период полувыведения примерно 2 часа у людей. Из-за ограниченной биодоступности при пероральном приеме, короткий период полувыведения и вероятную необходимость поддерживать свободные системные концентрации в течение длительного

времени, в качестве оптимального пути и режима дозирования была предложена непрерывная внутривенная (в.в.) инфузия.

Эффективная целевая концентрация и возможный прогноз дозы для человека для достижения целевой C_{eff}

Коэффициент ингибирования (IQ) был приемлемым показателем для передачи доклинических противовирусных эффектов в клинику по ряду вирусных заболеваний. IQ определяется как несвязанная концентрация $C_{min,u}$ человека, разделенная на *in vitro* несвязанные значения (с поправкой на сыворотку крови) $EC_{50,u}$ в противовирусном анализе (уравнение 1).

$$IQ = \frac{C_{min,u}}{EC_{50,u}} \quad (1)$$

Некоторые противовирусные способы лечения показали значительную пользу с IQ, близким к 1; однако для быстрого контроля репликации вируса часто необходимо поддерживать экспозицию по меньшей мере в 10 раз выше, чем *in vitro* EC_{50} . Клинически утвержденные ингибиторы протеазы эффективно снижают вирусную нагрузку при дозировке при значениях IQ от 1 до 100, если принять во внимание связывание с протеинами и сайт действия. Важно, что противовирусные препараты в целом и, в частности, ингибиторы протеазы могут потенциально привести к увеличению мутаций и дополнительной резистентности к лекарственным средствам, если дозировать с IQ менее 1.

Насколько высокое значение IQ необходимо, зависит от наклона кривой доза-ответ. Коэффициент Хилла (m) и EC_{50} связан с противовирусной активностью *in vitro* в диапазоне концентраций (C) по уравнению 2:

$$in\ vitro\ противовирусная\ активность = 100 * \frac{C^m}{EC_{50}^m + C^m} \quad (2)$$

N-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-(((3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил)метил)пропил)амино]карбонил)-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид демонстрирует высокий наклон (m=3) по всему диапазону *in vitro* противовирусных анализов, как и клинические ингибиторы протеазы, направленные на ВИЧ и HCV. Существует только 2-3-кратная разница между противовирусными концентрациями EC_{50} и EC_{90} , а не типичная 9-кратная разница для противовирусных средств с коэффициентом Хилла = 1. Таким образом, относительно небольшие соотношения влияния на значения EC_{50} (3-10) связаны с почти полной вирусной супрессией.

Прогнозируемая минимально эффективная концентрация (C_{eff}) выбиралась, чтобы соответствовать EC_{90} *in vitro*, что согласуется с доклинической трансляцией одобренных ингибиторов протеазы. Поскольку *N*-((1*S*)-1-(((1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-(((3*S*)-2-

оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1Н-индол-2-карбоксамид предлагался для введения путем непрерывной инфузии, прогнозируемая экспозиция в равновесном состоянии представляет собой C_{min} , которая выдерживалась в течение интервала дозирования. Анализ доза-ответ, проведенный в физиологически подходящем типе клеток, карциноме легких человека, давал в результате среднее значение EC_{90} 0,44 мкМ. Это согласуется с дополнительными противовирусными данными в клетках Hela-ACE2 ($EC_{90}=0,4$ мкМ) и клеточных Vero-клеточных линиях ($EC_{90} = 0,48-1,6$ мкМ), когда добавляли ингибитор P-gp, чтобы лучше отразить отсутствие значительного транспортера P-gp в легком. Кроме того, противовирусное ингибирование подтверждается экспериментом относительно периода действия, проводимого на модели первичного эпителия дыхательных путей человека (предварительные данные указывают на несвязанный $EC_{90} < 0,5$ мкМ), указывая на соответствующую внутреннюю анти-SARS-CoV-2 активность $N-((1S)-1-{\{((1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1Н-индол-2-карбоксамид}$ в разных типах клеток. Таким образом, предлагаемый целевой C_{eff} составляет $\sim 0,5$ мкМ.

Из-за быстрой перфузии крови через легкие и режима непрерывной равновесной внутривенной инфузии предполагается, что концентрации свободной плазмы и свободных легких находятся в равновесии, и, следовательно, концентрация свободной плазмы предполагает разумный суррогат концентрации в главном сайте действия заболевания. На основе прогнозов РК человека минимально эффективная доза $N-((1S)-1-{\{((1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1Н-индол-2-карбоксамид}$, необходима для того, чтобы достичь данное влияние составляет 320 мг/день, что вводится в виде непрерывной внутривенной инфузии. Необходимая продолжительность дозирования для эффективности остается неопределенной и требует оценки на людях. Исходя из клинических результатов ремдезивира продолжительность дозирования вплоть до 10 дней может потребоваться для получения улучшения результатов пациента.

Соединение из Примера 49, $(3S)-3-(\{N-[(4-метокси-1Н-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата$, как было обнаружено, имеет благоприятную растворимость в воде больше, чем 200 мг/мл и может, таким образом, быть сформулированным в виде водного раствора. Например, $(3S)-3-(\{N-[(4-метокси-1Н-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат$ может быть сформулирован как раствор или в физиологическом растворе или декстрозном растворе, который является приемлемым для внутривенного введения. Внутривенное введение $(3S)-3-(\{N-[(4-метокси-1Н-индол-2-$

ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата может осуществляться путем введения болюса соединения или путем непрерывного введения в виде инфузии. Стерильный замороженный раствор (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата могут быть разморожены с получением раствора лекарственного средства концентрацией 25 мг/мл, который может быть дозирован или может быть разбавлен 0,9% раствором хлорида натрия для инъекций, USP или 5% раствором декстрозы для инъекций, USP. Дозировка (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, который вводят пациенту, может находиться в диапазоне от 100 мг до 10 г в день, от 250 мг до 7,5 г в день, от 0,5 г до 5 г в день, от 1 г до 4 г в день или от 2 г до 3 г в день. Доза 500 мг/день (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата легко может быть введена пациенту с учетом растворимости соединения 200 мг/мл или более. Данная очень благоприятная растворимость позволяет введение (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата в количествах, которые в 1×, 3×, 7× и 10× раз превышают ЕС₉₀ для соединения и, таким образом, обеспечивает преимущество гибкости дозирования в клинических условиях.

Фармакокинетика однократной дозы (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата

Фармакокинетика (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата (соединения Примера 49), исходного гидрокси соединения, N-((1S)-1-{{{(1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{{(3S)-2-оксопирролидин}-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид и % превращения в N-((1S)-1-{{{(1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{{(3S)-2-оксопирролидин}-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид (после в.в. дозировки (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата) были охарактеризованы после единичного в.в. дозировки у крыс, собак и обезьян. 1,17 мг/кг (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата вводилось крысе (Wistar Han), собаке (Beagle) или обезьяне (Cynomolgus). Клиренс (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата был выше в кровотоке в печени, и приблизительно 75%

превращения в $N-((1S)-1-{\{((1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}пропил)амино\}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид$ наблюдалось у данных видов (68% у крысы, 81% у собаки и 76% у обезьяны).

Исследование метаболизма $(3S)-3-{\{N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата$

Метаболизм *in vitro*, способствующий превращению $(3S)-3-{\{N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-$

дигидрофосфата в $N-((1S)-1-{\{((1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}пропил)амино\}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид$

оценивали в плазме и фракциях S9, полученных из тканей печени, почек и легких доклинических видов и людей. Высокая скорость метаболизма фосфатного соединения в

гидроксисоединении наблюдалась во всех исследованных фракциях S9. В микросомах печени человека (HLM) и S9 человека, как деплеция $(3S)-3-{\{N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил-$

дигидрофосфат, так и образование $N-((1S)-1-{\{((1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}пропил)амино\}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-$

индол-2-карбоксамид в значительной степени повышались во время инкубирования, получались из Tris в сравнении с фосфатным буфером, что соответствует метаболической

активности, опосредованной щелочной фосфатазой.

Проводилась предварительная оценка метаболизма *in vitro* нерадиомиического $N-((1S)-1-{\{((1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}пропил)амино\}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид$ в

микросомах печени, и метаболизм *in vivo* в плазме от крыс, собак и обезьян, которым вводился $(3S)-3-{\{N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат$. *In vivo*, радиоактивно меченный $N-((1S)-1-{\{((1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}пропил)амино\}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид$

был основным лекарственным средством, связанным с ним, вместе с возможным эпимером такого соединения. Все метаболиты образовывались окислительными путями и не наблюдалось никаких уникальных метаболитов человека *in vitro*.

Профиль безопасности $(3S)-3-{\{N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил\}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата$ и $N-((1S)-1-{\{((1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}пропил)амино\}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид$

оценивали индивидуально в ряде исследований безопасности *in vitro* и *in vivo* на крысах. В

исследованиях *in vitro*, (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат и *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид были отрицательными/негативными в анализе обратной мутации бактерий и не вызывали образования микроядер. Как фосфат, так и исходные соединения обладали минимальным потенциалом для вторичной (нецелевой) фармакологии при клинически значимых воздействиях. Ни (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат, ни *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид не ингибировал амплитуду тока hERG при до 300 мкМ (1,770х и 600х, соответственно, прогнозируемая несвязанная C_{max} человека 0,17 и 0,50 мкм, соответственно, при прогнозируемой эффективной дозе (для человека), что указывает на благоприятный профиль сердечно-сосудистой безопасности. В анализах гемосовместимости крови человека оба соединения не оказывали влияния на параметры гемолиза или флокуляции/мутности, что указывает на совместимость с кровью человека и поддерживает внутривенное введение.

(3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат вводили крысам путем непрерывной внутривенной инфузии в течение 24 часов в исследовании GLP. Не было результатов, связанных с изучаемой статьей, и не было обнаружено токсичности для органов-мишеней. (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат не влиял на фармакологические параметры неврологической безопасности, как было оценено с использованием батареи стандартных тестов поведенческого фенотипирования в 24-часовом исследовании непрерывной внутривенной инфузии на крысах. Уровень нежелательных побочных эффектов (NOAEL) составил 1000 мг/кг. Исходное соединение *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид также вводилось самцам крыс путем непрерывной внутривенной инфузии в течение 4 дней в исследовательском изучении токсичности без GLP и переносился в дозе 246 мг/кг/сутки, в наивысшей возможной исследуемой дозой. Полученные результаты, связанные с *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамидом в данном исследовании были ограничены минимальными, не неблагоприятными воздействиями на клинические химические параметры, включая

высшие средние значения триглицеридов, холестерина, и фосфора без любых микроскопических коррелятов или связанных функциональных изменений. Ни в одном исследовании не было обнаружено побочных эффектов, связанных с исследуемым продуктом.

В NOAEL из 24-часового исследования GLP непрерывной внутривенной инфузии (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата (PF-07304814) у крыс, ожидаемые пределы риска для несвязанных C_{max} и AUC_{24} составляют $97\times$ и $65\times$ для (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата и $25\times$ и $21\times$ для *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил}метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид, при прогнозируемой минимальной эффективной дозе для человека 0,5 г/день. Это указывает на возможность безопасной оценки кратных показателей EC_{90} у людей во время клинических испытаний, чтобы понять взаимосвязь влияние-ответ и, если нужно, достичь высоких уровней ингибирования. Кроме того, не ожидается никакого перекрывания или аддитивной токсичности лекарственных средств, используемых в стандартном лечении COVID-19 при введении (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата у людей, что делает данное соединение привлекательным партнером для комбинированной терапии. На основании результатов ряда проведенных исследований безопасности, (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат демонстрирует обнадеживающий доклинический профиль безопасности. Прогнозируемая фармакокинетика у людей (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат обеспечивает способность достигать системной несвязанной концентрации 0,5 мкМ (EC_{90}) исходного соединения, *N*-((1*S*)-1-{{{(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{{(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил}метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамид путем доставки 500 мг (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата в виде непрерывной инфузии в течение 24 часов и объемами инфузии <250 мл.

Исследование мышинной инфекции *in vivo*

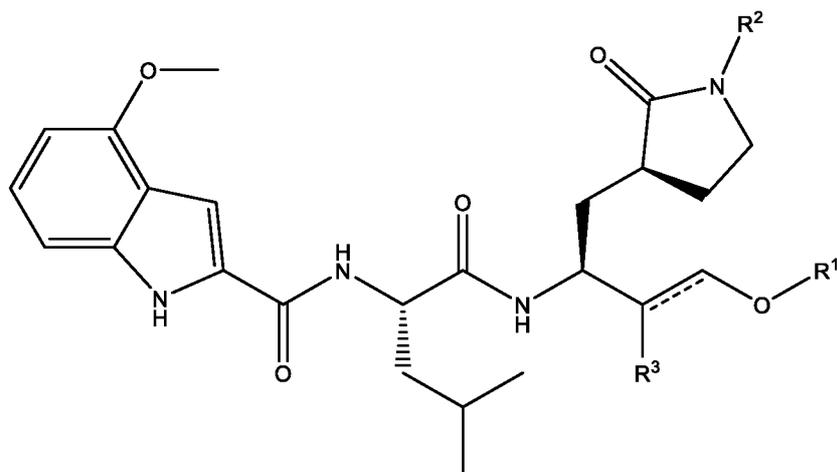
Демонстрация эффективности лекарственного средства на животной модели важна для установления взаимосвязи ФК/ФД и предоставления доказательств для выбора клинических параметров дозирования. Адаптированная к мышам (MA15) модель инфекции CoV-1 использовалась для оценки исходного соединения $N-((1S)-1-{\{[(1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}}пропил)амино\}}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид$ (активный фрагмент, образующийся после введения соединения из Примера 49); (смотрите Deming RA., et al. A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. PLoS Pathog. 2007; 3(1), e5 и Frieman M., et al. Molecular determinants of severe acute respiratory syndrome coronavirus pathogenesis and virulence in young and aged mouse models of human disease. J Virol. 2012; 86(2), 884-97. Мышей, инфицированных MA15-CoV, обрабатывали $N-((1S)-1-{\{[(1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}}пропил)амино\}}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамидом$, 100 мг/кг, дважды в день (BID) подкожным способом (п.к.). Данная дозировка, как предполагалось, дает достичь концентрации в плазме свободного лекарственного средства при $C_{min} \approx 500$ нМ или примерно $1 \times EC_{90}$ (концентрация соединения, необходимая для уменьшения вируса на 90% в анализах *in vitro* репликации CoV-1 и CoV-2), что клинически согласовывается с нашей потенциальной минимальной эффективной дозой. В одном эксперименте лечение начиналось во время инфицирования (день 0) или откладывалось на 1 или 2 дня после инфицирования. Титры вирусов в легких на 4-й день после инфицирования снижались на $\approx 2,0, 1,5$ и $1,0 \log_{10}$ в процессе лечения, начиная с дней 0, 1 и 2 после инфицирования соответственно. Потеря веса и гистопатологические признаки заболевания уменьшались, особенно когда применение дозировки $N-((1S)-1-{\{[(1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}}пропил)амино\}}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид$ начинали в день 0. Во втором эксперименте лечение $N-((1S)-1-{\{[(1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}}пропил)амино\}}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамидом$ начиналось в день 0, и доза лекарственного средства варьировалась (30, 100 и 300 мг/кг, BID, п.к.). Титры вирусов в легких у мышей, инфицированных MA15, получавших $N-((1S)-1-{\{[(1S)-3-гидрокси-2-оксо-1-{\{(3S)-2-оксопирролидин-3-ил\}метил\}}пропил)амино\}}карбонил\}-3-метилбутил)-4-метокси-1H-индол-2-карбоксамид$ или носитель, были определены в анализе вирусных бляшек на клетках Vero и представлены единицами, образующими бляшки (PFU) на мкг легочной ткани. Массы тела животных определяли каждый день и наносили на график как % исходной массы. Наблюдалось дозозависимое снижение титров вирусов в легких на 4-й день для трех дозировок: $\approx 1,5 \log_{10}$ при 30 мг/кг; $\approx 3 \log_{10}$ при 100

мг/кг; и $\geq 3,5 \log_{10}$ при 300 мг/кг. Потеря массы, вызванная вирусом, была уменьшена путем лечения исходным соединением *N*-((1*S*)-1-{[(1*S*)-3-гидрокси-2-оксо-1-{[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]метил}пропил)амино]карбонил}-3-метилбутил)-4-метокси-1*H*-индол-2-карбоксамидом во всех трех дозировках. Эти данные подтверждают прогноз, что 500 мг (3*S*)-3-({*N*-[(4-метокси-1*H*-индол-2-ил)карбонил]-*L*-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3*S*)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, вводимые в виде непрерывной инфузии в течение 24 часов, может представлять собой эффективную дозу для людей для лечения SARS-CoV-2.

Все патенты и публикации, описанные в данном документе выше, являются таким образом включенными в настоящий документ в виде ссылки в полном объеме. Несмотря на то, что изобретение было описано с точки зрения различных предпочтительных вариантов осуществления и конкретных примеров, изобретение следует понимать, как не ограничивающееся изложенным выше подробным описанием, но как определяется прилагаемой формулой и их эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы I



I,

в котором

----- отсутствует или представляет собой связь;

R^1 выбирают из группы, которая состоит из $-\text{CH}(R^{4a})-\text{OC}(\text{O})R^4$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$, $-\text{CH}(R^{4a})-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^4$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкил})(\text{OR}^5)$ и $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^6)_2$;

R^2 выбирают из группы, которая состоит из водорода, $-\text{C}(\text{O})R^7$, $-\text{CO}_2R^7$ и $-\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкил-OC}(\text{O})\text{OR}^7$;

и когда R^2 представляет собой $-\text{C}(\text{O})R^7$, $-\text{CO}_2R^7$ или $-\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкил-OC}(\text{O})\text{OR}^7$; то R^1 выбирают из группы, которая состоит из водорода, $-\text{CH}(R^{4a})-\text{OC}(\text{O})R^4$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$, $-\text{CH}(R^{4a})-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^4$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкил})(\text{OR}^5)$ и $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^6)_2$;

R^3 представляет собой оксо, когда ----- отсутствует или когда ----- представляет собой связь, R^3 , взятый вместе с R^1 и кислородом, к которому R^1 является присоединенным, представляют собой $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$;

R^4 и R^7 каждый независимо выбирают из группы, которая состоит из $\text{C}_1\text{-C}_6\text{алкила}$, незамещенного или замещенного от одного до трех R^8 , $\text{C}_3\text{-C}_7\text{циклоалкила}$, незамещенного или замещенного от одного до трех R^8 , $\text{C}_5\text{-C}_{12}\text{бициклоалкила}$, незамещенного или замещенного от одного до трех R^8 , от четырех до семи членного гетероциклоалкила, который содержит от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S, и который является незамещенным или замещенным от одного до трех R^8 , $\text{C}_6\text{-C}_{10}\text{арила}$, незамещенного и замещенного от одного до трех R^8 , и от пяти до десяти членного гетероарила, который содержит от одного до четырех гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S, и который является незамещенным и замещенным от одного до трех R^8 ;

R^{4a} представляет собой водород или C₁-C₆алкил;

R⁵ в каждом случае независимо представляет собой водород и C₁-C₆алкил; и обе R⁵ группы, взятые вместе, представляют собой C₂-C₄алкилен, который является необязательно замещенным фенилом;

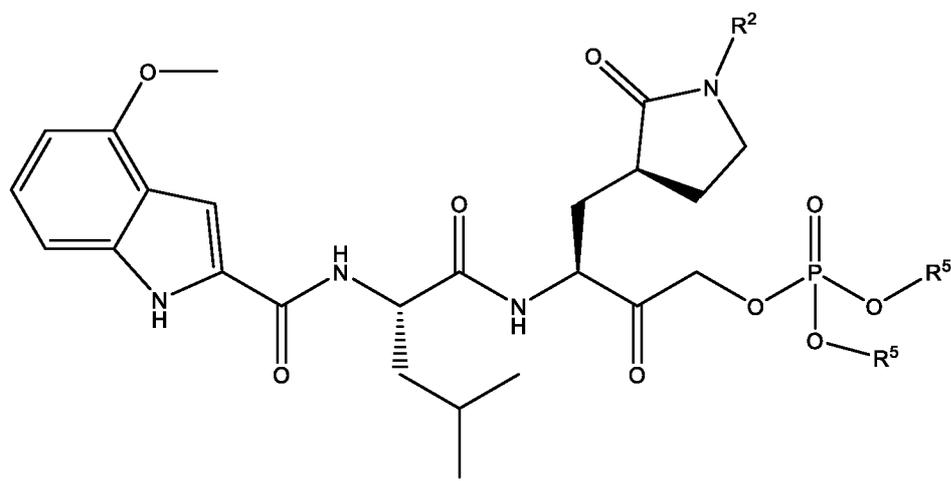
R⁶ в каждом случае является независимо выбранным из водорода и C₁-C₆алкила, который является незамещенным или замещенным от одного до трех R⁸;

или обе R⁶ группы, взятые вместе с азотом, к которому они являются присоединенными, представляют собой от четырех до семи членный гетероциклоалкил, который необязательно содержит дополнительные от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S; при этом указанный гетероциклоалкил является незамещенным и замещенным от одного до трех R⁸; и

R⁸ в каждом случае является независимо выбранным из галогена, гидроксид, циано, C₁-C₃алкила, C₁-C₃алкокси, C₁-C₃алкоксиC₁-C₃алкила, C₃-C₆циклоалкила, C₃-C₆циклоалкокси, ди(C₁-C₃алкил)амино, (C₁-C₃алкил)амино, амино, ди(C₁-C₃алкил)амино-C₁-C₃алкила, (C₁-C₃алкил)амино-C₁-C₃алкила, амино-C₁-C₃алкила и от четырех до семи членного гетероциклоалкила, который содержит от одного до трех гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S;

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат.

2. Соединение по пункту 1 формулы Ie



Ie

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат.

3. Соединение по пункту 2, в котором

R² выбирают из группы, которая состоит из водорода, -C(O)CH₃, -CO₂CH₃, -CH₂OC(O)OCH₃ и -CH(CH₃)OC(O)OCH₃; и

R⁵ в каждом случае независимо выбирают из группы, которая состоит из водорода, метил, этил, изопропил и трет-бутил; и обе R⁵ группы, взятые вместе, представляют собой -CH(фенил)CH₂CH₂-;

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат.

4. Соединение по пункту 3, выбрано из группы, которая состоит из

(1S)-1-({(3S)-3-[(2S)-4-[(диметоксифосфорил)окси]-2-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-ил}этилметилкарбонат;

(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат;

(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдиметилфосфат;

(3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдипропан-2-илфосфат;

(3S)-4-[(3S)-1-ацетил-2-оксопирролидин-3-ил]-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксобутилдиметилфосфат;

4-метокси-N-[(2S)-4-метил-1-({(2S)-4-[(2-оксидо-4-фенил-1,3,2-диокса фосфинан-2-ил)окси]-3-оксо-1-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутан-2-ил}амино)-1-оксопентан-2-ил]-1H-индол-2-карбоксамид;

диэтил (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилфосфат; и

метил (3S)-3-[(2S)-4-[(диметоксифосфорил)окси]-2-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-3-оксобутил]-2-оксопирролидин-1-карбоксилат;

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат.

5. Соединение по пункту 4, которое представляет собой (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат; или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат.

6. Соединение по пункту 5, которое находится в форме гидрата.

7. Соединение по пункту 6, которое представляет собой кристаллический гидрат (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата.

8. Соединение по пункту 7, которое представляет собой кристаллический гидрат (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата формы 1, который имеет одну или несколько характеристик, выбранных из группы, которая состоит из порошковой рентгеновской дифрактограммы, а ^{13}C твердотельного ЯМР спектра и спектра комбинационного рассеивания;

при этом характеристики порошковой рентгеновской дифрактограммы выбирают из

- a) порошковой рентгеновской дифрактограммы, которая содержит пики при $4,1 \pm 0,2$ и $7,2 \pm 0,2$ градусов 2-Тета;
- b) порошковой рентгеновской дифрактограммы, которая содержит пики при $4,1 \pm 0,2$, $7,2 \pm 0,2$ и $10,4 \pm 0,2$ градусов 2-Тета; и
- c) порошковой рентгеновской дифрактограммы, которая содержит пики при $4,1 \pm 0,2$, $7,2 \pm 0,2$, $10,4 \pm 0,2$ и $14,5 \pm 0,2$ градусов 2-Тета;

при этом характеристики ^{13}C твердотельного ЯМР спектра выбирают из

- a) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при 21,7, 153,8 и 172,2 м.д.; каждый пик $\pm 0,2$ м.д.;
- b) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при 21,7, 153,8, 172,2 и 118,6 м.д.; каждый пик $\pm 0,2$ м.д.; и
- c) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при 21,7, 153,8, 172,2, 118,6 и 57,8 м.д.; каждый пик $\pm 0,2$ м.д.; и

при этом характеристики спектра комбинационного рассеивания выбирают из

- a) спектра комбинационного рассеивания, который содержит пики комбинационного рассеивания при 1271, 1421 и 1217 см^{-1} ; каждый пик $\pm 2 \text{ см}^{-1}$;
1217 см^{-1}
- b) спектра комбинационного рассеивания, который содержит пики комбинационного рассеивания при 1271, 1421, 1217 и 1640 см^{-1} ; каждый пик $\pm 2 \text{ см}^{-1}$; и
- c) спектра комбинационного рассеивания, который содержит пики комбинационного рассеивания при 1271, 1421, 1217, 1640 и 3074 см^{-1} ; каждый пик $\pm 2 \text{ см}^{-1}$.

9. Соединение по пункту 5, которое находится в форме сольвата метилэтилкетону.

10. Соединение по пункту 9, которое представляет собой кристаллический сольват метилэтилкетона (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата.

11. Соединение по пункту 10 которое представляет собой кристаллический сольват метилэтилкетону (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфата, который имеет одну или несколько характеристик, выбранных из группы, которая состоит из порошковой рентгеновской дифрактограммы, ^{13}C ЯМР спектра и спектра комбинационного рассеивания;

при этом характеристики порошковой рентгеновской дифрактограммы выбирают из

а) порошковой рентгеновской дифрактограммы, которая содержит пики при $7,7 \pm 0,2$, $8,1 \pm 0,2$ и $23,1 \pm 0,2$ градусов 2-Тета;

б) порошковой рентгеновской дифрактограммы, которая содержит пики при $7,7 \pm 0,2$, $8,1 \pm 0,2$, $23,1 \pm 0,2$ и $17,0 \pm 0,2$ градусов 2-Тета; и

с) порошковой рентгеновской дифрактограммы, которая содержит пики при $7,7 \pm 0,2$, $8,1 \pm 0,2$, $23,1 \pm 0,2$, $17,0 \pm 0,2$ и $25,8 \pm 0,2$ градусов 2-Тета;

при этом характеристики ^{13}C твердотельного ЯМР спектра выбирают из

а) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при 7,2, 206,4 и 215,8 м.д.; каждый $\pm 0,2$ м.д.;

б) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при 7,2, 206,4, 215,8 и 42,2 м.д.; каждый $\pm 0,2$ м.д.; и

с) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при 7,2, 206,4, 215,8, 42,2 и 101,2 м.д.; каждый $\pm 0,2$ м.д.; и

при этом характеристики спектра комбинационного рассеивания выбирают из

а) спектра комбинационного рассеивания, который содержит пики при 1511, 1644 и 3081 см^{-1} ; каждый $\pm 2 \text{ см}^{-1}$;

б) спектра комбинационного рассеивания, который содержит пики при 1511, 1644, 3081 и 1265 см^{-1} ; каждый $\pm 2 \text{ см}^{-1}$; и

с) спектра комбинационного рассеивания, который содержит пики при 1511, 1644, 3081 , 1265 и 447 см^{-1} ; каждый $\pm 2 \text{ см}^{-1}$.

12. Соединение по пункту 5, которое находится в форме сольвата диметилсульфоксида.

13. Соединение по пункту 12, которое представляет собой кристаллический сольват диметилсульфоксида (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат.

14. Соединение по пункту 13, которое представляет собой кристаллический сольват диметилсульфоксида (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат, который имеет одну или несколько характеристик, выбранных из группы, которая состоит из порошковой рентгеновской дифрактограммы, ^{13}C твердотельного ЯМР спектра и спектра комбинационного рассеивания;

при этом характеристики порошковой рентгеновской дифрактограммы выбирают из

а) порошковой рентгеновской дифрактограммы, которая содержит пики при $7,4 \pm 0,2$, $14,8 \pm 0,2$ и $26,2 \pm 0,2$ градусов 2-Тета;

б) порошковой рентгеновской дифрактограммы, которая содержит пики при $7,4 \pm 0,2$, $14,8 \pm 0,2$, $26,2 \pm 0,2$ и $10,8 \pm 0,2$ градусов 2-Тета; и

с) порошковой рентгеновской дифрактограммы, которая содержит пики при $7,4 \pm 0,2$, $14,8 \pm 0,2$, $26,2 \pm 0,2$, $10,8 \pm 0,2$ и $22,3 \pm 0,2$ градусов 2-Тета;

при этом характеристики ^{13}C твердотельного ЯМР спектра выбирают из

а) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при $173,4 \pm 0,2$, $210,7 \pm 0,2$ и $26,2 \pm 0,2$ м.д.;

б) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при $173,4 \pm 0,2$, $210,7 \pm 0,2$, $26,2 \pm 0,2$ и $22,8 \pm 0,2$ м.д.; и

с) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при $173,4 \pm 0,2$, $210,7 \pm 0,2$, $26,2 \pm 0,2$, $22,8 \pm 0,2$ и $25,5 \pm 0,2$ м.д.; и

при этом характеристики спектра комбинационного рассеивания представляют собой спектр комбинационного рассеивания, который содержит пики при 1717 ± 2 и $675 \pm 2 \text{ см}^{-1}$.

15. Соединение по пункту 5, которое находится у форме сольвата диметилсульфоксида гидрата.

16. Соединение по пункту 15 которое представляет собой кристаллический гидрат сольвата диметилсульфоксида (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата.

17. Соединение по пункту 16 которое представляет собой кристаллический гидрат сольвата диметилсульфоксида (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, который имеет характеристики порошковой рентгеновской дифрактограммы;

при этом характеристики порошковой рентгеновской дифрактограммы выбирают из

- а) порошковой рентгеновской дифрактограммы, которая содержит пики при $14,5 \pm 0,2$, $25,6 \pm 0,2$ и $26,6 \pm 0,2$ градусов 2-Тета;
- б) порошковой рентгеновской дифрактограммы, которая содержит пики при $14,5 \pm 0,2$, $25,6 \pm 0,2$, $26,6 \pm 0,2$ и $21,9 \pm 0,2$ градусов 2-Тета; и
- с) порошковой рентгеновской дифрактограммы, которая содержит пики при $14,5 \pm 0,2$, $25,6 \pm 0,2$, $26,6 \pm 0,2$, $21,9 \pm 0,2$, $17,8 \pm 0,2$ градусов 2-Тета.

18. Соединение по пункту 5, которое представляет собой (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат.

19. Соединение по пункту 18, которое представляет собой аморфный (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат.

20. Соединение по пункту 19, которое представляет собой аморфный (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфат, который имеет одну или несколько характеристик, выбранных из группы, которая состоит из ^{13}C твердотельного ЯМР спектра и комбинации из ^{13}C твердотельного ЯМР спектра и ^{31}P твердотельного ЯМР спектра;

при этом характеристики ^{13}C твердотельного ЯМР спектра выбирают из

- а) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при $175,0 \pm 0,4$, $204 \pm 1,5$ и $181,8 \pm 0,4$ м.д.;
- б) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при $175,0 \pm 0,4$, $204 \pm 1,5$, $181,8 \pm 0,4$ и $54,8 \pm 0,2$ м.д.; и
- с) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при $175,0 \pm 0,4$, $204 \pm 1,5$, $181,8 \pm 0,4$, $54,8 \pm 0,2$ и $162,9 \pm 0,2$ м.д.; и

комбинация из ^{13}C твердотельного ЯМР спектра и ^{31}P твердотельного ЯМР спектра представляет собой ^{13}C твердотельный ЯМР спектр, который содержит пики при $175,0 \pm 0,4$ и $204 \pm 1,5$ и ^{31}P твердотельный ЯМР спектр с пиком при $-0,8 \pm 0,2$ м.д.

21. Соединение по пункту 5, которое представляет собой натриевую соль (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата.

22. Соединение по пункту 21, которое представляет собой аморфную натриевую соль (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата.

23. Соединение по пункту 22 которое представляет собой аморфную натриевую соль (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфату, которое имеет одну или несколько характеристик, выбранных из группы, которая состоит из ^{13}C твердотельного ЯМР спектра и комбинации из ^{13}C твердотельного ЯМР спектра и ^{31}P твердотельного ЯМР спектра;

при этом характеристики ^{13}C твердотельного ЯМР спектра выбирают из

а) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при $126,0 \pm 0,4$ м.д., $181,0 \pm 0,4$ м.д. и $208,0 \pm 1,5$ м.д.;

б) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при $126,0 \pm 0,4$ м.д., $181,0 \pm 0,4$ м.д., $208,0 \pm 1,5$ м.д. и $174,1 \pm 0,4$ м.д. $175,0 \pm 0,4$ м.д.; и

с) ^{13}C твердотельного ЯМР спектра, который содержит пики при $126,0 \pm 0,4$ м.д., $181,0 \pm 0,4$ м.д., $208,0 \pm 1,5$ м.д., $174,1 \pm 0,4$ м.д. и $163,1 \pm 0,2$ м.д.; и

комбинация из ^{13}C твердотельного ЯМР спектра и ^{31}P твердотельного ЯМР спектра представляет собой ^{13}C твердотельный ЯМР спектр, который содержит пики при $126,0 \pm 0,4$ м.д., $181,0 \pm 0,4$ м.д. и ^{31}P твердотельный ЯМР спектр с пиком при $1,9 \pm 0,2$ м.д.

24. Фармацевтическая композиция, яка содержит терапевтически эффективное количество (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата, или его фармацевтически принятой соли, сольвата или гидрата, в соответствии с любым одним из пунктов 5 - 23 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

25. Фармацевтическая композиция по пункту 24, при этом фармацевтическая композиция дополнительно содержит буферный агент.

26. Фармацевтическая композиция по пункту 25, в котором:

а) фармацевтически приемлемую соль выбирают из группы, которая состоит из бензатина, кальция, холина, диэтиламина, диоламина, магния, меглюмина, лизинка, пиперазина, калия, три(гидроксиметил)аминометана и натрия;

- b) молярное соотношение противоиона соли к (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата в фармацевтически приемлемой соли составляет от приблизительно 0,5:1 до приблизительно 3:1; и
- c) буферный агент выбирают из группы, которая состоит из фосфорной кислоты, лимонной кислоты, малеиновой кислоты, винной кислоты, молочной кислоты и уксусной кислоты.

27. Фармацевтическая композиция по пункту 26, в которой:

- a) фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль ;
- b) молярное соотношение противоиона натрия к (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата в фармацевтически приемлемой соли составляет от приблизительно 0,5:1 до приблизительно 2:1;
- c) буферный агент представляет собой лимонную кислоту; и
- d) молярное соотношение (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата до лимонной кислоты составляет от приблизительно 2:1 до приблизительно 10:1.

28. Фармацевтическая композиция по любому одному из пунктов 24 – 27, где композиция находится в форме порошка или является лиофилизированной, при этом pH раствора восстановленного препарата находится в диапазоне от 2 до 6.

29. Фармацевтическая композиция по пункту 28, при этом pH раствора восстановленного препарата находится в диапазоне от 3 до 5.

30. Фармацевтическая композиция по любому одному из пунктов 24 – 29, при этом фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или несколько стабилизирующих агентов.

31. Фармацевтическая композиция по пункту 30, в которой один или несколько стабилизирующих агентов выбирают из группы, которая состоит из декстранов, сахарозы, лактозы, трегалозы, манита, сорбита, глюкозы, рафинозы, глицина, гистидина, поливинилпирролидонов и полиэтиленгликолей.

32. Фармацевтическая композиция по пункту 30, в которой один или несколько стабилизирующих агентов выбирают из группы, которая состоит из полиэтиленгликоля 300, полиэтиленгликоля 400 и полиэтиленгликоля 3350.

33. Фармацевтическая композиция по пункту 32, в которой общее количество одного или нескольких стабилизирующих агентов составляет до приблизительно 15% масс./масс. препарата.

34. Фармацевтическая композиция по любому одному из пунктов 24 – 33, в которой фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или несколько солюбилизующих агентов.

35. Фармацевтическая композиция по пункту 34, в которой солюбилизующий агент выбирают из группы, которая состоит из полисорбата 20, полиэтоксифирированного касторового масла, полиэтиленгликоля (15)-гидроксистеарата, гидроксипропил-бета-циклодекстрина, сульфобутилового простого эфира-бета-циклодекстрина, гамма-циклодекстрина, и полисорбата 80.

36. Фармацевтическая композиция по пункту 35, в которой солюбилизующий агент представляет собой полисорбат 80, и буферный агент представляет собой лимонную кислоту.

37. Фармацевтическая композиция по пункту 36, в которой композиция представляет собой порошок или является лиофилизированной, которая, при восстановлении водой для инъекции, 0,9% физиологическим раствором или 5% мас./об. дает водный раствор, в котором концентрация (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата или его фармацевтически приемлемой соли составляет от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл.

38. Фармацевтическая композиция по пункту 37, при этом pH раствора препарата после восстановления находится в диапазоне от приблизительно 3 до приблизительно 5.

39. Фармацевтическая композиция по пункту 38, которая после восстановления имеет концентрацию полисорбата 80 составляет до приблизительно 5% мас./мас.
40. Фармацевтическая композиция по пункту 37, в которой фармацевтический порошок или лиофилизат имеет содержание воды меньше, чем приблизительно 1%.
41. Фармацевтическая композиция по любому одному из пунктов 24 – 40, яка представляет собой водный раствор, приемлемый для парентерального введения или является восстановленной водой для инъекций, 0,9% физиологическим раствором или 5% мас./об. декстрозой с получением водного раствора, приемлемого для парентерального введения.
42. Способ лечения коронавирусной инфекции у пациента, где способ включает введение терапевтически эффективного количества (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата; или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или гидрата, по любому одному из пунктов 5 – 23, пациенту, которому это необходимо.
43. Способ по пункту 42, по которому коронавирусная инфекция представляет собой COVID-19.
44. Способ по пункту 43, по которому от приблизительно 0,1 г до приблизительно 5 г (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата; или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или гидрата вводится ежедневно.
45. Способ по пункту 44, по которому от приблизительно 0,1 г до приблизительно 1 г (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутилдигидрофосфата; или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или гидрата внутривенно вводится ежедневно.
46. Способ лечения COVID-19 у пациента, где способ включает введение фармацевтической композиции, в соответствии с пунктом 41 пациенту, которому необходимо такое лечение.

47. Способ по любому одному из пунктов 42 – 46, по которому один или несколько дополнительных терапевтических агентов вводят пациенту.

48. Способ по пункту 47, по которому один или несколько дополнительных терапевтических агентов выбирают из группы, которая состоит из ремдесивира, галидесивира, фавилавира/авифавира, молнупиравира (МК-4482/EIDD 2801), АТ-527, АТ-301, BLD-2660, фавипиравира, камостата, SLV213 емтриктабина/тенофовира, клебудина, дальцетрапиба, боцепревира, АВХ464, дексаметазона, гидрокортизона, реконвалесцентной плазмы, гелсолина (Rhu-p65N), моноклональных антител, регданвимаба (Regkirova), равулизумаба (Ultomiris), VIR-7831/VIR-7832, BRII-196/BRII-198, COVI-AMG/COVI DROPS (STI-2020), бамланивимаба (LY-CoV555), маврилимаба, леронлимаба (PRO140), AZD7442, лензилумаба, инфликсимаба, адалимумаба, JS 016, STI-1499 (COVIGUARD), ланаделумаба (Takhzyro), канакинумаба (Ilaris), гимсилумаба, отилимаба, казиривимаба/имдевимаба (REGN-Cov2), МК-7110 (CD24Fc/SACCOVID), гепарина, аписабана, тоцилизумаба (Actemra), сарилумаба (Kevzara), апилимода димезилата, DNL758, PB1046, дапаглифозина, абивертиниба, АTR-002, бемцентиниба, акалабрутиниба, барицитиниба, тофацитиниба, лосмапимода, фамотидина, никлозамида и диминазена.

49. Способ по пункту 48, по которому один или несколько дополнительных агентов выбирают из группы, которая состоит из ремдесивира, дексаметазона, молнупиравира, бамланивимаба, тофацитиниба и барицитиниба.

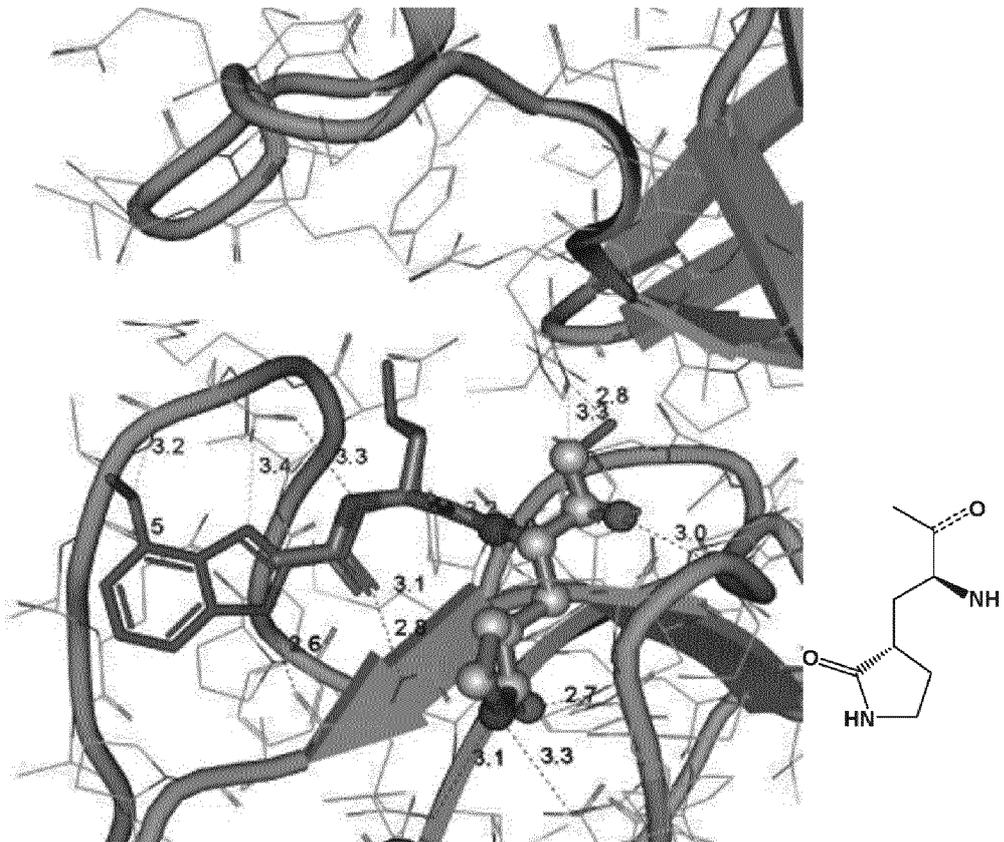
50. (3S)-3-({N-[(4-метокси-1H-индол-2-ил)карбонил]-L-лейцил}амино)-2-оксо-4-[(3S)-2-оксопирролидин-3-ил]бутил дигидрофосфат; или его фармацевтически приемлемая соль.

1/28

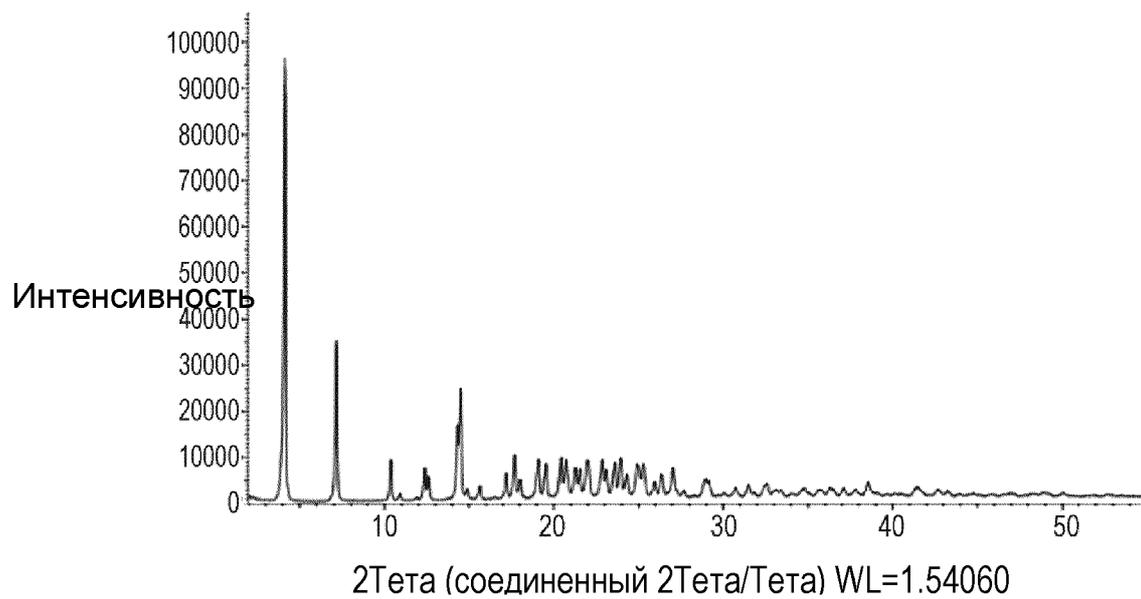
ФИГ. 1



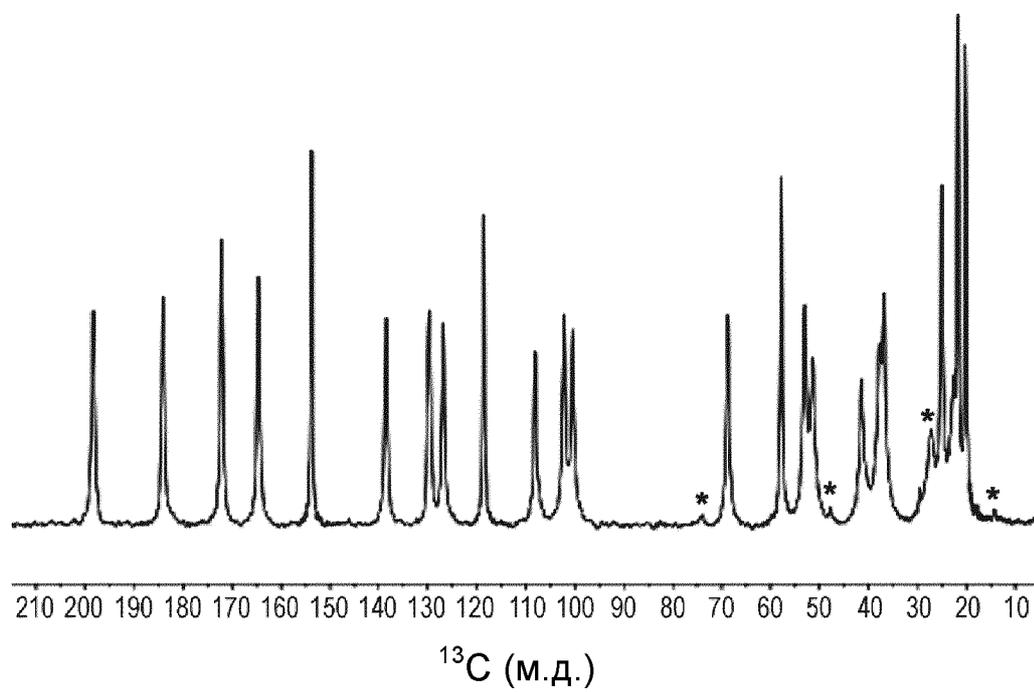
ФИГ. 2



ФИГ. 3

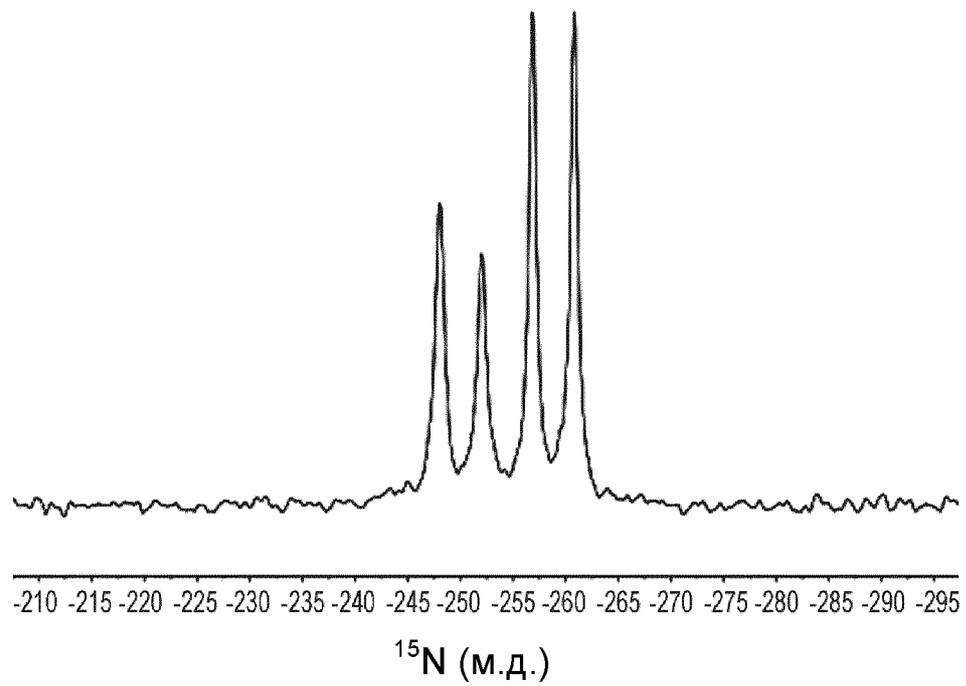


ФИГ. 4

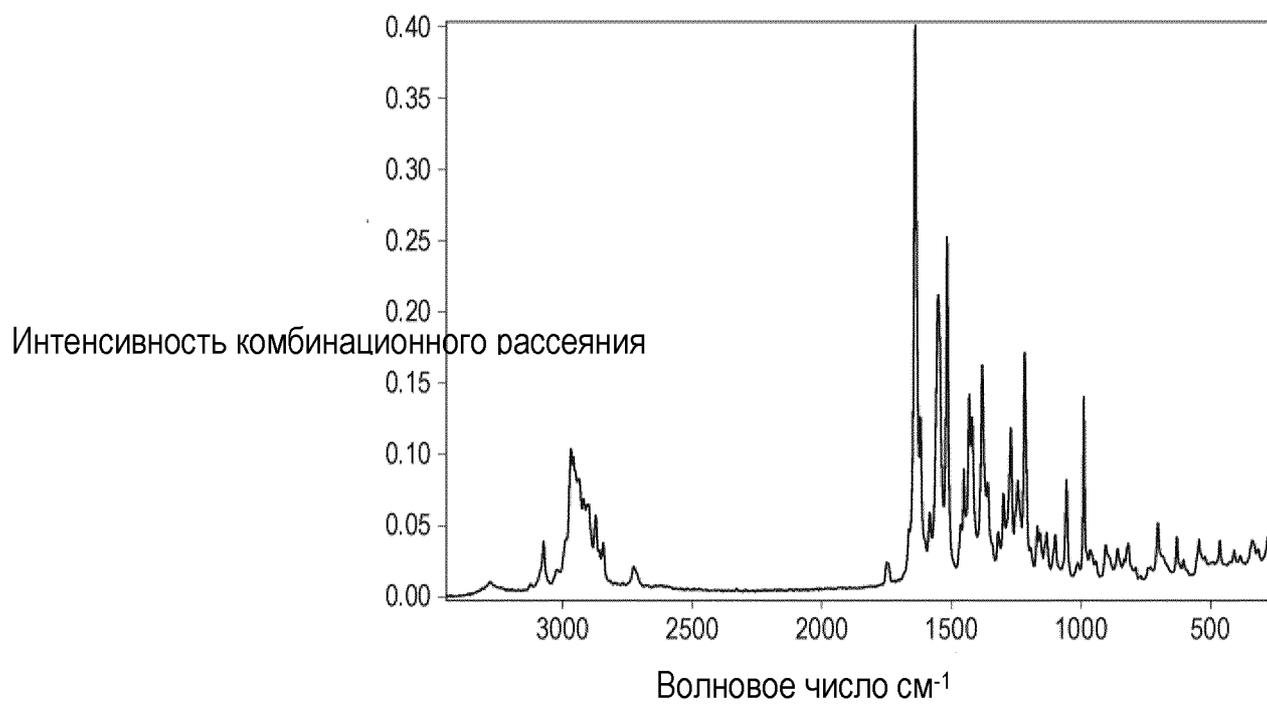


5/28

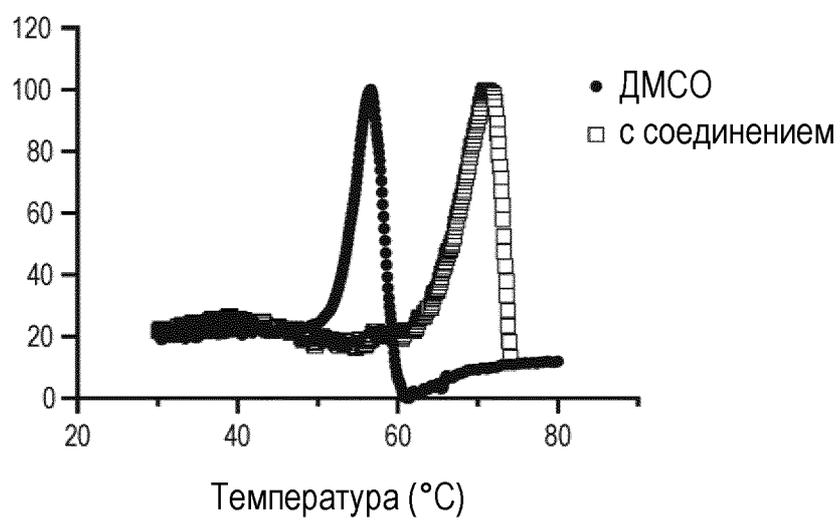
ФИГ. 5



ФИГ. 6

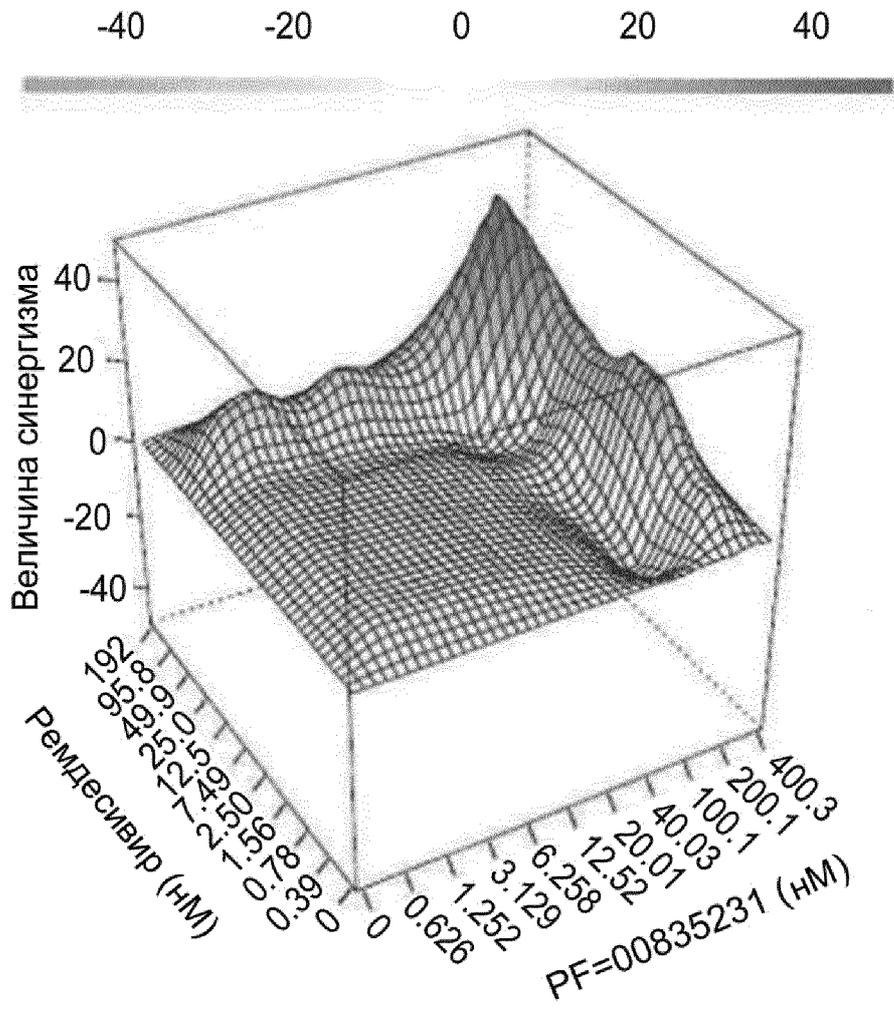


ФИГ. 7



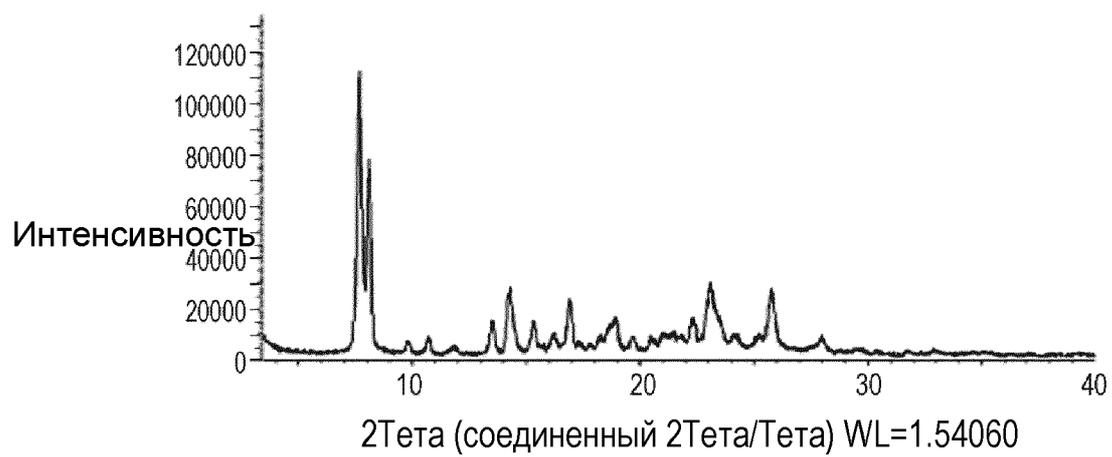
ФИГ. 8

Среднее значение синергизма: 5.823 (ZIP)



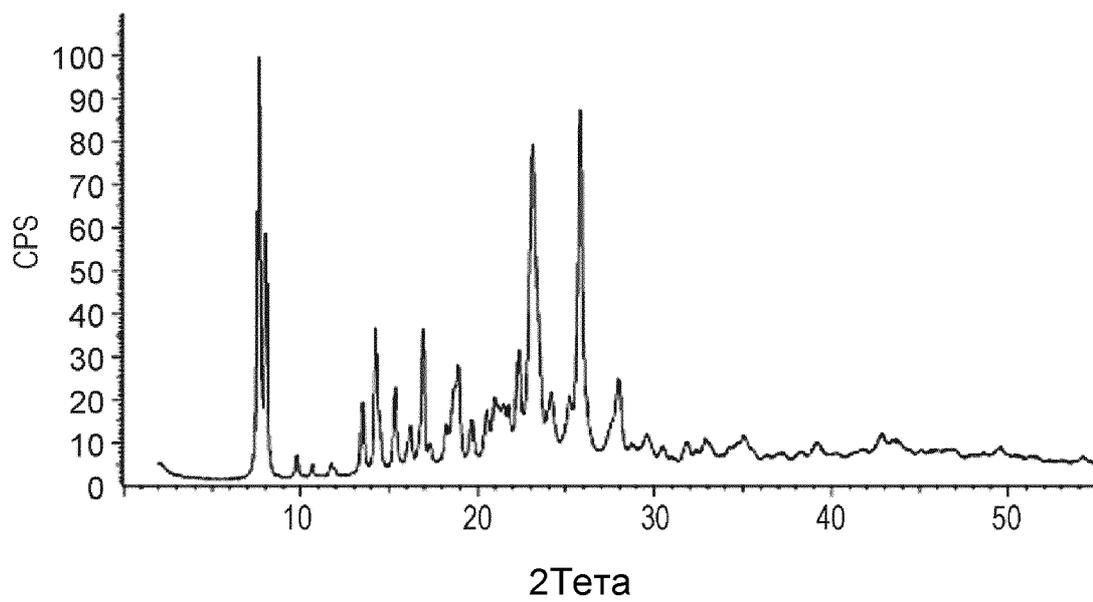
9/28

ФИГ. 9

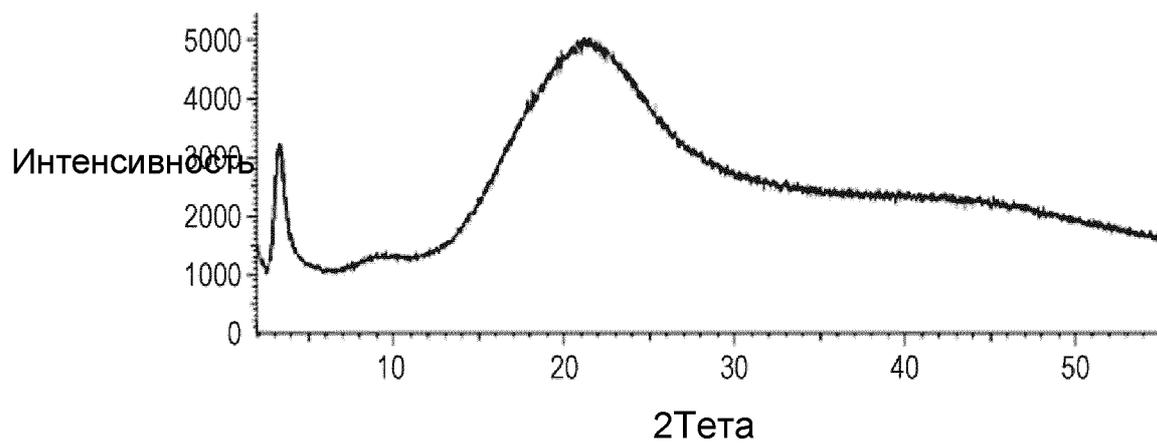


10/28

ФИГ. 10

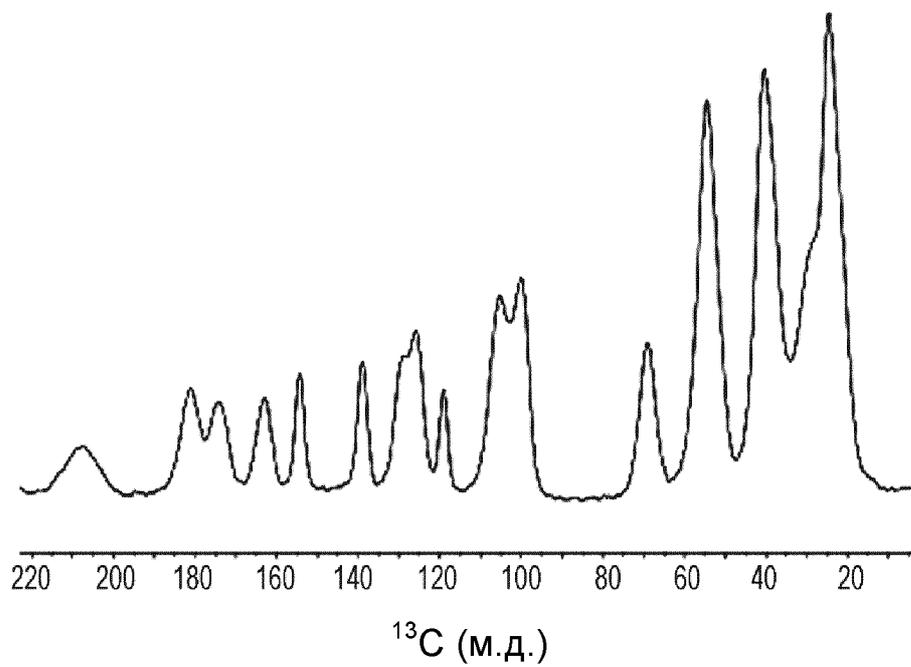


ФИГ. 11



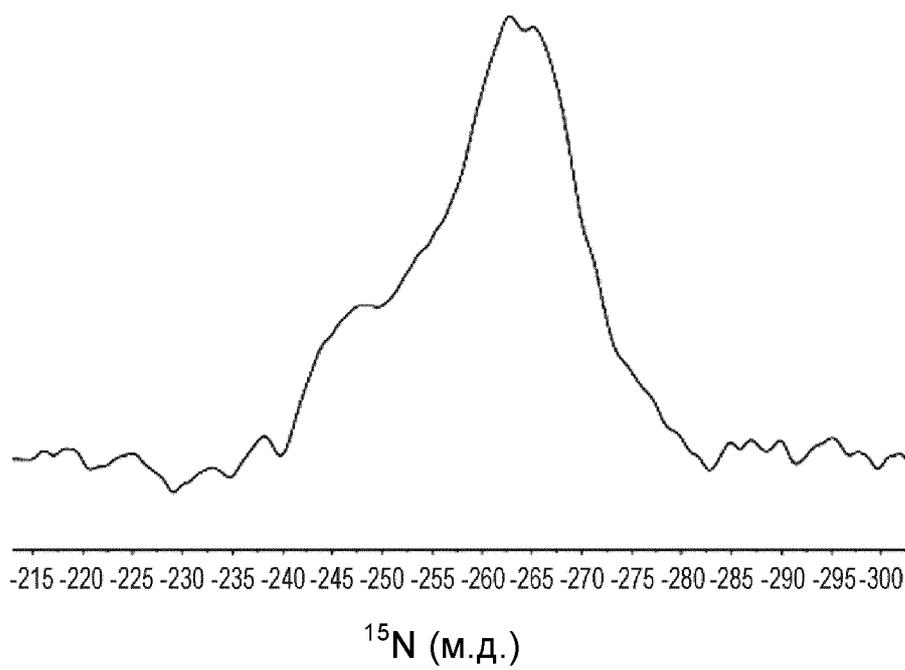
12/28

ФИГ. 12



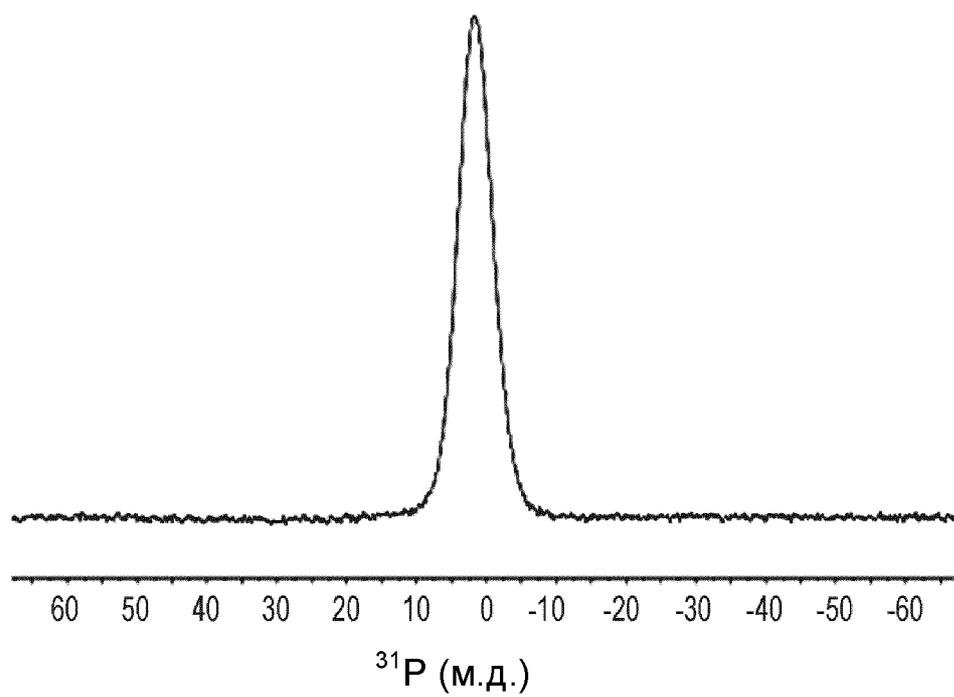
13/28

ФИГ. 13

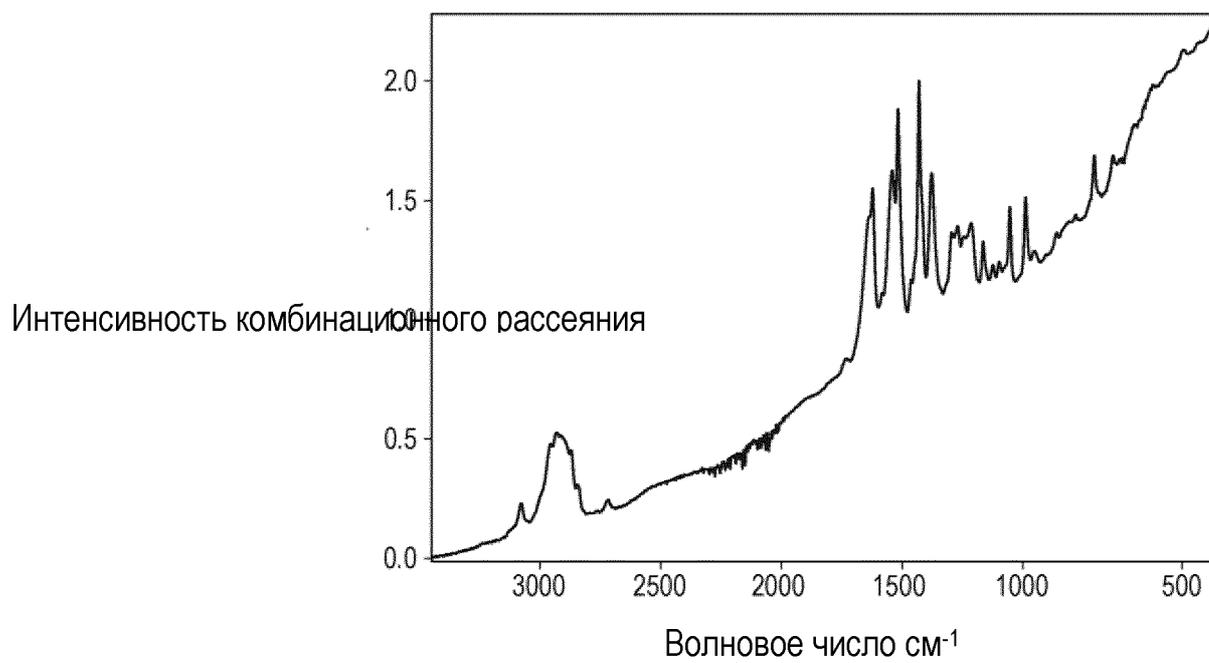


14/28

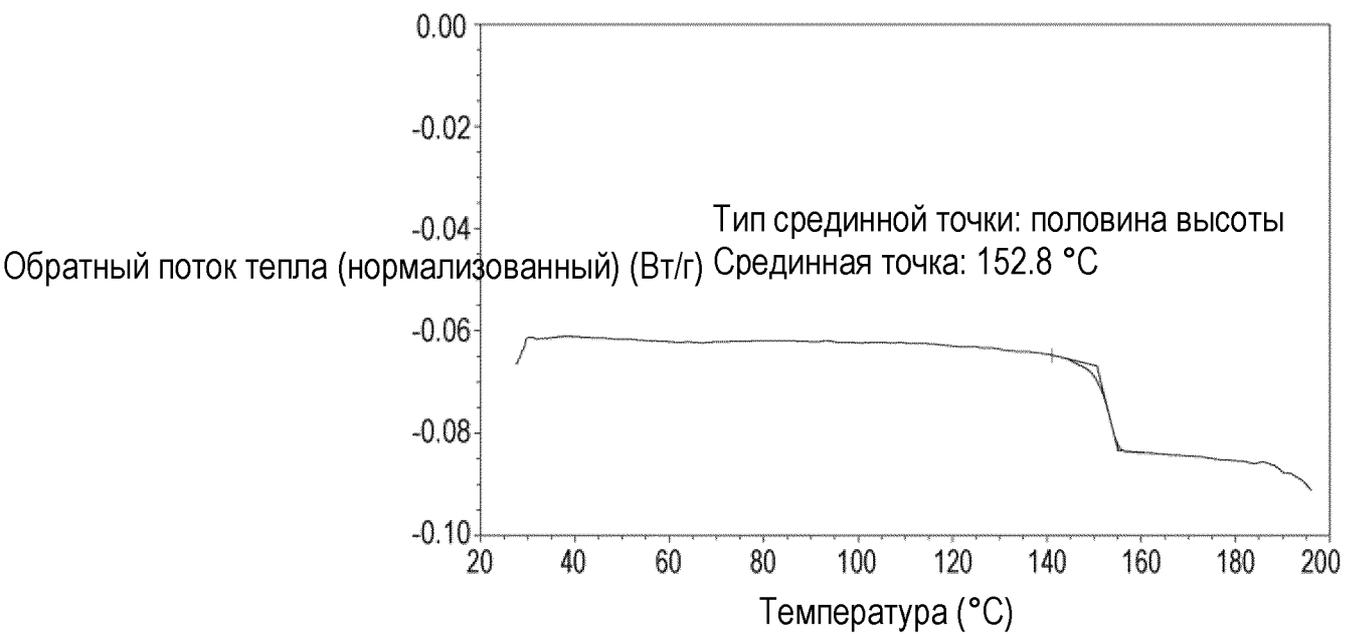
ФИГ. 14



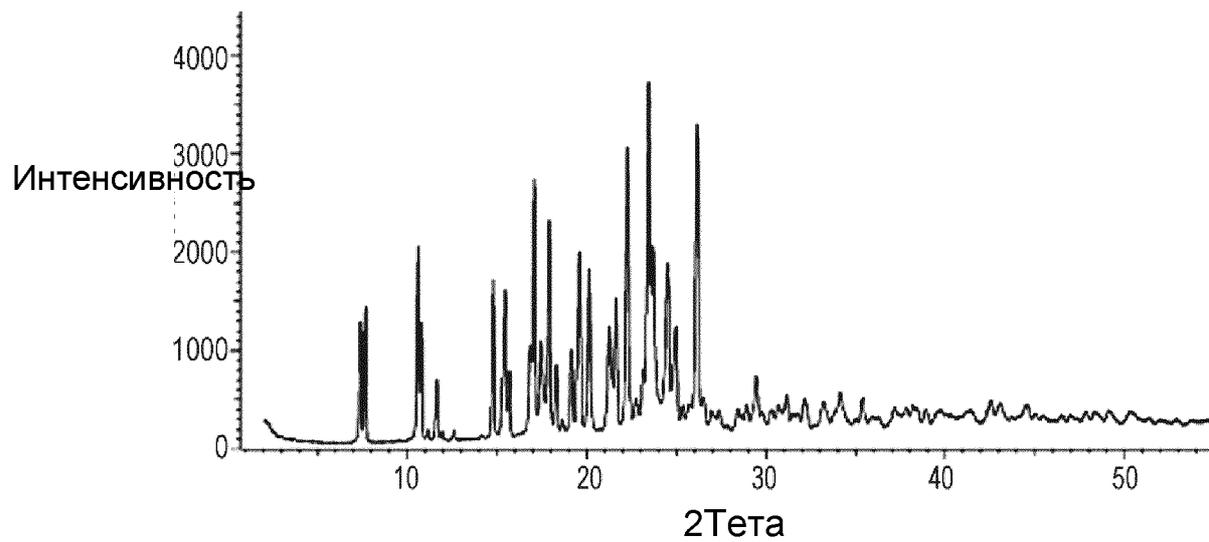
ФИГ. 15



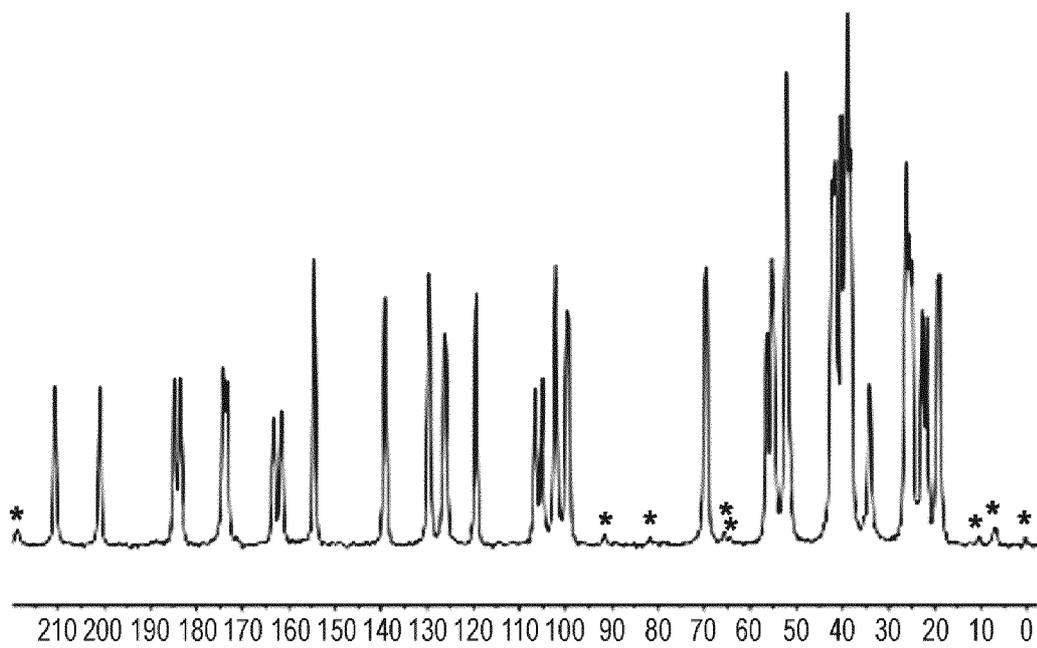
ФИГ. 16



ФИГ. 17

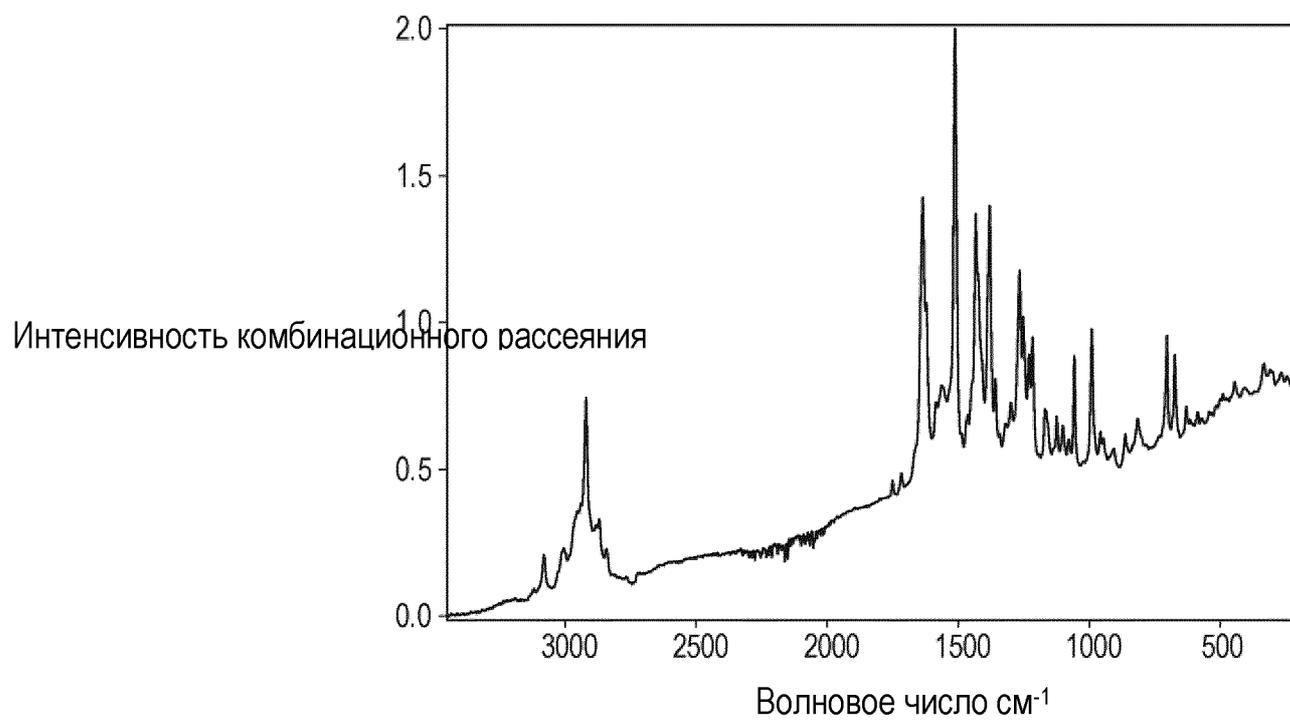


ФИГ. 18

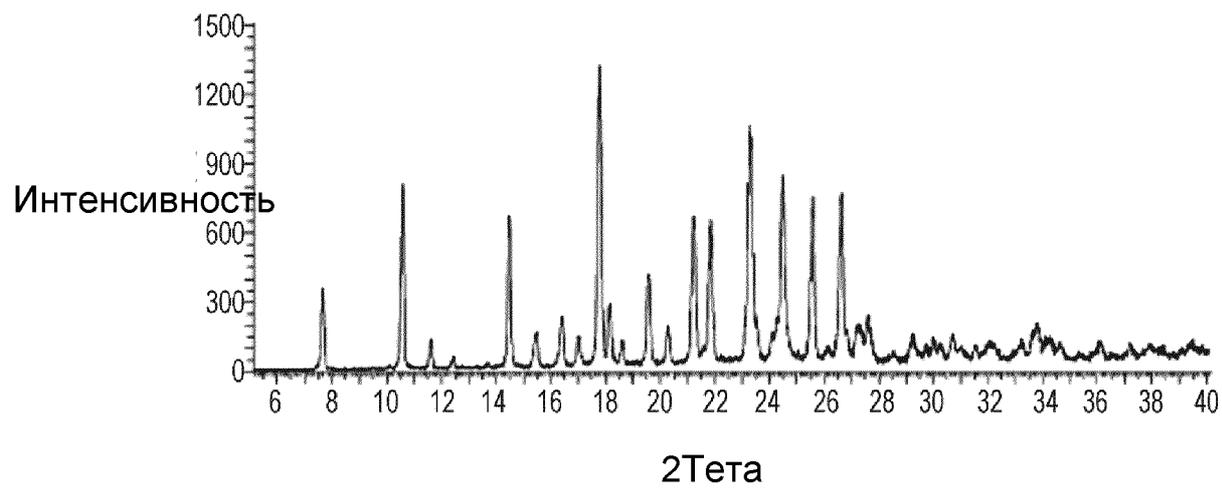


М.Д.

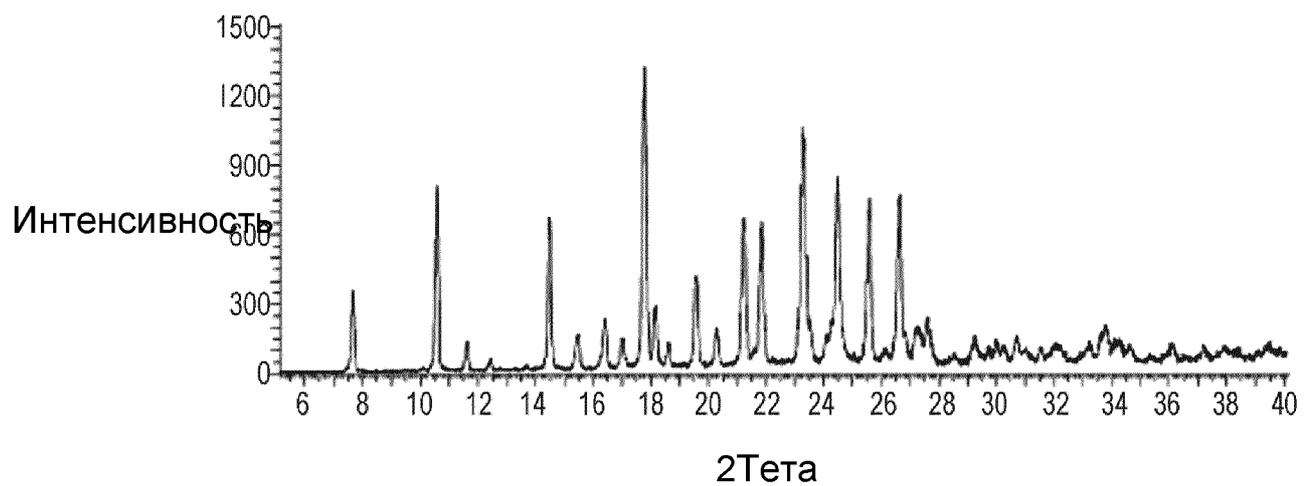
ФИГ. 19



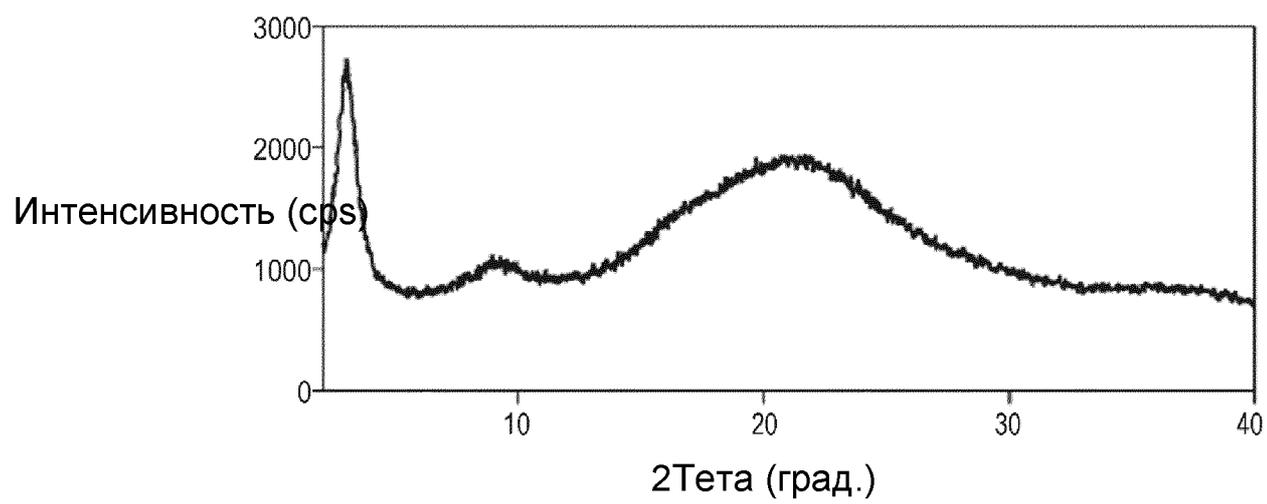
ФИГ. 20



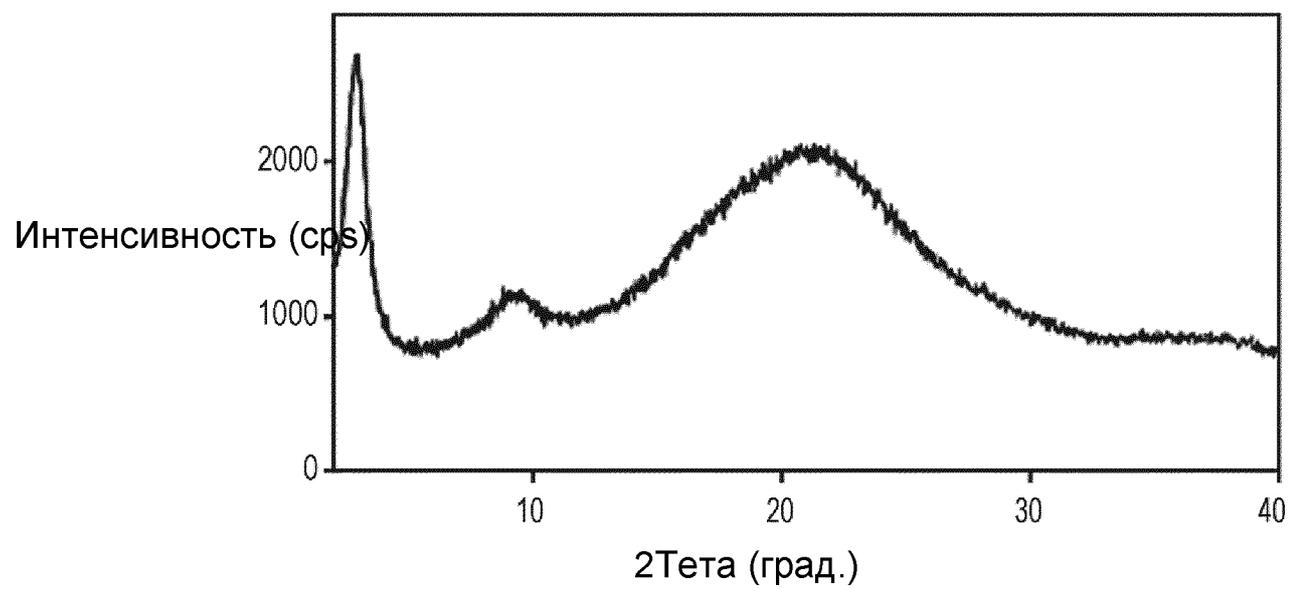
ФИГ. 21



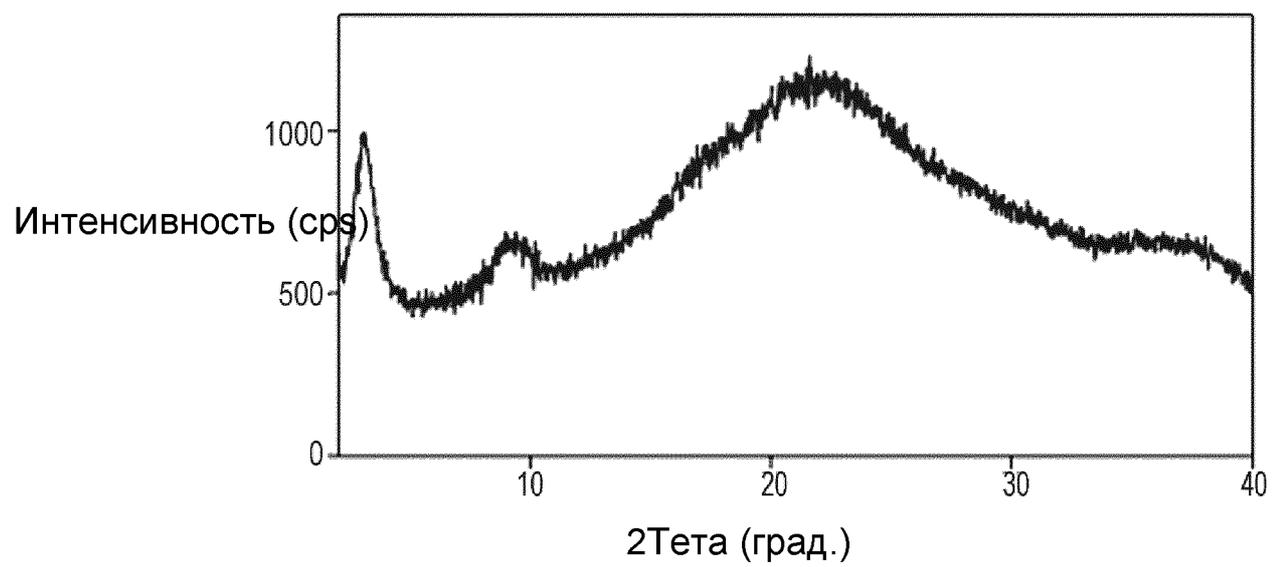
ФИГ. 22



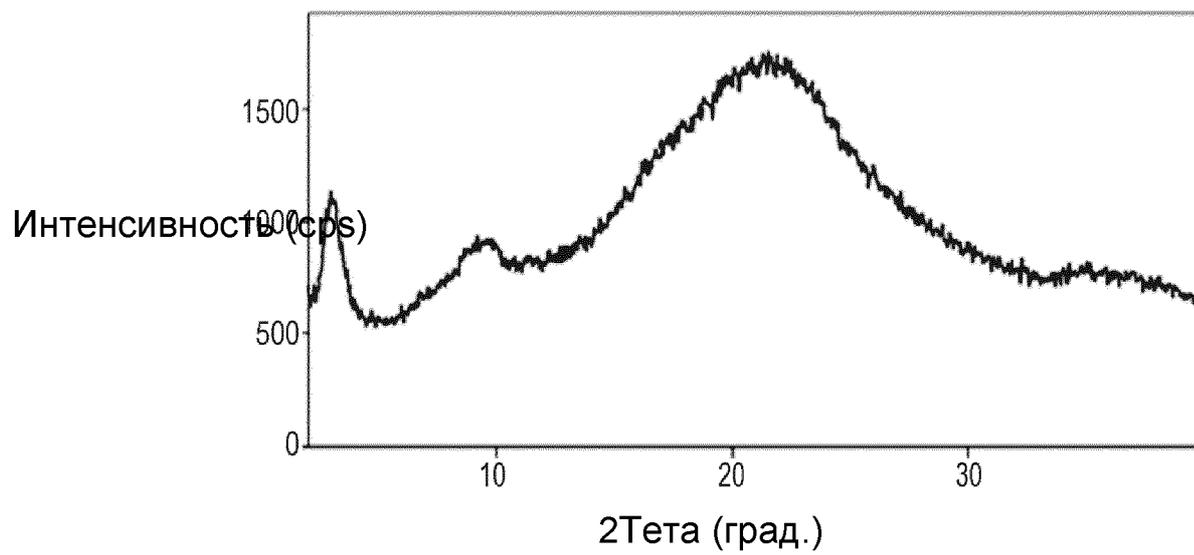
ФИГ. 23



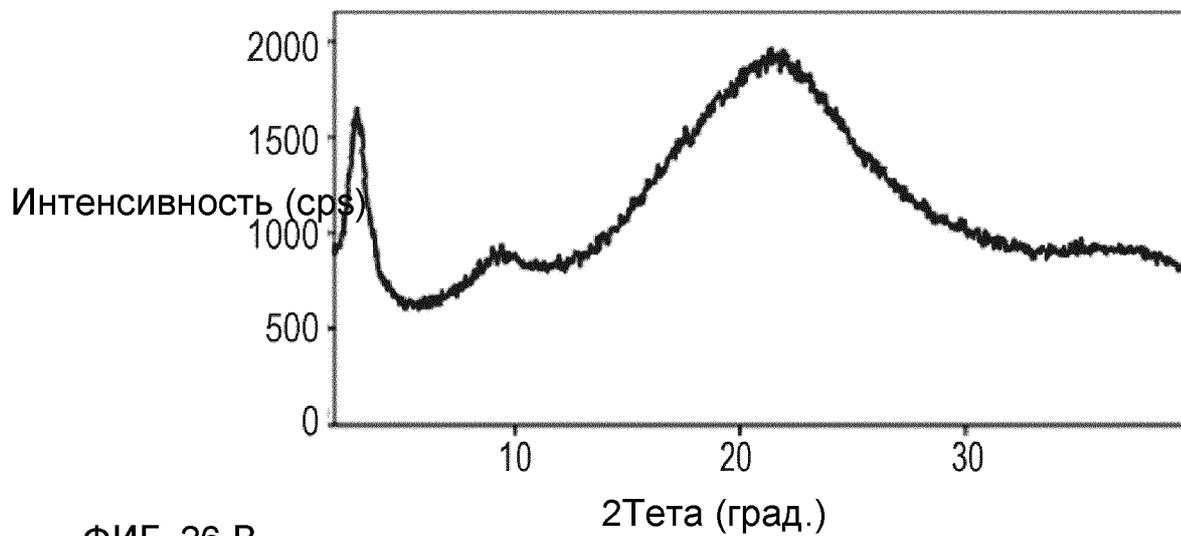
ФИГ. 24



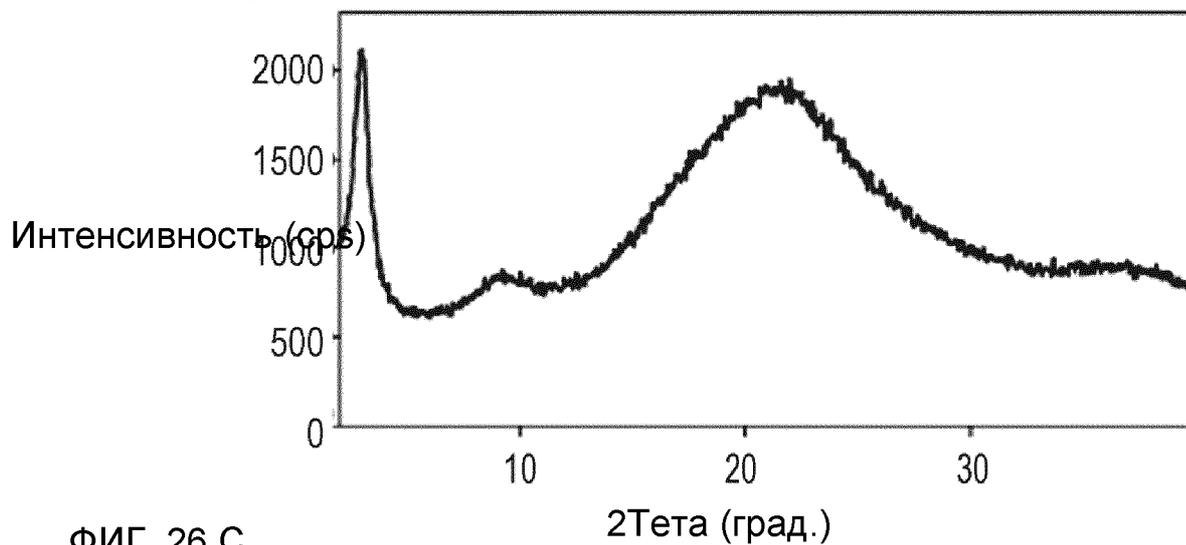
ФИГ. 25



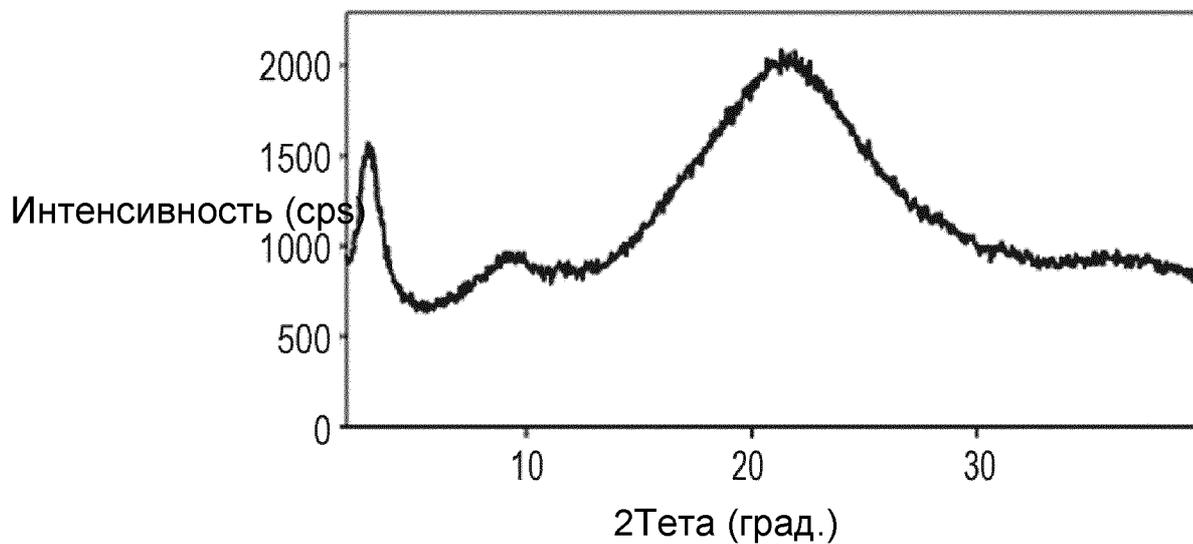
ФИГ. 26 А



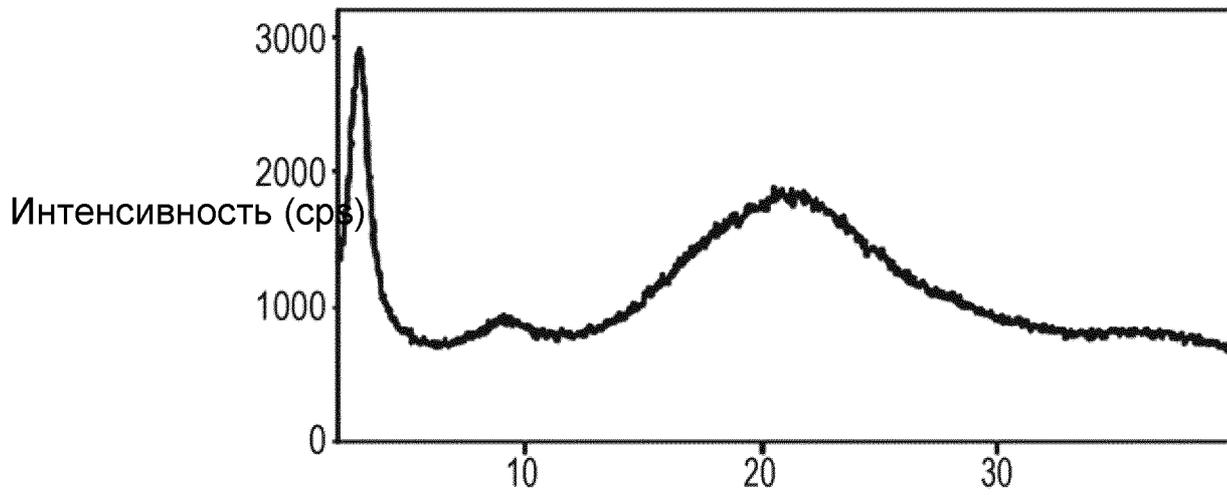
ФИГ. 26 В



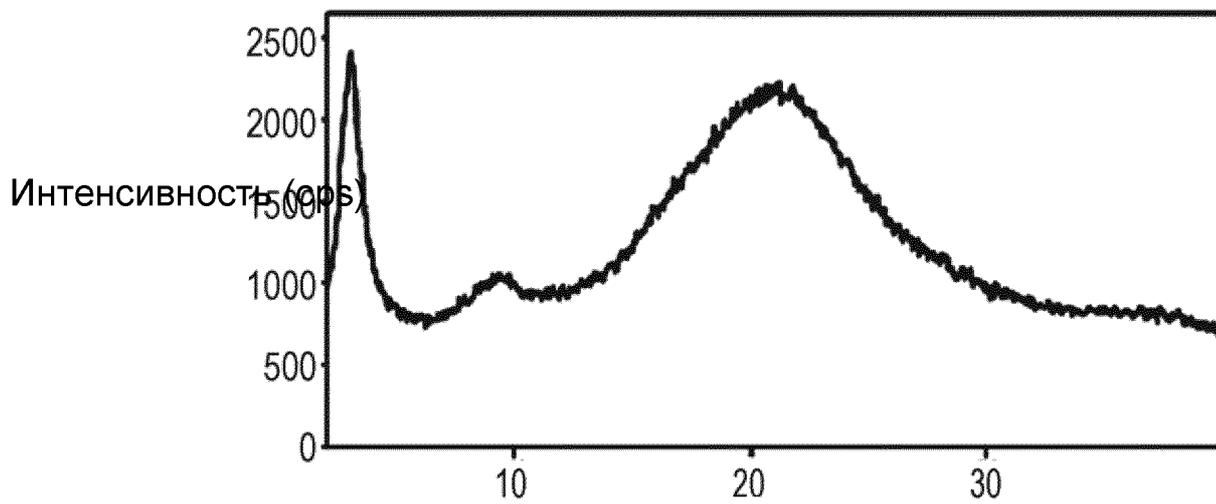
ФИГ. 26 С



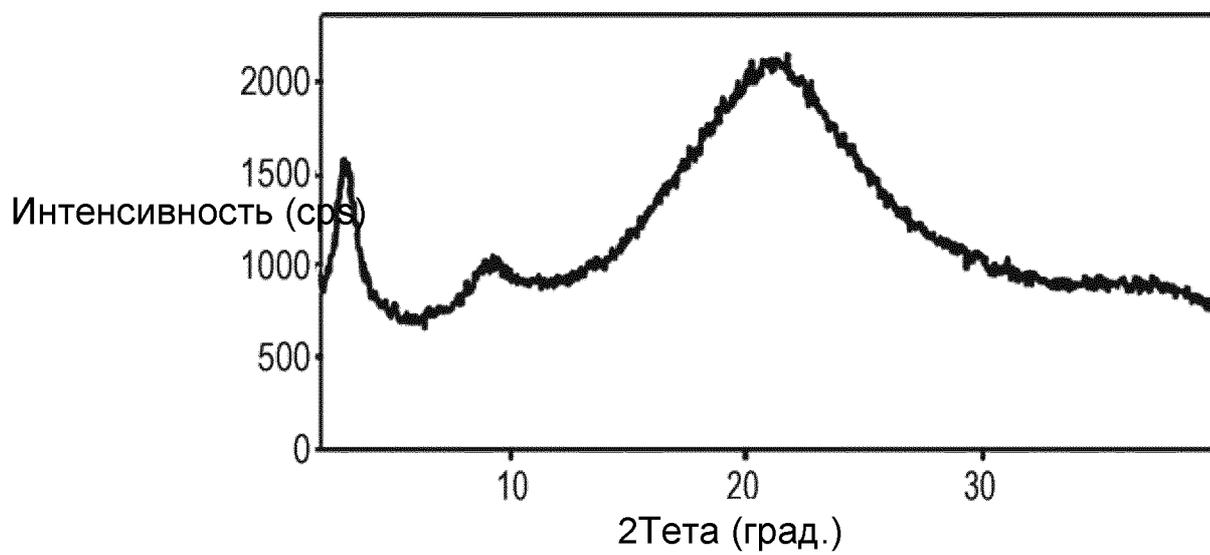
ФИГ. 27 А



ФИГ. 27 В



ФИГ. 27 С



ФИГ. 28

