



(19) **UA** (11) **78 774** (13) **C2**  
(51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 20041008768, 24.03.2003

(24) Дата начала действия патента: 25.04.2007

(30) Приоритет: 27.03.2002 US 60/367,971

(46) Дата публикации: 24.04.2007 А61К 31/55  
20070101CFI20070115RMUA А61К  
31/551 20070101CLI20070115RMUA  
А61Р 31/18  
20070101ALI20070115RMUA А61Р  
43/00 20070101CLI20070115RMUA  
C07D 471/14  
20070101ALI20070115RMUA

(86) Заявка РСТ:  
РСТ/CA03/00418, 20030324

(72) Изобретатель:

О'меара Джеффри, СА,  
Симоно Брюно, СА,  
Йоаким Кристиан, СА,  
Дезиэль Робер, СА,  
Огилви Уильям, СА

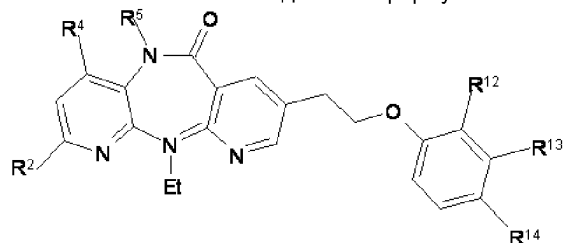
(73) Патентовладелец:

БЕРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ  
ГМБХ, DE

(54) ДИПИРИДОДИАЗЕПИНОНЫ КАК ИНГИБИТОРЫ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ

(57) Реферат:

В заявке описаны соединения формулы I:



, (I)

где

R<sup>2</sup> обозначает H, галоген, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкил,  
OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкил, NHC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкил или N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкил)<sub>2</sub>;

R<sup>4</sup> обозначает H или CH<sub>3</sub>;

R<sup>5</sup> обозначает H или CH<sub>3</sub>;

R<sup>12</sup> обозначает H, галоген, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкил, CF<sub>3</sub>  
или NO<sub>2</sub>;

R<sup>13</sup> обозначает H, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкил, галоген, OH или

NH<sub>2</sub>, при условии, что и R<sup>12</sup> и R<sup>13</sup> не обозначают  
H; и

R<sup>14</sup> обозначает COOR<sup>14a</sup>, где R<sup>14a</sup> обозначает  
H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил; или R<sup>14</sup> обозначает  
C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>алкенил-COOR<sup>14a</sup>, где R<sup>14a</sup> принимает  
вышеуказанные значения; или R<sup>14</sup> обозначает  
C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкил-COOR<sup>14a</sup>, где R<sup>14a</sup> принимает  
вышеуказанные значения;

их соли или пролекарства, которые можно  
применять как ингибиторы обратной  
транскриптазы ВИЧ.

Официальный бюллетень "Промышленная  
собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные  
модели, топографии интегральных микросхем",  
2007, N 5, 25.04.2007. Государственный  
департамент интеллектуальной собственности  
Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** (11) **78 774** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF  
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL  
PROPERTY

(12) DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION

(21), (22) Application: 20041008768, 24.03.2003

(24) Effective date for property rights: 25.04.2007

(30) Priority: 27.03.2002 US 60/367,971

(46) Publication date: 24.04.2007A61K 31/55  
20070101CFI20070115RMUA A61K  
31/551 20070101CLI20070115RMUA  
A61P 31/18  
20070101ALI20070115RMUA A61P  
43/00 20070101CLI20070115RMUA  
C07D 471/14  
20070101ALI20070115RMUA

(86) PCT application:  
PCT/CA03/00418, 20030324

(72) Inventor:

O'meara Jeffrey, CA,  
Simoneou Bruno, CA,  
Joakim Christiane, CA,  
Deziel Robert, CA,  
Ogilvie William, CA

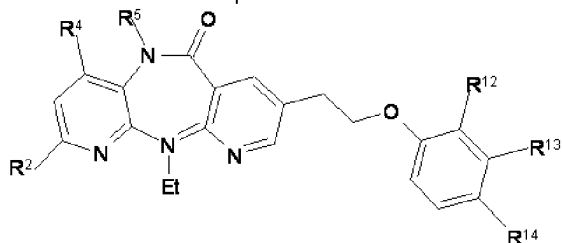
(73) Proprietor:

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL  
GMBH, DE

(54) DIPYRIDODIAZEPINONES AS INHIBITORS OF REVERSE TRANSCRIPTASE

(57) Abstract:

Disclosed are compounds of formula I:



wherein R<sup>2</sup> is H, halogen, (C<sub>1-4</sub>)alkyl, O(C<sub>1-4</sub>)alkyl, NH(C<sub>1-4</sub>)alkyl or N(C<sub>1-4</sub>)alkyl)<sub>2</sub>; R<sup>4</sup> is H or CH<sub>3</sub>; R<sup>5</sup> is H or CH<sub>3</sub>; R<sup>12</sup> is H, halogen, (C<sub>1-4</sub>)alkyl, CF<sub>3</sub>, or NO<sub>2</sub>; R<sup>13</sup> is H, (C<sub>1-4</sub>)alkyl,

halogen, OH, or NH<sub>2</sub>, with the proviso that R<sup>12</sup> and R<sup>13</sup> are not both H; and R<sup>14</sup> is COOR<sup>14a</sup> wherein R<sup>14a</sup> is H or (C<sub>1-6</sub>)alkyl; or R<sup>14</sup> is (C<sub>2-4</sub>)alkenyl-COOR<sup>14a</sup> wherein R<sup>14a</sup> is as defined herein; or R<sup>14</sup> is (C<sub>1-4</sub>)alkyl-COOR<sup>14a</sup> wherein R<sup>14a</sup> is as defined above; or a salt or a prodrug thereof, useful as inhibitors of HIV reverse transcriptase.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2007, N 5, 25.04.2007. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **78 774** (13) **C2**  
(51)МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:  
20041008768, 24.03.2003

(24) Дата набуття чинності: 25.04.2007

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 27.03.2002 US 60/367,971

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 24.04.2007 А61К 31/55 20070101CFI20070115RMUA А61К 31/551 20070101CLI20070115RMUA А61P 31/18 20070101ALI20070115RMUA А61P 43/00 20070101CLI20070115RMUA C07D 471/14 20070101ALI20070115RMUA

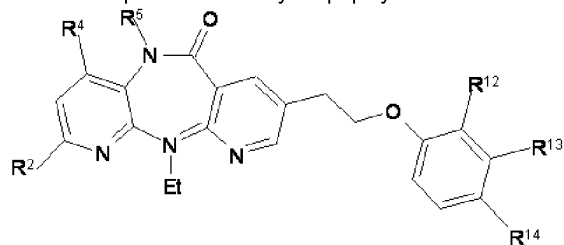
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору РСТ:  
PCT/CA03/00418, 20030324

(72) Винахідник(и):  
О'меара Джеффри , СА,  
Сімоно Брюно , СА,  
Йоакім Крістіан , СА,  
Дезіель Робер , СА,  
Огілві Уільям В., СА

(73) Власник(и):  
БЬОРІНГЕР ІНГЕЛЬХАЙМ ІНТЕРНАЦІОНАЛЬ  
ГМБХ, DE

(54) ДИПИРИДОДІАЗЕПІНОНИ ЯК ІНГІБОРИ ЗВОРОТНОЇ ТРАНСКРИПТАЗИ

(57) Реферат:  
У заявці описані сполуки формули I:



(I)  
де  
R<sup>2</sup> означає Н, галоген, С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл, ОС<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл, NHC<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл або N(С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл)<sub>2</sub>;

R<sup>4</sup> означає Н або СН<sub>3</sub>;  
R<sup>5</sup> означає Н або СН<sub>3</sub>;  
R<sup>12</sup> означає Н, галоген, С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл, CF<sub>3</sub> або NO<sub>2</sub>;  
R<sup>13</sup> означає Н, С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл, галоген, ОН або NH<sub>2</sub>, за умови, що й R<sup>12</sup> й R<sup>13</sup> не означають Н; і  
R<sup>14</sup> означає COOR<sup>14a</sup>, де R<sup>14a</sup> означає Н або С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкіл; або R<sup>14</sup> означає С<sub>2</sub>-С<sub>4</sub>алкеніл-COOR<sup>14a</sup>, де R<sup>14a</sup> має вказані вище значення; або R<sup>14</sup> означає С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл-COOR<sup>14a</sup>, де R<sup>14a</sup> має вказані вище значення;  
їх солі або проліки, які можна застосовувати як інгібітори зворотної транскриптази ВІЛ.

## Опис винаходу

Винахід стосується нових сполук й їх фармацевтично прийнятних солей, їх застосування індивідуально або в сполученні з іншими терапевтичними агентами для лікування або профілактики ВІЛ-інфекції й фармацевтичних композицій, які містять такі сполуки.

Захворювання, відоме як синдром набутого імунodefіциту (СНІД) викликається вірусом імунodefіциту людини (ВІЛ), насамперед штамом, відомим як ВІЛ-1. Для реплікації ВІЛ у клітині-хазяїні інформація, яка міститься у вірусному геномі, повинна бути інтегрована в ДНК клітини-хазяїна. Однак ВІЛ являє собою ретровірус, тобто вірус, у якого генетична інформація зчитується із РНК. Таким чином, цикл реплікації ВІЛ включає стадію транскрипції вірусного геному (РНК) з утворенням ДНК, цей процес є зворотним по відношенню до нормального ходу подій. Транскрипція вірусної РНК із утворенням ДНК відбувається за допомогою ферменту, який тому називається зворотною транскриптазою (ЗТ). Віріон ВІЛ містить копію ЗТ разом з вірусною РНК.

Відомо, що зворотна транскриптаза має три ферментативні функції: вона діє як РНК-залежна ДНК-полімераза, як рибонуклеаза й ДНК-залежна ДНК-полімераза. Як РНК-залежна ДНК-полімераза, ЗТ здійснює транскрипцію копії одноланюгової ДНК вірусної РНК. Як рибонуклеаза ЗТ розщеплює вихідну вірусну РНК і вивільняє ДНК отриману безпосередньо на матриці вихідної РНК. Нарешті, як ДНК-залежна ДНК-полімераза ЗТ створює другий комплементарний ланцюг ДНК, використовуючи перший ланцюг ДНК як матрицю. Два ланцюги утворюють дволанцюгову ДНК, яка інтегрується в геном клітин-хазяїв за допомогою іншого ферменту, який називається інтегразою.

Сполуки, які мають здатність інгібувати ферментативні функції зворотної транскриптази ВІЛ-1, можуть інгібувати реплікацію ВІЛ-1 в інфікованих клітинах. Такі сполуки можна застосовувати для запобігання або лікування інфекції, викликаной ВІЛ-1, у хворих людей, як це встановлено при використанні відомих інгібіторів ЗТ, таких як 3'-азидо-3'-дезокситимідин (AZT), 2',3'-дидезоксиінозин (ddI), 2',3'-дидезоксицитидин (ddC), d4T, ЗТС, невірапін, делавірдин, ефавіренц й абакавір, які є основними лікарськими засобами, дозволеними для застосування при лікуванні СНІДу.

Як і при будь-якій антивірусній терапії застосування інгібіторів ЗТ для лікування СНІДу в остаточному підсумку може приводити до зниження чутливості вірусу до конкретного лікарського засобу. Стійкість (знижена чутливість) до таких лікарських засобів є результатом мутацій, які відбуваються в сегменті зворотної транскриптази гена рої. Дотепер визначені характеристики декількох мутантних штамів ВІЛ і встановлено, що стійкість до відомих терапевтичних агентів зумовлена мутаціями в гені ЗТ. Одними з мутантів, які найбільш часто зустрічаються в клінічних умовах, є: мутант Y181C, у якому залишок тирозину (Y) у кодоні 181 замінений на залишок цистеїну (C), і K103N, у якому залишок лізину (K) у положенні 103 замінений на залишок аспарагіну (N). Інші мутанти, які виникають із зростаючою частотою, при лікуванні з використанням відомих антивірусних лікарських засобів, являють собою мутанти з однією мутацією V106A, G190A, Y188C й P236L; і мутанти із двома мутаціями K103N/Y181C, K103N/P225H, K103N/V108I й K103N/L100I.

Триваюче застосування антивірусних сполук для запобігання ВІЛ-інфекції безперечно буде приводити до збільшення випадків виникнення нових стійких штамів ВІЛ. Таким чином, існує необхідність в створенні нових інгібіторів ЗТ, які мають різні параметри ефективності відносно різних мутантів.

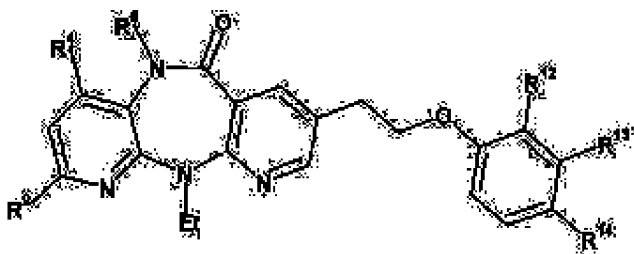
Сполуки, які мають трициклічні структури, які є інгібіторами ВІЛ-1, описані в [U.S. No. 5366972]. Інші інгібітори зворотної транскриптази ВІЛ-1 описані в [Hargrave й ін., J. Med. Chem., 34, (1991), стор. 2231].

В [U.S. No. 5705499] описані 8-арилалкіл-8-арилгетероалкіл-5,11-дигідро-6Н-дипіrido[3,2-В:2',3'-Е][1,4]діазепіни як інгібітори ЗТ. Встановлено, що вказані як приклади сполуки мають певну активність у відношенні ЗТ дикого типу й мутантного ВІЛ-1, насамперед Y181C, але при цьому вони менш ефективні відносно інших мутантів, які несуть одну мутацію, таких як K103N.

В [WO 01/96338A1 й US 6420359] описані діазепінові структури, які містять хінолінові й хінолін-1С-оксидні замінники, як інгібітори ЗТ. Наведені як приклади сполуки мають активність відносно штамів ВІЛ дикого типу (WT), мутантів з однією й двома мутаціями.

У винаході запропоновані заміщені похідні бензойної кислоти, які є ефективними інгібіторами ЗТ ВІЛ-1 дикого типу (WT) і мутантних штамів із двома мутаціями, насамперед мутантного штаму із двома мутаціями K103N/Y181C.

Першим об'єктом винаходу є сполука формули I:



де

R<sup>2</sup> означає H, галоген, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, O C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкіл, N C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл або N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл)<sub>2</sub>;

R<sup>4</sup> означає Н або CH<sub>3</sub>; R<sup>5</sup> означає Н або CH<sub>3</sub>;

R<sup>12</sup> означає Н, галоген, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, CF<sub>3</sub> або NO<sub>2</sub>;

R<sup>13</sup> означає Н, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, галоген, ОН або NH<sub>2</sub>, за умови, що R<sup>12</sup> й R<sup>13</sup> обидва не означають Н; і

R<sup>14</sup> означає COOR<sup>14a</sup>, де R<sup>14a</sup> означає Н або C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкіл; або R<sup>14</sup> означає C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>алкеніл-COOR<sup>14a</sup>, де R<sup>14a</sup> має вказані вище значення; або R<sup>14</sup> означає C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл- COOR<sup>14a</sup>, де R<sup>14a</sup> має вказані вище значення; або її сіль або проліки.

Другим об'єктом винаходу є фармацевтична композиція, призначена для лікування або запобігання ВІЛ-інфекції, яка містить представлену вище в даному описі сполуку формули I, або її фармацевтично прийнятну сіль, і фармацевтично прийнятний носій.

Третім об'єктом винаходу є спосіб лікування або запобігання ВІЛ-інфекції, який полягає в тому, що пацієнтові вводять інгібуючу ВІЛ кількість сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі, або фармацевтичної композиції, які вказані в даному описі.

Четвертим об'єктом винаходу є спосіб лікування або запобігання ВІЛ-інфекції, який полягає в тому, що вводять фармацевтичну композицію, яка містить описану вище сполуку формули I у сполученні з антиретровірусним лікарським засобом.

П'ятим об'єктом винаходу є спосіб лікування або запобігання перинатальної передачі ВІЛ від матері до дитини, який полягає в тому, що матері перед пологами вводять вказану в даному описі сполуку формули I або фармацевтичну композицію, як вони описані вище.

Докладний опис винаходу

Визначення

Якщо не вказане інше, то в описі використовуються наступні визначення:

У контексті даного опису поняття "C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> галкіл", "C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкіл" й "C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкіл" індивідуально або в сполученні з іншим радикалом означають ациклічні алкільні радикали, які містять аж до двох, чотирьох або шести атомів вуглецю відповідно. Прикладами таких радикалів є метил, етил, пропіл, бутил, 1-метилетил, 1-метилпропіл, 2-метилпропіл й 1,1-диметилетил.

У контексті даного опису поняття "C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>алкеніл" індивідуально або в сполученні з іншим радикалом означає ненасичений ациклічний радикал, який містить від двох до чотирьох атомів вуглецю.

У контексті даного опису поняття "галоген" означає атом галогену й включає фтор, хлор, бром і йод.

У контексті даного опису поняття "фармацевтично прийнятна сіль" означає солі, які отримані з фармацевтично прийнятних основ й є нетоксичними. Прикладами придатних основ можуть служити холін, етаноламін й етилендіамін. Мається на увазі, що під обсяг винаходу підпадають також Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> і Ca<sup>++</sup>-солі [див. також Birge S.M. і ін., Pharmaceutical salts, J. Pharm. Sci., 66, (1977), стор. 1-19, включено в даний опис як посилання].

У контексті даного опису поняття "проліки" означає фармакологічно прийнятні похідні, з яких у результаті біотрансформації утворюється діючий лікарський засіб, який стосується сполук формули I. Прикладами таких похідних є (але не обмежуючись ними) складні ефіри й амідні [див. Goodman й Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9-е вид., McGraw-Hill, Int. Ed., "Biotransformation of Drugs, 1995, стор. 11-16, включено в даний опис як посилання].

Докладний опис переважних варіантів здійснення винаходу

Переважно R<sup>2</sup> означає Н, галоген, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкіл, O-C<sub>1</sub>C<sub>4</sub> алкіл або N(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Переважно R<sup>2</sup> означає Н, Cl, F, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, O-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкіл або N-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл)<sub>2</sub>. Більш переважно R<sup>2</sup> означає Н, Cl, F, CH<sub>3</sub>, OMe або OEt. Найбільш переважно R<sup>2</sup> означає Н.

Переважно R<sup>4</sup> й R<sup>5</sup> обидва мають однакове значення.

Більш переважно R<sup>4</sup> означає Н.

Більш переважно R<sup>5</sup> означає CH<sub>3</sub>.

Переважно R<sup>12</sup> означає галоген, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкіл, CF<sub>3</sub> або NO<sub>2</sub>. Більш переважно, R<sup>12</sup> означає Br, Cl, CH<sub>3</sub> або CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>. Найбільш переважно R<sup>12</sup> означає CH<sub>3</sub> або CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>.

Переважно R<sup>13</sup> означає Н, CH<sub>3</sub>, галоген, ОН або NH<sub>2</sub>. Більш переважно R<sup>13</sup> означає Н, CH<sub>3</sub> або ОН. Найбільш переважно R<sup>13</sup> означає Н.

Переважно R<sup>14</sup> означає COOH, COOMe, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>алкенілCOOH або C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкілCOOH. Більш переважно R<sup>14</sup> означає COOH, CH=CH-COOH, CH<sub>2</sub>COOH або CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH. Найбільш переважно R<sup>14</sup> означає COOH.

Сполуки формули I є ефективними інгібіторами ВІЛ дикого типу, а також мають здатність інгібувати мутантний фермент, який несе дві мутації K103N/Y181C.

Сполуки формули I мають інгібуючу активність у відношенні зворотної транскриптази ВІЛ-1. При введенні у вигляді придатних лікарських засобів їх можна застосовувати для лікування СНІД, стану, який передуює синдрому набутого імунodefіциту (ARC) і споріднених захворювань, зв'язаних з ВІЛ-1-інфекцією. Таким чином, наступним об'єктом винаходу є спосіб лікування інфекції, яка викликається ВІЛ-1, який полягає в тому, що людині, інфікованій ВІЛ-1, вводять терапевтично ефективну кількість описаної вище нової сполуки формули I. Як для лікування, так і для профілактики, сполуку можна застосовувати також для запобігання перинатальної передачі ВІЛ-1 від матері до дитини шляхом введення сполуки матері перед пологами.

Сполуки формули I можна вводити у вигляді однократної дози або у вигляді розділених доз оральним або парентеральним шляхом. Придатна оральна доза сполуки формули I може становити від приблизно 0,5 мг до 3 г

на день. Переважно оральна доза сполуки формули I становить від приблизно 100 до 800 мг на день для пацієнта вагою 70 кг. У випадку композицій для парентерального введення придатна стандартна доза може становити від 0,1 до 250 мг сполуки, переважно від 1 до 200 мг. Однак слід мати на увазі, введена доза може змінюватися для різних пацієнтів й доза для кожного конкретного пацієнта залежить від рішення лікаря, який як критерій при призначенні відповідної дози повинен враховувати вагу і стан пацієнта, а також реакцію пацієнта на лікарський засіб.

Якщо сполуки, запропоновані в даному винаході, вводять оральним шляхом, то їх можна вводити у формі фармацевтичних композицій, які містять лікарський засіб у сполученні із сумісним фармацевтичним носієм. Такий носій може являти собою інертний органічний або неорганічний носій, придатний для орального введення. Прикладами таких носіїв є вода, желатин, тальк, крохмаль, стеарат магнію, аравійська камедь, рослинні олії, поліалкіленгліколи, вазелін і т.п.

Сполуки формули I можна застосовувати в сполученні з антиретровірусним лікарським засобом, відомим фахівцеві в даній галузі, як комбінований лікарський засіб для одночасного, окремого або послідовного введення для лікування або запобігання ВІЛ-інфекції в індивідуума. Приклади антиретровірусних лікарських засобів, які можна застосовувати при комбінованому лікуванні з використанням сполук формули I, включають (але не обмежуючись ними) нуклеозидні/нуклеотидні інгібітори зворотної транскриптази (такі як AZT і тенофовір), нуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази (такі як невірапін), інгібітори протеази (такі як ритановір), інгібітори вірусного злиття (такі як T-20), антагоністи CCR5 (такі як SCH-351125), антагоністи CXCR4 (такі як AMD-3100), інгібітори інтегрази (такі як L-870,810), інгібітори тирозинамінотрансферази (TAT), інші лікарські засоби, які знаходяться на стадії дослідження, (такі як PRO-542, BMS-806, TMC-114 або AI-183), протигрибкові або антибактеріальні агенти (такі як флуконазол), і імуномодулятори (такі як левамізол). Крім того, сполуку формули I можна застосовувати в сполученні з іншою сполукою формули I.

Фармацевтичні композиції можна готувати стандартним способом і кінцеві лікарські форми можуть являти собою тверді лікарські форми, наприклад, таблетки, драже, капсули й т.п., або рідкі лікарські форми, наприклад, розчини, суспензії, емульсії й т.п. Фармацевтичні композиції можна піддавати стандартній фармацевтичній обробці, такої як стерилізація. Крім того, фармацевтичні композиції можуть містити стандартні допоміжні речовини, такі як консерванти, стабілізатори, емульгатори, коригенти, змочувальні агенти, буфери, солі для зміни осмотичного тиску й т.п. Тверді носії, які можна застосовувати, включають, наприклад, крохмаль, лактозу, маніт, метилцелюлозу, мікрокристалічну целюлозу, тальк, вторинний кислий фосфат кальцію й високомолекулярні полімери (такі як поліетиленгліколь).

Для парентерального застосування сполуку формули I можна вводити у вигляді водного або неводного розчину, суспензії або емульсії у фармацевтично прийнятному маслі або суміші рідин, які можуть містити бактеріостатичні агенти, антиоксиданти, консерванти, буфери або інші розчинені речовини, які надають розчину ізотонічність із кров'ю, загусники, суспендувальні агенти або інші фармацевтично прийнятні добавки. Такі добавки включають, наприклад, тартратний, цитратний й ацетатний буфери, етанол, пропіленгліколь, поліетиленгліколь, комплексоутворюючі агенти (такі як ЕДТК), антиоксиданти (такі як бісульфіт натрію, метабісульфіт натрію й аскорбінова кислота), високомолекулярні полімери (такі як рідкі поліетиленоксиди) для регулювання в'язкості й поліетиленові похідні ангідридів сорбіту. За необхідності можна додавати також консерванти, такі як бензойна кислота, метил- або пропілпарабен, бензалконійхлорид й інші похідні четвертинного амонію.

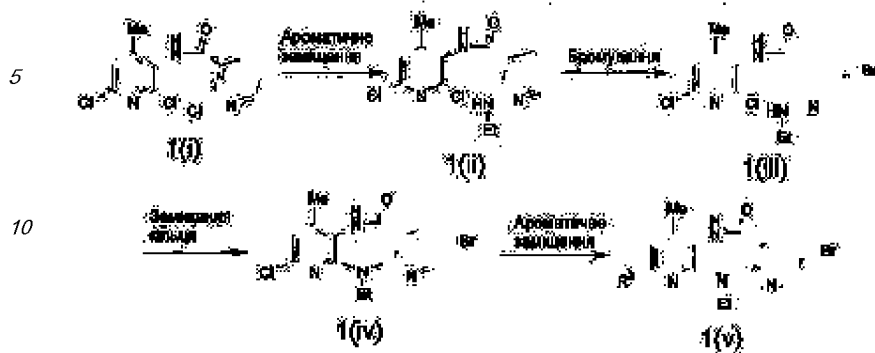
Сполуки, запропоновані у винаході, можна вводити також у вигляді розчинів для назального введення й вони можуть містити крім сполук, запропонованих у даному винаході, придатні буфери, агенти для регулювання тоничності, протимікробні консерванти, антиоксиданти й агенти, які підвищують в'язкість, у водному носії. Прикладами агентів, які підвищують в'язкість, є полівініловий спирт, похідні целюлози, полівінілпіролідон, полісорбати або гліцерин. Протимікробні консерванти, які можна додавати, включають бензалконійхлорид, тимерозал, хлорбутанол або фенілетиловий спирт.

Крім того, сполуки, запропоновані у винаході, можна вводити у вигляді супозиторію.

Метод і синтез

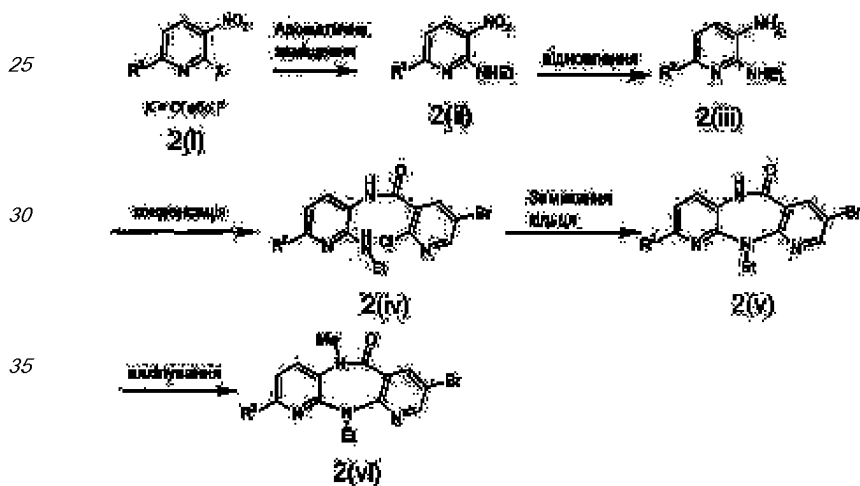
Фахівець в галузі синтетичної органічної хімії на основі своїх знань може одержувати сполуки, запропоновані у винаході. Приклади реакційних схем наведені нижче на схемах 1-4. Замісники R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>12</sup>, R<sup>13</sup>, R<sup>13</sup> й R<sup>14</sup> мають значення, вказані в описі.

**Схема 1: Одержання проміжних продуктів, де R<sup>2</sup> означає Me**



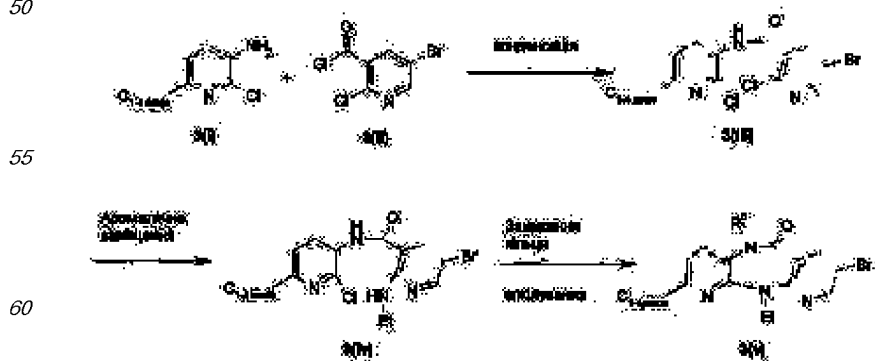
Загалом метод полягає в тому, що шляхом ароматичного заміщення (S<sub>N</sub>AR) сполуки 1(i) Et-NH<sub>2</sub> одержують проміжну сполуку 1(ii). Потім шляхом галогенування положення 5 за допомогою бромувального агента (наприклад, NBS або бром) одержують 1(iii). У результаті замикання кільця сполуки 1(iii) за допомогою проведеної в присутності основи реакції S<sub>N</sub>AR утворюється трициклічний проміжний продукт 1(iv). Шляхом введення замісника R<sup>2</sup> за допомогою ароматичного заміщення хлору в положенні C-2 сполуки 1(iv) одержують проміжну сполуку 1(v).

**Схема 2: Одержання проміжних продуктів, де R<sup>2</sup> означає Me**



Послідовність реакцій на схемі 2 аналогічна до послідовності, описаної в J.M. Klunder й ін.; J. Med. Chem. 41, 1998, стор. 2960-2971 й в С.L. Cywin й ін.; J. Med. Chem., 41, 1998, стор. 2972-2984. Загалом, метод полягає в тому, що шляхом ароматичного заміщення (S<sub>N</sub>AR) сполуки 2(i) Et-NH<sub>2</sub> одержують проміжний продукт 2(ii). Шляхом відновлення нітрогрупи (наприклад, за допомогою каталітичного гідронування) одержують сполуку 2(iii). У результаті реакції конденсації, проведеної в присутності основи, сполуки 2(iii), наприклад, з 5-бром-2-хлор-3-піридинкарбонілхлоридом, одержують сполуку 2(iv). Після замикання кільця сполуки 2(iv), яке здійснюють шляхом реакції S<sub>N</sub>AR у присутності основи, одержують трициклічний проміжний продукт 2(v). Метальну групу R<sup>5</sup> у сполуці 2(vi) можна вводити за допомогою відомого в даній галузі алкілування з використанням, наприклад, метилйодиду.

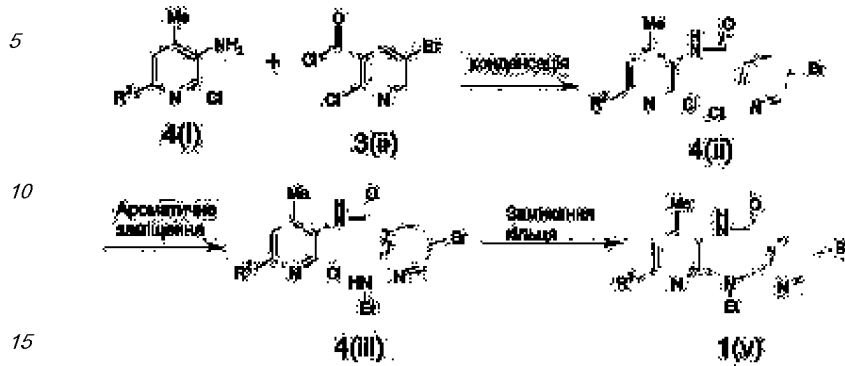
**Схема 3: Одержання проміжних продуктів, де R<sup>2</sup> означає C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкіл**



Загалом метод полягає в тому, що шляхом реакції конденсації сполук 3(i) та 3(ii), яку проводять у присутності основи, одержують проміжний продукт 3(iii). Шляхом ароматичного заміщення (S<sub>N</sub>AR) сполуки 3(iii) Et-NH<sub>2</sub> одержують проміжний продукт 3(iv). Замикання кільця сполуки 3(iv) проводять за допомогою S<sub>N</sub>AR-реакції в присутності основи, одержуючи трициклічний проміжний продукт, з якого шляхом алкілування

одержують проміжний продукт 3(v).

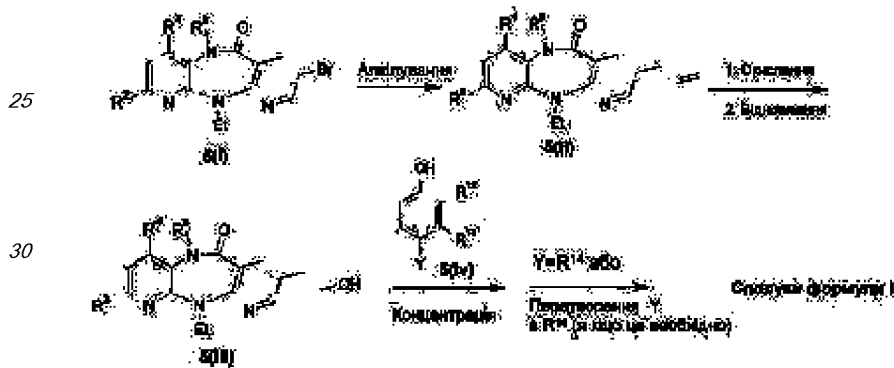
**Схема 4: Альтернативний варіант одержання сполуки, де R<sup>1</sup> означає Me**



20

Загалом метод полягає в тому, що за допомогою реакції конденсації сполук 4(i) і 3(ii) у присутності основи одержують проміжний продукт 4(ii). Шляхом ароматичного заміщення (S<sub>N</sub>AR) сполуки 4(ii) Et-NH<sub>2</sub> одержують проміжний продукт 4(iii). Шляхом замикання кільця 4(iii) за допомогою реакції S<sub>N</sub>AR у присутності основи одержують трициклічний проміжний продукт, який представляє собою сполуку 1(v).

**Схема 5: Введення похідних бензойної кислоти**



Загалом метод полягає в тому, що бром-вмісне похідне 5(i), синтезоване відповідно до методу, представленому в описі, піддають реакції сполучення з реагентом, що представляє собою алілолово, в апротонному розчиннику (наприклад, ДМФ) у присутності каталізатора, у результаті чого утворюються С-8-замісники 5(ii). Після окислення подвійного зв'язку (наприклад, шляхом озонолізу з одержанням озоніду), і наступного відновлення одержують С-8-гідроксиетильний замісник 5(iii). За допомогою реакції типу реакції Міцунобу, нафтильні похідні 5(iv), 5(v) або 5(vi), де Y має значення, вказані для R<sup>14</sup>, за винятком COOH, конденсують зі сполукою 5(iii), одержуючи сполуку формули I. В альтернативному варіанті, якщо Y означає попередник групи R<sup>14</sup>, наприклад, COOCH<sub>3</sub>, можна застосовувати реакцію типу реакції Міцунобу для конденсації сполуки 5(iv) або 5(v) зі сполукою 5(iii), і після цього Y можна хімічним шляхом перетворювати в замісники R<sup>14</sup>, наприклад, шляхом омилення COOCH<sub>3</sub>, з утворенням COOH, у результаті чого одержують сполуку формули I.

Як вказано вище, сполука, запропонована у винаході, інгібує ферментативну активність ЗТ ВІЛ-1. Шляхом тестування цих сполук відповідно до описаного нижче методу встановлено, що вони інгібують РНК-залежну ДНК-полімеразну активність ЗТ ВІЛ-1. Встановлено (дані не представлені), що вони інгібують також ДНК-залежну ДНК-полімеразну активність ЗТ ВІЛ-1. За допомогою описаного нижче аналізу на основі зворотної транскриптази (ЗТ) сполуки можна тестувати відносно їх здатності інгібувати РНК-залежну ДНК-полімеразну активність ЗТ ВІЛ-1. Таким шляхом було проведене тестування деяких конкретних сполук, які описані в наведених нижче прикладах. Результати тестування наведені в таблиці 1 у вигляді значень IC<sub>50</sub> й EC<sub>50</sub>.

Приклади

Нижче винахід більш докладно проілюстрований на прикладах, які не обмежують його обсяг. Всі реакції проводили в атмосфері азоту або аргону, якщо не вказане інше. Температури представлені в градусах Цельсія. Відсотки або співвідношення для розчинів являють собою об./об.-співвідношення, якщо не вказане інше.

Скорочення або символи, які використовуються в описі, мають наступні значення:

- ДЕАД: діетилазодикарбоксилат;
- ДІАД: діізопропілазодикарбоксилат;
- ДІЕА: діізопропіл етил амін; ДМАП: 4-(диметиламіно)піридин;
- ДМСО: диметилсульфоксид;
- ДМФ: диметилформамід;
- ДЦК: дициклогексилкарбодіімід;
- ES MS: мас-спектрометрія з використанням електронного пучка;
- Et: етил;

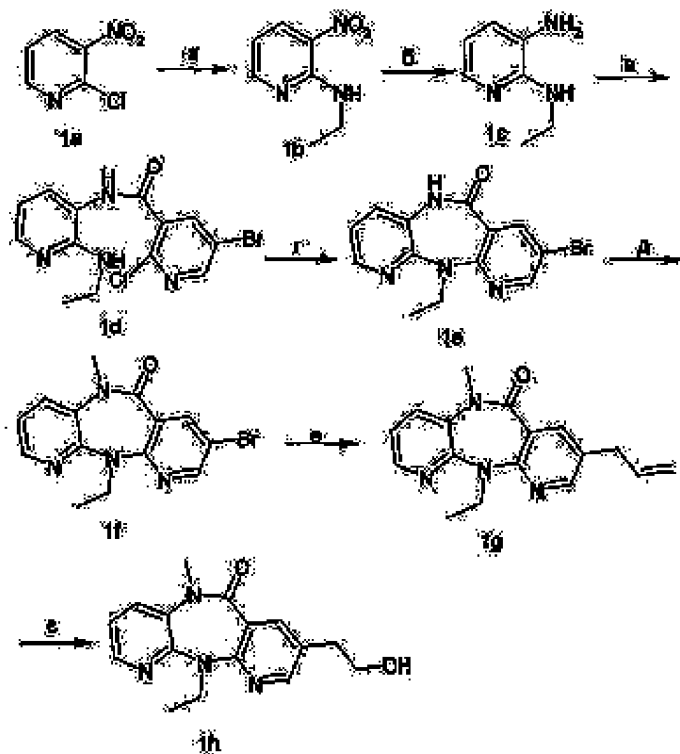
EtOH: етанол;  
 EtOAc: етилацетат;  
 Et<sub>2</sub>O: діетиловий ефір;  
 ВЕРХ: рідинна хроматографія високого розділення;  
 -Pr: ізопропіл;  
 Me: метил;  
 MeOH: метанол;  
 MeCN: ацетонітрил;  
 NaHMDS: гексаметилдисилазид натрію;  
 NEC: N-бромсукцинімід;  
 Ph: феніл;  
 ТБЕ: Трис-борат-ЕДТК;  
 ТБТУ: тетрафторборат 2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-N,N,N,N'-тетраметилуронію;  
 ТФК: трифторофосфорна кислота;  
 ТГФ: тетрагідрофуран;  
 БУО: бляшкоутворюючі одиниці;  
 ДЕПК: діетилпірокарбонат;  
 ДТТ: дитіотреїтол;  
 EDTA: етилендіамінотетраацетат;  
 УМФ: уридин-5'-монофосфат;  
 УТФ: уридин-5'-трифосфат;  
 МЕС: 2-(*n*-морфоліно)етансульфонова кислота;  
 ДСН-ПААГ: гель-електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію;  
 ММСО: граничне значення пропускнуої молекулярної маси;  
 Біс-трис-пропан: 1,3-біс{трис(гідроксиметил)метиламіно}пропан;  
 GSH: відновлений глутатіон;  
 ОБГ: *n*-октил-*p*-О-глюкозид.

Синтез

У наступних прикладах проілюстровані способи одержання сполук, запропонованих у винаході.

Приклад 1

Стадія а:



До розчину 2-хлор-3-нітропіридину 1а (51г, 325ммоль) у ТГФ (650мл) додавали 2М розчин етиламіну в ТГФ (365мл, 731ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Реакційну суміш зливали у воду (~1,5 л) і утворений твердий продукт фільтрували й сушили при зниженому тиску, одержуючи сполуку 1b (52г).

Стадія б:

Розчин 2-(етиламіно)-3-нітропіридину 1b (52 г) в MeOH (600 мл) перемішували протягом ночі при кімнатній температурі в атмосфері водню (1 атм.) у присутності 20%-ного Pd(OH)<sub>2</sub>/C (10,4 г). Каталізатор видаляли

шляхом фільтрації через діатомову землю. Фільтрат концентрували при зниженому тиску, одержуючи сполуку 1с у вигляді твердої речовини чорного кольору (39 г, вихід 88% після стадій а й б).

Стадія в:

5 До охолодженого розчину 3-аміно-2-(етиламіно)піридину 1с (30,6 г, 223 ммоль) в MeCN (740 мл) додавали твердий NaHCO<sub>3</sub> (56,3 г, 669 ммоль). Через 5 хв додавали неочищений 5-бром-2-хлор-3-піридинкарбонілхлорид (отриманий з 5-бром-2-гідрокси-3-піридинкарбонової кислоти й SOCl<sub>2</sub> (1екв., 223ммоль) [як описано в T. W. Gero й ін. в Synth. Commun. 19, 1989, стор. 553-559 (документ включений у даний опис як посилання) за винятком водної обробки]. Через 2 год реакційну суміш зливали на лід/H<sub>2</sub>O (1,5л) і утворений твердий продукт  
10 фільтрували, промивали H<sub>2</sub>O і потім гексаном. Після сушіння при зниженому тиску протягом ночі одержували сполуку 1d у вигляді твердої речовини чорного кольору (54,9г, вихід 69%).

Стадія г:

15 До розчину 2-хлор-N-(2-(етиламіно)-3-піридиніл)-5-бром-3-піридинкарбоксаміду 1d (54,9г, 154,4ммоль) у піридині (308мл) при 50°C додавали по краплях 1M розчин NaHMDS у ТГФ (355мл, 355ммоль). Через 10хв реакційної суміші давали охолонути до кімнатної температури й потім зливали на льодяну воду (2л). Утворений твердий продукт фільтрували, промивали водою й потім гексаном. Після сушіння при зниженому тиску протягом ночі одержували сполуку 1e (36г, вихід 75%) у вигляді твердої речовини темно-зеленого кольору.

Стадія д:

20 До розчину 8-бром-5,11-дигідро-11-етил-6Н-дипіrido[3,2-b:2',3'-e] [1,4]діазепін-6-ону 1e (36,7г, 115ммоль) у ДМФ (380мл) додавали NaN (3,5г, 138ммоль) і суміш нагрівали до 50°C протягом 30 хв. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури й обробляли MeI (14,3мл, 230ммоль). Через 1,5 год реакційну суміш зливали на льодяну воду. Твердий продукт фільтрували, промивали водою й потім гексаном, одержуючи після сушіння сполуку 1f (37,9г, вихід 99%) у вигляді твердої речовини темно-сірого кольору.

Стадія е:

25 Алілтрибутилолово (30,7мл, 99,0ммоль) і Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> (5,20г, 4,50ммоль) додавали до дегазованого (шляхом пропускання N<sub>2</sub> через розчин протягом 30хв) розчину  
30 8-бром-5,11-дигідро-11-етил-5-метил-6Н-дипіrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]діазепін-6-ону 1f (30,0г, 90,0ммоль) у ДМФ (450мл) при кімнатній температурі. Суміш перемішували при 90°C протягом 1,5 год, потім охолоджували до кімнатної температури й концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою експрес-хроматографії (гексан:EtOAc, від 8:2 до 7:3), одержуючи сполуку 1g (22,19г, вихід 84%).

Стадія є:

35 Струменем озонованого кисню барботували холодний (-78°C) розчин 5,11-дигідро-11-етил-5-метил-8-(2-пропеніл)-6Н-дипіrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]діазепін-6-ону 1g (22,19г, 75,4ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150мл) і MeOH (150мл) протягом 2,5год. Потім розчин барботували струменем N<sub>2</sub> протягом 15хв і після цього до розчину додавали твердий NaBH<sub>4</sub> (4,99г, 132ммоль). Реакційної суміші давали нагрітися до кімнатної температури. Через 1год додавали водний насичений NH<sub>4</sub>Cl (200мл) і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2год. Органічні розчинники видаляли при зниженому тиску. До залишку додавали воду (300мл) і CHCl<sub>3</sub> (300мл). Фази розділяли й водний шар екстрагували CHCl<sub>3</sub> (3 x 300мл). Об'єднані органічні шари сушили (MgSO<sub>4</sub>), фільтрували й концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали експрес-хроматографією (EtOAc:CHCl<sub>3</sub>, 4:1) одержуючи сполуку 1h (16,1 г, вихід 72%) у вигляді  
40 твердої речовини білого кольору.

Приклад 2

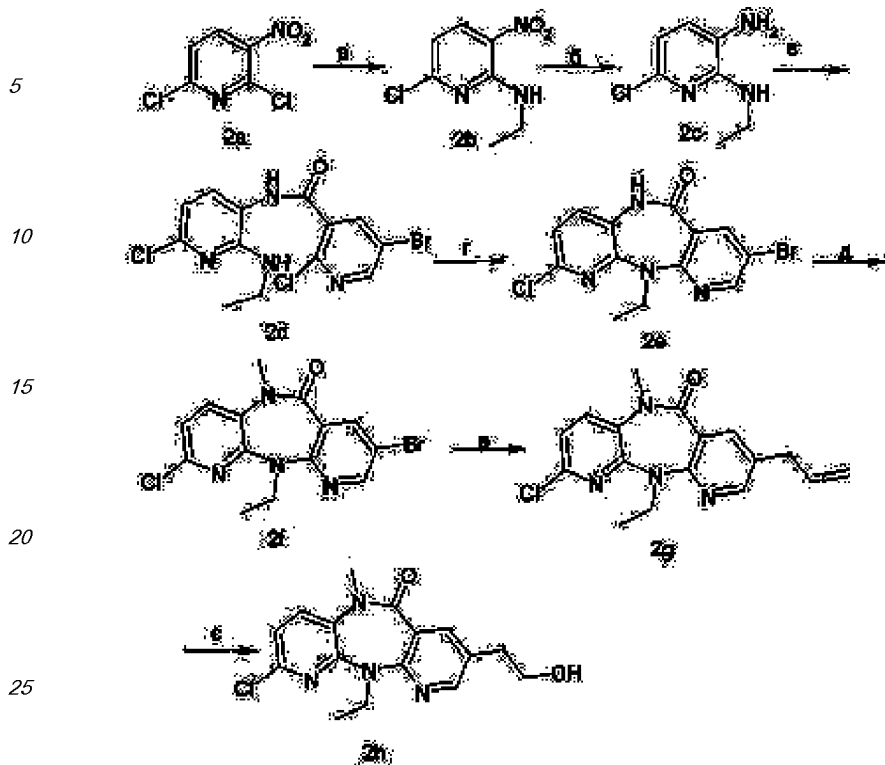
45

50

55

60

65



Стадія а:

Охолоджений на льоді розчин EtNH<sub>2</sub> (49,8г, 1,10моля) у толуолі (200мл) додавали протягом 15хв до охолодженого на льоді розчину 2,6-дихлор-3-нітропіридину 2а (100,0г, 0,52моля) у толуолі (225мл). Суміш перемішували при 0°С протягом 45хв. Додавали воду (500мл) і EtOAc (500 мл) і розділяли фази. Органічний шар послідовно промивали водою (200 мл) і соляним розчином (200 мл), сушили (MgSO<sub>4</sub>), фільтрували й концентрували при зниженому тиску. Твердий продукт, що залишився, перекристалізували з MeOH, одержуючи сполуку 2b (83,7г, вихід 80%) у вигляді голоч жовтого кольору.

Стадія б:

Сполуку 2с одержували методом, аналогічним до методу, описаному в прикладі I, стадія б.

Стадія в:

Розчин 5-бром-2-хлор-3-піридинкарбонілхлориду (30,0г, 97,0ммолів) в MeCN (100мл) додавали через канюлю при кімнатній температурі до розчину 3-аміно-6-хлор-2-(етиламіно)піридину 2с (16,6г, 97,0ммолів) в MeCN (180мл), який містить твердий NaHCO<sub>3</sub> (14,2г, 169ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1год. Додавали воду (200мл) і суміш перемішували протягом 10хв. Утворену суспензію фільтрували. Твердий продукт промивали водою, потім гексаном і сушили при зниженому тиску, одержуючи сполуку 2d (28,4г, вихід 75%).

Стадія г:

1М розчин NaHMDS у ТГФ (167,5мл, 167,5ммоль) повільно додавали до розчину 5-бром-2-хлор-N-{2-(етиламіно)-6-хлор-3-піридиніл}-3-піридинкарбоксаміду 2d (28,4г, 72,8ммоль) у піридині (146мл), нагрітому до 50°С. Реакційну суміш перемішували при 50°С протягом 1,5 год. Потім суміш зливали на суміш води й льоду (1 л) і через 1 год фільтрували утворену суспензію. Твердий продукт промивали водою й сушили при зниженому тиску, одержуючи сполуку 2e (23,4г, вихід 91%).

Стадія д:

Твердий NaH (60%-на масляна дисперсія, 3,46г, 86,1ммоль) додавали протягом 30хв до розчину 8-бром-2-хлор-5,11-дигідро-11-етил-6Н-дипіридо[3,2-б:2',3'-е] [1,4]діазепін-6-ону 2e (23,4г, 66,3ммоль) у ДМФ (220мл) при 50°С. Суміш перемішували при 50°С протягом 1 год, потім давали нагрітись до кімнатної температури. Суміш зливали на воду (1 л) і утворену суспензію фільтрували. Твердий продукт послідовно промивали водою й гексаном, потім сушили при зниженому тиску, одержуючи сполуку 2f (23,0 г, вихід 94%).

Стадія е:

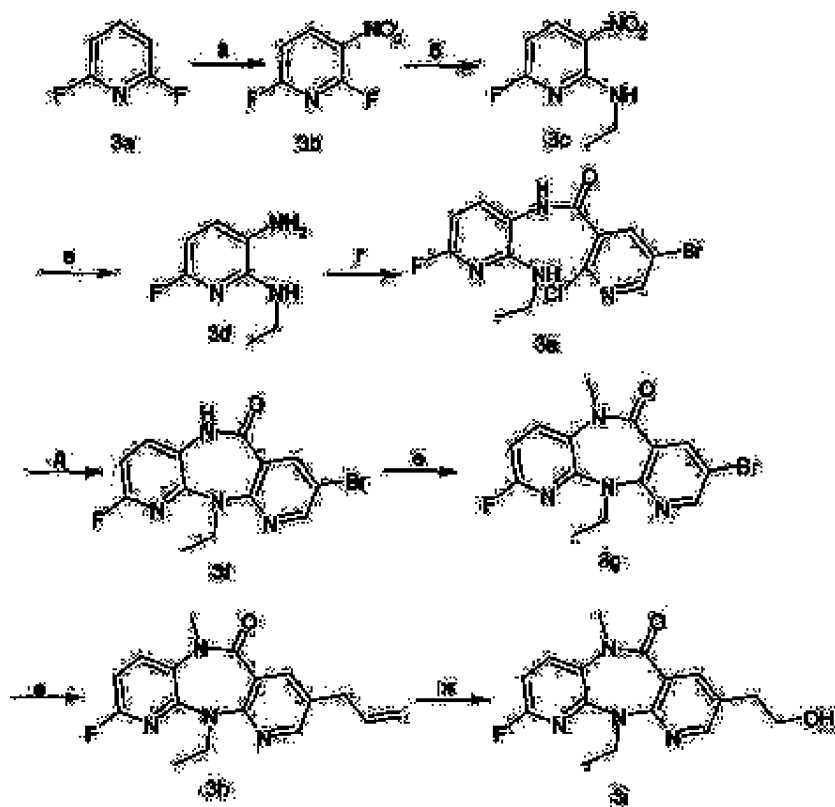
Алілтрибутилолово (21,3мл, 68,7ммоль) і Pd(PH<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> (3,61г, 3,12ммоль) додавали до дегазованого (шляхом пропускання N<sub>2</sub> через розчин протягом 30хв) розчину 8-бром-2-хлор-5,11-дигідро-11-етил-5-метил-6Н-дипіридо[3,2-б:2',3'-е] [1,4]діазепін-6-ону 2f (23,0г, 62,5ммоль) у ДМФ (312мл). Суміш нагрівали до 90°С протягом 2 год. Суміш концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою експрес-хроматографії (гексан: EtOAc, 7:3) одержуючи сполуку 2g (13,4 г, вихід 65%).

Стадія є:

Озонований кисень вводили в холодний (-78°С) розчин 2-хлор-5,11-дигідро-11-етил-5-метил-8-(2-пропеніл)-6Н-дипіридо[3,2-б:2',3'-е] [1,4]діазепін-6-ону 2g (13,4г,

40,7ммоль) в MeOH (102мл) і CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (102мл) до повного поглинання алкену. Розчин барботували азотом для видалення надлишку O<sub>3</sub>. Потім невеликими порціями додавали твердий NaBH<sub>4</sub> (2,69г, 71,1ммоль) і суміші давали повільно нагрітися до кімнатній температурі. Через 1год додавали водний насичений NH<sub>4</sub>Cl (150мл) і суміш перемішували протягом 20хв. Органічні розчинники видаляли при зниженому тиску. До водного розчину додавали воду (100мл). Розчин екстрагували CHCl<sub>3</sub> (3 x 200мл). Об'єднані органічні шари сушили (MgSO<sub>4</sub>), фільтрували й концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою експрес-хроматографії (EtOAc:CHCl<sub>3</sub>, 4:1), одержуючи сполуку 2h (10,4г, вихід 77%).

Приклад 3:



Стадія а:

До суміші концентрованої сірчаної кислоти (600мл) і димлячої азотної кислоти (90%, 400мл) у льодяній бані (внутрішню температуру підтримували на рівні 5-10°C) додавали по краплях 2,6-дифторпіридин 3a (200г, 1,74ммоль). Утворену суміш перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Суміш повільно зливали на 3 кг льоду й екстрагували Et<sub>2</sub>O (2 x 2л). Об'єднані органічні шари промивали водним 1,5н. NaOH (2x1л), потім водним насиченим NaHCO<sub>3</sub> (400мл) або до досягнення значення pH приблизно 8-9. Органічні шари сушили над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували й концентрували при зниженому тиску до постійної маси (для видалення 2,6-дифторпіридину, який не прореагував: 10-12%). У результаті одержували сполуку 3b у вигляді рідини жовтого кольору (207,3г, вихід 74%).

Стадія б:

До розчину 2,6-дифтор-3-нітропіридину 3b (45,7г, 285ммоль) у ТГФ (500мл) при -40°C додавали по краплях розчин етиламіну (25,7г, 570ммоль) у ТГФ (250мл). Через 30хв, реакційну суміш концентрували при зниженому тиску й залишок розчиняли в EtOAc. Органічну фазу промивали соляним розчином, сушили (MgSO<sub>4</sub>), фільтрували й концентрували. Утворений твердий продукт очищали за допомогою експрес-хроматографії (15% EtOAc у гексані), одержуючи сполуку 3c (43, 2г, вихід 82%) у вигляді твердої речовини жовтого кольору.

Стадія в:

Розчин 2-етиламіно-6-фтор-3-нітропіридину 3c (43,2г, 230ммоль) у ТГФ (1л) перемішували протягом ночі при кімнатній температурі в атмосфері водню (1атм.) у присутності 20%-ного Pd(OH)<sub>2</sub>/C (4,35г). Каталізатор видаляли фільтрацією через діатомову землю. Фільтрат концентрували при зниженому тиску, одержуючи сполуку 3d (36,3г, вихід 95%) у вигляді твердої речовини чорного кольору.

Стадія г:

До охолодженого розчину (4°C) 3-аміно-2-етиламіно-6-фторпіридину 3d(31,0г, 200ммоль) у MeCN (160мл) додавали твердий NaHCO<sub>3</sub> (50,4г, 600ммоль). Через 15хв додавали розчин 5-бром-2-хлор-3-піридинкарбонілхлориду (1екв., 200ммоль) у MeCN (155мл). Після витримання протягом 60хв при кімнатній температурі реакційну суміш зливали на воду (1,2л) і перемішували протягом 30 хв. Утворений твердий продукт фільтрували, сушили протягом ночі при зниженому тиску при 50 °C. У результаті одержували сполуку 3e (73,7г, вихід 99%) у вигляді твердої речовини чорного кольору.

Стадія д:

До розчину 2-хлор-N-{2-(етиламіно)-6-фтор-3-піридиніл}-5-бром-3-піридинкарбоксаміду 3e (73,5г, 216ммоль)

у піридині (435мл) при 50°C додавали по краплях 1М розчин NaHMDS у ТГФ (520мл, 520ммоль). Через 10хв реакційної суміші давали нагрітися до кімнатної температури, після чого зливали на льодяну воду (2л). Утворений твердий продукт фільтрували, промивали водою і потім гексаном. Твердий продукт сушили при

зниженому тиску, одержуючи сполуку 3f (50,6г, вихід 69%) у вигляді твердої речовини темно-зеленого кольору.

Стадія е:

До розчину 8-бром-5,11-дигідро-11-етил-2-фтор-6Н-дипіrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]діазепін-6-ону 3f (44г, 130,5ммоль) у ДМФ (520мл) додавали NaN (4,28г, 178ммоль) і суміш нагрівали до 50 °С протягом 30хв. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури й обробляли MeI (24,4мл, 522ммоль). Через 1,5год реакційну суміш зливали на льодяну воду. Твердий продукт фільтрували, промивали водою і потім гексаном, сушили при зниженому тиску, одержуючи сполуку 3g (43,2г, вихід 94%) у вигляді твердої речовини темно-сірого кольору.

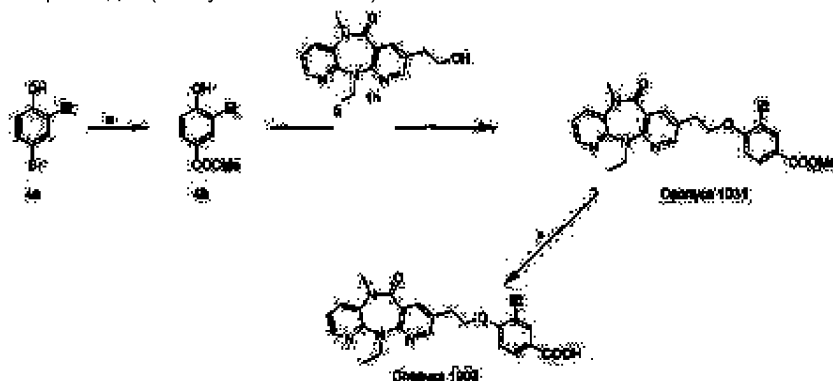
Стадія є:

Алілтрибутилово (32,0мл, 103,4ммоль) і Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> (5,43г, 4,70ммоль) додавали до дегазованого (шляхом пропускання N<sub>2</sub> через розчин протягом 45хв) розчину 8-бром-5,11-дигідро-11-етил-2-фтор-5-метил-6Н-дипіrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]діазепін-6-ону 3g (33,0г, 94,0ммоль) у ДМФ (470мл). Через 1, 2, 3, 4 і 5 год додавали додаткові кількості Pd(Ph<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1,09г, 0,94ммоль) для завершення реакції. Суміш нагрівали до 90 °С протягом 6 год. Суміш концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою експрес-хроматографії (гексан:EtOAc, від 8:2 до 7:3), одержуючи сполуку 3h (22,4г, вихід 76%).

Стадія є:

Струменем озонованого кисню барботували холодний (-78°C) розчин 5,11-дигідро-11-етил-2-фтор-5-метил-8-(2-пропешл)-6Н-дипіrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]діазепін-6-ону 3h (22,38г, 71,6ммоль) у CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100мл) і MeOH (100мл) протягом 3год. Після цього розчин барботували протягом 15хв струменем N<sub>2</sub> і потім до розчину додавали твердий NaBH<sub>4</sub> (5,05г, 133ммоль). Реакційній суміші давали нагрітися до кімнатної температури. Через 1 год до реакційної суміші додавали додаткову порцію NaBH<sub>4</sub> (1,62г, 43,0ммоль). Ще через 1 год додавали водний насичений NH<sub>4</sub>Cl (150мл) і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 30хв. Органічні розчинники видаляли при зниженому тиску. Додавали воду (200мл) і суміш екстрагували CHCl<sub>3</sub> (3 x 300мл). Об'єднані органічні шари сушили (MgSO<sub>4</sub>), фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою експрес-хроматографії (EtOAc:CHCl<sub>3</sub>, 4:1), одержуючи сполуку 3i (19,7г, вихід 72%) у вигляді твердої речовини білого кольору.

Приклад 4 (сполуки 1003 і 1031)



Стадія а:

Розчин 1,6М *n*-BuLi у гексані (6,22 мл, 9,95 ммоль) швидко додавали до холодного (-78°C) розчину сполуки 4a (0,87г, 4,33ммоль) у ТГФ (20мл). Суміш перемішували при -78 °С протягом 10хв, давали нагрітися до 0 °С, витримували при 0°C протягом 1 год. У реакційну суміш вводили струмінь CO<sub>2</sub> протягом 10хв і розчин підкисляли шляхом додавання водного 1,0н. розчину HCl. Суміш екстрагували EtOAc. Органічний шар сушили (MgSO<sub>4</sub>), фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Залишок розчиняли в Et<sub>2</sub>O (20мл) і обробляли надлишковою кількістю розчину CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> у Et<sub>2</sub>O (приблизно 0,6М, 10мл) протягом 10хв. Суміш концентрували при зниженому тиску і залишок очищали за допомогою експрес-хроматографії (гексан: EtOAc, від 4:1 до 7:3), одержуючи 4b (0,13г, вихід 17%).

Стадія б:

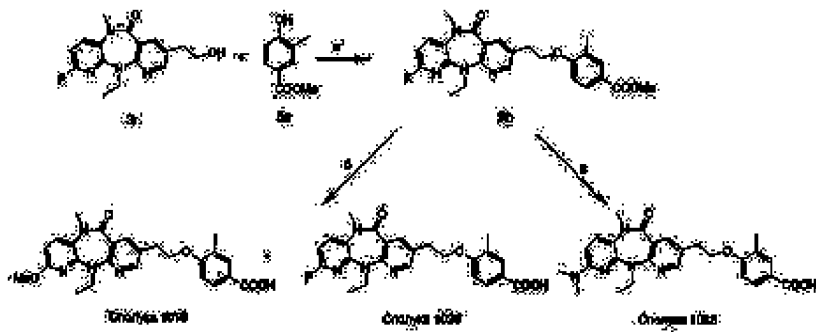
Розчин ДІАД (86мкл, 0,44ммоль) у ТГФ (2,0мл) додавали протягом 30хв до розчину, який містить сполуку 1h (100мг, 0,33ммоль), сполуку 4b (60,0мг, 0,33ммоль) і PPh<sub>3</sub> (114мг, 0,44ммоль) у ТГФ (10мл), при 25°C. Суміш перемішували протягом 1год і потім концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою експрес-хроматографії (гексан:EtOAc, від 7:3 до 1:1), одержуючи сполуку 1031 (128 мг, вихід 83%).

Стадія в:

Водний 1,0н. розчин LiOH (1,52мл, 1,52ммоль) додавали до розчину сполуки 1031 (100мг, 0,22ммоль) у ТГФ (6мл) і MeOH (2мл). Реакційну суміш перемішували при 25°C протягом 24год, потім нагрівали до температури дефлегмації протягом 1год. Розчин підкисляли шляхом додавання водного 1,0н. розчину HCl, потім екстрагували EtOAc. Органічний шар промивали водою (2 x) і соляним розчином, сушили (MgSO<sub>4</sub>), фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Залишок розтирали з Et<sub>2</sub>O/гексаном, одержуючи сполуку 1003 (80мг, вихід

83%) у вигляді твердої речовини білого кольору. Суміш сполуки 1003 (38,0 мг, 0,085 ммоль) і водного 0,02н. розчину NaOH (4,3 мл, 0,085ммоль) у MeCN (3мл) опромінювали ультразвуком. Утворений розчин заморожували і ліофілізували, одержуючи відповідну натрієву сіль (37мг, вихід 98%) у вигляді твердої речовини білого кольору.

Приклад 5 (сполуки 1019, 1020 і 1028)



Стадія а:

Розчин ДІАД (86мл, 0,44ммоль) у ТГФ (2,0мл) додавали протягом 2год до розчину, який містить сполуку 3i (106мг, 0,34ммоль), сполуку 5a (56,0мг, 0,34ммоль) і PPh<sub>3</sub> (114мг, 0,44ммоль) у ТГФ (7мл), при 25°C. Суміш перемішували протягом 1год і потім концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою експрес-хроматографії (гексан: EtOAc, від 7:3 до 1:1), одержуючи сполуку 5b (115мг, вихід 73%) у вигляді твердої речовини білого кольору.

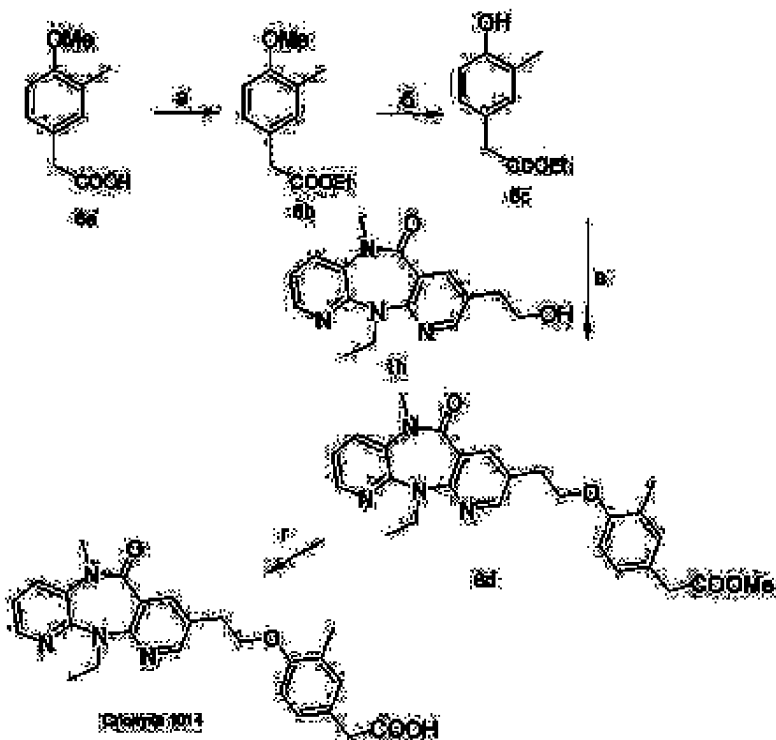
Стадія б:

Водний 1,0н. розчин LiOH (1,0мл, 1,0ммоль) додавали до розчину сполуки 5b (100мг, 0,21ммоль) у MeOH (6мл). Реакційну суміш перемішували при 25°C протягом 24год. Розчин підкисляли шляхом додавання водного 1,0н. розчину HCl і потім екстрагували EtOAc. Органічний шар промивали водою і соляним розчином, сушили (MgSO<sub>4</sub>), фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою експрес-хроматографії (гексан: EtOAc:AcOH, 50:50:1), одержуючи спочатку сполуку 1019 (25мг, вихід 25%) у вигляді твердої речовини білого кольору, а потім сполуку 1020 (48мг, вихід 50%) у вигляді твердої речовини білого кольору. Відповідні натрієві солі одержували шляхом обробки водним 0,02н. розчином NaOH.

Стадія в:

1,0М розчин диметиламіну в ТГФ (5,0мл, 5,0ммоль) і водний 1,0н. розчин LiOH (1,0мл, 1,0ммоль) додавали до розчину сполуки 5b (50,0мг, 0,11ммоль) у ізо-PrOH (3мл). Реакційну суміш нагрівали до температури дефлегмації протягом 48год. Додавали водний 1,0н. розчин HCl (2мл) і суміш екстрагували EtOAc. Органічний шар промивали водою і соляним розчином, сушили (MgSO<sub>4</sub>), фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою експрес-хроматографії (гексан: EtOAc:AcOH, 50:50:1), одержуючи сполуку 1028 (18мг, вихід 35%) у вигляді твердої речовини білого кольору. Відповідну натрієву сіль одержували шляхом обробки водним 0,02н. розчином NaOH.

Приклад 6 (сполука 1014)



Стадія а:

До розчину кислоти 6a (1,00г, 5,55ммоль) у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50мл) додавали оксалілхлорид (0,73мл, 8,3ммоль) і ДМФ (100мл). Реакційну суміш перемішували протягом 90хв, потім додавали EtOH (15мл) і реакційну суміш перемішували ще протягом 1год. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску, залишок розбавляли EtOAc і промивали послідовно водою, соляним розчином, сушили ( $\text{MgSO}_4$ ), фільтрували і концентрували, одержуючи складний ефір 6b, який використовували без додаткового очищення.

Стадія б:

До розчину складного ефіру 6b у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50мл) додавали 1М розчин  $\text{VBg}_3$  у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7,2мл, 7,20ммоль). Після витримання протягом 3год при кімнатній температурі реакційну суміш охолоджували до  $0^\circ\text{C}$  і додавали EtOH (5мл). Реакційну суміш перемішували протягом 30хв при кімнатній температурі, потім концентрували при зниженому тиску. Залишок розбавляли EtOAc і послідовно промивали насиченим водним розчином  $\text{NaHCO}_3$ , водою і соляним розчином, сушили ( $\text{MgSO}_4$ ), фільтрували і концентрували досуха. Залишок очищали за допомогою експрес-хроматографії (гексан: EtOAc; 70:30), одержуючи фенол 6c (802мг, вихід 74% після двох стадій) у вигляді прозорої смоли.

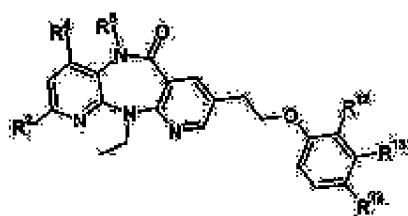
Стадія в:

Розчин ДІАД (87 мкл, 0,44 ммоль) у ТГФ (2,0 мл) додавали протягом 2 год до розчину, який містить сполуку 1h (100 мг, 0,33 ммоль),  $\text{Ph}_3\text{P}$  (104 мг, 0,44 ммоль) і фенол 6c (65 мг, 0,34 ммоль) у ТГФ (7,0 мл), при кімнатній температурі. Суміш перемішували протягом 4 год і потім концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали за допомогою експрес-хроматографії (гексан:EtOAc; від 30:70 до 50:50), одержуючи сполуку 6d (46 мг, вихід 29%) у вигляді піни білого кольору.

Стадія г:

До розчину складного ефіру 6d (44мг, 0,09ммоль) у суміші ТГФ (3мл) і MeOH (1мл) додавали водний 1н. розчин LiOH (1,0мл, 1,0ммоль). Після витримання протягом 4год при кімнатній температурі додавали 1н. HCl (2мл). Суміш екстрагували EtOAc. Органічний шар промивали водою і соляним розчином, сушили ( $\text{MgSO}_4$ ), фільтрували і концентрували досуха, одержуючи сполуку 1014 (39мг, вихід 93%) у вигляді твердої речовини білого кольору. Відповідну натрієву сіль одержували шляхом обробки 1екв. водного гідроксиду натрію і утворений розчин ліофілізували, одержуючи пухнасту тверду речовину білого кольору.

Таблица 1.



Стор. №	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	МС(ESI) m/z (MH) <sup>+</sup>
1001	H	H	Me	Me	Me	COOH	447
1002	H	H	Me	Me	H	COOH	433
1003	H	H	Me	Et	H	COOH	447
1004	H	H	Me	Me	OH	COOH	449
1005	H	H	Me	Br	H	COOH	497/499
1006	H	H	Me	Me	H	CHMeCOOH	461
1007	Cl	H	Me	Me	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	495/497
1008	H	H	Me	Me	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	461
1009	Cl	H	Me	Me	H	CH=CHCOOH	493/495
1010	H	H	Me	Me	H	CH=CHCOOH	459
1011	H	H	Me	Cl	H	CH <sub>2</sub> COOH	467/469
1012	H	H	Me	Br	H	CH <sub>2</sub> COOH	513/515
1013	H	H	Me	Me	Me	CH <sub>2</sub> COOH	461
1014	H	H	Me	Me	H	CH <sub>2</sub> COOH	447
1015	Cl	H	Me	Me	H	COOH	467/469
1016	Cl	Me	H	Me	H	COOH	467/469
1017	Me	H	Me	Me	H	COOH	447
1018	H	Me	H	Me	H	COOH	433
1019	OMe	H	Me	Me	H	COOH	463
1020	F	H	Me	Me	H	COOH	451

U A 7 8 7 7 4 C 2

U A 7 8 7 7 4 C 2

Code	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	MC (ESD) m/z (MH) <sup>+</sup>
1021	OBz	H	Me	Me	H	COOH	477
1022	H	H	Me	NO <sub>2</sub>	H	COOH	464
1023	H	H	Me	Cl	H	COOH	453/455
1024	H	H	Me	H	NH <sub>2</sub>	COOH	494
1025	H	H	Me	H	F	COOH	437
1026	H	H	Me	H	Cl	COOH	453/455
1027	H	H	Me	CF <sub>3</sub>	H	COOH	487
1028	N(Me) <sub>2</sub>	H	Me	Me	H	COOH	476
1029	H	H	H	Me	H	COOH	419
1030	H	H	Me	Me	H	COOMe	447
1031	H	H	Me	Et	H	COOMe	461
1032	H	H	Me	Cl	H	COOMe	467/469
1033	H	H	Me	CF <sub>3</sub>	H	COOMe	501
1034	OBz	H	Me	Me	H	COOMe	491
1035	H	H	Me	H	F	COOMe	451

### Аналіз зворотної транскриптази (ЗТ)

#### Теоретичні основи аналізу

До переліку ферментів, які кодується вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ-1), входить зворотна транскриптаза (1), яка одержала таку назву тому, що вона транскрибує копію ДНК на матриці РНК. Цю активність можна кількісно вимірювати за допомогою безклітинного ферментативного аналізу, який заснований на встановленому факті, що зворотна транскриптаза має здатність використовувати синтетичну матричну ролу r(C), примовану біотинільованим олігонуклеотидом d(G), для транскрипції радіоактивноміченого ланцюга ДНК із використанням як субстрату ЗН-дГТФ. В описаному нижче методі аналізу використовується фермент дикого типу (який є домінуючою формою ферменту, виявленою в пацієнтів, інфікованих ВІЛ-1), однак у методі можна застосовувати також мутантні ЗТ-ферменти (наприклад, Y181C, отриманий шляхом сайтнаправленого мутагенезу, у якому залишок тирозину в кодоні 181 замінений на залишок цистеїну) з використанням аналогічних умов проведення аналізу. Цей аналіз дозволяє оцінювати ефективність сполук відносно їх здатності інгібувати мутантні ферменти.

#### Матеріали:

##### а) Одержання ферменту

Деякі мутанти ЗТ ВІЛ-1 клону ВН10 ПІВ були отримані від Dr. С.-К. Shih (фірма Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc., США) у векторі рКК233-2 (фірма Pharmacia). Зокрема, клон ЗТ ВІЛ рКRT2, що несе тільки ген рбб ЗТ, яка знаходиться під контролем оперону lac/промотору trc, одержували від Dr. W. Summers (Єльський університет) (2). Шляхом сайтнаправленого мутагенезу в ген ЗТ дикого типу інтродукували різні амінокислотні заміни. Клон ЗТ субклонували в бактеріальному експресійному векторі рКК233-2. Отримані клони включали клон дикого типу, Val106Ala, Tyr181Cys, Tyr188Cys, Tyr188Leu, Gly190Ala й Pro236Leu. Інші клони були отримані заявниками шляхом сайтнаправленого мутагенезу ЗТ рКК233-2 і включали Lys103Asn, Lys103Asn/Tyr181Cys, Lys103Asn/Leu100Ile, Lys103Asn/Pro225His й Lys103Asn/Val108Ile.

##### б) Очищення ферменту

Очищення рекомбінантної зворотної транскриптази здійснювали за допомогою комбінації описаних раніше методів (3). Для ініціації росту попередньої культури, яку вирощували при 37°C, використовували індивідуальну колонію із планшета, який містить свіжі трансформовані клітини лінії JM109. Цією попередньою культурою інокулювали два літри середовища для росту. Після досягнення ОГ<sub>600</sub> ~1,5 (5-6 год при 37°C), експресію гена ЗТ індукували за допомогою ІПТГ (кінцева концентрація іММ) і ферментацію здійснювали ще протягом декількох годин при 37°C. Після центрифугування відкидали супернатанти, пелетовані клітини пулювали й поміщали на зберігання при -80°C до здійснення очищення. Клітинам давали розмерзтися при 4°C протягом ночі й суспендували в буфері для лізису (MES 50мМ рН 6, ЕДТА іММ, 10 об.% гліцерину, 0,02% мас/об. ОБГ, 0,02% мас/об. азиду натрію). Додавали лізоцим і суміш інкубували на льоді протягом 40 хв. Після гомогенізації з використанням Dounce у присутності лізоциму й опромінення ультразвуком клітини центрифугували протягом 30 хв. Збирали супернатант (S1) і поміщали на зберігання при 4°C. Отриманий центрифугуванням пелет ресуспендували в буфері для екстракції (MES 50мМ рН 6, КРО<sub>4</sub> 50мМ рН 6, КС1 100мМ, 10 об.% гліцерину, 0,02% мас/об. ОБГ, 0,02% мас/об. азиду натрію) і перемішували протягом 30хв при 4°C. Цю другу суміш знову

центрифугували й збирали супернатант (S2). Описану вище процедуру повторювали ще два рази, одержуючи супернатанти S3 й S4, і протягом ночі проводили останню екстракцію (S5). До об'єднаних супернатантів додавали полімін (кінцева концентрація 0,005%) для видалення нуклеїнових кислот. Цей розчин перемішували протягом 75хв при 4°C і центрифугували протягом 1год. Супернатант (SS1) осаджували на льоді за допомогою 20% мас/об, сульфату амонію й перемішували протягом 1год при 4°C. Потім суміш центрифугували й утворений супернатант (SS2) осаджували шляхом додавання 40% мас/об, сульфату амонію (усього 60%), перемішували протягом 1год і знову центрифугували. Кінцевий дебрис (P1) зберігали протягом ночі при 4 °C перед проведенням очищення наступного дня. Всі стадії очищення здійснювали при 4°C, якщо не вказане інше.

Дебрис (P1) ресуспендували в буфері MES, який містить 50мМ рН 6, КРО<sub>4</sub> 10мМ рН 6, КСІ 100мМ, 10 об.% гліцерину, 0,02% мас/об. ОБГ, 0,02% мас/об, азид натрію. Суспензію протягом ночі піддавали діалізу в протитечії того ж самого буфера з використанням діалізних трубок із ММСО 12-14кДа. Діалізат центрифугували й супернатант фільтрували через фільтри типу Milllex-PF з розміром отворів 0,8 мкм. Профільтрований зразок завантажували в гідроксіапатитну колонку (об'єм шару 30-мл) і промивали тим же самим буфером. Зв'язаний фермент елюювали з використанням лінійного градієнта від 10 до 300 мМ КРО<sub>4</sub> (-200 мл) у вказаному вище буфері. Фракції, які містять гетеродимер р66/р51 (за даними аналізу за допомогою ДСН-ПААГ 8% і вестерн-блотингу) об'єднували для внесення в наступну колонку. Фракції, які містять ЗТ, розбавляли у два рази біс-Трис-буфером, який містить пропан 50 мМ рН 7,0, 0,02 %мас./об. ОБГ, 10 об.% гліцерину, 0,02% мас/об, азиду натрію й завантажували в Ні-Тгар гепарин-сефарозну колонку (об'єм шару 5мл) і промивали тим же самим буфером. Потім зв'язану ЗТ елюювали з використанням лінійного градієнта від 0 до 1М сульфату амонію (75мл) у тому ж самому буфері. Фракції, які містять ЗТ, об'єднували на основі даних аналізу, отриманих за допомогою ДСН-ПААГ і вестерн-блотингу. Концентрацію протеїну в такому пулі визначали за допомогою методу Брадфорда, використовуючи як стандарт БСА. Кінцевий ферментний препарат піддавали діалізу в протитечії буфера, який містить MES 50мМ рН 6, КРО<sub>4</sub> 300 мМ рН 6, КСІ 175мМ, 10 об.% гліцерину, 0,02% мас/об, азиду натрію, розділяли на аліквоти і зберігали при -80°C.

Процедура аналізу:

Радіометричний ферментативний аналіз був адаптований до формату 96-лункового титраційного мікропланшета й заснований на використанні завантажених стрептавідином сцинтиляційних гранул. Метод аналізу коротко описаний нижче. Фермент ЗТ ВІЛ-1 піддавали розморожуванню й розбавляли відповідним чином Трис/НСІ-буфером, 50 мМ рН 7,8, який містить NaCl 60 мМ, гексагідрат MgCl<sub>2</sub> 2 мМ, ДТТ 6 мМ, GSH 2 мМ й 0,02% мас/об. Chaps, одержуючи ≈ 3 нМ фермент. До 30мкл розчину цього ферменту додавали 10мкл розчину інгібітора (від 50мкМ до 2,5нМ інгібітора в цьому ж самому буфері для аналізу, доповненому 15 об.% ДМСО). Перед здійсненням наступної стадії планшет піддавали попередній інкубації протягом 15хв при кімнатній температурі. На цій стадії попередньої інкубації найбільша й найменша концентрації інгібітора становили 12,5мкМ й 0,62нМ відповідно, а концентрація ДМСО становила 3,75об.%. Потім ініціювали ферментативну реакцію шляхом додавання 10мкл розчину субстрату. Кінцева реакційна суміш містила Трис/НСІ 50 мМ рН 7,8, NaCl 60 мМ, MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O 2 мМ, ДТТ 6 мМ, GSH 2 мМ, Chaps 0,02% мас/об. ДМСО 3об.%, Poly rC 179 нМ, біотин дГ<sub>15</sub> 18 нМ, дГТФ 288 нМ, <sup>3</sup>Н-дГТФ 71 нМ й 1-2 нМ фермент.

На цієї стадії інкубації найбільша й найменша концентрації інгібітора становили 10 мкМ й 0,5 нМ відповідно. Після додавання субстратів планшет заклеювали пластиковим покриттям й інкубували протягом 1 год при 37°C у сухій камері. Потім реакцію припиняли шляхом додавання 75 мкл 0,5М розчину ЕДТК, який містить 5 мг/мл завантажених стрептавідином сцинтиляційних гранул.

Планшет струшували протягом 2 хв при середній швидкості й інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі. Потім додавали 75 мкл 7М розчину хлориду цезію, планшет струшували протягом 2 хв при середній швидкості й знову інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі. Потім планшет заклеювали пластиковим покриттям і здійснювали кількісну оцінку з використанням сцинтиляційного й люмінесцентного лічильника для мікропланшетів типу TopCount-NXT™ (фірма Packard). Радіоактивність у кожній лунці оцінювали протягом 60 с. У кожній серії для одержання екстремальних значень використали порожні й контрольні лунки.

Відсоток інгібування розраховували в такий спосіб:

$$\% \text{інгібування} = \left(1 - \frac{\text{срт у лунці} - \text{срт у чист. лунці}}{\text{срт у контр. лунці} - \text{срт у чист. лунці}}\right) \cdot 100$$

За допомогою описаного вище аналізу тестували сполуку, запропоновану у винаході, у відношенні інгібування ЗТ дикого типу (WT) і мутантних ферментів. Результати наведені в таблиці 4 у вигляді значень IC<sub>50</sub> (нМ).

Для підтвердження здатності сполуки інгібувати реплікацію ВІЛ її тестували відповідно до описаного нижче методу аналізу людської Т-клітинної культури (фірма Syncytia).

Твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA) для оцінки активності в клітинній культурі

Здатність сполуки, запропонованої у винаході, інгібувати реплікацію ВІЛ у клітинній культурі тестували у форматі 96-лункового планшета. Для розведення сполуки, а також середовища для росту клітин використовували повне середовище RPMI 1640, яке містить RPMI 1640 + 10% фетальної телячої сироватки, 10 мкг/мл гентаміцину й ЮмкМ (β-меркаптоетанолу).

Клітинну лінію Т-лімфоцитів С8166 інфікували із множинністю зараження 0,001 вірусами, які кодують зворотну транскриптазу дикого типу й мутантну транскриптазу. Потім клітини інкубували протягом трьох днів у присутності серійних розведень сполуки, запропонованої у винаході. Об'єднували супернатант із восьми

лунок-копій і визначали концентрацію позаклітинного р24 з використанням набору для аналізу антигену р24 ВІЛ-1, який надходить в продаж (фірма Beckman-Coulter®). Рівень інгібування (% інгібування) розраховували на основі наступного рівняння:

$$\% \text{інгібування} = (1 - \frac{\text{р24 пг/мл інгібітора}}{\text{з24 пг/мл контролю}}) \cdot 100$$

Результати наведені в таблиці 2 у вигляді EC<sub>50</sub> (нМ).

Прочитована література (включена в опис як посилання)

1. Benn, S. I in., Science 230., 1985, стор. 949.
2. D'Aquila R. T. i Summers W. C. J., Acq. Imm. Def. Syn. 2: 1989, стор. 579.
3. а) Warren T. C i ін., Protein Expression & Purification 3., 1992, стор. 479; 6) Kohlstaedt L. A. Science 256 (5065);, 1992, стор. 1783.

Таблиця 2  
Інгібування ЗТ дикого типу й мутантних штамів ЗТ сполукою формули I

Сполука №	IC <sub>50</sub> (WT) (нМ)	IC <sub>50</sub> K103N/ Y181C (нМ)	EC <sub>50</sub> (WT) (нМ)	EC <sub>50</sub> K103N/ Y181C (нМ)
1001	С	А	С	С
1002	с	А	с	С
1003	с	А	с	с
1004	с	А	с	А
1005	с	А	с	С
1006	с	А	NT	NT
1007	с	В	С	В
1008	С	А	С	А
1009	с	С	с	С
1010	с	с	с	С
1011	с	А	Н. в.	Н. в.
1012	с	А	Н. в.	Н. в.
1013	с	А	Н. в.	Н. в.
1014	с	А	С	А
1015	с	В	С	С
1016	с	А	NT	NT
1017	с	А	С	С
1018	с	А	С	С
1019	с	А	с	с
1020	с	А	с	с
1021	с	А	Н. в.	Н. в.
1022	в	А	В	А
1023	в	А	с	А
1024	с	А	Н. в.	Н. в.
1025	в	Н. в.	Н. в.	Н. в.
1026	в	Н. в.	Н. в.	Н. в.
1027	в	А	Н. в.	Н. в.
1028	с	А	Н. в.	Н. в.
1029	с	А	С	Н. в.
1030	с	С	С	С
1031	с	С	Н. в.	Н. в.
1032	с	С	Н. в.	Н. в.
1033	с	А	Н. в.	Н. в.
1034	с	В	Н. в.	Н. в.
1035	С	А	Н. в.	Н. в.

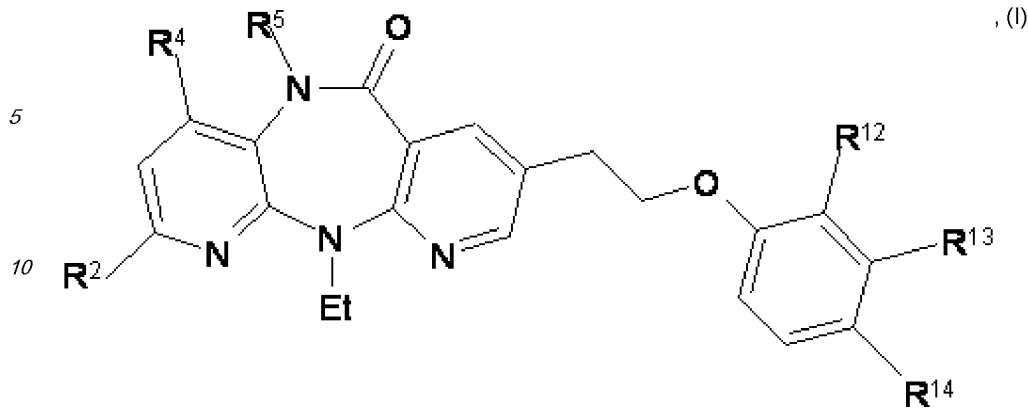
Позначення для таблиці:

IC<sub>50</sub> й EC<sub>50</sub>: А = >100 нМ; В = 100-50 нМ; С = <50 нМ; і

Н.в. = не визначали.

### Формула винаходу

1. Сполука формули:



15 де  
 R<sup>2</sup> означає Н, галоген, С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл, ОС<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл, NHC<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл або N(С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub> алкіл)<sub>2</sub>;  
 R<sup>4</sup> означає Н або СH<sub>3</sub>;  
 R<sup>5</sup> означає Н або СH<sub>3</sub>, за умови, що й R<sup>4</sup> й R<sup>5</sup> не мають однакового значення;  
 20 R<sup>12</sup> означає Н, галоген, С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл, CF<sub>3</sub> або NO<sub>2</sub>;  
 R<sup>13</sup> означає Н, С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл, галоген, ОН або NH<sub>2</sub>, за умови, що R<sup>12</sup> й R<sup>13</sup> обидва не означають Н; і  
 R<sup>14</sup> означає COOR<sup>14a</sup>, де R<sup>14a</sup> означає Н або С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub>алкіл; або R<sup>14</sup> означає С<sub>2</sub>-С<sub>4</sub>алкеніл-COOR<sup>14a</sup>, де R<sup>14a</sup>  
 має вказані вище значення; або R<sup>14</sup> означає С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл-COOR<sup>14a</sup>, де R<sup>14a</sup> має вказані вище значення;  
 або її сіль або проліки.

25 2. Сполука за п. 1, де R<sup>2</sup> означає Н, галоген, С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл, ОС<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл або N(С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл)<sub>2</sub> й R<sup>4</sup> й R<sup>5</sup> не мають  
 однакових значень.

3. Сполука за п. 2, де R<sup>2</sup> означає Н, Cl, F, С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл, ОС<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл або N(С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл)<sub>2</sub>.

4. Сполука за п. 3, де R<sup>2</sup> означає Н, Cl, F, СH<sub>3</sub>, OMe або OEt.

30 5. Сполука за п. 4, де R<sup>2</sup> означає Н.

6. Сполука за п. 1, де R<sup>4</sup> означає Н.

7. Сполука за п. 1, де R<sup>5</sup> означає СH<sub>3</sub>.

8. Сполука за п. 1, де R<sup>12</sup> означає галоген, С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл, CF<sub>3</sub> або NO<sub>2</sub>.

35 9. Сполука за п. 8, де R<sup>12</sup> означає Br, Cl, СH<sub>3</sub> або СH<sub>3</sub>СH<sub>2</sub>.

10. Сполука за п. 9, де R<sup>12</sup> означає СH<sub>3</sub> або СH<sub>3</sub>СH<sub>2</sub>.

11. Сполука за п. 1, де R<sup>13</sup> означає Н, СH<sub>3</sub> галоген, ОН або NH<sub>2</sub>.

12. Сполука за п. 11, де R<sup>13</sup> означає Н, СH<sub>3</sub> або ОН.

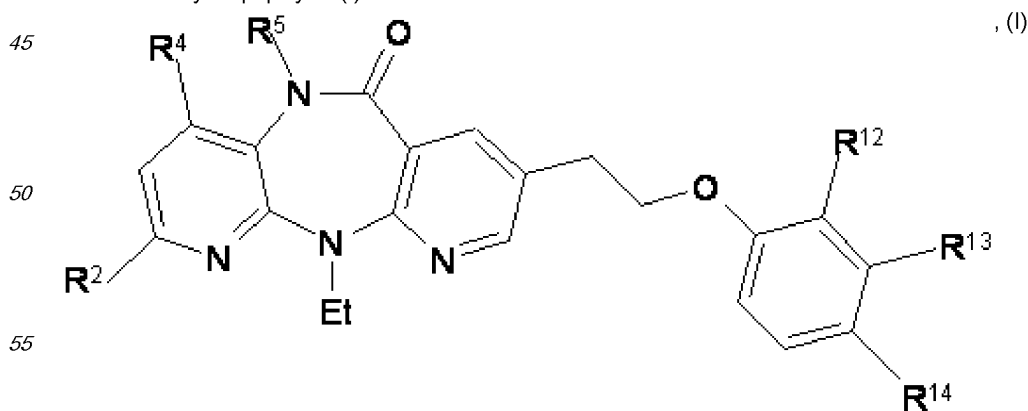
13. Сполука за п. 12, де R<sup>13</sup> означає Н.

40 14. Сполука за п. 1, де R<sup>14</sup> означає COOH, COOMe, С<sub>2</sub>-С<sub>4</sub>алкеніл-COOH або С<sub>1</sub>-С<sub>4</sub>алкіл-COOH.

15. Сполука за п. 14, де R<sup>14</sup> означає COOH, СH=СH-COOH, СH<sub>2</sub>COOH або СH<sub>2</sub>СH<sub>2</sub>COOH.

16. Сполука за п. 15, де R<sup>14</sup> означає COOH.

17. Сполука формули (I) за п. 1:



55 де  
 R<sup>2</sup> означає Н, Cl, F, СH<sub>3</sub>, OMe або OEt; R<sup>4</sup> означає Н; R<sup>5</sup> означає СH<sub>3</sub>; R<sup>12</sup> означає Br, Cl, СH<sub>3</sub> або  
 60 СH<sub>2</sub>СH<sub>3</sub>; R<sup>13</sup> означає Н, СH<sub>3</sub> або ОН; і R<sup>14</sup> означає COOH, СH=СH-COOH, СH<sub>2</sub>COOH або СH<sub>2</sub>СH<sub>2</sub>COOH; або її  
 сіль або проліки.

18. Сполука за п. 17, де R<sup>2</sup> означає Н; R<sup>4</sup> означає Н; R<sup>5</sup> означає СH<sub>3</sub>; R<sup>12</sup> означає СH<sub>3</sub> або СH<sub>3</sub>СH<sub>2</sub>; R<sup>13</sup>  
 означає Н; і R<sup>14</sup> означає COOH; або її сіль або проліки.

65 19. Фармацевтична композиція, призначена для лікування або запобігання ВІЛ-інфекції, яка містить сполуку  
 формули I за п. 1 або її фармацевтично прийнятну сіль і фармацевтично прийнятний носій.

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2007, N 5 25.04.2007. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

U  
A  
7  
8  
7  
7  
4  
C  
2

U  
A  
7  
8  
7  
7  
4  
C  
2