

(19) C2 (11) 100436 (13) UA

(98) ТОВ "ЮРИДИЧНА ФІРМА ГОРОДИССЬКИЙ ТА ПАРТНЕРИ", вул. В. Чорновола, 25, оф. 2-3, м.

(85) 2011-02-22

(74) Мошинська Ніна Миколаївна, (UA)

(45) [2012-12-25]

(43) [2011-07-25]

(24) 2012-12-25

(22) 2009-07-17

(12) Патент України (на 20 р.)

(21) a201102068

(46) 2022-10-26

(86) 2009-07-17 PCT/US2009/050915

(30) 61/135,559 2008-07-22 US

(54) МАКРОЦИКЛІЧНІ ХІНОКСАЛІНОВІ СПОЛУКИ ЯК ІНГІБІТОРИ ПРОТЕАЗИ ВГС NS3 МАКРОЦИКЛИЧЕСКИЕ ХИНОКСАЛИ НОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕАЗЫ ВГС NS3 MACROCYCLIC QUINOXALINE COMPOUNDS AS HCV NS3 PROTEASE INHIBITORS

(56) WO 2008/057209 A, 15.05.2008 2 WO 2007/016441 A, 08.02.2007 2 WO 2006/119061, A, 09.11.2006 2 WO 2008/002924 A, 03.01.2008 2

(71) US MERCK SHARP ЕНД ДОМЕ КОРП. US MERCK SHARP ЭНД ДОМЕ КОРП. US MERCK SHARP and DONME CORP. IT INC ТІТУТО ДІ РІЧЕРКЕ ДІ БІОЛОДЖІА МОЛЕКОЛАРЕ П. АНДЖЕЛЕТТИ С.П.А. IT ИНСТИТУТО ДИ РИЧЕРКЕ ДИ БІОЛОДЖІА МОЛЕКОЛАРЕ П. АНДЖЕЛЕТТИ С.П.А. IT INSTITUTO DI RICERCHE BIOLOGIA MOLECOLARE P. ANGELETTI S.P.A.

(72) IT Харпер Стівен IT Харпер Стивен IT Harper, Steven IT Сумма Вінченцо IT Сумма Винченцо IT Summa, Vincenzo US Лівертон Найджел Дж. US Ливертон Найджел Дж. US Liverton, Nigel, J. US Макколі Джон А. US Макколи Джон А. US McCauley, John, A.

(73) US MERCK SHARP ЕНД ДОУМ ЕЛЕЛСІ ІТ МСД Італія С.р.л.

Галузь техніки, до якої належить винахід

Даний винахід належить до макроциклічних сполук, які можна використовувати як інгібітори NS3 протеази вірусу гепатиту С (ВГС), синтезу таких сполук і їх застосування для лікування інфекції ВГС і/або зменшення імовірності виникнення або тяжкості інфекції ВГС.

Рівень техніки

Інфекція, викликана вірусом гепатиту С (ВГС), є основною проблемою здоров'я, оскільки в результаті цієї інфекції значне число заражених людей страждає на хронічне захворювання печінки, таке як цироз печінки і гепатоцелюлярна карцинома. Існуюча профілактика інфекції ВГС включає імунотерапію тільки рекомбінантним інтерфероном- α або в комбінації з нуклеозидним аналогом рибавірином.

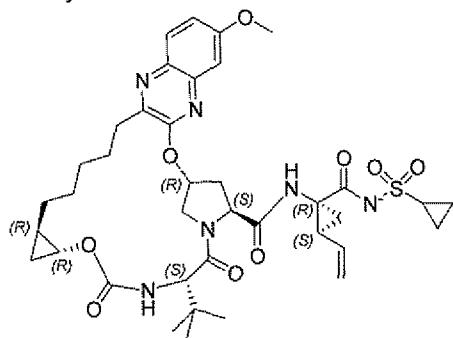
Декілька кодованих вірусом ферментів є передбачуваними мішенями для терапевтичного втручання, що включають металопротеазу (NS2-3), серин-протеазу (NS3), геліказу (NS3) і РНК-залежну РНК-полімеразу (NS5B). Протеаза NS3 знаходиться в N-термінальній ділянці білка NS3. NS4A забезпечує кофактор для активності NS3.

Потенційні способи лікування інфекції ВГС обговорюються в різних джерелах, включаючи Balsano, *Mini-Rev. Med. Chem.* 8(4):307-318, 2008, Ronn et al., *Current Topics in Medicinal Chemistry* 5:533-562, 2008, Sheldon et al., *Expert Opin. Investig. Drugs* 16(8):1171-1181, 2007, і De Francesco et al., *Antiviral Research* 58:1-16, 2003.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід належить до макроциклічної сполуки формули (I) і її фармацевтично прийнятних солей. Дана сполука і її солі являють собою інгібітори протеази ВГС NS3. Ця сполука і її солі застосовуються як у терапії, так і в наукових дослідженнях.

Таким чином, перший аспект даного винаходу описує сполуку формули (I), або її фармацевтично прийнятну сіль:



(I).

Даний винахід також включає фармацевтичні композиції, що містять сполуку за даним винаходом, і способи одержання таких фармацевтичних композицій. Даний винахід також включає способи лікування або зменшення імовірності виникнення або тяжкості інфекції ВГС.

Інші варіанти здійснення, аспекти й ознаки даного винаходу або описані в даному описі нижче, або є очевидними з приведенного нижче опису, прикладів і прикладеної формули винаходу.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід включає сполуку формули (I) і її фармацевтично прийнятні солі. Дана сполука і її фармацевтично прийнятні солі можуть використовуватися для інгібування протеази ВГС NS3, лікування інфекції ВГС і/або зменшення імовірності виникнення або тяжкості інфекції ВГС. Профілактичне застосування включає, наприклад, лікування після появи підозри на наявність ВГС у результаті, наприклад, переливання крові, заміни рідини тіла, укусу, випадкового уколу голкою або зараження пацієнта через кров під час хірургічного втручання.

Як компоненти фармацевтичної композиції, дані сполуки і солі можуть являти собою основний активний терапевтичний агент. Дана сполука також може бути об'єднана з іншими терапевтичними агентами, включаючи, без обмежень, інші анти-ВГС агенти, протиінфекційні агенти, імуномодулятори, антибіотики або вакцини.

Інгібітори NS3 також придатні для підготовки і здійснення скринінгових тестів антивірусних сполук. Наприклад, такі сполуки можуть використовуватися для виділення ферментів-мутантів, які є відмінними інструментами для скринінгу більш сильних антивірусних сполук. Крім того, ці сполуки можна використовувати для виявлення або визначення сайту зв'язування іншого антивірусного агента з протеазою ВГС, наприклад, шляхом конкурентного інгібування.

Як описано нижче в Прикладі 2, при проведенні порівняння сполуки формули (I) зі сполукою, описаною у прикладах 110 і 118 WO 2008/057209, показано, що заявлена сполука має декілька переваг. WO 2008/057209 не може розглядатися як найближчий аналог заявленого винаходу.

I. Композиції і способи

Різні варіанти здійснення включають наступне:

(a) Фармацевтичну композицію, що містить ефективну кількість сполуки формули (I) і фармацевтично прийнятний носій.

(b) Фармацевтичну композицію (a), що додатково містить другий терапевтичний агент, вибраний із групи, яка складається з анти-ВГС агентів, імуномодуляторів і протиінфекційних агентів.

(c) Фармацевтичну композицію (b), у якій анти-ВГС агент являє собою антивірусний агент, вибраний із групи, яка складається з інгібіторів протеази ВГС і інгібіторів полімерази ВГС NS5B.

(d) Фармацевтичну комбінацію зі (i) сполуки формули (I) і (ii) другого терапевтичного агента, вибраного з групи, яка складається з анти-ВГС агентів, імуномодуляторів і протиінфекційних агентів; причому і сполука формули (I), і другий терапевтичний агент використовується в кількості, що робить комбінацію ефективною для інгібування протеази ВГС NS3 або для лікування інфекції ВГС і/або зменшення імовірності виникнення або тяжкості інфекції ВГС.

(e) Комбінацію (d), у якій анти-ВГС агент являє собою антивірусний агент, вибраний із групи, яка складається з інгібіторів протеази ВГС і інгібіторів полімерази ВГС NS5B.

(f) Спосіб інгібування протеази ВГС NS3 у суб'єкта, який цього потребує, що включає введення суб'єкту ефективної кількості сполуки формули (I).

(g) Спосіб лікування інфекції ВГС і/або зменшення імовірності виникнення або тяжкості інфекції ВГС у суб'єкта, який цього потребує, що включає введення суб'єкту ефективної кількості сполуки формули (I).

(h) Спосіб (g), у якому сполуку формули (I) вводять у комбінації з ефективною кількістю щонайменше одного другого терапевтичного агента, вибраного з групи, яка складається з анти-ВГС агентів, імуномодуляторів і протиінфекційних агентів.

(i) Спосіб (h), у якому анти-ВГС агент являє собою антивірусний агент, вибраний із групи, яка складається з інгібіторів протеази ВГС і інгібіторів полімерази ВГС NS5B.

(j) Спосіб інгібування протеази ВГС NS3 у суб'єкта, який цього потребує, що включає введення суб'єкту фармацевтичної композиції (a), (b) або (c) або комбінації (d) або (e).

(k) Спосіб лікування інфекції ВГС і/або зменшення імовірності виникнення або тяжкості інфекції ВГС у суб'єкта, який цього потребує, що включає введення суб'єкту фармацевтичної композиції (a) (b), або (c) або комбінації (d) або (e).

(l) сполуку формули (I) для застосування в медицині, для профілактики або лікування інфекції ВГС або для застосування (i), (ii) як лікарського засібу, або (iii) для готування лікарського засобу для: (a) інгібування протеази ВГС NS3 або (b) лікування інфекції ВГС і/або зменшення імовірності виникнення або тяжкості інфекції ВГС. У таких застосуваннях сполуки за даним винаходом необов'язково використовуються в комбінації з одним або декількома іншими терапевтичними агентами, вибраними з анти-ВГС агентів, протиінфекційних агентів і імуномодуляторів.

В усіх цих варіантах здійснення сполука необов'язково використовується у вигляді фармацевтично прийнятної солі.

Термін "або", як використовується тут, позначає альтернативні варіанти, що, при необхідності, можуть бути об'єднані. Таким чином, термін "або" включає кожен перерахований альтернативу окремо, а також їхню комбінацію, якщо така комбінація не є взаємовиключною.

Посилання на сполуку також включає стабільні комплекси цієї сполуки, такі як стабільний гідрат. "Стабільна" сполука являє собою сполуку, що може бути отримана і виділена, і структура, і властивості якої залишаються або можуть залишатися без істотних змін протягом періоду часу, достатнього для можливості використовувати цю сполуку з описаною в даній заявці метою (наприклад, терапевтичне або профілактичне застосування суб'єктом).

II. Застосування і композиції

Термін "застосування" і його варіанти (наприклад, "уведення" сполуки) означає надання сполуки або проліків даної сполуки індивідууму, що потребує лікування. Якщо сполука за винаходом або її проліки надаються в комбінації з одним або декількома іншими активними агентами (наприклад, антивірусними агентами, придатними для лікування інфекції ВГС), і "застосування", і його варіанти варто інтерпретувати як такі, що включають паралельне і послідовне надання цієї сполуки або її солі й інших агентів.

Сполуки за даним винаходом можна вводити у вигляді фармацевтично прийнятних солей. Термін "фармацевтично прийнятна сіль" належить до солі батьківської сполуки, що має активність і не є небажаною, ні біологічно, ні будь-яким іншим чином (наприклад, не є ні токсичною, ні будь-яким іншим чином шкідливою для того, хто її приймає). Прийнятні солі включають кислотні-адитивні солі, що, наприклад, можуть бути утворені шляхом змішування розчину сполуки з розчином фармацевтично прийнятної кислоти, такої як соляна кислота, сірчана кислота, оцтова кислота, трифтороцтова кислота або бензойна кислота. Сполуки, що несуть кислотний фрагмент, можуть бути змішані з придатними фармацевтично прийнятними солями для одержання, наприклад, солей лужного металу (наприклад, солей натрію або калію), солей лужноземельного металу (наприклад, солей кальцію або магнію), і

солей, утворених прийнятними органічними лігандами, таких як солі четвертинного амонію. Крім того, при наявності кислотної (-COOH) групи або групи спирту, для зміни розчинності або характеристик гідролізу даної сполуки можна використовувати фармацевтично прийнятні ефіри.

Термін "проліки", як використовується тут, охоплює неактивну форму лікарської речовини або сполуки, що перетворюється в активну форму лікарської речовини або сполуки під впливом ферментів, хімікатів або метаболічних процесів у тілі людини, якій її вводять.

Термін "композиція", як використовується тут, охоплює продукт, що містить вказані компоненти, а також будь-який продукт, що отримується, безпосередньо або опосередковано, з об'єднання вказаних компонентів.

"Фармацевтично прийнятний" означає, що компоненти фармацевтичної композиції повинні бути сумісними один з одним і нешкідливими для реципієнта.

Термін "суб'єкт" (що альтернативно згадується тут як "пацієнт"), використовуваний у даній заявці, стосується тварини, переважно, ссавця, найбільш переважно, людини, що була об'єктом лікування, спостереження або експерименту.

Термін "ефективна кількість" указує на кількість, достатню для прояву терапевтичного або профілактичного ефекту. Для пацієнта, інфікованого ВГС, ефективною кількістю є кількість, достатня для досягнення одного або декількох з наступних ефектів: зменшення здатності ВГС до реплікації, зменшення навантаження ВГС і посилення елімінації вірусу. Для пацієнта, не інфікованого ВГС, ефективною кількістю є кількість, достатня для досягнення одного або декількох з наступних ефектів: зниженої сприйнятливості до інфекції ВГС і ослабленої здатності інфікуючого вірусу викликати персистентну інфекцію у випадку хронічного захворювання.

З метою інгібування протеази ВГС NS3 і лікування інфекції ВГС і/або зменшення імовірності виникнення або тяжкості симптомів інфекції ВГС сполуки за даним винаходом, необов'язково у вигляді солі, можуть вводитися таким чином, щоб виникав контакт активного агента з ділянкою його впливу. Сполуки можуть вводитися за допомогою звичайних засобів, доступних для застосування разом з фармацевтичними препаратами, або у вигляді окремих терапевтичних агентів або у комбінації з терапевтичними агентами. Вони можуть вводитися окремо, але звичайно вводяться з фармацевтичним носієм, вибраним у залежності від вибраного режиму введення і стандартної фармацевтичної практики.

Сполуки можуть вводитися, наприклад, одним або декількома з наступних способів: перорально, парентерально (включаючи підшкірні ін'єкції, внутрішньовенні, внутрішньом'язові, інтратермальні ін'єкції або техніку інфузії), за допомогою інгаляції (такої як у формі спрею) або ректально, у вигляді одиничних доз фармацевтичної композиції, що містить ефективну кількість сполуки і звичайні нетоксичні фармацевтично прийнятні носії, ад'юванти і розріджувачі. Рідкі препарати, прийнятні для перорального введення (наприклад, суспензії, сиропи, еліксири і т. п.), можуть бути приготовлені відповідно до методів, відомих у даній галузі, при цьому можна використовувати кожне зі звичайних середовищ, таких як вода, гліколи, олії, спирти і т. п. Тверді препарати, прийнятні для перорального введення (наприклад, порошки, пігулки, капсули і таблетки), можуть бути приготовлені відповідно до методів, відомих у даній галузі, при цьому можна використовувати такі тверді наповнювачі, як крохмалі, цукри, каолін, лубриканти, зв'язувальні агенти, дезінтегруючі агенти і т. п. Парентеральні композиції можна готувати відповідно до методів, відомих у даній галузі, при цьому як носій звичайно використовується стерильна вода і необов'язково інші компоненти, речовини, що сприяють розчинності. Ін'єктовані розчини можуть бути приготовлені відповідно до способів, відомих у даній галузі, де носій містить фізіологічний розчин, розчин або глюкози розчин, що містить суміш фізіологічного розчину і глюкози. Додаткові інструкції щодо способів, прийнятних для використання при готуванні фармацевтичних композицій за даним винаходом, і компонентів, прийнятних для використання в зазначених композиціях, можна знайти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th edition (ed... A.R. Gennaro, Mack Publishing Co., 2000).

Сполуки за даним винаходом можна вводити перорально дозою від 0,001 до 1000 мг/кг маси тіла ссавця (наприклад, людини) у добу у вигляді однієї дози або у вигляді невеликих доз. Один з діапазонів доз складає 0,01-500 мг/кг маси тіла на добу перорально у вигляді однієї дози або у вигляді невеликих доз. Інший діапазон доз складає 0,1-100 мг/кг маси тіла на добу перорально у вигляді однієї або дози у вигляді невеликих доз. Для перорального введення композиції можуть знаходитися у вигляді таблеток або капсул, що містять 1,0-500 мг активного компонента, зокрема, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 і 750 мг активного компонента для підбору дозування в залежності від симптомів для пацієнта, що знаходиться на лікуванні. Визначений рівень дози і частота прийому доз для будь-якого конкретного пацієнта можуть бути різними і будуть залежати від множини факторів, включаючи активність конкретної використовуваної сполуки, метаболічну стабільність і тривалість впливу цієї сполуки, вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать, дієту, спосіб і час уведення, швидкість виведення, комбінацію лікарських речовин, тяжкість конкретного стану й основну терапію, що проводиться.

III. Комбінована терапія

Макроциклічні хіноксалінові сполуки, описані тут, можуть використовуватися в комбінованій терапії, що включає один або декілька додаткових терапевтичних агентів. Додаткові терапевтичні агенти також включають агенти, спрямовані на ВГС, спрямовані на агенти, що викликають інші захворювання, або включають агенти, що підсилюють імунну систему. Агенти, що підсилюють імунну систему, включають агенти, в основному посилюючі функцію імунної системи, і агенти, що викликають певну імунну відповідь проти ВГС. Додаткові терапевтичні агенти, спрямовані на ВГС, включають агенти, спрямовані на NS3, і агенти, спрямовані на інші активності ВГС, такі як NS5A і NS5B, і агенти, спрямовані на ті види активності клітини-хазяїна, що беруть участь у реплікації ВГС.

Різні інгібітори ВГС описані в різних публікаціях. Макроциклічні сполуки, використовувані як інгібітори протеази ВГС, описані в WO 06/119061, WO 7/015785, WO 7/016441, WO 07/148135, WO 08/051475, WO 08/051477, WO 08/051514, WO 08/057209. Додаткові інгібітори протеази ВГС NS3 розкриті в публікаціях міжнародних заявок на патент WO 98/22496, WO 98/46630, WO 99/07733, WO 99/07734, WO 99/38888, WO 99/50230, WO 99/64442, WO 00/09543, WO 00/59929, WO 02/48116, WO 02/48172, британський патент GB 2337262 і патент США 6323180.

Додаткові приклади терапевтичних агентів, що можуть бути присутніми у комбінації, включають рибавірин, левовірин, вірамідин, тимозин альфа-1, інтерферон-β, інтерферон-α, пегілований інтерферон-α (пегінтерферон-α), комбінацію інтерферону-α і рибавірину, комбінацію пегінтерферону-α і рибавірину, комбінацію інтерферону-α і левовірину і комбінацію пегінтерферону-α і левовірину. Інтерферон-α включає рекомбінантний інтерферон-α2a (такий як інтерферон РОФЕРОН, що випускається компанією Hoffmann-LaRoche, Nutley, Нью-Джерсі), пегілований інтерферон-α2a (PEGASYS), інтерферон-α2b (такий як інтерферон ІНТРОН-А, що випускається компанією Schering, Kenilworth, Нью-Джерсі), пегілований інтерферон-α2b (ПЕГІНТРОН), рекомбінантний консенсусний інтерферон (такий як інтерферон альфакон-1) і очищений продукт інтерферону-α. Рекомбінантний консенсусний інтерферон компанії Amgen має торгову назву ІНФЕРГЕН. Левовірин являє собою L-енантіомер рибавірину, що виявляє імуномодуляторну активність, аналогічну рибавірину. Вірамідин являє собою аналог рибавірину, розкритий у WO 01/60379. Окремі компоненти комбінації можна вводити окремо в різний час у ході лікування або одночасно у вигляді окремих форм або у вигляді однієї комбінації.

Рибавірин, левовірин і вірамідин можуть виявляти анти-ВГС ефекти шляхом модуляції внутрішньоклітинних пулів гуанінових нуклеотидів через інгібування внутрішньоклітинного ферменту інозин-монофосфат-дегідрогенази (IMPDH). IMPDH являє собою фермент, що обмежує швидкість біосинтезу de novo гуанінових нуклеотидів у біосинтетичному шляху. Рибавірин здійснює швидке внутрішньоклітинне фосфорилування, а похідна монофосфату є інгібітором IMPDH. Таким чином, інгібування IMPDH є іншою корисною мішенню для виявлення інгібіторів реплікації ВГС. Таким чином, сполуки за даним винаходом також можна вводити в комбінації з інгібітором IMPDH, таким як VX-497, що розкритий у публікаціях міжнародних заявок на патент WO 97/41211 і WO 01/00622; іншим інгібітором IMPDH, як описано в WO 00/25780; або мікофенолат мофетилом. Див. A.C. Allison і E.M. Eugui, 44 (Suppl.) Agents Action 165(1993).

Для лікування інфекції ВГС сполуки за даним винаходом також можна вводити в комбінації з противірусним засобом амантадином (1-аміноадамантан). Для одержання всебічного опису цього агента див. J. Kirschbaum, 12 Anal. Profiles Drug Subs. 1-36(1983).

Для лікування інфекції ВГС сполуки за даним винаходом також можна вводити в комбінації з противірусним засобом інгібітором полімерази R7128 (Roche).

Для лікування інфекції ВГС сполуки за даним винаходом також можна комбінувати з противірусними 2'-С-розгалуженими рибонуклеозидами, розкритими в R.E. Harry-O'Kuru et al., 62 J. Org. Chem. 1754-59(1997); M.S. Wolfe et al., 36 Tet.Lett. 7611-14 (1995); патенті США 3480613; і публікаціях міжнародних заявок на патент WO 01/90121, WO 01/92282, WO 02/32920, WO 04/002999, WO 04/003000 і WO 04/002422; зміст, кожного з яких включений в даний опис у всій повноті як посилання. Такі 2'-С-розгалужені рибонуклеозиди включають, без обмежень, 2'-С-метил-цитидин, 2'-С-метил-уридин, 2'-С-метил-аденозин, 2'-С-метил-гуанозин і 9-(2'-С-метил-β-D-рибофуранозил)-2,6-діамінопурин і відповідний складний ефір амінокислоти і С-2', С-3' і С-5'-гідроксилів рибози і відповідні складні ефіри необов'язково заміщеного циклічного 1,3-пропандіолу з похідною 5'-фосфату.

Для лікування інфекції ВГС сполуки за даним винаходом також можна комбінувати з іншими нуклеозидами, що мають анти-ВГС властивості, такі як розкрито в публікаціях міжнародних заявок на патент WO 02/51425, WO 01/79246, WO 02/32920, WO 02/48165 і WO 2005/003147 (включаючи R1656, (2'R)-2'-дезоксид-2'-фтор-2'-С-метилцитидин, показаний у вигляді сполук 3-6 на стор.77); WO 01/68663; WO 99/43691; WO 02/18404 і WO2006/021341, і заявці на патент US 2005/0038240, включаючи 4'-азидо нуклеозиди, такі як R1626, 4'-азидоцитидин; публікаціях заявок на патент US 2002/0019363, US 2003/0236216, US 2004/0006007 і US 2004/0063658; і публікаціях міжнародних заявок на патент WO 02/100415, WO 03/026589, WO 03/026675, WO 03/093290, WO 04/011478, WO 04/013300 і WO 04/028481; зміст кожної з яких включено в даний опис у всій повноті як посилання.

Для лікування інфекції ВГС сполуки за даним винаходом також можна поєднувати з агентом, що є

інгібітором полімерази ВГС NS5B. Такі інгібітори полімерази ВГС NS5B, що можуть використовуватися у вигляді комбінованої терапії, включають, без обмеження, інгібітори, описані в публікаціях міжнародних заявок на патент WO 02/057287, WO 02/057425, WO 03/068244, WO 2004/000858, WO 04/003138 і WO 2004/007512; патенті США 6777392 і публікації заявки на патент US 2004/0067901; зміст кожного з яких включено в даний опис у всій повноті як посилання. Інші інгібітори полімерази ВГС включають, без обмеження, валопіцитабін (HM 283; Idenix), і 2'-F-2'-бета-метилцитидин (див. також WO 2005/003147).

В одному з варіантів здійснення нуклеозидні інгібітори полімерази ВГС NS5B, що використовуються в комбінації з інгібіторами протеази ВГС NS3 за даним винаходом, вибирають з наступних сполук: 4-аміно-7-(2-С-метил-β-D-арабінофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-7-(2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-метиламіно-7-(2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-диметиламіно-7-(2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-циклопропіламіно-7-(2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-7-(2-С-вініл-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-7-(2-с-гідроксиметил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-7-(2-с-фторметил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-5-метил-7-(2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-7-(2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин-5-карбоксильна кислота; 4-аміно-5-бром-7-(2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-5-хлор-7-(2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-5-фтор-7-(2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 2,4-діаміно-7-(2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 2-аміно-7-(2-з-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 2-аміно-4-циклопропіламіно-7-(2-з-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 2-аміно-7-(2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4(3Н)-он; 4-аміно-7-(2-С-етил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-7-(2-С, 2-о-диметил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 7-(2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4(3Н)-он; 2-аміно-5-метил-7-(2-С, 2-о-диметил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин-4(3Н)-он; 4-аміно-7-(3-дезоксид-2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-7-(3-дезоксид-2-с-метил-β-D-арабінофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-2-фтор-7-(2-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-7-(3-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-7-(2,4-ди-С-метил-β-D-рибофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; 4-аміно-7-(3-дезоксид-3-фтор-2-С-метил-β-D-ксилофуранозил)-7Н-піроло[2,3-d]піримідин; і відповідні 5'-трифосфати, або їх фармацевтично прийнятні солі.

Для лікування інфекції ВГС сполуки за даним винаходом також можна комбінувати з нуклеозидними інгібіторами полімерази ВГС такими, як розкрито в публікаціях міжнародних заявок на патент WO 01/77091; WO 01/47883; WO 02/04425; WO 02/06246; WO 02/20497; WO 2005/016927 (зокрема, JTK003); зміст кожної з яких включений в даний опис у всій повноті як посилання; і HCV-796 (Viropharma Inc).

В одному з варіантів здійснення нуклеозидні інгібітори полімерази ВГС NS5B, що використовуються в комбінації з інгібіторами протеази ВГС NS3, вибирають з наступних сполук: 14-циклогексил-6-[2-(диметиламіно)етил]-7-оксо-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; 14-циклогексил-6-(2-морфолін-4-ілетил)-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; 14-циклогексил-6-[2-(диметиламіно)етил]-3-метокси-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; 14-циклогексил-3-метокси-6-метил-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; метил(((14-циклогексил-3-метокси-6-метил-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-іл)карбоніл)аміно)сульфоніл)ацетат; (((14-циклогексил-3-метокси-6-метил-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-іл)-карбоніл)аміно)сульфоніл)оцтова кислота; 14-циклогексил-N-[(диметиламіно)сульфоніл]-3-метокси-6-метил-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксамід; 3-хлор-14-циклогексил-6-[2-(диметиламіно)етил]-7-оксо-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; N'-(11-карбоксо-14-циклогексил-7,8-дигідро-6Н-індоло[1,2-е][1,5]бензоксазоцин-7-іл)-N, N-диметилетан-1,2-діаміній біс(трифторацетат); 14-циклогексил-7,8-дигідро-6Н-індоло[1,2-е][1,5]бензоксазоцин-11-карбоксильна кислота; 14-циклогексил-6-метил-7-оксо-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; 14-циклогексил-3-метокси-6-метил-7-оксо-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; 14-циклогексил-6-[2-(диметиламіно)етил]-3-метокси-7-оксо-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; 14-циклогексил-6-[3-(диметиламіно)пропіл]-7-оксо-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; 14-циклогексил-7-оксо-6-(2-піперидин-1-ілетил)-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; 14-циклогексил-6-(2-морфолін-4-ілетил)-7-оксо-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; 14-циклогексил-6-[2-(диетиламіно)етил]-7-оксо-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота;

14-циклогексил-6-(1-метилпіперидин-4-іл)-7-оксо-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; 14-циклогексил-N-[(диметиламіно)сульфоніл]-7-оксо-6-(2-піперидин-1-ілетил)-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксамід; 14-циклогексил-6-[2-(диметиламіно)етил]-N-[(диметиламіно)сульфоніл]-7-оксо-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксамід; 14-циклопентил-6-[2-(диметиламіно)етил]-7-оксо-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; 6-аліл-14-циклогексил-3-метокси-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; 14-циклопентил-6-[2-(диметиламіно)етил]-5,6,7,8-тетрагідроіндоло[2,1-а][2,5]бензодіазоцин-11-карбоксильна кислота; 13-циклогексил-5-метил-4,5,6,7-тетрагідроіндоло[3',2":6,7][1,4]діазоцино[1,8-а]індол-10-карбоксильна кислота; 15-циклогексил-6-[2-(диметиламіно)етил]-7-оксо-6,7,8,9-тетрагідро-5H-індоло[2,1-а][2,6]бензодіазонін-12-карбоксильна кислота; 15-циклогексил-8-оксо-6,7,8,9-тетрагідро-5H-індоло[2,1-а][2,5]бензодіазонін-12-карбоксильна кислота; 13-циклогексил-6-оксо-6,7-дигідро-5H-індоло[2,1-d][1,4]бензодіазепін-10-карбоксильна кислота; і їх фармацевтично прийнятні солі.

IV. Оцінка сполук

Описані тут сполуки можуть бути оцінені відносно різних видів активності, таких як здатність інгібувати активність ВГС NS3, активність реплікону ВГС і активність реплікації ВГС, використовуючи методи, відомі в даній галузі. (Див., наприклад, Carroll et al., J. Biol Chem. 278:11979-11984, 2003).

Одним з таких видів аналізу є флуоресцентний аналіз протеази ВГС NS3 з часовим розрізненням (TRF), як описано нижче, а також у Mao et al., Anal. Biochem. 373:1-8, 2008 і в публікації міжнародної заявки на патент WO 2006/102087. Аналіз протеази NS3 може бути виконаний, наприклад, у буфері для аналізу з кінцевим об'ємом 100 мкл, що містить 50 мм HEPES (pH 7,5), 150 мм NaCl, 15 % гліцерину, 0,15 % тритону X-100, 10 мм DTT і 0,1 % ПЕГ 8000. Протеазу NS3 і NS4A попередньо інкубують з різними концентраціями інгібіторів у ДМСО протягом 30 хвилин. Реакцію ініціюють додаванням TRF пептидного субстрату (кінцева концентрація 100 нм). NS3-опосередкований гідроліз субстрату завершують через 1 годину при кімнатній температурі, використовуючи 100 мкл 500 мМ MES (pH 5,5). Флуоресценцію продукту детектують за допомогою флуорофотометра або VICTOR V2, або FUSION (Perkin Elmer Life і Analytical Sciences) зі збудженням на 340 нм і випромінюванням на 615 нм із 400 мкс затримкою. Тестовані концентрації різних форм ферменту вибирають таким чином, щоб у результаті вийшло відношення сигналу до фону (S/B), що знаходиться в межах 10-30. Значення IC50 одержують, використовуючи стандартне чотирипараметричне припасування даних. Значення Ki виводять зі значень IC50 за допомогою наступної формули:

$$IC50=Ki(1+[S]/KM),$$

Рівняння (1),

де [S] - концентрація пептидного субстрату в реакції, а KM - константа Міхаеліса. Див. P. Gallinari et al., 38 BIOCHEM. 5620-32(1999); P. Gallinari et al., 72 J. VIROL. 6758-69 (1998); M. Taliani et al., 240 ANAL. BIOCHEM. 60-67 (1996); Mao et al., Analytical Biochemistry 373: 1-8, 2008.

V. Загальна схема одержання сполук

Даний винахід також включає способи одержання сполук формули (I). Сполуки за даним винаходом можна легко одержати відповідно до наступних схем реакцій і прикладів, або шляхом їхньої модифікації, використовуючи легко доступні вихідні речовини, реактиви і звичайні способи синтезу. У цих реакціях також можна використовувати варіанти, що добре відомі фахівцям у даній галузі. Інші способи одержання сполук за винаходом є очевидними для фахівця з нижчеподаних схем реакції і прикладів. Якщо не зазначено інше, усі перемінні варто розуміти відповідно до приведенного вище визначення. Наступні схеми реакції і приклади служать тільки як ілюстрація винаходу і його практичного застосування.

Каталізатори метатезису олефінів включають наступні різновиди на основі рутенію: F. Miller et al., 118 J. Am. Chem. Soc. 9606 (1996); G. Kingsbury et al., 121 J. Am. Chem.Soc. 791 (1999); H. Scholl et al., 1 Org. Lett. 953 (1999); публікація заявки на патент США US2002/0107138; K. Furstner et al., 64 J.Org.Chem. 8275 (1999). Користь цих каталізаторів у замкнутому циклі метатезису відома з літератури (наприклад, Trnka and Grubbs, 34 Acc. Chem. Res. 18 (2001)).

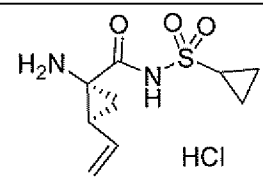
Наступні приклади служать тільки як ілюстрація винаходу і його практичного застосування. Приклади не слід розглядати як обмежуючі обсяг або суть винаходу.

Список скорочень

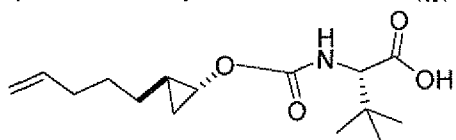
DCM/CH ₂ Cl ₂	дихлорметан
DCE	1,2 дихлоретан
DIEA	діізопропілетиламін
DMF	диметилформахід

DMSO	диметилсульфоксид
Dppf	дифенілфосфінофероцен
Et ₂ O	діетиленовий ефір
EtOAc	етилацетат
HATU	O-(7-азабензотриазол-1-іл)-N, N,N',N'-тетраметилуроній гексафторфосфат
HCl	хлороводнева кислота
TMSCl	хлортриметилсилан
TBAF	тетра-бутиламоній фторид
DMAP	диметиламінопіридин
MeCN	ацетонітрил
MeOH	метанол
Pd/C	паладій на вугіллі
TBTU	O-бензотриазол-1-іл-N, N,N',N'-тетраметилуроній гексафторфосфат
TFA	трифтороцтова кислота
THF	тетрагідрофуран
Флеш-хроматографія	очищення за допомогою системи Biotage Horizon с використанням картриджа на основі силікагелю і визначеного градієнта рухомої фази
ВЕРХ	автоматизована мас- або УФ-ініційована високоефективна рідинна хроматографія з використанням як рухомої фази градієнтів підкисненого MeCN і H ₂ O
МГц	Мега Герц

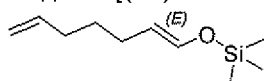
Синтез проміжних сполук
Проміжні сполуки А

Проміжна сполука #	Структура	Назва	Посилання
A1		(1R, 2S)-1-аміно-N-(циклопропілсульфоніл)-2-вінілциклопропанкарбоксаміду гідрохлорид	Wang et al., US 6,995,174

Проміжна сполука В1: 3-метил-N-(((1R, 2R)-2-пент-4-ен-1-ілциклопропіл)окси)карбоніл)-L-валін



Стадія 1: [(1E)-гепта-1,6-дієн-1-ілокси](триметил)силан



Розчин (0,5 M) бутенілмагній броміду в THF (1,4 екв.) обробляли при -78 °С, використовуючи Si(I)Br.SMe₂ (0,05 екв.) і HMPA (2,4 екв.). Суміш перемішували протягом 10 хвилин, потім розчин (1 M) акролеїну (1 екв.) і TMSCl (2 екв.) у THF додавали протягом більше 1 год. таким чином, щоб внутрішня температура залишалася нижчою -68 °С. Отриману суміш перемішували при -78 °С

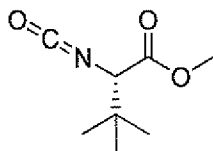
протягом 2 год., потім обробляли надлишком Et₃N і розбавляли гексаном. Після того як температура суміші досягла кімнатної, суміш обробляли невеликою кількістю H₂O і фільтрували через целіт. Фільтрат промивали 10 разів, використовуючи H₂O, а потім розсіл. Органічний шар сушили, і леткі компоненти видаляли, а отриманий залишок дистильовали при зниженому тиску (20 мбар). При 80-86 °C збирали фракцію, до складу якої входила названа сполука (58 %) у вигляді безбарвної рідини. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 6,19 (д, J=11,6 Гц, 1H), 5,85-5,75 (м, 1H), 5,02-4,92 (м, 3H), 2,08-2,02 (м, 2H), 1,94-1,88 (м, 2H), 1,46-1,38 (м, 2H), 0,18 (с, 9H).

Стадія 2: транс-2-пент-4-ен-1-ілциклопропанол



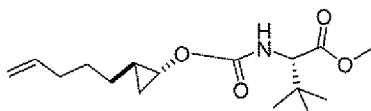
Розчин (0,45 M) попередньої сполуки в гексані обробляли розчином (15 %) Et₂Zn (1,2 екв.) у толуолі, і отриманий розчин охолоджували в крижаній бані. Дийодметан (1,2 екв.) додавали по краплях, потім, перед тим як нагріти до 20 °C, розчин перемішували протягом 1 год. Додавали піридин (6 екв.), і кашку перемішували протягом 15 хв, потім виливали в петролейний ефір. Суміш фільтрували через целіт декілька разів доти, доки не одержали прозорий розчин. Цю суміш концентрували при 100 мбар, і розчин, що залишився, (що містить триметил[[(транс-2-пент-4-ен-1-ілциклопропіл)окси]силан, толуол і піридин) додатково розбавляли THF. Суміш охолоджували до 0 °C, потім по краплях додавали розчин (1M) TBAF (1,2 екв.) у THF. Через 10 хвилин залишали суміш для того, щоб вона нагрілася до 20 °C, а потім ще через 1 год. виливали в H₂O. Водну фазу екстрагували за допомогою EtOAc, і об'єднані органічні екстракти промивали розсоллом, а потім сушили. Після видалення летких компонентів одержували залишок, що очищали за допомогою флеш-хроматографії (елюент 0-66 % Et₂O/петролейний ефір), одержуючи названу сполуку (71 %) у вигляді безбарвної рідини. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,85-5,75 (м, 1H), 5,00 (дд, J=17,1, 1,6 Гц, 1H), 4,94 (уш.д, J=10,4 Гц, 1H), 3,20 (очевидний дт, J=6,4, 2,5 Гц, 1H), 2,10-2,04 (м, 2H), 1,52-1,44 (м, 2H), 1,29-1,19 (м, 1H), 1,15-1,07 (м, 1H), 0,95-0,87 (м, 1H), 0,71-0,66 (м, 1H), 0,31 (очевидний кв., J=6,0 Гц, 1H).

Стадія 3: метил 3-метил-N-(оксометилен)-L-валінат



Розчин (0,39 M) метил 3-метил-L-валінату в суміші насиченого водного розчину NaHCO₃ і CH₂Cl₂ (2:1) охолоджували в крижаній бані і швидко перемішували. Суміш обробляли трифосгеном (0,45 екв.) у вигляді однієї порції, і отриману суміш перемішували протягом 0,5 год. Реакційну суміш розбавляли CH₂Cl₂, і шари відділяли. Водну фазу екстрагували, використовуючи CH₂Cl₂, потім об'єднані органічні шари промивали розсоллом і сушили. Після видалення розчинника одержали названу сполуку у вигляді прозорої масла, яке витримували протягом 12 год. під вакуумом (0,1 мбар), потім відразу використовували на наступній стадії. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 3,79 (с, 3H), 3,75 (с, 1H), 1,00 (с, 9H).

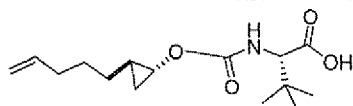
Стадія 4: метил 3-метил-N-(((1R, 2R)-2-пент-4-ен-1-ілциклопропіл)окси)карбоніл)-L-валінат і метил 3-метил-N-(((1S, 2S)-2-пент-4-ен-1-ілциклопропіл)окси)карбоніл)-L-валінат



Розчин (0,45 M) транс-2-пент-4-ен-1-ілциклопропанолу в толуолі обробляли метил 3-метил-N-(оксометилен)-L-валінатом (1,1 екв.), а потім DMAP (1 екв.). Отриману суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 12 год., потім охолоджували до 20 °C. Додавали H₂O і EtOAc, і органічний шар відділяли і промивали 1N HCl, розсоллом і сушили. Після видалення летких компонентів одержували залишок, що двічі очищали за допомогою флеш-хроматографії (елюент 0-30 % Et₂O/петролейний ефір). Перші фракції містили метил 3-метил-N-(((1R, 2R)-2-пент-4-ен-1-ілциклопропіл)окси)карбоніл)-L-валінат (38 %) у вигляді масла. MS(ES⁺) m/z 298 (M+H)⁺

Більш пізні фракції містили метил 3-метил-N-(((1S, 2S)-2-пент-4-ен-1-ілциклопропіл)окси)карбоніл)-L-валінат (28 %) у вигляді масла. MS(ES⁺) m/z 298 (M+H)⁺

Стадія 5: 3-метил-N-(((1R, 2R)-2-пент-4-ен-1-ілциклопропіл)окси)карбоніл)-L-валін

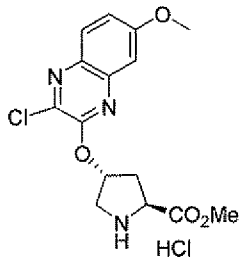


Розчин (0,1 M) метил 3-метил-N-(((1R, 2R)-2-пент-4-ен-1-ілциклопропіл)окси)карбоніл)-L-валінату в суміші MeOH/H₂O (2:1) обробляли LiOH·H₂O (4 екв.) і потім нагрівали до 60 °C протягом 4 год. Суміш

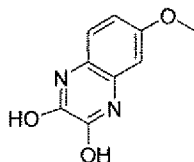
охолоджували і концентрували до половини об'єму, потім розбавляли, використовуючи EtOAc, і підкисляли водним розчином HCl (1N). Органічний шар відділяли і промивали розсоллом, потім сушили. Після видалення летких компонентів одержали названу сполуку (98 %) у вигляді масла. MS(ES+) m/z 284 (M+H)⁺

Проміжні сполуки С

Проміжна сполука С1: метил (4R)-4-[(3-хлор-7-метоксихіноксалін-2-іл)окси]-L-пролінату гідрохлорид

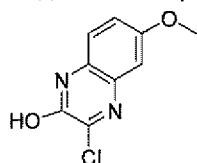


Стадія 1: 6-метоксихіноксалін-2,3-діол



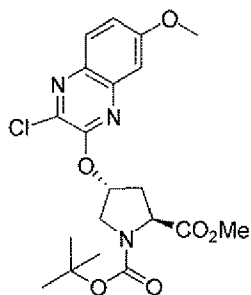
Суспензію 4-метоксибензен-1,2-діамін дигідрохлориду в діетилоксалаті (8 екв.) обробляли Et3N (2 екв.) і потім нагрівали до 150 °C протягом 2 год. Суміш охолоджували і фільтрували, потім зібрану тверду речовину промивали, використовуючи H2O і EtOH. Отриманий залишок сушили й одержували названу сполуку (69 %). MS(ES+) m/z 193 (M+H)⁺

Стадія 2: 3-хлор-6-метоксихіноксалін-2-ол



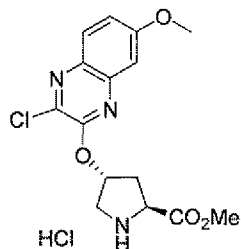
Розчин (1,53 M) 6-метоксихіноксалін-2,3-діолу в DMF обробляли SOCl2 (1 екв.) і нагрівали до 110 °C. Після 1,5 год. реакційну суміш охолоджували і наливали у водний розчин HCl (1 N). Отриманий осад фільтрували і промивали, використовуючи H2O і Et2O. Висушена тверда речовина складалася в основному з названої сполуки у вигляді суміші з 6-мітоксихіноксалін-2,3-діолом і 2,3-дихлор-6-метоксихіноксаліном. Цю речовину відразу використовували на наступній стадії. MS(ES+) m/z 211 (M+H)⁺

Стадія 3: 1-трет-бутил 2-метил(2S, 4R)-4-[(3-хлор-7-метоксихіноксалін-2-іл)окси]піролідин-1,2-дикарбоксилат



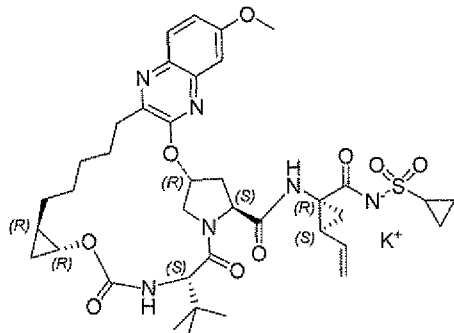
Розчин (0,35 M) 3-хлор-6-метоксихіноксалін-2-олу в NMP обробляли Cs2CO3 (1,5 екв.) і 1-трет-бутил 2-метил(2S, 4S)-4-[[4-бромфеніл)сульфоніл]окси]піролідин-1,2-дикарбоксилатом (1,1 екв.). Отриману суміш перемішували при 50 °C протягом 18 год., потім додавали ще одну частину (0,1 екв.) 1-трет-бутил 2-метил(2S, 4S)-4-[[4-бромфеніл)сульфоніл]окси]піролідин-1,2-дикарбоксилату. Після перемішування протягом 2 год. суміш охолоджували і розбавляли, використовуючи H2O і EtOAc. Органічні фази промивали водним розчином HCl (1 N), насиченим водним розчином NaHCO3 і розсоллом. Висушену органічну фазу концентрували до одержання залишку, який очищали за допомогою флеш-хроматографії (0-60 % EtOAc/петролейний ефір) і одержували названу сполуку (35 % за два проходи) у вигляді твердої речовини. MS(ES+) m/z 438 (M+H)⁺

Стадія 4: метил(4R)-4-[(3-хлор-7-метоксихіноксалін-2-іл)окси]-L-пролінату гідрохлорид

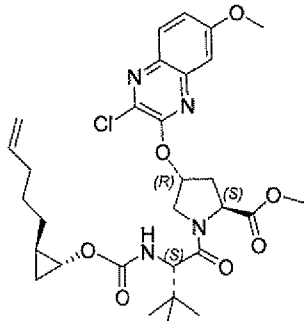


Розчин (0,62 М) 1-трет-бутилметил(2S, 4R)-4-[(3-хлор-7-метоксигіноксалін-2-іл)окси]піролідин-1,2-дикарбоксилату в CH_2Cl_2 обробляли розчином (4 М) HCl у діоксані (5 екв.). Суміш перемішували при $20\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 2 год., потім обробляли розчином (4 М) HCl у діоксані (2 екв.). Через 5 год. після початку реакції було вирішено, що реакція завершилася, після чого суміш концентрували при зниженому тиску. Отриманий залишок розтирали в порошок з Et_2O для одержання названої сполуки (95 %) у вигляді твердої речовини. $\text{MS}(\text{ES}^+) \text{ m/z } 338 (\text{M}+\text{H})^+$

Приклад 1: Калій {{{(1R, 2S)-1-(((1a, 5S, 8S, 10R, 22a)-5-трет-бутил-14-метокси-3,6-діоксо-1,1,а, 3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22а-тетрадекагідро-8H-7,10-метанциклопропа[8,19][1,10,3,6]діоксадіазаціклононадецино[11,12-b]хіноксалін-8-іл)карбоніл)аміно)-2-вінілциклопропіл)карбоніл}}(циклопропілсульфоніл)азанід

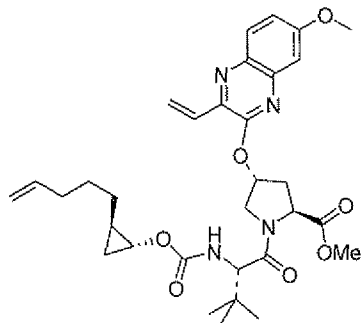


Стадія 1: метил 3-метил-N-(((1R, 2R)-2-пент-4-ен-1-ілциклопропіл)окси)карбоніл)-L-валіл-(4R)-4-[(3-хлор-7-метоксигіноксалін-2-іл)окси]-L-пролінат



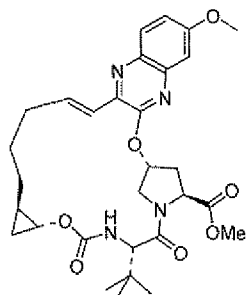
Розчин (0,2 М) метил (4R)-4-[(3-хлор-7-метоксигіноксалін-2-іл)окси]-L-пролінату гідрохлорид у DMF обробляли 3-метил-N-(((1R, 2R)-2-пент-4-ен-1-ілциклопропіл)окси)карбоніл)-L-валіном (1,1 екв.), DIEA (5 екв.) і NATU (1,2 екв.). Отриману суміш перемішували при $20\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 5 год., потім розбавляли EtOAc . Органічний шар відділяли і промивали водним розчином HCl (1N), насиченим водним розчином NaHCO_3 і розсоллом. Висушену органічну фазу концентрували при зниженому тиску для одержання залишку, що очищали флеш-хроматографією (елюент 10-30 % EtOAc /петролейний ефір), одержуючи названу сполуку (96 %) у вигляді олії. $\text{MS}(\text{ES}^+) \text{ m/z } 604 (\text{M}+\text{H})^+$

Стадія 2: метил 3-метил-N-(((1R, 2R)-2-пент-4-ен-1-ілциклопропіл)окси)карбоніл)-L-валіл-(4R)-4-[(7-метокси-3-вінілхіноксалін-2-іл)окси]-L-пролінат



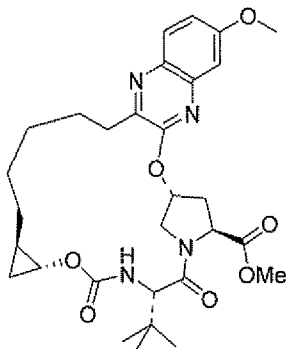
Розчин (0,1 М) метил 3-метил-N-(((1R, 2R)-2-пент-4-ен-1-ілциклопропіл)окси)карбоніл)-L-валіл-(4R)-4-[(3-хлор-7-метоксихіноксалін-2-іл)окси]-L-пролінат у EtOH обробляли калій трифтор(вініл)боратом (1,5 екв.) і триетиламіном (1,5 екв.). Отриману суміш дегазували, потім додавали аддукт PdCl₂(dppf)-CH₂Cl₂ (0,1 екв.). Суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 1 год., потім охолоджували до кімнатної температури і розбавляли, використовуючи H₂O і EtOAc. Органічну фазу відділяли, промивали H₂O і розсолем, потім сушили. Після видалення летких компонентів одержували залишок, що очищали флеш-хроматографією (20-30 % EtOAc/петролейний ефір), одержуючи названу сполуку у вигляді жовтої піни, що відразу використовували на наступній стадії. MS(ES⁺) m/z 595 (M+H)⁺

Стадія 3: метил (1a, 5S, 8S, 10R, 18E, 22a)-5-трет-бутил-14-метокси-3,6-діоксо-1,1a, 3,4,5,6,9,10,20,21,22,22a-додекагідро-8H-7,10-метанциклопропа[18,19][1,10,3,6]діоксадіазаціклононадецино[11,12-b]хіноксалін-8-карбоксилат



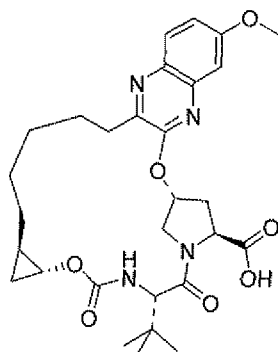
Розчин (0,02 М) метил 3-метил-N-(((1R, 2R)-2-пент-4-ен-1-ілциклопропіл)окси)карбоніл)-L-валіл-(4R)-4-[(7-метокси-3-вінілхіноксалін-2-іл)окси]-L-пролінату в DCE нагрівали до 80 °С, потім обробляли каталізатором Zhan 1 (0,15 екв.). Отриману суміш перемішували при 80 °С протягом 1 год., потім охолоджували до кімнатної температури і концентрували при зниженому тиску. Отриманий залишок очищали флеш-хроматографією (20-50 % EtOAc/петролейний ефір) і одержували названу сполуку (25 % за 2 проходи) у вигляді піни. MS(ES⁺) m/z 567 (M+H)⁺

Стадія 4: метил (1a, 5S, 8S, 10R, 22a)-5-трет-бутил-14-метокси-3,6-діоксо-1,1a, 3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-тетрадекагідро-8H-7,10-метанциклопропа[18,19][1,10,3,6]діоксадіазаціклононадецино[11,12-b]хіноксалін-8-карбоксилат



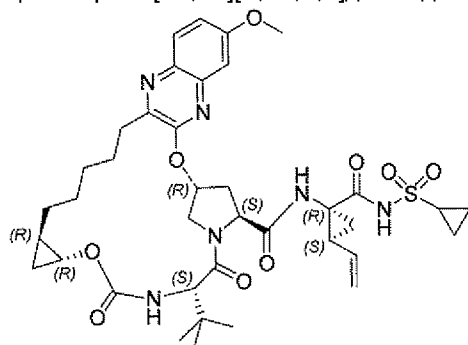
Розчин (0,05 М) метил(1a, 5S, 8S, 10R, 18E, 22a)-5-трет-бутил-14-метокси-3,6-діоксо-1,1a, 3,4,5,6,9,10,20,21,22,22a-додекагідро-8H-7,10-метанциклопропа[18,19][1,10,3,6]діоксадіазаціклононадецино[11,12-b]хіноксалін-8-карбоксилату в суміші MeOH/діоксан (1:1) обробляли Pd/C (8 вага. %). Отриману суміш перемішували в атмосфері водню протягом 4 год. Каталізатор відфільтровували, і фільтрат концентрували при зниженому тиску, одержуючи названу сполуку (98 %) у вигляді твердої речовини. MS(ES⁺) m/z 569 (M+H)⁺

Стадія 5: (1a, 5S, 8S, 10R, 22a)-5-трет-бутил-14-метокси-3,6-діоксо-1,1a, 3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-тетрадекагідро-8H-7,10-метанциклопропа[18,19][1,10,3,6]діоксадіазаціклононадецино[11,12-b]хіноксалін-8-карбоксильна кислота



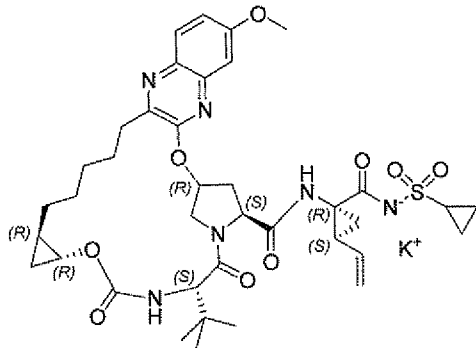
Розчин (0,1 M) метил(1a, 5S, 8S, 10R, 22a)-5-трет-бутил-14-метилокси-3,6-діоксо-1,1a, 3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-тетрадекагідро-8H-7,10-метанциклопропа[18,19][1,10,3,6]діоксадіазаціклононадецино[11,12-b] хіноксалін-8-карбоксилату у суміші 1:1 H₂O/THF обробляли LiOH·H₂O (3 екв.). Отриману суміш перемішували при 20 °C протягом 18 год., підкисляли водним розчином HCl (0,2 M) і розбавляли EtOAc. Органічну фазу відділяли, промивали водним розчином HCl (0,2 M) і розсолем, потім сушили. Після видалення летких компонентів одержали названу сполуку (98 %) у вигляді твердої речовини. MS(ES⁺) m/z 555 (M+H)⁺

Стадія 6: (1a, 5S, 8S, 10R, 22a)-5-трет-бутил-N-((1R, 2S)-1-{{циклопропілсульфоніл}аміно}карбоніл)-2-вінілциклопропіл)-14-метокси-3,6-діоксо-1,1a, 3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-тетрадекагідро-8H-7,10-метанциклопропа[18,19][1,10,3,6]діоксадіазаціклононадецино[11,12-b]хіноксалін-8-карбоксамід



Розчин (0,1 M) (1a, 5S, 8S, 10R, 22a)-5-трет-бутил-14-метокси-3,6-діоксо-1,1a, 3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-тетрадекагідро-8H-7,10-метанциклопропа[18,19][1,10,3,6]діоксадіазаціклононадецино[11,12-b]хіноксалін-8-карбоксильної кислоти у CH₂Cl₂ обробляли (1R, 2S)-1-{{циклопропілсульфоніл}аміно}карбоніл)-2-вінілциклопропанаміній хлоридом (1,3 екв.), DIEA (3 екв.), DMAP (1,5 екв.) і TBTU (1,45 екв.). Отриману суміш перемішували при 20 °C протягом 18 год., а потім розбавляли EtOAc. Розчин промивали водним розчином HCl (0,2 M), насиченим водним розчином NaHCO₃ і розсолем. Органічні фази сушили і концентрували до одержання залишку, що очищали флеш-хроматографією (елюент 2,5 % MeOH/CH₂Cl₂), одержуючи названу сполуку (89 %) у вигляді твердої речовини. ¹³C ЯМР (100 МГц, DMSO-d₆) δ 172,32 170,63 169,04 159,86, 156,95 154,74 148,10 140,41, 133,55 (2 сигнали), 128,94 118,21 117,58, 105,89, 74,88, 59,75, 58,71, 55,68, 54,13, 54,01, 40,13, 34,49, 34,04, 33,76, 32,68, 30,71, 30,43, 28,55, 27,69, 27,28, 26,38, 21,98, 18,49, 10,67, 5,69, 5,46; MS(ES⁺) m/z 767 (M+H)⁺

Стадія 7: калій {{{(1R, 2S)-1-(((1a, 5S, 8S, 10R, 22a)-5-трет-бутил-14-метокси-3,6-діоксо-1,1a, 3,4,5,6,9,10,18,19,20,21,22,22a-тетрадекагідро-8H-7,10-метанциклопропа[18,19][1,10,3,6]діоксадіазаціклононадецино[11,12-b]хіноксалін-8-іл)-карбоніл}аміно)-2-вінілциклопропіл}карбоніл}(циклопропілсульфоніл)азанід



Попередню речовину використовували в EtOH, і отриманий розчин (0,025 M) охолоджували до 0 °С. Додавали розчин (0,02 M) трет-БуОК (1,5 екв.) у EtOH, що приводило до утворення осаду. Суміш перемішували при 20 °С протягом 18 год., потім фільтруванням збирали тверду речовину. Цю речовину промивали EtOH і сушили, одержуючи названу сполуку (93 %) у вигляді білої кристалічної твердої речовини. MS(ES+) m/z 767 (M+H)+

Приклад 2: Порівняння різних сполук

Сполуку, описану в прикладі 1, порівнювали зі сполукою, розкритою у прикладах 110 і 118 WO 2008/057209. Результати показані нижче в таблицях 1 і 2. Як можна бачити з таблиць і обговорення результатів, виявилось, що сполука формули (I) має декілька корисних властивостей в порівнянні як зі сполукою прикладу 118 документа WO 2008/057209, так і сполукою прикладу 110 документа WO 2008/057209.

Таблиця 1

	WO 2008/057209, приклад 118	Приклад 1	WO 2008/057209, приклад 110
Структура			
NS 3/4A інгібіторна активність1 (Ki) 1b	<0,016 нМ	<0,016 нМ	<0,016 нМ
Реплікативна активність2 EC50 gt1b	3 нМ	2 нМ	5 нМ
Плазмова AUC у щурів @ 25 трк per os3	38,5 мкм.год.	20,6 мкм.год.	5,8 мкм.год.
Концентрація в печінці щура @ 24 год. (25 трк per os)3	18,4 мкМ	27,9 мкМ	8,5 мкМ
Плазмова AUC у собак @ 25 трк per os3	10,9 мкм.год.	48,6 мкм.год.	1,0 мкм.год.
Концентрація в печінці собаки @ 24 год. (25 трк per os)3	Не визначено	120 мкМ	3,3 мкМ
Ковалентне зв'язування білка in vivo4	Щур @ 6 год. плазма = BLQ, печінка = 30±3 пмоль/мг білка	Щур @ 6 год. плазма = LOQ, печінка = LOQ	Щур @ 6 год. плазма = BLQ, печінка = BLQ

Фізичні властивості ⁵	сіль калію не диспропорціонує у розчині	сіль калію не диспропорціонує у розчині	сіль калію диспропорціонує у розчині з утворенням кристалічної нейтральної форми
----------------------------------	---	---	--

Ki: константа інгібування, посилання на <0,016 нМ указує, що активність, яка спостерігається, не перевищує 0,016 нМ, точну кількість, менше ніж 0,016 нМ, у тесті не була визначено; EC50: ефективна концентрація, при якій досягається пригнічення реплікації вірусу на 50 %; gt: генотип; AUC: ділянка під кривою концентрація в плазмі/час; LOQ: межа кількісного визначення (3 пмоль/мг); BLQ: нижче межі кількісного визначення.

Порівняння сполуки формули (I) зі сполукою прикладу 110 WO 2008/057209

Сполуки формули (I) мають наступні корисні властивості в порівнянні зі сполукою прикладу 110 WO 2008/057209:

- 1) Фізичні властивості (відсутня диспропорція солей сполуки формули (I));
- 2) Фармакокінетичний профіль у щурів після введення солі калію; і
- 3) Вплив на печінку (цільовий орган).

Відмінності у властивостях, виявлені при порівнянні зі сполукою прикладу 110 WO 2008/057209, особливо переважні у випадку застосування сполуки формули (I) у лікарських сполуках і застосування цієї сполуки. Відсутність диспропорції солей сполуки формули (I) дає можливість використовувати розведення у воді 1,8 мг/мл солі K⁺ сполуки прикладу 1. Хоча сіль K⁺ сполуки прикладу 110 WO 2008/057209 демонструє кращу розчинність у воді (9,7 мг/мл), ця розчинена таким чином сполука диспропорціонує з утворенням кристалічної цвітер-іонної форми, що має низьку розчинність у воді (<0,009 мг/мл). Відсутність такого поведіння в сполуки прикладу 1 дає несподівану перевагу для застосування в лікарській сполуці для фармацевтичного введення й у результаті виявляє поліпшені фармакокінетичні властивості, як показано в таблиці 1 (плазмова AUC і вплив на печінку щурів і собак). Високий рівень впливу в плазмі і на печінку в доклінічних дослідженнях є перевагою з погляду добору безпечних і ефективних доз для застосування при лікуванні пацієнтів.

Порівняння сполуки формули (I) зі сполукою прикладу 118 WO 2008/057209

Перевагою, що спостерігається, сполуки формули (I) у порівнянні зі сполукою прикладу 118 WO 2008/057209 є його профіль резистентності до різних мутантних ферментів. Згідно з даними клінічних досліджень, проведених з використанням противірусних агентів родинних класів (наприклад, інгібітори протеази ВІЛ), а також досліджень, проведених з використанням інгібіторів протеази ВГС NS3 (наприклад, VX-950, телапревір), передбачається, що резистентність до вірусів може розвинути у відповідь на лікування сполуками за даним винаходом. Сполука прикладу 1 показала поліпшену ферментативну афінність (Ki) до різних мутантних ферментів, що, як відомо, забезпечують резистентність до інгібіторів протеази ВГС NS3. У таблиці 2 підсумовані дані по активності відносно різних мутантних ферментів. Таким чином, перевагою сполуки 1 може бути більш високий бар'єр до розвитку стійкого вірусу при введенні пацієнтам. Вона також дає потенційну перевагу в лікуванні пацієнтів, яким не допомогли інші методи лікування через розвиток резистентності, оскільки сполука 1 може інгібувати такий стійкий вірус.

Таблиця 2

Значення Ki1 до 1b мутантного ферменту (нМ)

1b зрушення	D168T	D168A	D168E	D168G	D168V	D168Y	D168Q
Приклад 1	0,18	0,43	0,04	0,08	0,14	0,22	0,12
стр 118	0,78	0,86	0,12	0,45	0,65	1,5	0,42
1b зрушення	A156S	A156T	A156V	R155K	R155Q	R155G	R155N
Приклад 1	0,05	5,2	11	0,07	0,43	0,63	0,13
стр 118	0,10	3,4	15	0,08	1,9	2,3	0,56
1Порівняльні дані зібрані в одній серії аналізу ферментів							

У порівнянні зі сполукою прикладу 110 WO 2008/057209 сполуки формули (I) мають наступні додаткові очікувані корисні властивості:

- 1) Низьке ковалентне зв'язування in vivo; і

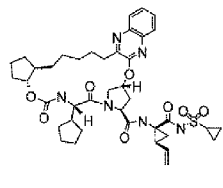
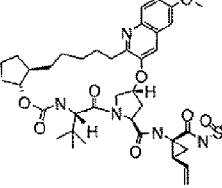
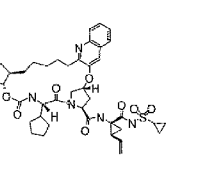
2) Високий рівень впливу в плазмі і на печінку.

Було виявлено, що сполука формули (I) має дуже гарні характеристики ковалентного зв'язування *in vivo* і фармакокінетичні властивості. Виходячи з фармакокінетичних властивостей, що спостерігаються, і ковалентного зв'язування *in vivo* сполуки прикладу 1 і сполуки прикладу 118 WO 2008/057209, сполука формули (I) має значно більш кращі характеристики ковалентного зв'язування *in vivo* і фармакокінетичні властивості.

Сполуки, що утворюють ковалентні зв'язки з білками або утворюють метаболіти, які потім утворюють ковалентні зв'язки з білками, потенційно сприяють збільшенню небажаних явищ у пацієнтів, таких як імунологічна токсичність, опосередкована антитільними відповідями на кон'югат білок-лікарська речовина, і ідіосинкратична токсичність. (Див. Chem. Res. Toxicol. 2004, 17, 3-16).

Сполука прикладу 1 показала недетектоване зв'язування з білками плазми після перорального введення щурам одиначної дози 20 мг/кг. (Див. таблицю 1). При аналогічних умовах, сполука прикладу 118 WO 2008/057209 продемонструвала детектоване зв'язування з білками печінки щура (див. таблицю 1), і тому його можна вважати менш корисною сполукою для введення людині в порівнянні зі сполукою формули (I).

У таблиці 3 приведені деякі додаткові дані по ковалентному зв'язуванню *in vivo*, отримані для споріднених сполук з WO 2008/057209, що містять фрагмент (R, R)-транс-2-алкілциклопентанол, що міститься біля сполуки прикладу 118.

	WO 2008/057209, приклад 108	WO 2008/057209, приклад 103	WO 2008/057209, приклад 96
Структура			
Ковалентне зв'язування білка <i>in vivo</i>	Щур @ 6 год. плазма = 15 пмоль екв./мг печінка = 38 пмоль екв./мг	Щур @ 6 год. плазма = 6 пмоль екв./мг печінка = 24 пмоль екв./мг	Щур @ 6 год. плазма = 6 пмоль екв./мг печінка = 63 пмоль екв./мг

Наявність високого рівня впливу в плазмі і на печінку в доклінічних дослідженнях є перевагою для ефективною демонстрації того, що потенційна лікарська речовина-кандидат не виявляє небажану токсичність. Також більш імовірно, що сполука, з високим рівнем впливу в плазмі і на печінку тварин, має таку ж поведінку в організмі людини, у порівнянні зі сполукою, у якій такий вплив відсутній. Необхідний ефективний вплив такої сполуки в людини може бути досягнутий при більш низькій дозі, що є перевагою як з погляду вартості, так і легкості виготовлення лікарського засобу, а також з погляду потенційного зменшення імовірності виникнення побічних ефектів. Вплив на цільовий орган у багатьох видів, що брали участь у доклінічних дослідженнях, підтверджує, що для цієї сполуки можна досягти високого рівня впливу на цільовий орган у пацієнтів, а високий рівень впливу на печінку як у щурів, так і в собак дає можливість вірогідно оцінити доклінічну токсичність. Високий рівень впливу на печінку є особливо корисним для ВГС, оскільки вона є цільовим органом для даного лікарського засобу.

Сполука прикладу 1 має дуже гарний вплив у плазмі і на печінку щурів. Вплив на печінку щурів, що спостерігається, є більш сильним у порівнянні зі сполукою прикладу 118 і сполукою 110 WO 2008/057209. (Див. таблиця 1). На підставі цих результатів і результатів тестування декількох різних сполук WO 2008/057209 шляхом їхнього перорального введення як щурам (25 мрк), так і собакам (5 мрк), також очікувалося, що сполука формули (I) буде сильніше впливати на печінку собак у порівнянні зі сполукою прикладу 118 і сполукою прикладу 110 WO 2008/057209.

Методи

Інгібіторна активність¹ (Ki) NS3/4A: Інгібіторну активність (Ki) для NS3/4A визначали, як описано в секції IV. Оцінка сполук *supra*, і Mao et al., Anal. Biochem 373:1-8, 2008.

Активність реплікону² EC50: Активність реплікону визначали, використовуючи процедури, описані в Carroll et al., J. Biol. Chem. 278:11979-11984, 2003 і Olsen et al., Anti Microb. Agents 45:3944-3953, 2004.

Плазмова AUC у щурів @ 25 мрк *per os*: Тестовані сполуки розчиняли в прийнятному розчиннику для *iv* введення (наприклад, 20 %:60 %:20 % DMSO:PEG400:вода), або *per os* введення (наприклад, 10 % полісорбат 80:90 % або вода 100 % PEG400), що вводили тваринам (n=3), використовуючи перехресне дослідження, розроблене для негризунів. Зразки плазми відбирали в тимчасових точках між 2 хвилинами і 24 год., і визначали рівні сполук методом ВЕРХ з оберненою фазою. Зразки печінки

щурів брали після смерті тварини, а зразки печінки собак брали за допомогою анестезії (за 0,5 год. до біопсії). Зразки печінки зважували, гомогенізували і розбавляли, використовуючи методи, добре відомі фахівцям у даній галузі, а рівні сполук визначали методом ВЕРХ з оберненою фазою.

Фармакокінетичні параметри обчислювали методом некомпартментного аналізу (наприклад, Watson®, WinNolin®). Передозові концентрації, які були нижчими межі кількісного визначення (BLQ), встановлювали в значення 0. Для оцінки пероральної AUC перші значення BLQ у термінальній фазі задавали у вигляді значення, що дорівнює 1/2 найнижчої межі кількісного визначення, у той час як наступні значення в термінальній фазі задавали такими, що дорівнюють 0. Обчислювали стандартні фармакокінетичні параметри CL_p , V_{dss} , період напіввиведення (тільки для IV), %F, C_{max} , T_{max} , AUC_{0-last}, AUC_{0-infinity}. Значення AUC обчислювали, використовуючи лінійний метод трапецій для збільшення концентрацій і логарифмічний метод трапецій для зменшення концентрацій.

Ковалентне зв'язування⁴ *in vivo*: Тестовані сполуки відповідним чином помічали радіоактивними мітками (3H) і готували 20 мг/кг дозу, що містить радіоактивність 25-75 мКю/щур (чистота >98,5 %), шляхом комбінації холодної сполуки й отриманого випарюванням вихідного розчину з радіоактивною міткою. Цю суміш розчиняли в розчиннику, прийнятному для введення *per os* (див. вище), потім вводили перорально щуру (n=3 на 1 часову точку, 2 год., 6 год., 24 год.). Відбирали плазму і печінку, і до проведення аналізу швидко заморожували і зберігали при -80 °C.

Вимірювання радіоактивності зразків плазми: 200 мкл аліквоти поміщали в 20 мл сцинтиляційний флакон. Додавали 500 мкл Solvable™ і інкубували, струшуючи, протягом 1 год. при 55 °C. Виймали, давали охолонути перед додаванням 15 мл сцинтиляційного коктейлю і вимірювали радіоактивність. Потім зразки плазми (200 мкл аліквоти) обробляли, як описано нижче для білків печінки.

Гомогенізація тканини: Зважені зразки печінки розбавляли 2 об'ємами 100 мМ фосфатного буфера (pH 7,4) і гомогенізували на льоду.

Вимірювання радіоактивності гомогенату печінки: Аліквоти поміщали в 20 мл сцинтиляційний флакон, розбавляли, використовуючи 1 мл Solvable™, і інкубували, струшуючи, протягом 1 год. при 55 °C. Потім виймали з інкубатора і після охолодження додавали 15 мл сцинтиляційного коктейлю і 30 % H₂O₂ і вимірювали радіоактивність.

Преципітація білка: Брали 500 мкл аліквоти, додавали гомогенат:ацетонітрил (1:8) (якщо є підозра, що сполука має низьку розчинність в ацетонітрилі, може бути вибраний інший розчинник), струшували і центрифугували (3500 об. на хв протягом 20 хвилин). Супернатант видалляли.

Ресуспендування осажденного білка: Обробляли ультразвуком (мінімальна інтенсивність, <5 секунд) і струшували в суміші 80 % MeOH:20 % води до руйнування осаду.

Промивання білкового осаду: 2-5 мл MeOH:вода (80:20). За необхідності, варто видалити 1,0 мл супернатанту, додавали 15 мл сцинтиляційного коктейлю і вимірювали радіоактивність. Білковий осад продовжували промивати доти, доки радіоактивність у супернатанті не стала <200 DPM, або доти, доки значення DPM не перестало знижуватися в результаті послідовних промивань, перевищуючи при цьому 200.

Розчинення кінцевого осаду: 1 мл 1N NaOH або Solvable™, інкубували при 50 °C протягом ночі або до повного розчинення.

Вимірювання радіоактивності кінцевого осаду: 1 мл розчиненого осаду, 15 мл сцинтиляційного коктейлю (якщо використовується коктейль, відмінний від ULTIMA GOLD™, може виникнути необхідність у нейтралізації осаду за допомогою 1N HCl), і виконували вимірювання радіоактивності.

Концентрація білка в кінцевому осаді: як стандарт BSA використовували набір BCA або BIO-Rad.

Вимірювання радіоактивності порожніх зразків: 15 мл сцинтиляційного коктейлю, два зразка.

Вимірювання радіоактивності розчинника: використовували відомий об'єм розчинника, три зразка.

Аналіз даних: Усереднювали результати вимірювання радіоактивності (DPM) розчинника й обчислювали визначену активність розчинника, виражену в мКю/моль. Усереднювали результати вимірювання радіоактивності порожніх зразків. Віднімали результат вимірювання радіоактивності усередненого порожнього зразка з результатів вимірювання радіоактивності для кожного осаду, отриманого зі зразків печінки і плазми. Обчислювали величину радіоактивності (мКю) на одиничний об'єм (L) для кожного осаду, отриманого зі зразків печінки і плазми. Обчислювали концентрацію радіоактивності в кожному осаді, отриманому зі зразків плазми і печінки, шляхом розподілу отриманого вище значення (мКю/L) на питому активність (мКю/моль). Обчислювали величину радіоактивності ковалентних зв'язків з білком у пмоль/мг білка.

Вимірювання радіоактивності порожніх зразків: 15 мл сцинтиляційного коктейлю, два зразка.

Вимірювання радіоактивності розчинника: використовували відомий об'єм розчинника, три зразка.

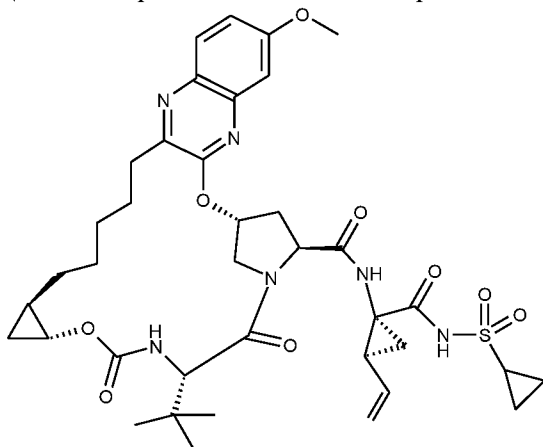
Фізичні властивості⁵: кристалічні тестовані сполуки (сіль калію, приблизно 5 мг) зважували в скляному флаконі і додавали воду або водний буфер (100 мкл). Отриману кашку перемішували протягом 24 год. при кімнатній температурі. Після центрифугування супернатант аналізували методом ВЕРХ з оберненою фазою і визначали рівноважну розчинність шляхом порівняння з каліброваною кривою. Тверду речовину частково переносили на пластину XRPD, сушили, а потім аналізували методом рентгенівської порошкової дифракції. Зразок XRPD порівнювали з позитивним

контролем для кристалічної K⁺ солі, кристалічних цвітер-іонних (або підкислених) і аморфних форм тестованої сполуки. Подальше визначення форми солі одержували з другої частини твердої речовини, яку аналізували, використовуючи 400 МГц ЯМР (Bruker) після розчинення в DMSO-d₆. Спектри ¹H-ЯМР порівнювали з позитивними контролями, описаними вище.

Жоден з документів, представлених у даній заявці у вигляді посилань, не розглядається як попередній рівень техніки для заявленого винаходу.

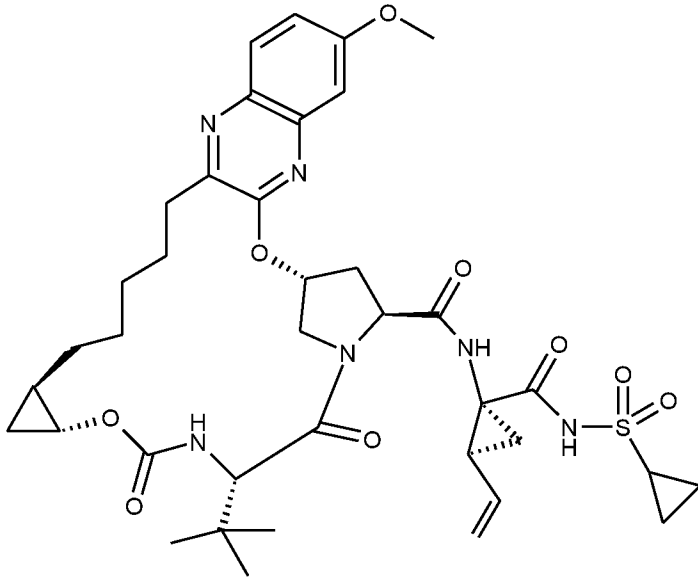
Інші варіанти здійснення розкриті в приведеній нижче формулі винаходу. Хоча показано й описано кілька варіантів здійснення, можуть бути зроблені різні модифікації, без відступу від суті й обсягу даного винаходу.

Данное изобретение относится к макроциклическому соединению формулы (I):



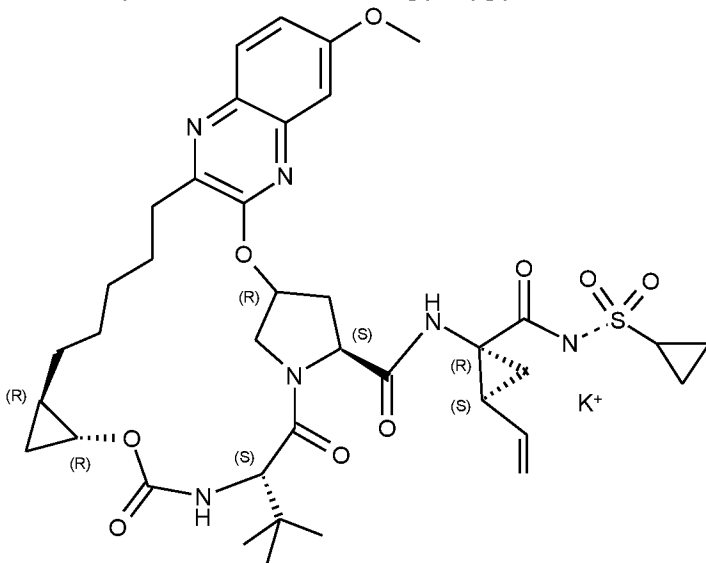
и его применения как ингибитора протеазы вируса гепатита С (ВГС) NS3, а также для лечения или профилактики инфекции ВГС.

1. Сполука формули (I) або її фармацевтично прийнятна сіль:



(I)

2. Фармацевтична композиція, яка містить ефективну кількість сполуки за п. 1 і фармацевтично прийнятний носій.
3. Фармацевтична композиція за п. 2, яка додатково містить другий терапевтичний агент, вибраний із групи, яка складається з інгібітора протеази ВГС і інгібіторів полімерази ВГС NS5B.
4. Застосування сполуки за п. 1 у медицині.
5. Застосування сполуки за п. 1 для профілактики або лікування інфекції ВГС.
6. Застосування сполуки за п. 1 для одержання лікарського засобу для інгібування активності протеази ВГС NS3 у суб'єкта, який цього потребує.
7. Застосування композиції за будь-яким з пп. 2-3 для одержання лікарського засобу для інгібування активності протеази ВГС NS3 у суб'єкта, який цього потребує.
8. Застосування сполуки за п. 1 для одержання лікарського засобу для профілактики або лікування інфекції ВГС у суб'єкта, який цього потребує.
9. Застосування композиції за будь-яким з пп. 2-3 для одержання лікарського засобу для профілактики або лікування інфекції ВГС у суб'єкта, який цього потребує.
10. Спосіб лікування пацієнта, інфікованого ВГС, що включає стадію введення вказаному пацієнту ефективної кількості сполуки за п. 1 або композиції за будь-яким з пп. 2-3.
11. Сполука за п. 1, що має структуру:



12. Фармацевтична композиція, що містить ефективну кількість сполуки за п. 11 і фармацевтично прийнятний носій.
13. Фармацевтична композиція за п. 12, що додатково містить другий терапевтичний агент, вибраний із групи, яка складається з інгібітора протеази ВГС і інгібіторів полімерази ВГС NS5B.
14. Спосіб лікування пацієнта, інфікованого ВГС, що включає стадію введення вказаному пацієнту ефективної кількості сполуки за п. 11.
15. Спосіб лікування пацієнта, інфікованого ВГС, що включає стадію введення вказаному пацієнту ефективної кількості композиції за п. 12.
16. Спосіб лікування пацієнта, інфікованого ВГС, що включає стадію введення вказаному пацієнту ефективної кількості композиції за п. 13.

The present invention relates to macrocyclic compound of formula (I) and its use as inhibitors of the hepatitis C virus (HCV) NS3 protease, and in treating or preventing HCV infections. Formula (I).

