

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202293337** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2023.03.14

(22) Дата подачи заявки  
2021.05.14

(51) Int. Cl. *A61K 31/56* (2006.01)  
*A61K 31/569* (2006.01)  
*A61K 31/575* (2006.01)  
*A61P 31/14* (2006.01)

---

(54) **СТЕРОЛЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ И/ИЛИ ПРОФИЛАКТИКЕ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2**

---

(31) 10202000011092

(32) 2020.05.14

(33) IT

(86) PCT/IB2021/054142

(87) WO 2021/229519 2021.11.18

(71) Заявитель:

**БАР ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ  
СОЧЬЕТА' А РЕСПОНСАБИЛИТА'  
ЛИМИТАТА (IT)**

(72) Изобретатель:

**Цампелла Анджела, Каталанотти  
Бруно, Фьоруччи Стефано (IT)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к стеролам для применения при профилактике и/или лечении вирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19).

**A1**

**202293337**

**202293337**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576893EA/019

### СТЕРОЛЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ И/ИЛИ ПРОФИЛАКТИКЕ ИНФЕКЦИИ SARS-COV-2 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Эта патентная заявка испрашивает приоритет в соответствии заявкой на выдачу патента Италии № 102020000011092, поданной 14 мая 2020 г., полное раскрытие которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ НАСТОЯЩЕЕ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к применению стеролов, включая желчные кислоты и их производные, для лечения и/или профилактики заболевания, вызванного инфекцией, вызванной SARS-CoV-2 (COVID-19).

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Слияние вируса SARS-CoV-2 с клеточной мембраной клетки-хозяина опосредуется специфическим связыванием спайкового гликопротеина (S) вируса с внеклеточным пептидазным доменом (PD) карбоксипептидазы, связанной с ангиотензин-превращающим ферментом (ACE2). Спайковый белок (белок Spike) вируса представляет собой тример, в котором присутствуют две области: S1 и S2. Механизм, посредством которого происходит связывание с рецептором ACE2, предусматривает конформационное изменение С-концевой области субъединицы S1, называемой RBD (Receptor Binding Domain), из закрытого состояния (называемого «down»), недоступного для связывания с рецептором, в метастабильное состояние (называемое «up») перед слиянием, в котором он принимает открытую конформацию, обеспечивая возможность связывания с рецептором ACE2. Связь между RBD и областью PD рецептора ACE2 вызывает конформационное изменение белка Spike, которое обнажает протеолитический сайт между областями S1 и S2, с последующим отделением субъединицы S1 от субъединицы S2. Это протеолитическое расщепление после слияния вызывает переход в состояние, ответственное за проникновение SARS-CoV-2, то есть за слияние вируса с мембраной клетки-хозяина.

Поиск соединений, способных вмешиваться в процесс слияния на уровне взаимодействия между спайковым белком SARS-CoV-2 и рецептором ACE2, представляет собой одну из стратегий, полезных для защиты от вирусной инфекции.

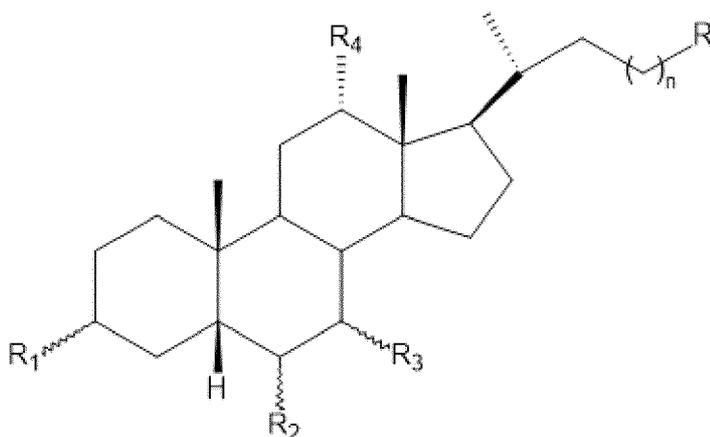
#### РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Целью настоящего изобретения является выявление новых соединений, обладающих противовирусной активностью в отношении SARS-CoV-2.

Эта цель достигается настоящим изобретением, в котором предложено применение соединений формулы (I), указанных в п.1 формулы изобретения, и соединений, указанных в п.5 формулы изобретения, а также противовирусных комбинаций соединений, как указано в п.7 формулы изобретения. Предпочтительные варианты осуществления изобретения представлены в зависимых пунктах формулы изобретения.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что описанные здесь стеролы обладают способностью ингибировать связывание спайкового белка SARS-CoV-2 с соответствующим рецептором ACE2 человека.

Согласно **первому аспекту** изобретения предложены соединения формулы (I) для применения при профилактике или лечении инфекций, вызванных SARS-CoV-2. В частности, это соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемый сольват или изомер, где:

R выбран из группы, состоящей из OH, COOH, OSO<sub>3</sub>Na, CONHCH<sub>2</sub>COOH, CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na;

n находится в диапазоне от 0 до 4;

R<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из H и OH;

R<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H и этила;

R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из H и OH;

R<sub>4</sub> выбран из группы, состоящей из H и OH.

В первом варианте осуществления изобретения соединения формулы (I) выбраны из группы, состоящей из следующих соединений:

Название	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	n
CDCA	COOH	αOH	H	αOH	H	1
GlycoCDCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	αOH	H	1
TauroCDCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	αOH	H	1
UDCA	COOH	αOH	H	βOH	H	1
GlycoUDCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	βOH	H	1
TauroUDCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	βOH	H	1
CA	COOH	αOH	H	αOH	αOH	1
GlycoCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	αOH	αOH	1
TauroCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	αOH	αOH	1
DCA	COOH	αOH	H	H	αOH	1
GlycoDCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	H	αOH	1

TauroDCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	H	αOH	1
LCA	COOH	αOH	H	H	H	1
GlycoLCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	H	H	1
TLCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	H	H	1
norCDCA	COOH	αOH	H	αOH	H	0
GlyconorCDCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	αOH	H	0
TauronorCDCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	αOH	H	0
norUDCA	COOH	αOH	H	βOH	H	0
GlyconorUDCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	βOH	H	0
TauronorUDCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	βOH	H	0
CDCA-C26	COOH	αOH	H	αOH	H	3
GlycoCDCA-C26	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	αOH	H	3
TauroCDCA-C26	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	αOH	H	3
UDCA-C26	COOH	αOH	H	βOH	H	3
GlycoUDCA-C26	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	βOH	H	3
TauroUDCA-C26	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	βOH	H	3
BAR802	COOH	αOH	αЭТИЛ	αOH	H	3
GlycoBAR802	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	αЭТИЛ	αOH	H	3
TauroBAR802	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	αЭТИЛ	αOH	H	3
OCA	COOH	αOH	αЭТИЛ	αOH	H	1
GlycoOCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	αЭТИЛ	αOH	H	1
TauroOCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	αЭТИЛ	αOH	H	1
BAR704	COOH	H	αЭТИЛ	αOH	H	1
GlycoBAR704	CONHCH <sub>2</sub> COOH	H	αЭТИЛ	αOH	H	1
TauroBAR704	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	H	αЭТИЛ	αOH	H	1
BAR710	COOH	βOH	αЭТИЛ	αOH	H	1
GlycoBAR710	CONHCH <sub>2</sub> COOH	βOH	αЭТИЛ	αOH	H	1
TauroBAR710	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	βOH	αЭТИЛ	αOH	H	1
BAR712	COOH	βOH	αЭТИЛ	βOH	H	1
GlycoBAR712	CONHCH <sub>2</sub> COOH	βOH	αЭТИЛ	βOH	H	1
TauroBAR712	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	βOH	αЭТИЛ	βOH	H	1
CDCOH	OH	αOH	H	αOH	H	2
C26-CDCOH	OH	αOH	H	αOH	H	4
NorUDCOH	OH	αOH	H	βOH	H	1
UDCOH	OH	αOH	H	βOH	H	2
C26-UDCOH	OH	αOH	H	βOH	H	4
BAR501	OH	αOH	βЭТИЛ	βOH	H	2

BAR502	ОН	$\alpha$ ОН	$\beta$ этил	$\alpha$ ОН	Н	1
BAR504	ОН	$\alpha$ ОН	$\beta$ этил	$\alpha$ ОН	Н	2
BAR701	ОН	Н	$\beta$ этил	$\alpha$ ОН	Н	2
BAR708	ОН	$\beta$ ОН	$\beta$ этил	$\beta$ ОН	Н	2
BAR804	OSO <sub>3</sub> Na	$\alpha$ ОН	$\beta$ этил	$\alpha$ ОН	Н	4
BAR803	ОН	$\alpha$ ОН	$\beta$ этил	$\alpha$ ОН	Н	4

В другом варианте осуществления изобретения в формуле (I) R выбран из группы, состоящей из ОН, COOH, OSO<sub>3</sub>Na и CONHCH<sub>2</sub>COOH, R<sub>1</sub> представляет собой Н или ОН, R<sub>3</sub> представляет собой ОН, и R<sub>4</sub> представляет собой Н.

Предпочтительно, когда соединения формулы (I) выбраны из группы, состоящей из UDCA, GlycoUDCA и GlycoCDCA, BAR501, BAR502 и BAR704, OCA, BAR804.

Специалистам в области органической химии понятно, что многие органические соединения могут образовывать комплексы с растворителями, в которых они вступают в реакции с другими соединениями, или из которых их осаждают или кристаллизуют. Эти комплексы известны как «сольваты». Например, комплекс с водой известен как «гидрат». Сольваты соединений по изобретению входят в объем настоящего изобретения. Соединения формулы (I) могут быть легко выделены в форме ассоциатов с молекулами растворителя путем кристаллизации или выпаривания соответствующего растворителя с получением соответствующих сольватов.

Соединения формулы (I) могут находиться в кристаллической форме. В некоторых вариантах осуществления изобретения кристаллические формы соединений формулы (I) представляют собой полиморфы.

Настоящее изобретение также включает меченые изотопами соединения, которые идентичны соединениям формулы (I), но отличающиеся тем, что в них один или несколько атомов замещены атомом или атомами, имеющими атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа атомов, которые обычно присутствуют в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения по изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, серы, фтора и хлора, такие как <sup>2</sup>H, <sup>3</sup>H, <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>17</sup>O.

Соединения по изобретению, которые содержат указанные выше изотопы и/или другие изотопы других атомов, входят в объем настоящего изобретения. Меченые изотопами соединения по изобретению, например соединения, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как <sup>3</sup>H и <sup>14</sup>C, можно использовать в анализах для оценки распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях. Изотопы трития или <sup>3</sup>H, и углерода-14 или <sup>14</sup>C, особенно предпочтительны из-за простоты их получения и обнаружения. Изотопы <sup>11</sup>C особенно полезны для использования в ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография). Кроме того, замена более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий или <sup>2</sup>H, может принести некоторые терапевтические преимущества в результате большей метаболической стабильности, например, за счет увеличения периода полужизни

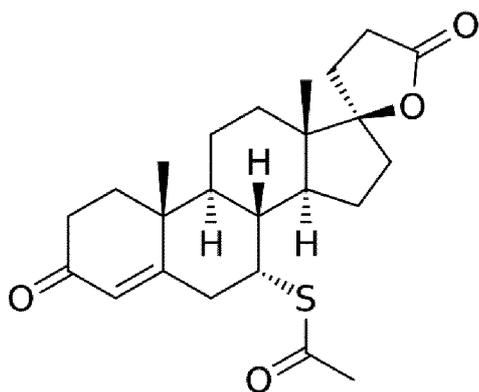
*in vivo*, или при необходимости снижения доз, и, следовательно, такая изотопная замена может быть рекомендована при некоторых обстоятельствах. Меченые изотопами соединения формулы (I) по изобретению могут быть получены, как правило, путем проведения процедур, описанных на приведенных ниже схемах и/или в примерах, с заменой немеченого изотопом реагента на легкодоступный реагент, меченный изотопом.

Некоторые группы/заместители, представленные в соединениях по изобретению, могут присутствовать в виде изомеров. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения соединения формулы (I) могут иметь аксиальную асимметрию, и, соответственно, они могут существовать в форме оптических изомеров, таких как (R)-форма, (S)-форма и т.п. Все эти изомеры, включая рацематы, энантиомеры и их смеси, входят в объем настоящего изобретения.

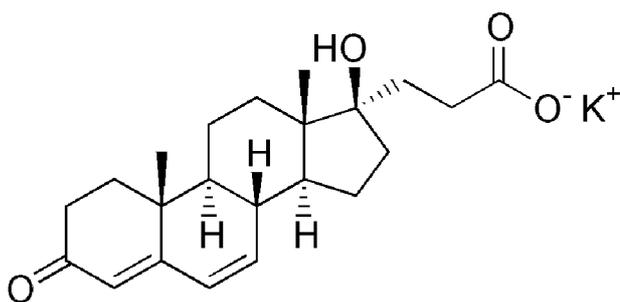
В частности, все стереоизомерные формы, включая энантиомеры, диастереоизомеры и их смеси, включая рацематы, включены в объем настоящего изобретения, и общая ссылка на соединения формулы (I) включает все их стереоизомерные формы, если не указано иное.

В целом, соединения (если они присутствуют), которые химически очень нестабильны как сами по себе, так и в воде, и, как следствие этого, они явно непригодны для фармацевтического применения при всех путях введения, таких как пероральный, парентеральный или любой другой, следует считать исключенными из соединений формулы (I) настоящего изобретения. Такие соединения известны специалистам в области химии.

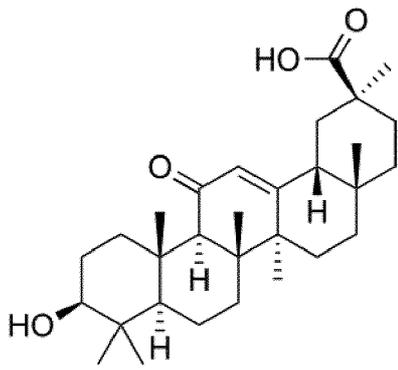
Согласно **второму аспекту** изобретения, при лечении и/или профилактике инфекций, вызванных SARS-CoV-2, предложено применение соединений, выбранных из группы, состоящей из:



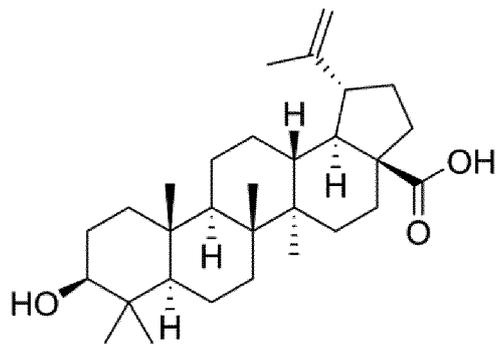
спиронолактона;



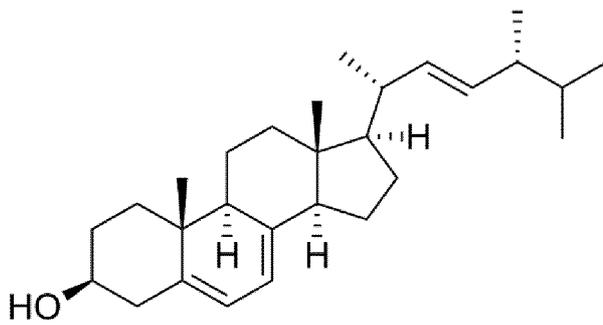
канреноата калия;



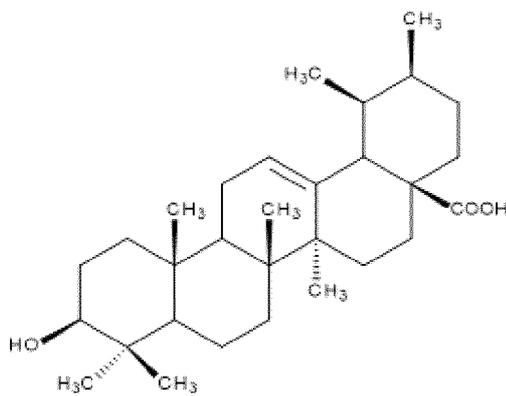
глицирретиновой кислоты;



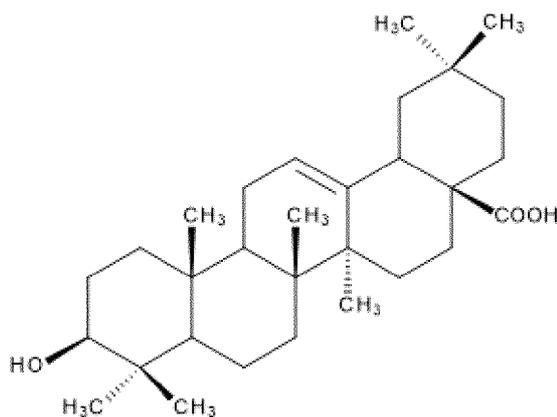
бетулиновой кислоты;



эргостерола;



урсоловой кислоты; и



олеаноловой кислоты.

Доказано, что соединения по изобретению эффективны при лечении и профилактике инфекций, вызванных SARS-CoV-2.

Соединения по изобретению, отдельно или в комбинации друг с другом, вместе с обычно используемым эксципиентом, могут быть включены в состав фармацевтических композиций и соответствующих единичных дозированных лекарственных форм. Эти формы могут представлять собой и использоваться в виде твердых субстанций, таких как таблетки или заполненные капсулы, или жидкостей, таких как растворы, суспензии, эмульсии, эликсиры или капсулы, заполненные этими жидкостями. Эти формы предназначены для перорального введения или для использования в виде стерильных инъекционных растворов для парентерального введения (включая подкожное или внутривенное введение).

Эти фармацевтические композиции и единичные дозированные лекарственные формы могут содержать ингредиенты в обычном процентном соотношении, с дополнительными соединениями или дополнительными активными ингредиентами, или без них, и эти единичные дозированные лекарственные формы могут содержать любое подходящее эффективное количество активного ингредиента, соразмерное используемому ежедневному диапазону дозировок.

Фармацевтические композиции, содержащие соединение по изобретению, могут быть изготовлены способом, хорошо известным специалистам в области фармацевтики, и они содержат по меньшей мере одно активное соединение. Как правило, соединения по изобретению представлены в композициях в фармацевтически эффективном количестве. Эффективное количество вводимого соединения обычно определяется врачом с учетом соответствующих обстоятельств, включая состояние, подлежащее лечению, выбранный путь введения, вводимое эффективное соединение, возраст, массу тела и реакцию каждого пациента, тяжесть симптомов у пациента и тому подобное.

Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить различными путями, включая пероральный, ректальный, подкожный, внутривенный, внутримышечный, интраназальный и легочный пути. Композиции для перорального введения могут иметь форму нерасфасованных жидких растворов или суспензий, или

нерасфасованных порошков. Однако для облегчения точной дозировки чаще всего композиции представлены в виде единичных дозированных лекарственных форм. Выражение «единичные дозированные лекарственные формы» относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для людей и других млекопитающих, причем каждая единичная дозированная лекарственная форма содержит заранее определенное количество активного ингредиента, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с фармацевтически приемлемым эксципиентом. Типичные единичные дозированные лекарственные формы включают предварительно заполненные ампулы или шприцы с жидкими композициями или пилюли, таблетки, капсулы и т.п. в случае твердых композиций, с предварительно заданной дозой.

Жидкие формы, подходящие для перорального введения, могут включать в своем составе подходящий водный или неводный носитель с буферными агентами, суспендирующими агентами и диспергаторами, красителями, флаворантами и т.п. Твердые формы могут включать, например, любой из следующих ингредиентов или соединений аналогичной природы: связующее, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиент, такой как крахмал или лактоза, дезинтегрирующий агент, такой как альгиновая кислота, Primogel или кукурузный крахмал; смазывающий агент, такой как стеарат магния; агент для повышения текучести, такой как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза, лактоза или сахарин; или флаворант, такой как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый флаворант.

Композиции для инъекций обычно основаны на стерильном растворе для инъекций или на забуференном фосфатом растворе, или на других носителях, используемых для инъекционных форм, которые известны в данной области техники.

Фармацевтические композиции могут быть в форме таблеток, пилюль, капсул, растворов, суспензий, эмульсий, порошков, суппозиторий и в виде составов с замедленным высвобождением.

Если желательно, то на таблетки можно нанести покрытие стандартными водными или неводными методами. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти композиции и препараты могут содержать по меньшей мере 0,1% активного соединения. Естественно, процентное содержание активного соединения в этих композициях может варьироваться, и оно предпочтительно может составлять от приблизительно 1 до приблизительно 60% от массы единичной дозированной лекарственной формы. В этих терапевтически полезных композициях активное соединение представлено в количестве, которое соответствует терапевтически эффективной дозе. Активное соединение также можно вводить интраназально, например, в виде жидких капель или спрея.

Таблетки, пилюли, капсулы и т.п. также могут содержать связующее, такое как трагакантовая камедь, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатин; эксципиенты, такие как фосфат кальция; дезинтегрирующий агент, такой как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота; смазывающий агент, такой как

стеарат магния; и подсластитель, такой как сахароза, лактоза или сахарин. Когда единичная дозированная лекарственная форма представляет собой капсулу, то, в дополнение к другим веществам указанного выше типа, она может содержать жидкую среду, такую как жирное масло. Различные другие материалы могут присутствовать в качестве агентов для покрытия или для изменения физической формы единичной дозированной лекарственной формы. Например, таблетки могут быть покрыты шеллаком, сахаром или тем и другим. Сироп или эликсир могут содержать, помимо активного ингредиента, сахарозу в качестве заменителя сахара, метил- и пропилпарабены в качестве консервантов, краситель и флаворант, такой как вишневый или апельсиновый флаворант. Для предотвращения распада лекарственной формы при прохождении ее через верхние отделы желудочно-кишечного тракта, композиция может быть представлена в форме с энтеросолюбильным покрытием.

Композиции для пульмонарного введения включают, без ограничения, сухие порошковые композиции, состоящие из порошка соединения формулы (I) и порошка подходящего носителя и/или смазывающего агента. Композиции для пульмонарного введения можно вдыхать из любого подходящего устройства для ингаляции сухого порошка, которые известны специалистам в данной области.

Введение композиций осуществляют по протоколу и в дозе, достаточной для уменьшения воспаления и боли у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения в фармацевтических композициях по изобретению активный ингредиент или активные ингредиенты обычно представлены в составе изготовленных единичных дозированных лекарственных форм. Единичная дозированная лекарственная форма может содержать от 0,1 до 1000 мг соединения формулы (I) в каждой единице дозированных лекарственных форм для ежедневного введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективные количества в конкретном лекарственном средстве будут зависеть от тяжести заболевания, недомогания или состояния, предшествующего лечению, состояния здоровья индивидуума и его реакции на лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления изобретения доза находится в диапазоне от 0,001 масс.% до приблизительно 60 масс.% по отношению к массе лекарственного средства/композиции.

При использовании соединения по изобретению в комбинации с одним или несколькими другими активными ингредиентами, другие активные ингредиенты можно использовать в меньших дозах, по сравнению с дозами при использовании каждого из них по отдельности.

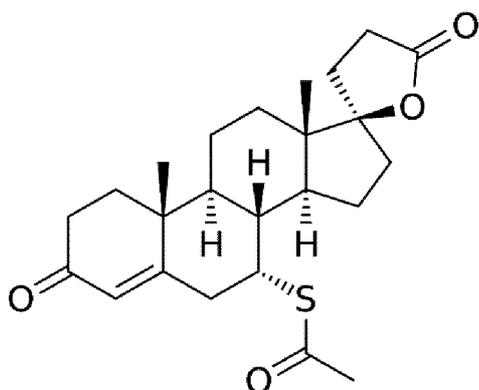
Что касается лекарственных средств/композиций, предназначенных для введения различными путями введения, то следует отметить, что способы и составы для введения лекарственных средств описаны в следующих справочниках: Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>th</sup> Edition, Gennaro et al. Ed., Mack Publishing Co., 1985; Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro AR ed. 20<sup>th</sup> Edition, 2000, Williams & Wilkins PA, USA; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, Lippincott Williams & Wilkins

Ed., 2005; и Lloyd V. Allen, Howard C. Ansel: Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 10<sup>th</sup> Edition, Lippincott Williams & Wilkins Ed., 2014.

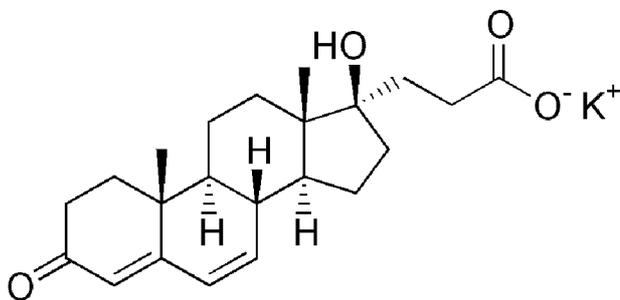
Конкретные компоненты, описанные выше для композиций, вводимых перорально или путем инъекций, являются только иллюстративными.

Соединения по изобретению также можно вводить в виде форм с замедленным высвобождением или с помощью систем введения с замедленным высвобождением для лекарственных средств.

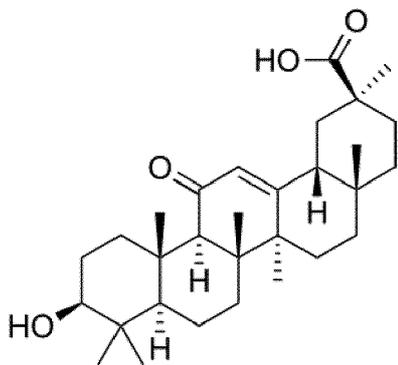
В частности, согласно **третьему аспекту** изобретения предложена противовирусная комбинация, содержащая по меньшей мере одно соединение формулы (I), как описано выше, и по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из:



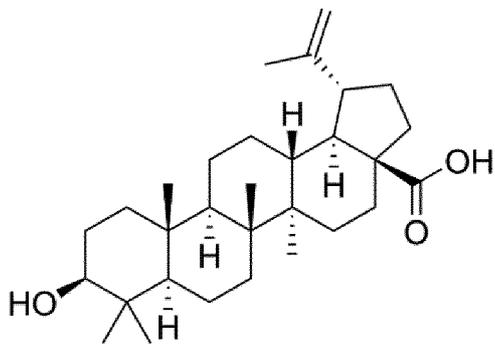
спиронолактона;



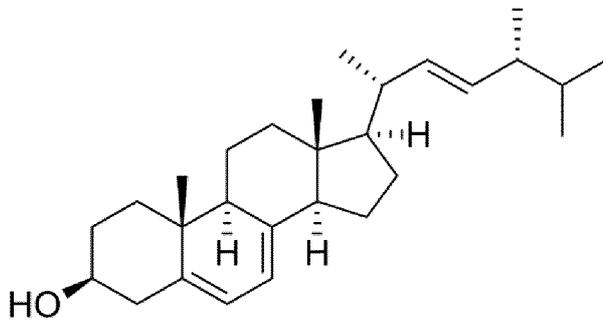
канреноата калия;



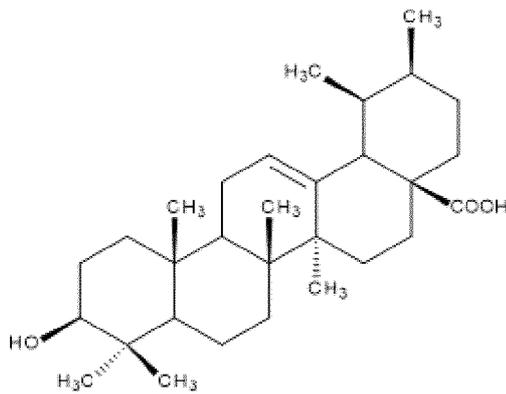
глицирретиновой кислоты;



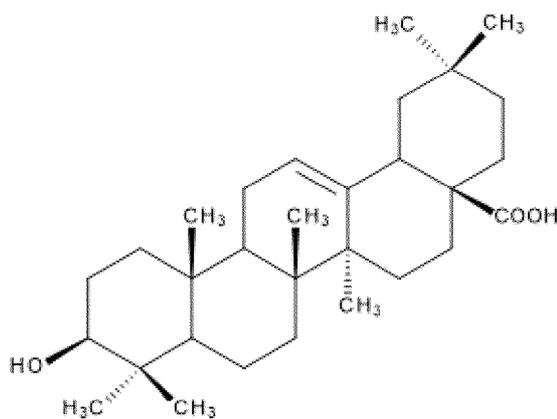
бетулиновой кислоты;



эргостерола;



урсоловой кислоты; и



олеаноловой кислоты.

Дополнительные характеристики настоящего изобретения станут более очевидными из некоторых неограничивающих примеров, описанных ниже, которые представлены исключительно в иллюстративных целях.

## ПРИМЕРЫ

## Пример 1. Виртуальный скрининг области RBD спайкового белка SARS-CoV-2.

Авторы изобретения провели виртуальный скрининг библиотеки лекарственных средств, одобренных FDA, в отношении потенциальных карманов связывания, идентифицированных в области RBD домена S1 спайкового белка SARS-CoV-2.

Поиск карманов связывания проводили с помощью программы Fpocket (Le Guilloux V et al. BMC Bioinformatics, 2009, 10, 168) на веб-сервере, и для первого скрининга базы данных лекарственных средств, одобренных FDA, было выделено 6 карманов. Библиотека лекарственных средств, одобренная FDA, была получена как с веб-сайта DrugBank (<https://www.drugbank.ca/releases/latest#structures>) (2106 соединений), так и с веб-сайта FDA (<https://www.selleckchem.com./screening/fda-approved-drug-library.html>) (всего 2638). Каждая база данных была преобразована в 3D-образы с помощью программы LigPrep (Schrödinger Release 2018-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018) с учетом степени протонирования при физиологическом pH 7,4. Затем две библиотеки были объединены и из нее удалены дубликаты; при этом библиотека включала в общей сложности 2906 лекарственных средств.

Структура, использованная для присоединения, была получена из банка данных белков (PDB ID 6SVB, разрешение 3,64 Å), и она соответствовала структуре спайкового гликопротеина 2019-nCoV в состоянии до слияния (Wrapp D. et al. Science. 2020, 367, 1260-1263). Недостающие области структуры 6SVB были построены с использованием веб-сервера SwissModel (Bertoni, M. et al. Scientific Reports 2017, 7). Качество полученной модели оценивали по значению параметра QMEAN, равному -2,67.

Скрининг проводили с помощью программы AutoDock4.2.6 (Morris, GM et al. J. Computational Chemistry 2009, 16, 2785-91) и графического интерфейса Raccoon2 (Forli, S. Nature Protocols, 2016, 11, 905-919), используя ламарковский метод конформационного гибридного поиска (LGA), который объединяет два алгоритма конформационного поиска, а именно алгоритмы генетического (GA) и локального поиска (LS). Для каждого из 2906 лекарственных средств были разработаны по три объемных модели, полученные обработкой программой с использованием 250000 стадий GA и 300 стадий LS.

По результатам виртуального скрининга авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что некоторые соединения, имеют сродство (в различной степени) к большинству карманов. Поэтому связывание стеролов по изобретению дополнительно анализировали с помощью скрининга по более строгому протоколу с использованием 20 объемных моделей лигандов, которые были получены программной обработкой с использованием 25000000 стадий GA и 300 стадий LS.

Результаты, полученные для некоторых соединений по изобретению, приведены в Таблице 1, в которой приведены значения показателя ADscore, выраженные в ккал/моль.

**Таблица 1**

Соединение	ADscore	Карман
GlycoCA	-5,7	3

HDCA	-6,47	1
UDCA	-7,52	5
TauroUDCA	-7,36	1
TauroCA	-5,68	5
CDCA	-7,34	5
DCA	-7,03	5
GlycoCDCA	-7,6	6
GlycoUDCA	-7,33	6
GlycoDCA	-7,23	1
Spirolactone	-7,71	3
Oleanolic acid_	-8,19	1
Betulinic acid	-7,4	1
Glycyrrhetic acid_	-7,5	1
BAR304	-8,69	5
BAR802	-8,3	5
BAR804	-8,04	5
GlycoBAR712	-7,12	2
GlycoBAR802	-6,4	2
	-7,27	1
BAR708	-7,88	2
BAR712	-7,83	2
BAR501	-7,72	5
TauroBAR704	-7,7	1
GlycoBAR704	-7,66	1
BAR701	-7,46	6
BAR703	-7,4	6
BAR504	-7,3	5
BAR502	-7,3	5
BAR704	-7,2	1

### **ПРИМЕР 2. Биологическая активность**

Взаимодействие ACE2 и спайкового белка (Spike) SARS-CoV-2 оценивали с помощью метода ELISA, используя набор для скрининга ингибиторов (Inhibitor Screening Assay Kit от BPS Bioscience (кат.№ 79936) в соответствии с инструкциями производителя. Набор предназначен для скрининга и профилирования ингибиторов взаимодействия между рецептором ACE2 и RBD спайкового белка.

На первой стадии эксперимента белок ACE2 человека связывали с 96-луночным планшетом, имеющим никелевое покрытие. Затем белок SARS-CoV2-Spike (RBD) инкубировали с ACE2 внутри лунок (положительный контроль - только ACE2) или в

присутствии тестируемого соединения. Эффективность набора связана с его высокой чувствительности к антителам, конъюгированным с HRP, направленным против Fc-фрагмента человека, конъюгированного со спайковым белком (анти-Fc-HRP). Затем планшет обрабатывали антителом анти-Fc-HRP, и после инкубации добавляли субстрат HRP, вызывая тем самым хемилюминесценцию, которую измеряли с использованием планшет-ридера FluoStar Omega.

Данные по активности некоторых соединений по изобретению приведены в Таблице 2 в виде процента ингибирования взаимодействия ACE2 и спайкового белка SARS-CoV-2. Соединения тестировали в различных концентрациях в диапазоне от 0,1 мкМ до 100 мкМ, с концентрацией спайкового белка, равной 5 нМ (из диапазона 0,1-100 нМ), в отношении которой определяли дозозависимое увеличение люминесценции.

Таблица 2

Соединение	10 мкМ	5 мкМ	1 мкМ	0,1 мкМ	100 мкМ
UDCA		3,315547	5,755289788	6,307267709	
CDCA		4,198712	8,404783809	4,121435143	
GlycoUDCA	4,187672	7,091076	10,27046918	9,530818767	
GlycoCDCA	3,293468	14,22263	16,66237351	9,354185833	
BAR501	7,477461	24,27967	13,7700092	8,53725851	
BAR502	12,27967	10,13799	15,53633855	13,68169273	
BAR704	17,11954	23,9816	25,00727	29,72217111	
TauroUDCA			1,527138914	4,971481141	
GlycoCDCA+ UDCA					21,59338
BAR804	27,96528		2,903246	1,78351	
OCA	34,72037		0,658884		
Канреноат калия	26,31257		20,25670803	8,594829167	
Олеаноловая кислота	40,22615		11,07878492		
Глициррети- новая кислота	31,9137		11,26459263		
Бетулиновая кислота	16,36431	21,42042	28,5850966	18,61637534	

Численные значения, приведенные в Таблице 2, рассчитывали как процентную разницу между величиной люминесценции положительного контроля (пик для 5 нМ

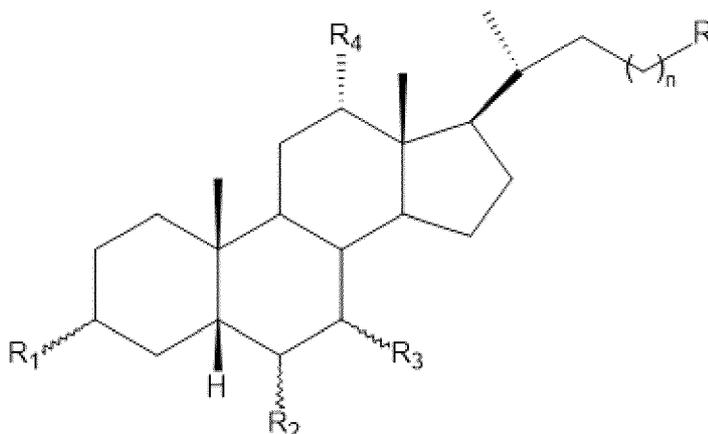
условно принят за 100%) и величиной люминесценции в присутствии тестируемого соединения-ингибитора.

Примерами отобранных соединений по изобретению являются Glyco UDCA и Glyco CDCA, BAR501, BAR502 и BAR704, OCA, BAR804, канреноат калия (эндогенный метаболит спиронолактона), олеаноловая кислота, глицирретиновая кислота и бетулиновая кислота, которые обладают высокой способностью к ингибированию связывания спайкового белка (белка Spike) с рецептором ACE2.

Также представляет интерес комбинация GlycoCDCA и UDCA, которая показала свою эффективность в отношении ингибирования взаимодействия спайкового белка (белка Spike) с рецептором ACE2 в концентрации 100 мкМ.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемый сольват или изомер, где:

R выбран из группы, состоящей из OH, COOH, OSO<sub>3</sub>Na, CONHCH<sub>2</sub>COOH, CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na;

n находится в диапазоне от 0 до 4;

R<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из H и OH;

R<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H и этила;

R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из H и OH;

R<sub>4</sub> выбран из группы, состоящей из H и OH;

для применения при профилактике или лечении вирусных инфекций, вызванных SARS-CoV-2.

2. Соединение формулы (I) для применения по п.1, где соединение выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:

Название	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	n
CDCA	COOH	αOH	H	αOH	H	1
GlycoCDCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	αOH	H	1
TauroCDCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	αOH	H	1
UDCA	COOH	αOH	H	βOH	H	1
GlycoUDCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	βOH	H	1
TauroUDCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	βOH	H	1
CA	COOH	αOH	H	αOH	αOH	1
GlycoCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	αOH	αOH	1
TauroCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	αOH	αOH	1
DCA	COOH	αOH	H	H	αOH	1
GlycoDCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	H	αOH	1
TauroDCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	H	αOH	1
LCA	COOH	αOH	H	H	H	1

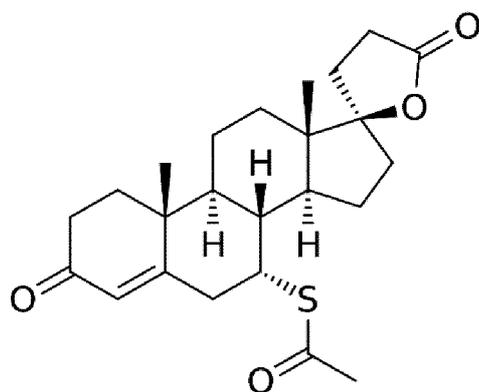
GlycoLCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	H	H	1
TLCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	H	H	1
norCDCA	COOH	αOH	H	αOH	H	0
GlyconorCDCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	αOH	H	0
TauronorCDCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	αOH	H	0
norUDCA	COOH	αOH	H	βOH	H	0
GlyconorUDCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	βOH	H	0
TauronorUDCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	βOH	H	0
CDCA-C26	COOH	αOH	H	αOH	H	3
GlycoCDCA-C26	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	αOH	H	3
TauroCDCA-C26	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	αOH	H	3
UDCA-C26	COOH	αOH	H	βOH	H	3
GlycoUDCA-C26	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	H	βOH	H	3
TauroUDCA-C26	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	H	βOH	H	3
BAR802	COOH	αOH	αЭТИЛ	αOH	H	3
GlycoBAR802	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	αЭТИЛ	αOH	H	3
TauroBAR802	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	αЭТИЛ	αOH	H	3
OCA	COOH	αOH	αЭТИЛ	αOH	H	1
GlycoOCA	CONHCH <sub>2</sub> COOH	αOH	αЭТИЛ	αOH	H	1
TauroOCA	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	αOH	αЭТИЛ	αOH	H	1
BAR704	COOH	H	αЭТИЛ	αOH	H	1
GlycoBAR704	CONHCH <sub>2</sub> COOH	H	αЭТИЛ	αOH	H	1
TauroBAR704	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	H	αЭТИЛ	αOH	H	1
BAR710	COOH	βOH	αЭТИЛ	αOH	H	1
GlycoBAR710	CONHCH <sub>2</sub> COOH	βOH	αЭТИЛ	αOH	H	1
TauroBAR710	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	βOH	αЭТИЛ	αOH	H	1
BAR712	COOH	βOH	αЭТИЛ	βOH	H	1
GlycoBAR712	CONHCH <sub>2</sub> COOH	βOH	αЭТИЛ	βOH	H	1
TauroBAR712	CONH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na	βOH	αЭТИЛ	βOH	H	1
CDCOH	OH	αOH	H	αOH	H	2
C26-CDCOH	OH	αOH	H	αOH	H	4
NorUDCOH	OH	αOH	H	βOH	H	1
UDCOH	OH	αOH	H	βOH	H	2
C26-UDCOH	OH	αOH	H	βOH	H	4
BAR501	OH	αOH	βЭТИЛ	βOH	H	2
BAR502	OH	αOH	βЭТИЛ	αOH	H	1
BAR504	OH	αOH	βЭТИЛ	αOH	H	2

BAR701	ОН	Н	βэтил	αОН	Н	2
BAR708	ОН	βОН	βэтил	βОН	Н	2
BAR804	OSO <sub>3</sub> Na	αОН	βэтил	αОН	Н	4
BAR803	ОН	αОН	βэтил	αОН	Н	4

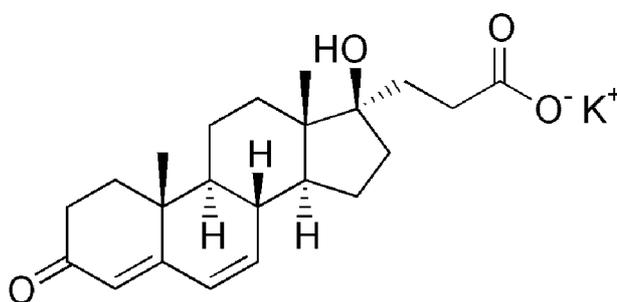
3. Соединение формулы (I) для применения по п.1, где R<sub>1</sub> представляет собой ОН, R<sub>3</sub> представляет собой ОН, и R<sub>4</sub> представляет собой Н.

4. Соединение формулы (I) для применения по п.3, где соединение выбрано из группы, состоящей из UDCA, GlycoUDCA и GlycoCDCA, BAR501, BAR502 и BAR704, OCA, BAR804.

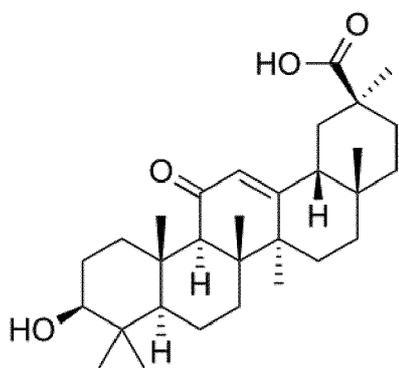
5. Соединение, выбранное из группы, состоящей из



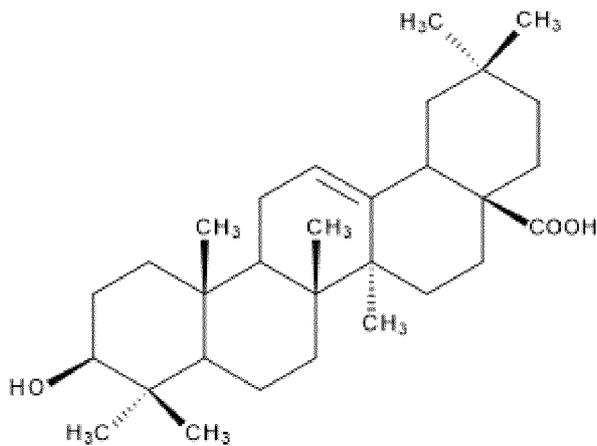
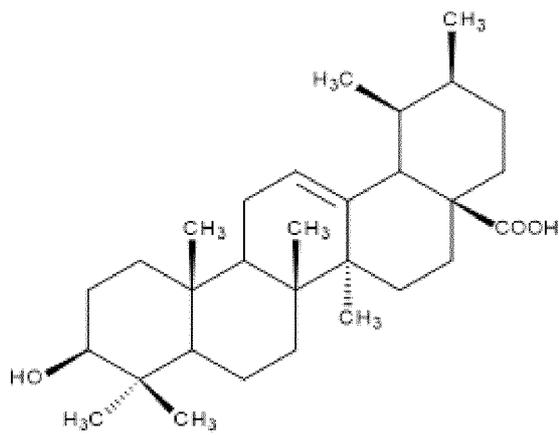
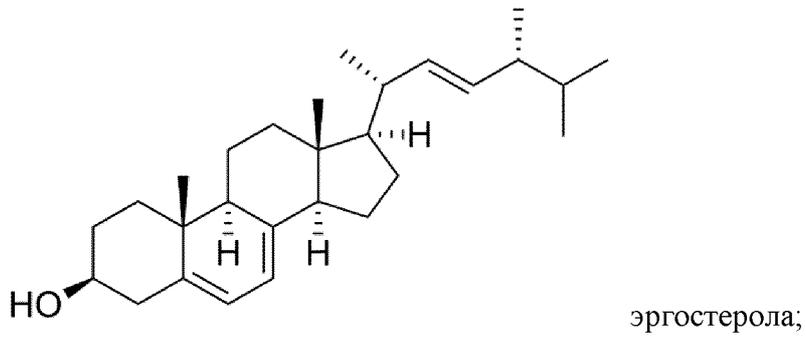
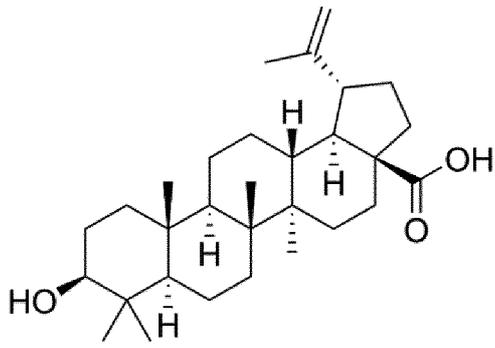
спиронолактона;



канреноата калия;



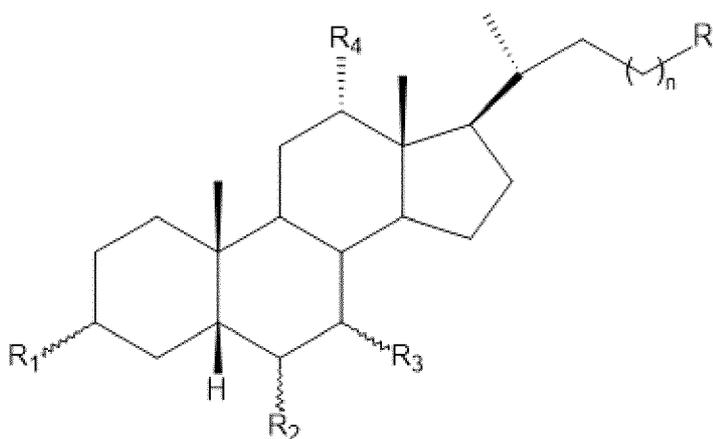
глицирретиновой кислоты;



для применения при профилактике или лечении вирусных инфекций, вызванных SARS-CoV-2.

6. Соединение для применения по п.5, где соединение выбрано из группы, состоящей из канреноата калия, олеаноловой кислоты, глицирретиновой кислоты и бетулиновой кислоты.

7. Противовирусная комбинация, содержащая по меньшей мере одно соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемый сольват или изомер, где:

R выбран из группы, состоящей из OH, COOH, OSO<sub>3</sub>Na, CONHCH<sub>2</sub>COOH, CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na;

n находится в диапазоне от 0 до 4;

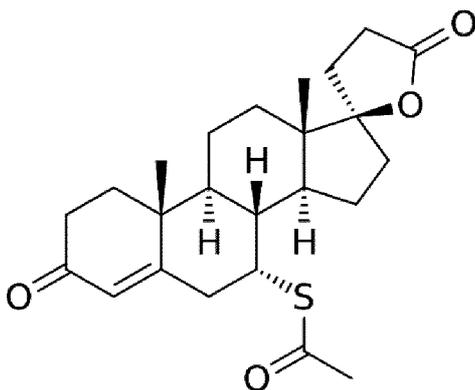
R<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из H и OH;

R<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H и этила;

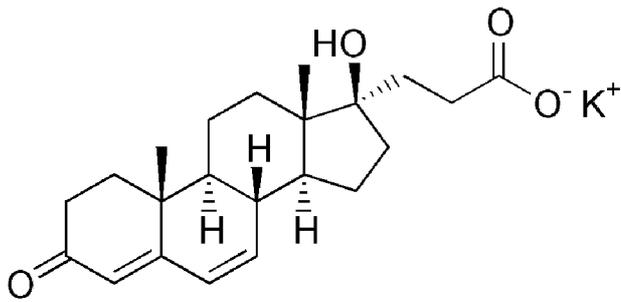
R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из H и OH;

R<sub>4</sub> выбран из группы, состоящей из H и OH;

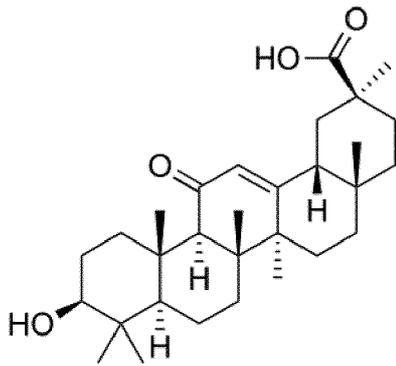
и по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из



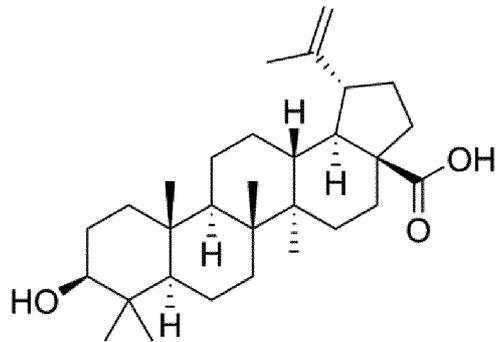
спиронолактона;



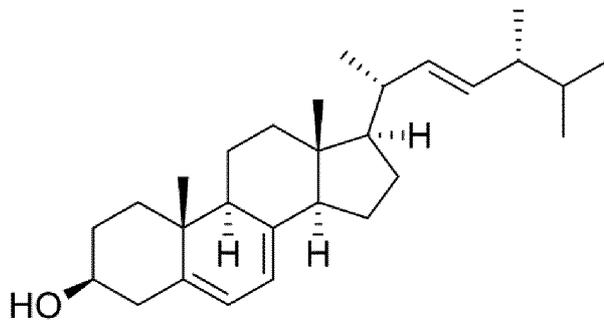
канреноата калия;



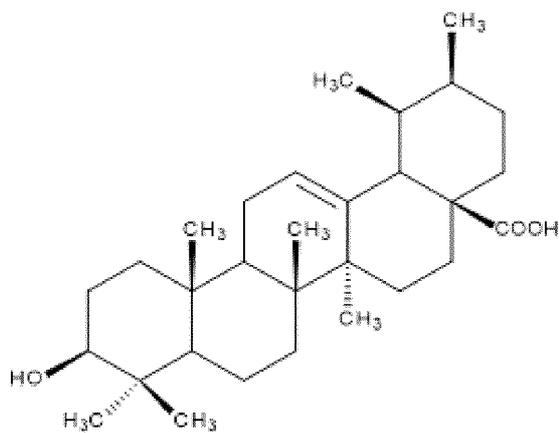
глицирретиновой кислоты;



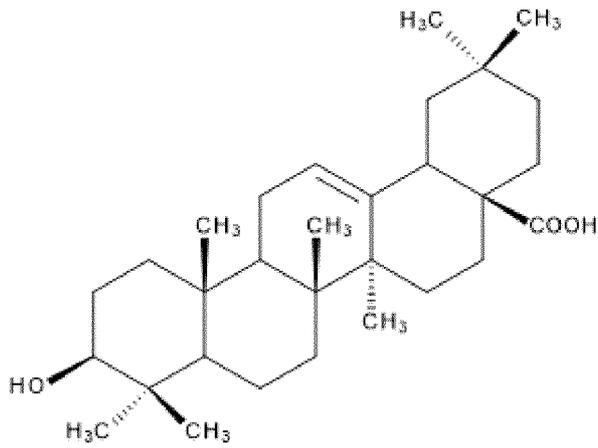
бетулиновой кислоты;



эргостерола;



урсоловой кислоты; и



олеаноловой кислоты.

8. Противовирусная комбинация по п.7 для применения при профилактике или лечении вирусных инфекций, вызванных SARS-CoV-2.

По доверенности