

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к соединениям, способам их синтеза, композициям и способам лечения инфекции, вызываемой вирусом гепатита С (HCV). В частности, настоящее изобретение относится к новым пептидным аналогам, фармацевтическим композициям, содержащим такие аналоги, и к способам применения этих аналогов для лечения вызываемой HCV инфекции.

Предпосылки создания изобретения

Вирус гепатита С (HCV) является основным возбудителем гепатита, относящегося к не-А, не-Б гепатиту, который передается при переливании крови и поражает людей во всем мире. Установлено, что свыше 200 миллионов людей в мире заражено вирусом. Большой процент носителей становится хронически инфицированным и у многих пациентов это приводит к хроническому заболеванию печени, так называемому хроническому гепатиту С. В свою очередь, эта группа больных имеет высокий риск заболевания такой серьезной болезнью печени, как цирроз печени, печеночно-клеточный рак и последняя стадия болезни печени, приводящая к смерти.

Механизм, с помощью которого происходит сохранение вируса HCV в организме и который обуславливает высокий коэффициент заболеваемости хронической болезнью печени, пока недостаточно изучен. Неизвестно, как HCV взаимодействует с иммунной системой хозяина и преодолевает ее действие. Кроме того, еще не выявлены также роли клеточных и гуморальных иммунных ответов в защите от HCV-инфекции и при заболевании гепатитом. Имеются данные о том, что для профилактики связанного с переливанием крови вирусного гепатита можно применять иммуноглобулины, однако, Центр по контролю заболеваемости в настоящее время не рекомендует для этой цели применять лечение с использованием иммуноглобулинов. Отсутствие эффективного защитного иммунного ответа затрудняет разработку вакцины или адекватных профилактических мер после контакта, поэтому в ближайшее время надежды, в основном, возлагаются на антивирусные средства.

С целью выявления фармацевтических агентов, обладающих эффективностью в отношении лечения HCV-инфекции, были проведены различные клинические исследования с участием пациентов, страдающих хроническим гепатитом С. В этих исследованиях применяли интерферон-альфа индивидуально или в сочетании с другими антивирусными агентами. Эти исследования позволили установить, что у основного большинства участников эксперимента не было обнаружено реакции на такие схемы лечения, а из тех участников, которые оказались чувствительными к лечению, у большей части после окончания лечения происходил рецидив.

Таким образом, до последнего времени терапия с использованием интерферона (IFN) оставалась единственным доступным методом лечения пациентов, страдающих хроническим гепатитом С, которая обладала доказанной в клинических условиях эффективностью. Однако эффективность такого лечения сохраняется в течение непродолжительного периода времени, и, кроме того, лечение интерфероном вызывает серьезные побочные действия (т.е. ретинопатию, тиреоидит, острый панкреатит, депрессию), что снижает качество жизни пациентов, подвергающихся лечению. В настоящее время интерферон в сочетании с рибавирином предложен для лечения пациентов, не чувствительных к IFN при его индивидуальном применении. Однако побочные действия, вызываемые IFN, не уменьшаются при такой совместной терапии. Установлено, что пэгилированные формы интерферонов, такие как PEG-Intron® и Pegasys®, могут частично снижать указанные вредные побочные действия, однако, антивирусные лекарственные препараты все еще остаются основным средством для орального лечения HCV.

Таким образом, существует необходимость в разработке эффективных антивирусных агентов для лечения HCV-инфекции, которые были бы лишены недостатков существующих методов лечения, основанных на применении фармацевтических средств.

HCV представляет собой заключенную в оболочку положительную цепь РНК-ового вируса семейства Flaviviridae. Геном HCV, представленный одноцепочечной РНК, состоит приблизительно из 9500 нуклеотидов и имеет одну открытую рамку считывания (OPC), которая кодирует один большой полипротеин, состоящий примерно из 3000 аминокислот. В зараженных клетках этот полипротеин расщепляется во многих сайтах клеточными и вирусными протеазами с образованием структурных и неструктурных (NS) протеинов. В случае HCV под действием двух вирусных протеаз образуются зрелые неструктурные протеины (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B). Первая из указанных протеаз, которая пока еще недостаточно охарактеризована, расщепляет связь NS2-NS3 (далее в контексте настоящего описания обозначена как NS2/3-протеаза; вторая представляет собой сериновую протеазу, содержащуюся в N-концевой области NS3 (далее обозначена как NS3-протеаза), и она опосредует все последующие расщепления, происходящие по ходу транскрипции NS3, как в цис-ориентации в сайте расщепления NS3-NS4A, так и в транс-ориентации в остальных сайтах NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B. Протеин NS4A, вероятно, обладает множественными функциями, действуя в качестве кофактора для NS3-протеазы и возможно способствуя мембранный локализации NS3 и других компонентов вирусных репликаз. Образование комплекса протеазы NS3 с NS4A, вероятно, необходимо для процессирования, усиления протеолитической эффективности во всех сайтах. Протеин NS3 обладает также нуклеозидтрифосфатазной активностью и РНК-геликазной активностью. NS5B представляет собой РНК-зависимую РНК-полимеразу, принимающую участие в репликации HCV.

Общая стратегия разработки антивирусных агентов предусматривает инактивацию кодируемых вирусом ферментов, которые играют основную роль в репликации вируса.

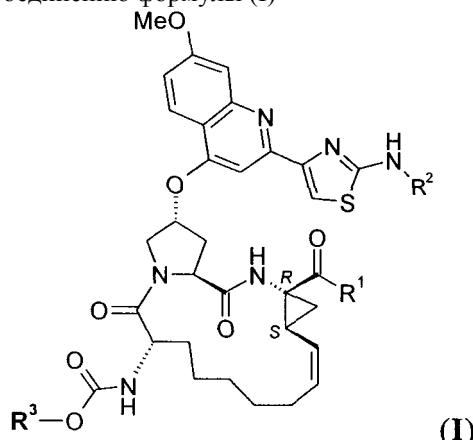
Ниже приведен перечень заявок на патенты, опубликованных в течение последних нескольких лет, в которых описаны пептидные аналоги, являющиеся ингибиторами NS3-протеазы HCV, которые по строению отличаются от соединений, предлагаемых в настоящем изобретении:

GB 2337262; JP 10298151; JP 11126861; JP 11292840; JP 2001-103993; US 6159938; US 6187905; WO 97/43310; WO 98/17679; WO 98/22496; WO 98/46597; WO 98/46630; WO 99/38888; WO 99/50230; WO 99/64442; WO 99/07733; WO 99/07734; WO 00/09543; WO 00/09558; WO 00/20400; WO 00/59929; WO 00/31129; WO 01/02424; WO 01/07407; WO 01/16357; WO 01/32691; WO 01/40262; WO 01/58929; WO 01/64678; WO 01/74768; WO 01/77113; WO 01/81325; WO 02/08187; WO 02/08198; WO 02/08244; WO 02/08251; WO 02/08256; WO 02/18369; WO 02/60926 и WO 02/79234.

Соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, отличаются по своему химическому строению, и при создании изобретения неожиданно было установлено, что они специфично ингибируют NS3-протеазу HCV, обладая при этом незначительной ингибирующей активностью в отношении других сериновых протеаз. Кроме того, соединения обладают активностью на культуре клеток и неожиданно хорошим фармакокинетическим профилем *in vivo*.

Краткое изложение сущности изобретения

Изобретение относится к соединению формулы (I)



в котором R¹ обозначает гидрокси или $\text{NHSO}_2\text{R}^{1\text{A}}$, где R^{1A} обозначает метил, этил, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопропилметил, циклогексил, CCl_3 , CF_3 , фенил, 2-фторфенил или 4-метилфенил, R² обозначает $\text{C}_5\text{-C}_6$ циклоалкил и R³ обозначает циклопентил; или его фармацевтически приемлемой соли.

Еще одним объектом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая эффективное в отношении вируса гепатита С количество соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли в смеси с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом.

В заявке также описан способ лечения или предупреждения инфекции, вызываемой вирусом гепатита С у млекопитающего, предусматривающий введение млекопитающему эффективного в отношении вируса гепатита С количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

Еще в одном варианте осуществления изобретения указанное соединение может вводиться с одним или несколькими другими агентами, обладающими активностью в отношении HCV.

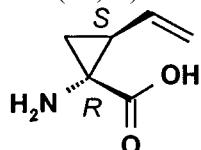
И, наконец, последним объектом изобретения является применение соединения формулы (I) для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или предупреждения инфекции, вызываемой вирусом гепатита С.

Определения

В тех случаях, когда для обозначения абсолютной конфигурации асимметричного центра используют дескрипторы (R) или (S), то обозначение относится ко всему соединению, а не только к заместителю.

Обозначение «P1, P2 и P3» в контексте настоящего описания относится к положению аминокислотных остатков, начиная с C-конца пептидных аналогов и простираясь к N-концу [т.е. P1 обозначает положение 1 относительно C-конца, P2 обозначает положение 2 относительно C-конца и т.д. (см. Berger A. и Schechter I., *Transactions of the Royal Society London series B* 257, 1970, сс. 249-264)].

В контексте настоящего описания понятие «(1R,2S)-винил-АЦКК» относится к соединению формулы



т.е. (1R,2S)-1-амино-2-этенилциклопропилкарбоновой кислоте.

Понятие «галоген» в контексте настоящего описания обозначает галогеновый заместитель, выбранный из группы, включающей бром, хлор, фтор или йод.

Понятие « C_1 - C_6 алкил» или «(низш.)алкил» в контексте настоящего описания, индивидуально или в сочетании с другим заместителем, обозначает ациклические алкильные заместители с прямой или разветвленной цепью, содержащие от 1 до 6 атомов углерода, и включает, например, метил, этил, пропил, бутил, гексил, 1-метилэтил, 1-метилпропил, 2-метилпропил, 1,1-диметилэтил.

Понятие « C_1 - C_8 алкил» в контексте настоящего описания, индивидуально или в сочетании с другим заместителем, обозначает ациклические алкильные заместители с прямой или разветвленной цепью, содержащие от 1 до 8 атомов углерода, и включает, например, метил, этил, 2,2-диметилбутил, гексил, 1-метилгексил, гептил и октил.

Понятие « C_3 - C_7 циклоалкил» в контексте настоящего описания, индивидуально или в сочетании с другим заместителем, обозначает циклоалкильный заместитель, содержащий от 3 до 7 атомов углерода, и включает циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и циклогептил.

Понятие « C_1 - C_6 алкил- C_3 - C_7 циклоалкил» в контексте настоящего описания обозначает циклоалкильный радикал, содержащий от 3 до 7 атомов углерода, который непосредственно связан с алкиленовым радикалом, содержащим от 1 до 6 атомов углерода, например циклопропилметил, циклопентилэтил, циклогексилметил, циклогексилэтан и циклогептилпропил. Например, когда R^{3A} обозначает C_1 - C_6 алкил- C_3 - C_7 циклоалкил, то эта группа связана с SO_2 -группой через C_1 - C_6 алкил (т.е. алкиленовый фрагмент).

Понятие « OC_1 - C_6 алкил» в контексте настоящего описания, индивидуально или в сочетании с другим заместителем, обозначает заместитель $-OC_1$ - C_6 алкил, в котором алкил, как указано выше, содержит вплоть до 6 атомов углерода. OC_1 - C_6 алкил обозначает метокси, этокси, пропокси, 1-метилэтокси, бутокси и 1,1-диметилэтокси. Последний заместитель обычно обозначают как трет-бутокси.

Понятие «фармацевтически приемлемая соль» обозначает соль соединения формулы (I), которую с медицинской точки зрения можно использовать в контакте с тканями человека и низших животных без признаков повышенной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.п., которая соответствует приемлемому соотношению польза/риск и, как правило, может растворяться или диспергироваться в воде или масле и обладает эффективностью при целевом использовании. Понятие включает фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли и фармацевтически приемлемые соли присоединения оснований. Перечень приемлемых солей приведен, например, у S.M. Birge и др., J. Pharm. Sci., 66, 1977, сс. 1-19, публикация полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Понятие «фармацевтически приемлемая кислотно-аддитивная соль» обозначает соли, которые сохраняют свою биологическую эффективность и свойства свободных оснований и которые не являются нежелательными с позиций биологии или по другим причинам, образованные с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромисто-водородная кислота, йодисто-водородная кислота, серная кислота, сульфаминовая кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и т.п., и с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, трихлоруксусная кислота, трифторуксусная кислота, адипиновая кислота, альгиновая кислота, аскорбиновая кислота, аспарагиновая кислота, бензолсульфоновая кислота, бензойная кислота, 2-ацетоксibenзойная кислота, масляная кислота, камфорная кислота, камфорсульфоновая кислота, коричная кислота, лимонная кислота, диглюконовая кислота, этансульфоновая кислота, глутаминовая кислота, гликоловая кислота, глицерофосфорная кислота, полусерная кислота, энантовая кислота, капроновая кислота, муравьиная кислота, фумаровая кислота, 2-гидроксизетансульфоновая кислота (изэтионовая кислота), молочная кислота, малеиновая кислота, гидроксималеиновая кислота, яблочная кислота, малоновая кислота, миндальная кислота, мезитиленсульфоновая кислота, метансульфоновая кислота, нафтилинсульфоновая кислота, никотиновая кислота, 2-нафтилинсульфоновая кислота, щавелевая кислота, памовая кислота, пектиновая кислота, фенилуксусная кислота, 3-фенилпропионовая кислота, пикриновая кислота, пивалиновая кислота, пропионовая кислота, пировиноградная кислота, салициловая кислота, стеариновая кислота, янтарная кислота, сульфаниловая кислота, винная кислота, паратолуолсульфоновая кислота, ундекановая кислота и т.п.

Понятие «фармацевтически приемлемая соль присоединения основания» обозначает соли, которые сохраняют свою биологическую эффективность и свойства свободных кислот и которые не являются нежелательными с позиций биологии или по другим причинам, образованные с неорганическими основаниями, такими как аммиак или гидроксид, карбонат или бикарбонат аммония, или катионами металла, такого как натрий, калий, литий, кальций, магний, железо, цинк, медь, марганец, алюминий и т.п. Наиболее предпочтительными являются соли аммония, калия, натрия, кальция и магния. Соли, полученные из фармацевтически приемлемых органических нетоксических оснований, включают соли первичных, вторичных и третичных аминов, четвертичных аминовых соединений, замещенных аминов, включая встречающиеся в естественных условиях замещенные амины, циклические амины и основные ионообменные смолы, такие как метиламин, диметиламин, trimетиламин, этиламин, диэтиламин, триэтиламин, изопропиламин, трипропиламин, трибутиламин, этаноламин, дистаноламин, 2-диметиламиноэтанол, 2-диэтиламиноэтанол, дициклогексиламин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, гидрабамин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, метилглюкозамин, теобромин, пурин, пиперазин, пиперидин, N-этилпиперидин, производные тетраметиламмония, производные тетраэтиламмония, пиридин, N,N-диметиланилин, N-ме-

тиллиперидин, N-метилморфолин, дициклогексиламин, дibenзиламин, N,N-дibenзилфенэтиламин, 1-эфенамин, N,N'-дibenзилэтилендиамин, полиаминовые смолы и т.п. Наиболее предпочтительными органическими нетоксическими основаниями являются изопропиламин, диэтиламин, этаноламин, trimетиламин, дициклогексиламин, холин и кофеин.

Понятие «антивирусный агент» в контексте настоящего описания обозначает агент (химическое соединение или биологический агент), который обладает эффективностью в отношении ингибиования образования и/или репликации вируса в организме млекопитающего. Оно включает агенты, которые оказывают действие на связанные либо с хозяином, либо с вирусом механизмы, необходимые для образования и/или репликации вируса в организме млекопитающего. Антивирусные агенты включают, например, рибавирин, амантадин, VX-497 (меримеподиб, фирма Vertex Pharmaceuticals), VX-498 (фирма Vertex Pharmaceuticals), левовиридин, вирамидин, цеплен (максамин), XTL-001 и XTL-002 (фирма XTL Biopharmaceuticals).

Понятие «другой агент, обладающий активностью в отношении HCV» в контексте настоящего описания обозначает агенты, эффективные в отношении снижения или предупреждения развития связанных с гепатитом С симптомов болезни. Такие агенты выбирают из иммуномодуляторов, ингибиторов NS3-протеазы HCV, ингибиторов полимеразы HCV или ингибиторов другой мишени в жизненном цикле HCV.

Понятие «иммуномодулятор» в контексте настоящего описания обозначает агенты (химические соединения или биологические агенты), которые обладают эффективностью в отношении повышения или потенцирования реакции иммунной системы у млекопитающего. Иммуномодуляторы включают, например, интерфероны класса I (такие как α -, β -, δ - и ω -интерфероны, τ -интерфероны, консенсусные интерфероны и азиало-интерфероны), интерфероны класса II (такие как γ -интерфероны) и пэгилированные интерфероны.

Понятие «ингибитор NS3-протеазы HCV» в контексте настоящего описания обозначает агент (химическое соединение или биологический агент), который обладает эффективностью в отношении ингибиования функции NS3-протеазы HCV у млекопитающего. Ингибиторы NS3-протеазы HCV включают, например, соединения, описанные в WO 99/07733, WO 99/07734, WO 00/09558, WO 00/09543, WO 00/59929 или WO 02/060926, перспективное соединение, разработанное фирмой Boehringer Ingelheim, обозначенное как BILN 2061, которое изучено в клиническом исследовании, и перспективные соединения, разработанное фирмой Vertex/Eli Lilly, обозначенные как VX-950 или LY-570310, которые еще не окончательно исследованы. В частности, соединения №№ 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 18, 19, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 55, 59, 71, 91, 103, 104, 105, 112, 113, 114, 115, 116, 120, 122, 123, 124, 125, 126 и 127, представленные в таблице на сс. 224-226 WO 02/060926, можно применять в сочетании с соединениями, предлагаемыми в настоящем изобретении.

Понятие «ингибитор полимеразы HCV» в контексте настоящего описания обозначает агент (химическое соединение или биологический агент), который обладает эффективностью в отношении ингибиования функции полимеразы HCV у млекопитающего. Оно относится, например, к ингибиторам NS5B-полимеразы HCV. Ингибиторы полимеразы HCV включают не относящиеся к нуклеозидам соединения, например, описанные в:

заявке на патент США № 10/198680, которая соответствует PCT/CA02/01127, оба документа поданы 18 июля 2002г. (фирма Boehringer Ingelheim),

заявке на патент США № 10/198384, которая соответствует PCT/CA02/01128, оба документа поданы 18 июля 2002г. (фирма Boehringer Ingelheim),

заявке на патент США № 10/198259, которая соответствует PCT/CA02/01129, оба документа поданы 18 июля 2002г. (фирма Boehringer Ingelheim),

WO 02/100846 A1 и WO 02/100851 A2 (обе на имя фирмы Shire),

WO 01/85172 A1 и WO 02/098424 A1 (обе на имя фирмы GSK),

WO 00/06529 и WO 02/06246 A1 (обе на имя фирмы Merck),

WO 01/47883 и WO 03/000254 (обе на имя фирмы Japan Tobacco) и

EP 1 256 628 A2 (на имя фирмы Agouron).

Кроме того, другие ингибиторы полимеразы HCV включают также нуклеозидные аналоги, например соединения, описанные в:

WO 01/90121 A2 (фирма Idenix),

WO 02/069903 A2 (Biocryst Pharmaceuticals Inc.) и

WO 02/057287 A2 и WO 02/057425 A2 (обе на имя фирмы Merck/Isis).

Конкретными примерами ингибиторов полимеразы HCV являются JTK-002, JTK-003 и JTK-109 (фирма Japan Tobacco).

Понятие «ингибитор другой мишени в жизненном цикле HCV» в контексте настоящего описания обозначает агент (химическое соединение или биологический агент), который обладает эффективностью в отношении ингибиования образования и/или репликации HCV у млекопитающего, отличной от ингибиования функции NS3-протеазы HCV. Они включают агенты, которые оказывают действие на связанные либо с хозяином, либо с вирусом HCV механизмы, необходимые для образования и/или реплика-

ции HCV в организме млекопитающего. Ингибиторы другой мишени в жизненном цикле HCV включают, например, агенты, которые ингибируют мишень, выбранную из ряда, включающего геликазу, NS2/3-протеазу HCV и внутренний сайт входа в рибосому (IRES). Конкретным примером ингибиторов другой мишени в жизненном цикле HCV является ISIS-14803 (ISIS Pharmaceuticals).

Понятие «ингибитор ВИЧ» в контексте настоящего описания обозначает агент (химическое соединение или биологический агент), который обладает эффективностью в отношении ингибирования образования и/или репликации ВИЧ в организме млекопитающего. Оно включает агенты, которые оказывают воздействие на связанные либо с хозяином, либо с вирусом механизмы, необходимые для образования и/или репликации ВИЧ в организме млекопитающего. Ингибиторы ВИЧ включают, например, нуклеозидные ингибиторы, ненуклеозидные ингибиторы, ингибиторы протеаз, ингибиторы слияния и ингибиторы интегразы.

Понятие «ингибитор HAV (вирус гепатита А)» в контексте настоящего описания обозначает агент (химическое соединение или биологический агент), который обладает эффективностью в отношении ингибирования образования и/или репликации HAV в организме млекопитающего. Оно включает агенты, которые оказывают воздействие на связанные либо с хозяином, либо с вирусом механизмы, необходимые для образования и/или репликации HAV в организме млекопитающего. Ингибиторы HAV включают вакцины, содержащие вирус гепатита А, например Havrix® (фирма GlaxoSmithKline), VAQTA® (фирма Merck) и Avaxim® (фирма Aventis Pasteur).

Понятие «ингибитор HBV (вирус гепатита В)» в контексте настоящего описания обозначает агент (химическое соединение или биологический агент), который обладает эффективностью в отношении ингибирования образования и/или репликации HBV в организме млекопитающего. Оно включает агенты, которые оказывают воздействие на связанные либо с хозяином, либо с вирусом механизмы, необходимые для образования и/или репликации HBV в организме млекопитающего. Ингибиторы HBV включают, например, агенты, которые ингибируют ДНК-полимеразу вируса HBV или вакцины на основе HBV.

Конкретными примерами ингибиторов HBV являются ламивудин (Epivir-HBV®), адефовирдипивоксил, энтекавир, FTC (Coviracil®), DAPD (DXG), L-FMAU (Clevudine®), AM365 (амрад), Ldt (тебивудин), моновалентный-LdC (валторцитабин), ACH-126,443 (L-Fd4C) (ахиллион), MCC478 (фирма Eli Lilly), рацивир (RCV), фтор-L- и -D-нуклеозиды, робустафлавон, ICN 2001-3 (ICN), Bam 205 (Novelos), XTL-001 (XTL), иминосахара (Nonyl-DNJ) (фирма Synergy), HepBzyme; иммуномодуляторы, такие как интерферон альфа 2b, HE2000 (фирма Hollis-Eden), Theradigm (эпиммун), EHT899 (фирма Enzo Biochem), тимозин альфа-1 (Zadaxin®), вакцина на основе ДНК HBV (фирма PowderJect), вакцина на основе ДНК HBV (фирма Jefferon Center), антиген HBV (фирма OraGen), BayHep B® (фирма Bayer), Nabi-HB® (фирма Nabi) и антитела к вирусу гепатита В (фирма Cangene); и вакцины на основе HBV, такие, например, как Engerix B, Recombivax HB, GenHevac B, Hepacare, Bio-Hep B, TwinRix, Comvax, Hexavac.

Понятие «интерферон класса I» в контексте настоящего описания обозначает интерферон, выбранный из группы интерферонов, которые все связываются с рецептором типа I. Оно включает как встречающиеся в естественных условиях, таких и полученные синтетическим путем интерфероны класса I. Примеры интерферонов класса I включают α -, β -, ω -интерфероны, τ -интерфероны, консенсусные интерфероны, азиато-интерфероны.

Понятие «интерферон класса II» в контексте настоящего описания обозначает интерферон, выбранный из группы интерферонов, которые все связываются с рецептором типа II. Примеры интерферонов класса II включают γ -интерфероны.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в изобретении, могут содержать одно или несколько дополнительных действующих веществ, например, выбранных из антивирусных агентов, иммуномодуляторов, других ингибиторов NS3-протеазы HCV, ингибиторов полимеразы HCV, ингибиторов другой мишени в жизненном цикле HCV, ингибиторов ВИЧ, ингибиторов HAV и ингибиторов HBV. Примеры таких агентов приведены выше в разделе «Определения».

Ниже представлены конкретные предпочтительные примеры некоторых таких агентов:

антивирусные агенты: рибавирин и амантадин;

иммуномодуляторы: интерфероны класса I, интерфероны класса II и пэгилированные интерфероны;

ингибитор другой мишени в жизненном цикле HCV, мишенью такого ингибитора являются NS3-геликаза, NS2/3-протеаза HCV или внутренний сайт входа в рибосому (IRES);

ингибиторы ВИЧ: нуклеозидные ингибиторы, ненуклеозидные ингибиторы, ингибиторы протеаз, ингибиторы слияния и ингибиторы интеграз; или

ингибиторы HBV: агенты, которые ингибируют вирусную ДНК-полимеразу HBV, или вакцина на основе HBV.

Как указано выше, совместная терапия предусматривает совместное введение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли по меньшей мере с одним дополнительным агентом, выбранным из следующего ряда: антивирусный агент, иммуномодулятор, другой ингибитор NS3-протеазы HCV, ингибитор полимеразы HCV, ингибитор другой мишени в жизненном цикле HCV, ингибитор ВИЧ, ингибитор HAV и ингибитор HBV. Примеры таких агентов приведены выше в разделе «Определения».

Указанные дополнительные агенты можно объединять с соединениями, предлагаемыми в изобретении, получая лекарственное средство, которое содержит однократную фармацевтическую дозу. В другом варианте указанные дополнительные агенты можно вводить пациенту индивидуально в виде составной части многокомпонентного лекарственного средства, например, используя набор. Указанные дополнительные агенты можно вводить пациенту до, одновременно или после введения соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

В контексте настоящего описания понятие «лечение» обозначает введение соединения или композиции, предлагаемых в настоящем изобретении, для облегчения или устранения симптомов гепатита С и/или снижения вирусного титра у пациента.

В контексте настоящего описания понятие «предупреждение» обозначает введение соединения или композиции, предлагаемых в настоящем изобретении, после контакта индивидуума с вирусом, но до проявления симптомов болезни и/или до обнаружения вируса в крови.

Предпочтительные варианты осуществления изобретения

Предпочтительно соединение формулы (I) является соединением, как оно определено выше, в котором R^1 обозначает гидрокси или $NHSO_2R^{1A}$, где R^{1A} обозначает метил, циклопропил, CF_3 или фенил. И в этом случае наиболее предпочтительно R^{1A} обозначает циклопропил.

Наиболее предпочтительно R^1 обозначает гидрокси.

Наиболее предпочтительно R^2 обозначает циклопентил.

Предпочтительными вариантами осуществления изобретения являются все соединения формулы (I), приведенные в табл. 1.

Согласно другому варианту осуществления изобретения фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может дополнительно содержать другой агент, обладающий активностью в отношении HCV. Примеры других агентов, обладающих активностью в отношении HCV, включают α - (альфа), β - (бета), δ - (дельта), γ - (гамма) или ω - (омега) интерферон, рибавирин и амантадин.

Согласно другому варианту осуществления изобретения фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может дополнительно содержать другой ингибитор NS3-протеазы HCV.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может дополнительно содержать ингибитор полимеразы HCV. Согласно следующему варианту осуществления изобретения фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может дополнительно содержать ингибитор других мишней жизненного цикла HCV, включая (но не ограничиваясь ими) геликазу, NS2/3-протеазу или внутренний сайт входа в рибосому (IRES).

Фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно вводить орально, парентерально или с помощью устройства для имплантации. Предпочтительным является оральное введение или введение с помощью инъекции. Фармацевтическая композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, может содержать любые общепринятые нетоксические фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или наполнители. В некоторых случаях значение pH композиции можно регулировать с помощью фармацевтически приемлемых кислот, оснований или буферов с целью повышения стабильности соединения, включенного в композицию или в форму для его введения. В контексте настоящего описания понятие «парентеральный» включает подкожный, внутримышечный, внутривенный, внутримышечный, внутрисуставной, интрасиновиальный, интрастернальный, интрапекальный путь введения, введение с помощью инъекции или инфузии, а также введение в область повреждения.

Фармацевтическая композиция может иметь форму стерильного препарата для инъекции, например стерильной инъецируемой водной или жирорастворимой супензии. Эту супензию можно получать с помощью хорошо известных методов с использованием диспергирующих или смачивающих агентов (таких, например, как Твин 80) и супендирующих агентов.

Фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно вводить орально в виде любой приемлемой формы лекарственного средства, предназначеннной для орального введения, включая (но не ограничиваясь ими) капсулы, таблетки и водные супензии и растворы. В случае таблеток для орального введения обычно применяемые носители представляют собой лактозу и кукурузный крахмал. Как правило, добавляют также замасливатели, такие как стеарат магния. Для орального введения в форме капсул приемлемые разбавители представляют собой лактозу и безводный кукурузный крахмал. Когда оральным путем вводят водные супензии, действующее вещество объединяют с эмульгирующими и супендирующими агентами. При необходимости можно добавлять определенные подслащающие вещества, и/или корригенты, и/или красители.

Другие пригодные наполнители или носители для указанных выше препартивных форм и композиций приведены в обычных фармацевтических справочниках, например в «Remington's Pharmaceutical Sciences», The Science and Practice of Pharmacy, 19-е изд. Mack Publishing Company, Easton, Penn., (1995).

Для монотерапии с целью предупреждения и лечения опосредованной HCV болезни можно применять дозы в диапазоне от примерно 0,01 до примерно 100 мг/кг веса тела в день, предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 50 мг/кг веса тела в день предлагаемого соединения, которое является инги-

битором протеазы. Как правило, фармацевтическую композицию, предлагаемую в изобретении, можно вводить от примерно 1 до примерно 5 раз в день или в другом варианте путем непрерывной инфузии. Такое введение можно применять как для длительного, так и для экстренного лечения. Количество действующего вещества, которое можно объединять с носителями для получения однократной дозы лекарственного средства, должно варьироваться в зависимости от хозяина, подлежащего лечению, и конкретного пути введения. Обычная композиция может содержать от примерно 5 до примерно 95% действующего вещества (мас.%). Предпочтительно такие композиции содержат от примерно 20% до примерно 80% действующего вещества.

Как должно быть очевидно специалисту в данной области, можно применять и более низкие или более высокие дозы по сравнению с указанными выше. Конкретные дозы и схемы лечения любого конкретного пациента могут зависеть от различных факторов, включая активность конкретного применяемого соединения, возраст, вес тела, общее состояние здоровья, пол, рацион, время введения, скорость выведения, сочетание лекарственных средств, серьезность и особенности развития болезни, предрасположенность пациента к инфекции, и их определяет лечащий врач. Как правило, лечение начинают с небольших доз, существенно более низких, чем оптимальная доза пептида. Затем дозу повышают небольшими порциями до достижения оптимального действия в конкретных условиях. Как правило, наиболее предпочтительно вводить соединение в таком диапазоне концентраций, которые, в целом, обеспечивают антивирусную активность, но не обладают какими-либо вредными или опасными побочными действиями.

Когда композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, включают в комбинацию, содержащую соединение формулы (I) и один или несколько дополнительных терапевтических или профилактических агентов, то соединение и дополнительный агент должны присутствовать в дозе, составляющей примерно от 10 до 100% и более предпочтительно примерно от 10 до 80% от дозы, обычно применяемой в режиме монотерапии.

Когда эти соединения или их фармацевтически приемлемые соли объединяют в препартивной форме с фармацевтически приемлемым носителем, то полученную композицию можно вводить *in vivo* млекопитающему, такому как человек, для ингибирования NS3-протеазы HCV или для лечения или предупреждения инфекции, вызываемой вирусом HCV. Такое лечение можно осуществлять также при использовании соединения, предлагаемого в изобретении, в сочетании с агентами, включающими (но не ограничиваясь ими) α -, β -, δ -, ω -, τ - или γ -интерферон, рибавирин, амантадин; другие ингибиторы NS3-протеазы HCV; ингибиторы полимеразы HCV; ингибиторы других мишней жизненного цикла HCV, которые включают (но не ограничиваясь ими) геликазу, NS2/3-протеазу или внутренний сайт входа в рибосому (IRES); или их комбинации. С соединениями, предлагаемыми в настоящем изобретении, можно объединять другие агенты, получая однократную дозу лекарственного средства.

В другом варианте эти дополнительные агенты можно вводить млекопитающему по отдельности в виде составной части многокомпонентного лекарственного средства.

Если фармацевтическая композиция содержит в качестве действующего вещества только соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, то такой способ может дополнительно предусматривать введение указанному млекопитающему агента, выбранного из ряда, включающего иммуномодулятор, антивирусный агент, ингибитор NS3-протеазы HCV, ингибитор полимеразы HCV или ингибитор других мишней жизненного цикла HCV, таких как геликаза, NS2/3-протеаза или IRES. Такой дополнительный агент можно вводить млекопитающему до, одновременно или после введения композиции, предлагаемой в настоящем изобретении.

Соединение формулы (I), предлагаемое в настоящем изобретении, можно применять также в качестве лабораторного реагента. Соединение, предлагаемое в настоящем изобретении, можно применять также для устранения или предупреждения вирусного загрязнения материалов, и тем самым оно снижает риск заражения вирусом персонала лабораторий или медицинских учреждений или пациентов, которые имеют контакт с такими материалами (например, кровью, тканями, хирургическими инструментами и предметами одежды, лабораторными инструментами и предметами одежды, приборами и материалами для сбора крови).

Соединение формулы (I), предлагаемое в настоящем изобретении, можно применять также в качестве реагента для исследований. Соединение формулы (I) можно использовать в качестве позитивного контроля для обоснования модельных анализов на клетках или анализов *in vitro* или *in vivo* репликации вирусов.

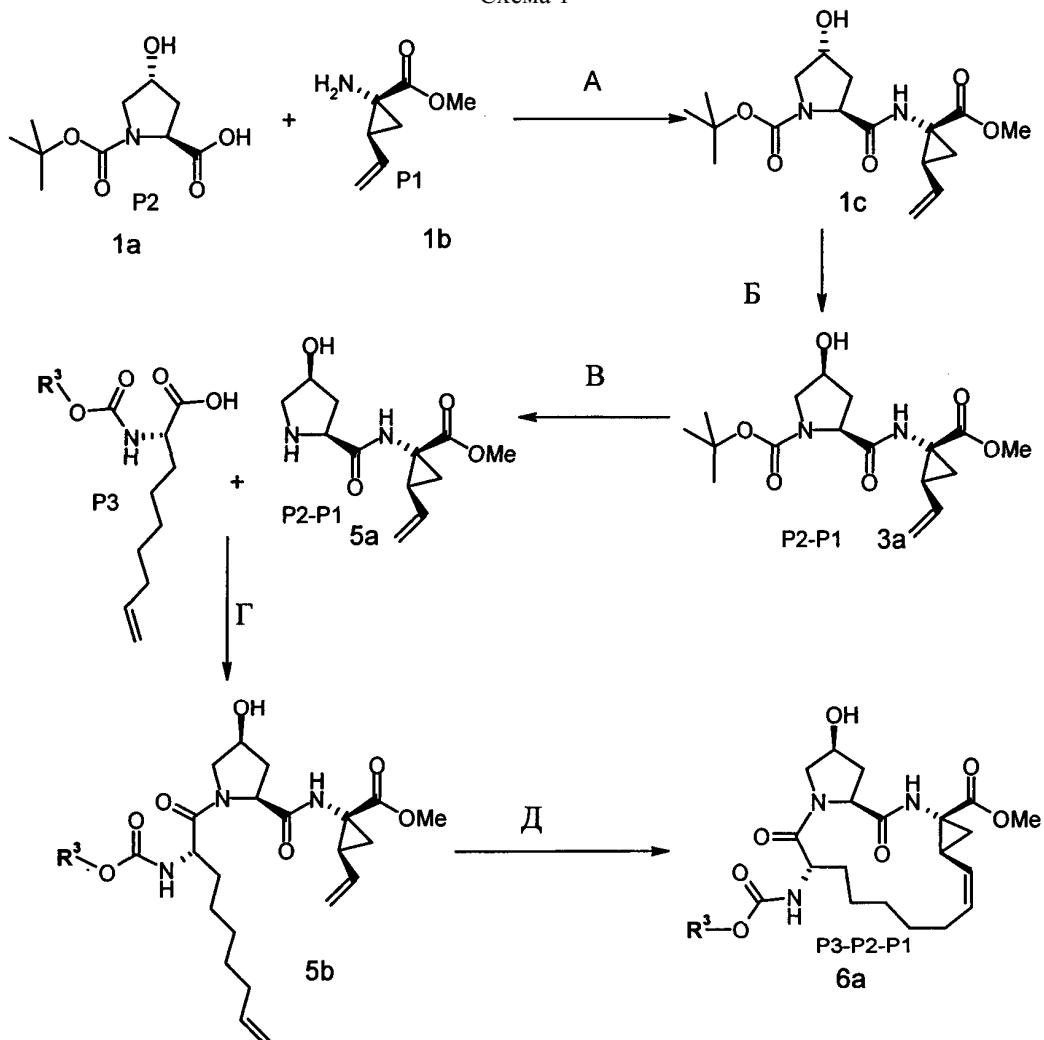
Ниже изобретение проиллюстрировано на примерах, не ограничивающих его объем, заявляемый в приведенной ниже формуле изобретения.

Методология

В целом, соединение формулы (I) и его промежуточные продукты получают известными методами, используя реакционные условия, которые, как известно, являются приемлемыми для реагентов. Некоторые такие методы описаны в WO 00/09543 и WO 00/09558.

На приведенной ниже схеме проиллюстрирован пригодный, основанный на применении известных методов процесс получения основного промежуточного продукта формулы ба из ациклических промежуточных продуктов.

Схема 1



Стадия А, В, Г.

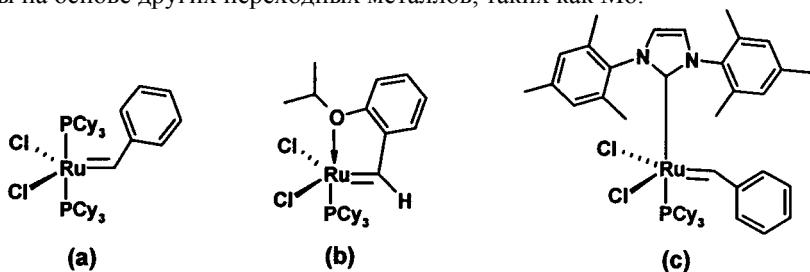
В целом, метод состоит в следующем: фрагменты P1, P2 и P3 можно связывать с помощью известных методов пептидного сочетания, которые описаны в WO 00/09543 и WO 00/09558.

Стадия Б.

Эта стадия включает инверсию конфигурации 4-гидроксизаместителя. Имеется несколько путей осуществления этого процесса, как это должно быть хорошо известно специалистам в данной области. Одним из примеров пригодного метода является хорошо известная реакция Митсунобу (Mitsunobu, *Synthesis*, январь 1981, с. 1-28; Rano и др. *Tet. Lett.*, 36, 1994, с. 3779-3792; Krchnak и др. *Tet. Lett.*, 36, 1995, с. 6193-6196).

Стадия Д.

Получение макролика можно осуществлять с помощью реакции обмена олефина, используя катализатор на основе Ru, например, описанный у Miller S.J.; Blackwell H.E.; Grubbs R.H.; J. Am. Chem. Soc., 118, 1996, с. 9606-9614 (a); Kingsbury J.S.; Harrity J.P.A.; Bonitatebus P.J.; Hoveyda A.H.; J. Am. Chem. Soc., 121, 1999, с.791-799 (b); и Huang J.; Stevens E.D.; Nolan S.P.; Petersen J.L.; J. Am. Chem. Soc., 121, 1999, с. 2674-2678 (b); или в WO 00/59929. Следует иметь в виду также, что для этой реакции можно использовать катализаторы на основе других переходных металлов, таких как Mo.



Последующее превращение основного промежуточного продукта формулы 6a в соединения формулы

лы (I), предлагаемые в настоящем изобретении, подробно описано ниже в примерах.

Представленные в описании соединения формулы (I), в которых R^1 обозначает $NHSO_2R^{1A}$, получают сочетанием соответствующей кислоты формулы (I) (т.е. R^1 обозначает гидрокси) с соответствующим сульфонамидом формулы $R^{1A}SO_2NH_2$ в присутствии связующего агента в стандартных условиях. Хотя можно применять несколько общепринятых связующих агентов, предпочтительными для практики являются ТБТУ и ГАТУ. Сульфонамиды поступают в продажу или их можно получать известными методами.

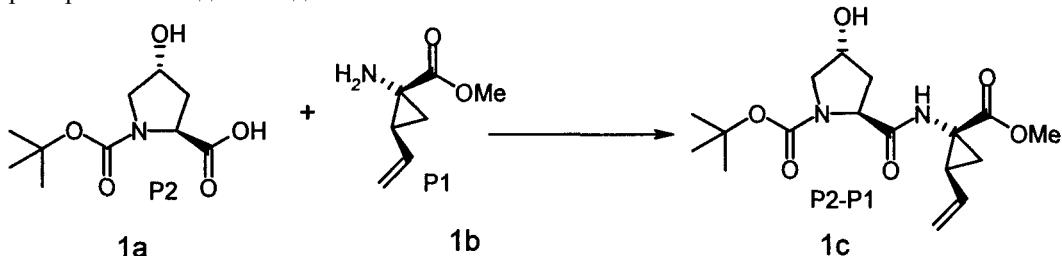
Примеры

Настоящее изобретение проиллюстрировано более подробно с помощью примеров, не ограничивающих его объем. Другие конкретные пути синтеза или разделения описаны в WO 00/09543; WO 00/09558 и WO 00/59929.

Температуры даны в градусах Цельсия. Проценты для растворов представляют собой % (мас./об.), а соотношения в растворах представляют собой соотношения объемов, если не указано иное. Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) регистрировали с помощью спектрометра фирмы Brucker при частоте 400 МГц, химические сдвиги (δ) выражены в част./млн и отнесены к внутреннему дейтериевому растворителю, если не указано иное. ЯМР-спектры всех конечных соединений (ингибиторов) регистрировали в $CDCl_3$, если не указано иное. Экспресс-хроматографию на колонке проводили на силикагеле (SiO_2) согласно методу экспресс-хроматографии Стилла (W.C. Still и др., J. Org. Chem., 43, 1978, с. 2923).

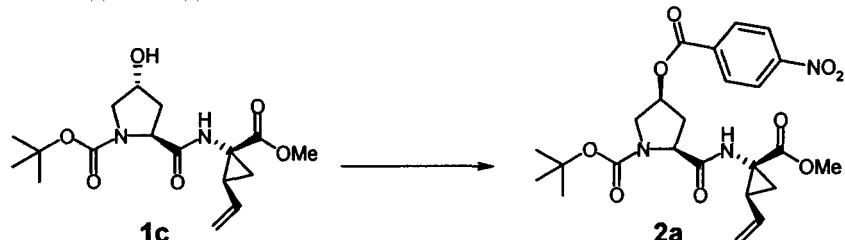
В примерах использовали следующие сокращения: Вос: трет-бутилоксикарбонил $\{Me_3COOC(O)\}$; БСА: бычий сывороточный альбумин; ХАПС: 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат; CH_2Cl_2 =ДХМ: метиленхлорид; ДЭАД: диэтилазодикарбоксилат; ДИАД: диизопропилазодикарбоксилат; ДИПЭА: диизопропилэтиламин; ДМАП: диметиламинопиридин; ДМФ: N,N-диметилформамид; ДМСО: диметилсульфоксид; (S,S)-Et-DUPHOS Rh (COD)OTf: трифторметансульфонат (+)-1,2-бис(2S,5S)-2,5-диэтилфосфолано)бензол(циклооктадиен)родия(1); EtOH: этанол; EtOAc: этилацетат; ES-МС: масс-спектрометрия с ионизацией электронным пучком; ГАТУ: [гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония]; ЖХВР: жидкостная хроматография высокого разрешения; МС: масс-спектрометрия; MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight, FAB: бомбардировка быстрыми атомами; Me: метил; MeOH: метанол; К.Т.: комнатная температура ($18-22^\circ$); ТБТУ: тетрафторборат 2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония; ТФК: трифтруксуная кислота; ТГФ: тетрагидрофуран; ТСХ: тонкослойная хроматография; Трис/HCl: гидрохлорид три(гидроксиметил)аминометана.

Пример 1. Синтез дипептида 1с.



Смесь, содержащую Вос-гидроксипролин 1а (50,0 г, 216 ммолей), гидрохлорид (1R,2S)-винил-АЦКК 1b (42,25 г, 238 ммолей), ТБТУ (76,36 г, 238 ммолей) и ДИПЭА (113 мл, 649 ммолей) в ДМФ (800 мл), перемешивали при К.Т. в атмосфере азота. Через 3,5 ч растворитель выпаривали и остаток экстрагировали EtOAc и промывали соляной кислотой (10%), насыщенным раствором бикарбоната натрия и соляным раствором. Затем органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и упаривали, получая масло. После сушки масла в течение ночи (18 ч) в глубоком вакууме получали дипептид 1с в виде пены желтого цвета (72,0 г, 94%, чистота >95%, по данным ЖХВР).

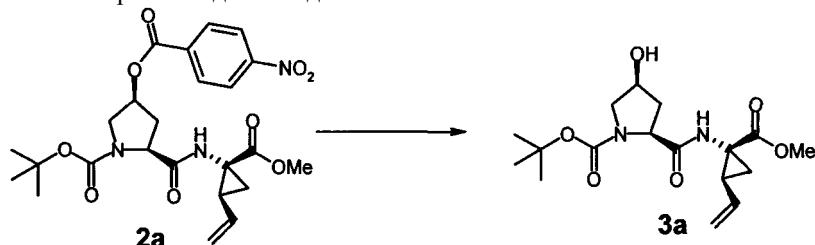
Пример 2. Синтез дипептида 2а.



Дипептид 1с (72,0 г, 203 ммоля), трифенилфосфин (63,94 г, 243,8 ммоля, 1,2 экв.) и 4-нитробензойную кислоту (41,08 г, 245,8 ммоля, 1,2 экв.) растворяли в безводном ТГФ (1,4 л) и раствор при перемешивании охлаждали до 0° в атмосфере азота. Затем по каплям в течение 45 мин добавляли ДЭАД (38,4 мл, 244 ммоля, 1,2 экв.) и реакционной смеси давали нагреться до К.Т. Через 4 ч растворитель выпаривали и остаток разделяли на 4 порции. Каждую из них хроматографировали на силикагеле (зернистость 10-40 мкм, диаметр колонки 12 см, длина колонки 16 см), используя градиент от 2:1 гексан/EtOAc до 1:1 гексан/

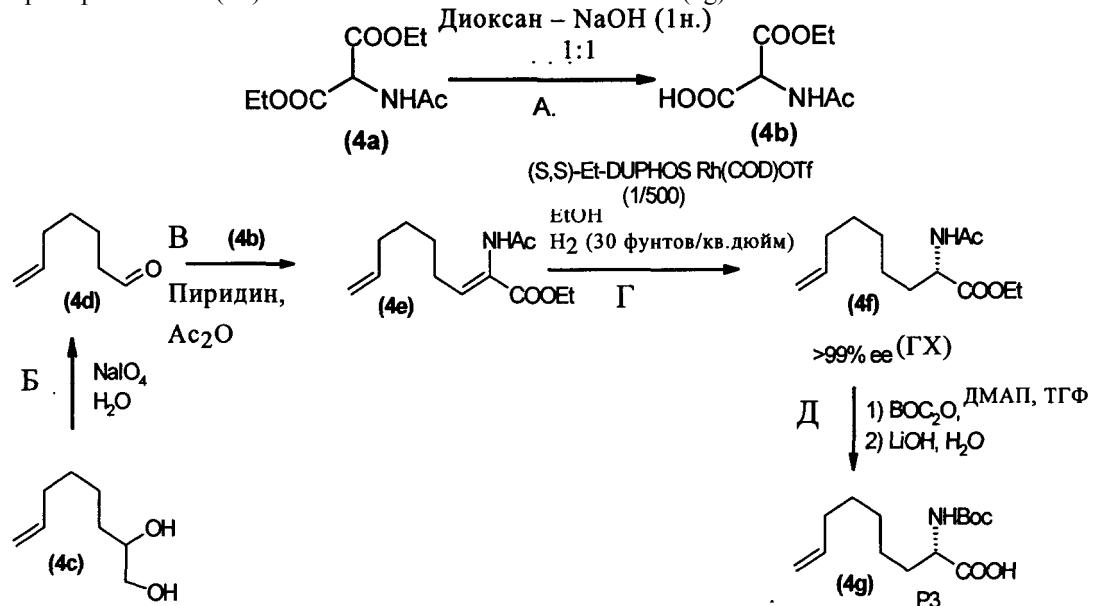
EtOAc и до чистого (100%) EtOAc. После выпаривания растворителей и сушки в глубоком вакууме при 70° в течение 1 ч получали сложный эфир 2a в виде аморфного твердого вещества белого цвета (108,1 г, количественный выход).

Пример 3. Синтез спиртового дипептида 3a.



Сложный нитробензоиловый эфир 2a (108,1 г, 203,1 ммоля) растворяли в ТГФ (1,0 л) и образовавшийся раствор охлаждали до 0°. Затем быстро добавляли раствор моногидрата гидроксида лития (10,66 г, 253,9 ммоля) в воде (225 мл) и реакционную смесь перемешивали при 0° в течение 30 мин, после чего оставшееся основание нейтрализовали соляной кислотой (1н., 50,8 мл). Медленно вносили дополнительную порцию кислоты до исчезновения желтой окраски (7 мл). Затем образовавшуюся смесь упаривали и остаток экстрагировали EtOAc (3x150 мл). Экстракт промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (150 мл) и соляным раствором (150 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом магния - древесном углем, фильтровали через диатомовую землю и упаривали. После сушки остатка в глубоком вакууме получали спирт 3a в виде бесцветной пены (70,1 г, 98%, чистота >99%, по данным ЖХВР).

Пример 4. Синтез (2S)-N-Вос-аминоон-8-еновой кислоты (4g).



Стадия А.

К раствору поступающего в продажу диэтил-2-ацетамидомалоната 4a (100 г, 0,46 моля) в диоксане (500 мл) добавляли по каплям в течение 30-45 мин водный раствор гидроксида натрия (1М, 1 экв., 460 мл). Образовавшуюся смесь выдерживали при перемешивании в течение 16,5 ч, затем диоксан выпаривали в вакууме. Полученный водный раствор экстрагировали 3 порциями по 300 мл EtOAc и подкисляли до pH 1 концентрированной HCl. Этот раствор оставляли для кристаллизации в бане лед-вода. После появления нескольких кристаллов смесь обрабатывали ультразвуком, после чего образовывалось большое количество осадка. После фильтрации и сушки в вакууме получали соединение 4b (62,52 г, выход 72%) в виде твердого вещества белого цвета.

Стадия Б.

К перемешиваемой с помощью магнитной мешалки эмульсии поступающего в продажу 7-октен-1,2-диола 4c (25 г, 0,173 моля) и H2O (100 мл) в 1-литровой круглодонной колбе добавляли в течение 20 мин водный раствор периодата натрия (40,7 г, 0,190 моля, 1,1 экв., в 475 мл H2O) (слабая экзотермическая реакция). Образовавшуюся смесь перемешивали при комнатной температуре в течение еще 1 ч (завершение реакции подтверждали с помощью ТСХ). Затем смесьсливали в делительную воронку и водный слой отделяли от органического слоя. Водный раствор насыщали NaCl, сливали и еще раз отделяли от органической фракции. Две органические фракции объединяли, сушили над сульфатом натрия и фильтровали через ватную пробку (в Пастеровской пипетке), получая соединение 4d (15,135 г, бесцветное масло, выход 78%). Водный раствор экстрагировали CH2Cl2, сушили над безводным MgSO4 и концентрировали в вакууме (без нагревания, т.к. t_{кпп} 6-гертанала 153°C), получая дополнительное количество соединения 4d

(1,957 г, бесцветное масло, выход 10%). Общий выход 88%.

Стадия В.

К твердому этил-2-ацетамидомалонату 4b (7,57 г, 40 ммолей) добавляли в течение 1 мин 6-гептенал 4d (4,48 г, 40 ммолей) в растворе пиридина (32 мл, 10 экв.). Образовавшийся раствор охлаждали до 10° в бане. Добавляли в течение 4 мин уксусный ангидрид (1 мл, 3,2 экв.). Полученный раствор оранжевого цвета перемешивали в течение 3 ч при К.Т. и добавляли другую порцию этил-2-ацетамидомалоната 4b (2,27 г). Образовавшуюся смесь перемешивали при комнатной температуре еще 11 ч. Затем добавляли лед (60 мл) и раствор перемешивали в течение 1,5 ч, затем смесь разбавляли 250 мл воды и экстрагировали двумя порциями диэтилового эфира. Эфирный раствор промывали 1н. HCl, насыщенным раствором NaHCO₃, сушили над Na₂SO₄, концентрировали и очищали экспресс-хроматографией (EtOAc 40%/гексан), получая соединение 4e (4,8 г, выход 50%) в виде масла светло-желтого цвета.

Стадия Г.

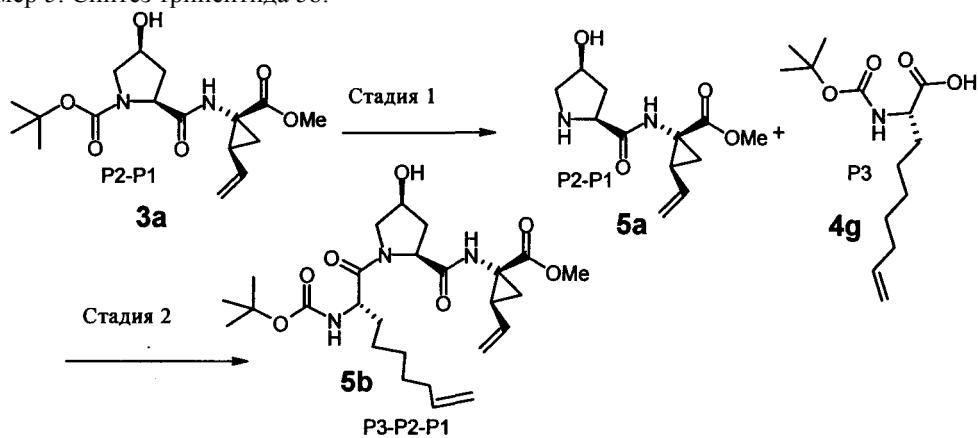
К дегазированному (барботирование аргоном в течение 30 мин) раствору Z-этил-2-ацетамило-2,8-нонадиеноата 4e (8,38 г, 35 ммолей) в безводном этаноле (70 мл) добавляли (S,S)-Et-DUPHOS Rh (COD)OTf (51 мг, соотношение субстрата/катализатора=496). Смесь помещали под давление водорода 30 фунтов/кв.дюйм (после 4 циклов H₂-вакуумирования) и перемешивали в шейкере Парра в течение 2 ч. Образовавшуюся смесь упаривали досуха, получая неочищенное соединение 4f, которое применяли на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия Д.

К раствору неочищенного (S)-этил 2-ацетамило-8-ноненоата 4f (7,3 г, 30,3 ммоля) в ТГФ (100 мл) добавляли Вос₂O (13,2 г, 2 экв.) и ДМАП (740 мг, 0,2 экв.). Реакционную смесь выдерживали при температуре дефлгмации в течение 2,5 ч. Затем большую часть растворителя ТГФ выпаривали, неочищенную смесь разбавляли CH₂Cl₂ и промывали 1н. HCl для удаления ДМАП. Органический слой дополнительно экстрагировали насыщенным водным раствором NaHCO₃, сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Затем неочищенный продукт разбавляли ТГФ (50 мл) и водой (30 мл). Добавляли LiOH·H₂O (2,54 г, 2 экв.) и образовавшуюся смесь перемешивали при К.Т. в течение 25 ч (завершение гидролиза подтверждены с помощью ТСХ). Реакционную смесь концентрировали в вакууме для удаления большей части растворителя ТГФ и разбавляли CH₂Cl₂. Образовавшийся раствор промывали 1н. HCl, сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Для удаления миорных примесей и избытка Вос₂O неочищенный продукт очищали экспресс-хроматографией (используя в качестве элюента градиент растворителя от 100% гексана до 100% EtOAc). Получали указанное в заголовке соединение 4g в виде высокоочищенного масла светло-желтого цвета (5,82 г, выход 71%).

¹H ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ 7,01 (d, J=8 Гц, 1H), 5,79 (tdd, Jt=6,7 Гц, Jd=17,0, 10,2 Гц, 1H), 5,00 (md, Jd=17,0 Гц, 1H), 4,93 (md, Jd=10,2 Гц, 1H), 3,83 (m, 1H), 2,00 (q, J=6,9 Гц, 2H), 1,65-1,5 (m, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,35-1,21 (m, 6H).

Пример 5. Синтез трипептида 5b.



Стадия 1.

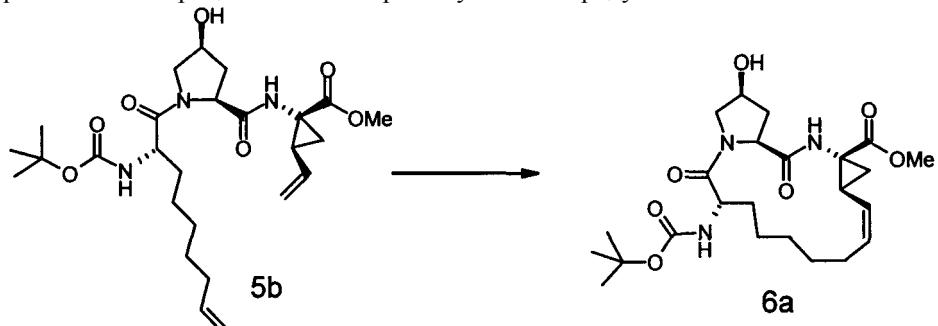
Раствор хлористого водорода в диоксане (4н.) добавляли к Вос-P2-P1-фрагменту 3a (5,32 г, 15,0 ммолей), получая бесцветный раствор. После перемешивания при комнатной температуре растворитель выпаривали и остаток помещали в глубокий вакуум на 3 ч, получая гидрохлорид соединения 5a в виде аморфного твердого вещества, которое использовали без дополнительной очистки.

Стадия 2.

Добавляли ДИПЭА (2,6 мл, 15 ммолей) к смеси вышеуказанного гидрохлорида P1-P2 (15 ммолей) в безводном ДХМ (100 мл), получая гомогенный раствор. Отдельно при перемешивании добавляли ТБТУ (5,30 г, 16,5 ммоля, 1,1 экв.) к раствору C9-линкера 4g (4,07 г, 15,0 ммолей) в безводном ДХМ (130 мл), что приводило к частичному растворению реагента. Добавляли ДИПЭА (2,6 мл, 15 ммолей), получая через 10 мин практически гомогенный раствор. Затем к этому раствору добавляли раствор P1-P2 и ДИПЭА

до подщелачивания реакционной смеси ($\text{pH} > 8$, определение с помощью влажной лакмусовой бумаги). После перемешивания в атмосфере азота в течение 5 ч растворитель выпаривали и остаток экстрагировали EtOAc (2x250 мл) и промывали разбавленной соляной кислотой (0,05н., 400 мл), водой (400 мл) и насыщенным раствором бикарбоната натрия (400 мл). Затем объединенные органические фазы сушили над сульфатом магния, фильтровали и упаривали, получая сироп желтого цвета. Неочищенный продукт хроматографировали на силикагеле, используя в качестве элюента градиент от 6:1 $\text{EtOAc}/\text{гексан}$ до 100% EtOAc , после чего получали требуемый трипептидный диен 5b в виде пены белого цвета (5,88 г, 82%, чистота >95%, по данным ЖХВР).

Пример 6. Синтез макроциклического промежуточного продукта 6a.

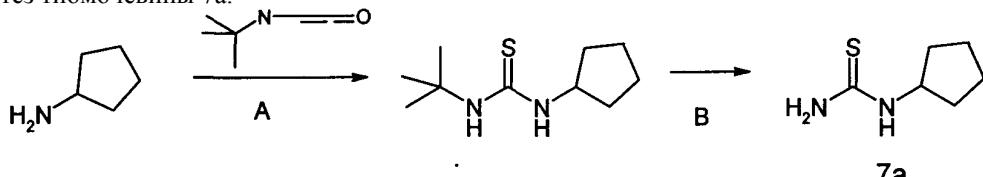


Раствор диена 5b (4,0 г, 7,88 ммоля) в безводном ДХМ (800 мл) дезоксигенировали, барботируя Ar в течение 2 ч. Затем добавляли катализатор Ховейда (Hoveyda) (262 мг, 0,434 ммоля, 5,5 мол.%) в виде твердого вещества и реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в атмосфере Ar, который поступал из баллона. Через 28 ч раствор красно-оранжевого цвета упаривали до получения аморфного твердого вещества и затем очищали с помощью экспресс-хроматографии на силикагеле. Начальная система растворителей представляла собой 10% EtOAc в CH_2Cl_2 . После элюирования катализатора из колонки растворитель заменяли на чистый EtOAc . Об элюировании катализатора из колонки судили по окраске. Выделяли макроциклический продукт 6a в виде бесцветной пены, которую повторно растворяли в смеси $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{гексан}$ (~1:2). После выпаривания растворителя получали порошок белого цвета (3,362 г, выход 89%).

^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 1,20-1,50 (m, 6H), 1,43 (s, 9H), 1,53 (dd, $J=9,5$ и $5,4$ Гц, 1H), 1,61-1,70 (m, 1H), 1,76-1,90 (m, 2H), 2,05-2,26 (m, 4H), 2,45 (d, $J=14,3$ Гц, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,71 (d, $J=11,1$ Гц, 1H), 3,90 (dd, $J=11,1$ и $4,3$ Гц, 1H), 4,43-4,53 (m, 2H), 4,76 (d, $J=8,6$ Гц, 1H), 4,86 (bd, $J=9,8$ Гц, 1H), 5,20-5,23 (m, 2H), 5,57 (dt, $J=7,0$ и $9,8$ Гц, 1H), 7,32 (bs, 1H).

Пример 7. Получение тиомочевин 7.

Синтез тиомочевины 7a.

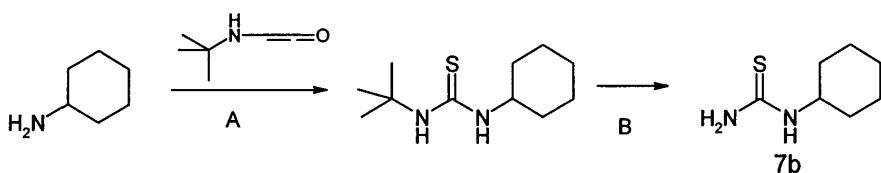


К раствору трет-бутилизотиоцианата (5,0 мл; 39,4 ммоля) в ДХМ (200 мл) добавляли циклопентиламин (4,67 мл; 47,3 ммоля), а затем добавляли ДИЭА (дизопропилэтиламин) и реакционную смесь перемешивали при К.Т. в течение 2 ч. Смесь разбавляли EtOAc , промывали 10%-ным водным раствором лимонной кислоты (2x), насыщенным NaHCO_3 (2x), H_2O (2x) и соляным раствором (1x). Органический слой сушили над безводным MgSO_4 , фильтровали и упаривали, получая трет-бутил-N'-цикlopентилтиомочевину в виде твердого вещества белого цвета (3,70 г; выход 47%). N-трет-Бутил-N'-цикlopентилтиомочевину (3,70 г) растворяли в концентрированной HCl (46 мл). Раствор темно-желтого цвета осторожно кипятили с обратным холодильником. Через 40 мин реакционной смеси давали охладиться до К.Т. и затем охлаждали на льду и подщелачивали до $\text{pH} 9,5$ с помощью твердого NaHCO_3 и насыщенного водного раствора NaHCO_3 . Продукт экстрагировали EtOAc (3x), объединенные EtOAc -экстракти промывали H_2O (2x) и соляным раствором (1x). Органический слой сушили (MgSO_4), фильтровали и концентрировали, получая твердое вещество бежевого цвета (2,46 г, неочищенный продукт). После растирания неочищенного продукта в гексане/ EtOAc (95/5) с последующей фильтрацией получали N-цикlopентилтиомочевину 7a в виде твердого вещества белого цвета (2,38 г; выход 90%).

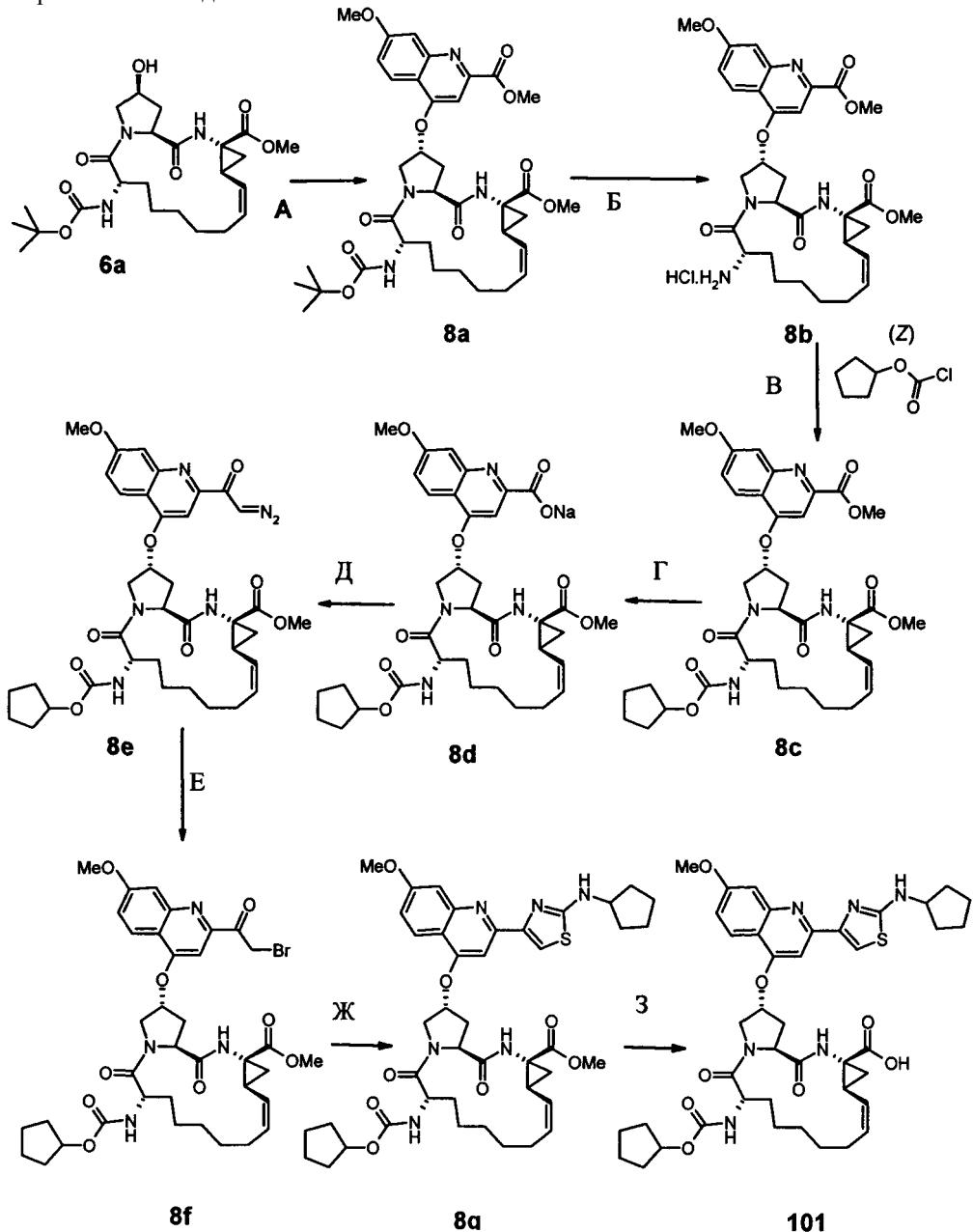
^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 7,58 (bs, 1H), 7,19 (bs, 1H), 6,76 (bs, 1H), 4,34 (bs, 1H), 1,92-1,79 (m, 2H), 1,66-1,55 (m, 2H), 1,55-1,30 (m, 4H). MC: $\text{es}^+ \cdot 144,9 (\text{M}+\text{H})^+$, $\text{es}^- \cdot 142,8 (\text{M}-\text{H})^-$.

Получение тиомочевины 7b.

С помощью описанного выше процесса и используя поступающий в продажу циклогексиламин (вместо цикlopентиламина), получали тиомочевину 7b.



Пример 8. Синтез соединения 101.



Стадия А.

К раствору, содержащему макроциклический промежуточный продукт 6а (13,05 г, 27,2 ммоля, 1,0 экв.), Ph₃P (14,28 г, 54,4 ммоля, 2,0 экв.) и 2-карбоксиметокси-4-гидрокси-7-метоксихинолин (WO 00/09543; WO 00/09558 и WO 00/59929) (6,67 г, 28,6 ммоля, 1,05 экв.) в ТГФ (450 мл), при 0° по каплям в течение 15 мин добавляли ДИАД (10,75 мл, 54,6 ммоля, 2,0 экв.). Затем ледяную баню удаляли и реакционную смесь перемешивали при К.Т. в течение 3 ч. После завершения превращения исходного продукта в требуемые вещества растворитель выпаривали в вакууме, оставшуюся смесь разбавляли EtOAc, промывали насыщенным NaHCO₃ (2х) и соляным раствором (1х), органический слой сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и упаривали досуха. После колоночной экспресс-хроматографии получали чистое соединение 7а; колонку элюировали сначала гексаном/EtOAc (50:50), затем CHCl₃/EtOAc (95:5) для удаления побочных продуктов Ph₃PO и ДИАД и элюирование примесей оценивали с помощью ТСХ. Наконец, из колонки элюировали требуемый продукт 8а с помощью CHCl₃/EtOAc (70:30). Как правило, стадию хроматографии требовалось повторять 2-3 раза до тех пор пока соединение 8а можно было выделять в виде высокоочищенного твердого продукта белого цвета, общий выход которого составлял 68% (12,8 г, чисто-

та 99,5%, по данным ЖХВР).

Стадия Б.

К раствору защищенного с помощью Вос промежуточного продукта 8а (1,567 г) в CH_2Cl_2 (15 мл) добавляли 4н. HCl в диоксане (12 мл). Реакционную смесь перемешивали при К.Т. в течение 1 ч. (В случае, когда в середине реакционного периода образовывался густой гель, дополнительно вносили 10 мл CH_2Cl_2 .) После завершения стадии удаления защитной группы растворители выпаривали досуха, получая твердое вещество желтого цвета и пастообразный продукт. Смесь повторно растворяли примерно в 5% MeOH в CH_2Cl_2 и повторно упаривали досуха в вакууме, получая соединение 8b в виде твердого вещества желтого цвета, которое использовали на следующей стадии без какой-либо очистки.

Стадия В.

К раствору циклопентанола (614 мкл, 6,76 ммоля) в ТГФ (15 мл) добавляли по каплям раствор фосгена в толуоле (1,93М, 5,96 мл, 11,502 ммоля) и смесь перемешивали при К.Т. в течение 2 ч, получая циклопентилхлорформиатный реагент (z). После этого примерно половину растворителя удаляли, выпаривая в вакууме. Оставшийся раствор светло-желтого цвета разбавляли, добавляя CH_2Cl_2 (5 мл), и концентрировали до половины его первоначального объема для гарантии удаления всего избыточного фосгена. Затем вышеуказанный раствор циклопентилхлорформиатного реагента дополнительно разбавляли ТГФ (15 мл) и добавляли дигидрохлорид амина 8b. Смесь охлаждали до 0° в ледяной бане, значение pH доводили до ~8,5-9, добавляя Et_3N (по каплям), и реакционную смесь перемешивали при 0° в течение 1 ч. Затем смесь разбавляли EtOAc , промывали водой (1x), насыщенным NaHCO_3 (2x), H_2O (2x) и соляным раствором (1x). Органический слой сушили над безводным MgSO_4 , фильтровали и упаривали в вакууме, получая пену желто-янтарного цвета. После очистки с помощью колоночной экспресс-хроматографии (используя в качестве элюента градиент растворителей от 30% гексана до 20% гексана в EtOAc) получали сложный диметиловый эфир 8c в виде пены желтого цвета, выход 80% (1,27 г) и чистота >93%.

Стадия Г.

Сложный диметиловый эфир 8c (1,17 г) растворяли в смеси ТГФ/ $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (20 мл, соотношение 2:1:1) и добавляли водный раствор NaOH (1,8 мл, 1н., 1 экв.). Реакционную смесь перемешивали при К.Т. в течение 1 ч, а затем упаривали досуха, получая натриевую соль 8d в виде твердого вещества белого цвета (~1,66 ммоля). Соединение 8d использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия Д.

Неочищенную натриевую соль 8d (1,66 ммоля) растворяли в ТГФ (17 мл), добавляли Et_3N и смесь охлаждали до 0° в ледяной бане. Добавляли по каплям изобутилхлорформиат (322 мкл, 2,5 ммоля) и смесь перемешивали при 0° в течение 75 мин. Затем добавляли диазометан (15 мл) и перемешивание продолжали при 0° в течение 30 мин, а далее при К.Т. в течение еще 1 ч. Большую часть растворителя упаривали досуха в вакууме, оставшуюся смесь разбавляли EtOAc , промывали насыщенным NaHCO_3 (2x), H_2O (2x) и соляным раствором (1x), сушили над безводным MgSO_4 , фильтровали и упаривали досуха, получая соединение 8e в виде светло-желтой пены (1,2 г, ~1,66 ммоля). Представляющий собой диазокетон промежуточный продукт 8e использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия Е.

Раствор диазокетона 8e (1,2 г, 1,66 ммоля), растворенный в ТГФ (17 мл), охлаждали до 0° в ледяной бане. Добавляли по каплям раствор водной HBr (48%, 1,24 мл) и реакционную смесь перемешивали при 0° в течение 1 ч. Затем смесь разбавляли EtOAc , промывали насыщенным NaHCO_3 (2x), H_2O (2x) и соляным раствором (1x). Органический слой сушили над безводным MgSO_4 , фильтровали и упаривали досуха, получая промежуточный продукт, представляющий собой α -бромкетон 8f в виде пены светло-желтого цвета (~1,657 ммоля).

Стадия Ж.

К раствору бромкетона 8f (2,51 г, 3,27 ммоля) в изопропаноле (105 мл) добавляли циклопентилтиомочевину 7а (565 мг, 3,92 ммоля) и реакционную смесь помещали в предварительно нагретую маслянную баню с температурой 70° и перемешивали в течение 1,5 ч. Затем изопропанол удаляли в вакууме и продукт растворяли в EtOAc . Раствор промывали насыщенным NaHCO_3 , водой и соляным раствором, органический слой сушили над безводным MgSO_4 , фильтровали и выпаривали, получая неочищенный продукт 8g (1,35 г) в виде твердого вещества светло-желтого цвета. Неочищенный продукт очищали экспресс-хроматографией на силикагеле (гексан/ EtOAc , 1:1), получая 2,12 мг беловатого твердого вещества (выход 80%).

Стадия З.

Сложный метиловый эфир 8g (1,82 г, 2,2 ммоля) растворяли в растворе ТГФ/ $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (38/20/18 мл) и омыляли с помощью $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (935 мг, 22,3 ммоля). Осуществляли реакцию гидролиза в течение 18 ч при К.Т. Затем раствор упаривали досуха, получая беловатую пасту. Пасту разбавляли EtOAc и соляным раствором. Значение pH смеси доводили 6 с помощью 1н. HCl . EtOAc -слой отделяли и водный слой экстрагировали дважды EtOAc . Объединенные EtOAc -экстракты промывали деионизированной водой (2x) и соляным раствором (1x), сушили (MgSO_4) и упаривали, получая циклическое трипептидное соединение 101 в виде твердого вещества желтого цвета (1,76 г; выход 99%).

Превращение в Na-соль.

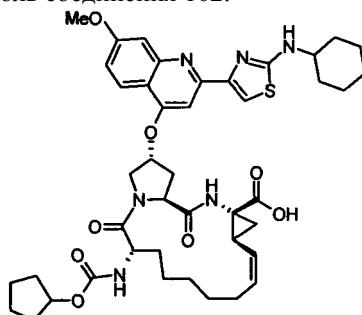
Соединение 8h (106 мг; 0,132 ммоля) растворяли в MeOH (20 мл) и добавляли 0,01н. раствор NaOH (13,2 мл). Прозрачный раствор желтого цвета разбавляли водой, замораживали и лиофилизировали, получая натриевую соль соединения 8h в виде аморфного твердого вещества желто-белого цвета (106 мг; выход 97%).

М.С.(электроспрей): 799,3 (M-H)- 801,4 (M+H), гомогенность, по данным ЖХВР, с обращенной фазой (0,06% ТФК; CH₃CN:H₂O) 99%.

¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,02 (d, J=9,2 Гц, 1H), 7,90 (d, J=6,4 Гц, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,44 (bs, 2H), 7,27 (d, J=1,9 Гц, 1H), 7,11 (d, J=7,0 Гц, 1H), 7,03 (d, J=9,2 Гц, 1H), 5,48 (dd, J=18,4, 9,9 Гц, 1H), 5,43 (bs, 1H), 5,15 (dt, J=17,8, 7,63 Гц, 1H), 4,70 (bs, 1H), 4,49-4,34 (m, 2H), 4,34-4,25 (m, 1H), 4,13-4,03 (m, 1H), 3,99-3,86 (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 2,58-2,44 (m, 1H), 2,42-2,32 (m, 1H), 2,15-1,93 (m, 4H), 1,83-1,14 (m, 24H), 1,14-1,12 (m, 1H).

Пример 9.

Используя процесс, описанный в примере 8, но применяя на стадии Ж N-циклогексилтиомочевину 7b, получали натриевую соль соединения 102.



Соединение 102

¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,02 (d, J=9,2 Гц, 1H), 7,86 (bs, 1H), 7,78 (d, J=7,3 Гц, 1H), 7,43 (s, 2H), 7,27 (d, J=2,2 Гц, 1H), 7,12 (d, J=6,9 Гц, 1H), 7,03 (dd, J=9,2, 1,9 Гц, 1H), 5,57-5,40 (m, 1H), 5,40 (s, 1H), 5,26-5,17 (m, 1H), 4,70 (bs, 1H), 4,52-4,35 (m, 2H), 4,29-4,23 (m, 1H), 4,18-4,00 (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,87-3,65 (m, 1H), 2,42-2,32 (m, 1H), 2,19-2,10 (m, 1H), 2,07-1,96 (m, 3H), 1,82-0,95 (m, 28H). MC; es⁺: 815,4 (M+H)⁺, es⁻: 813,4 (M-H)⁻.

Пример 10. Анализ NS3-NS4A-протеазы.

Ферментативный анализ, который применяли для оценки соединений, предлагаемых в настоящем изобретении, описан в WO 00/09543 и WO 00/59929.

Пример 11. Анализ репликации РНК HCV на культуре клеток.

Культура клеток.

Клетки линии HuH7, стабильно поддерживающие субгеномный репликон HCV, создавали согласно описанному ранее методу (Lohman и др., Science 285, 1999, сс. 110-113) и обозначали их как клеточная линия S22.3 (WO 02/052015). Клетки линии S22.3 поддерживали в модифицированной по методу Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% ФБС и 1 мг/мл неомицина (стандартная среда). В процессе анализа использовали среду DMEM, дополненную 10% ФБС, содержащую 0,5% ДМСО и не содержащую неомицина (среда для анализа). За 16 ч до внесения соединения клетки линии S22.3 обрабатывали трипсином и разбавляли до 50000 клеток/мл стандартной средой. По 200 мкл (10000 клеток) вносили в каждую лунку 96-луночного планшета. Затем планшет инкубировали при 37° в атмосфере с 5% CO₂ до следующего дня.

Реагенты и материалы.

Продукт	Компания	Каталожный №	Условия хранения
DMEM	Wisent Inc.	10013CV	4°C
ДМСО	Sigma	D-2650	К.Т.
Модифицированный по методу Дульбекко ЗФР	Gibco-BRL	14190-136	К.Т.
Фетальная телячья сыворотка (ФТС) (сыворотка плода коровы)	Bio-Whittaker	14-901F	-20°C/4°C
Неомицин (G418)	Gibco-BRL	10131-027	-20°C/4°C
Трипсин-ЭДТК	Gibco-BRL	25300-054	-20°C/4°C
96-луночные планшеты	Costar	3997	К.Т.
Фильтр из поливинилиденфторида (ПВДФ), 0,22 мкм	Millipore	SLGV025LS	К.Т.
Титрационный планшет из полипропилена с глубокими лунками	Beckman	267007	К.Т.

Подготовка тестируемого соединения к анализу.

10 мкл тестируемого соединения (в 100% ДМСО) добавляли к 2 мл среды для анализа до конечной концентрации ДМСО 0,5% и раствор обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин и фильтровали через фильтр типа Millipore с размером отверстий 0,22 мкм. 900 мкл вносили в ряд А титрационного планшета из полипропилена с глубокими лунками. Ряды Б-3 содержали аликвоты по 400 мкм среды для анализа (содержащей 0,5% ДМСО), и их применяли для приготовления серийных разведений (1/2) путем переноса по 400 мкл из ряда в ряд (в ряд 3 не вносили никакого соединения).

Внесение тестируемого соединения в культуру клеток.

Среду для культуры клеток аспирировали из 96-луночного планшета, содержащего клетки линии S22.3. По 175 мкл среды для анализа с соответствующим образом разбавленным тестируемым соединением переносили из каждой лунки планшета, содержащего соединения, в соответствующую лунку планшета, содержащего культуру клеток (ряд 3 применяли в качестве «контроля без ингибитора»). Планшет с культурой клеток инкубировали при 37° в атмосфере с 5% CO₂ в течение 72 ч.

Экстракция общей клеточной РНК.

После 72-часового периода инкубации экстрагировали общую клеточную РНК из клеток линии S22.3, находящихся в 96-луночном планшете, используя набор типа RNeasy 96 (Qiagen[®], RNeasy Handbook, 1999.). В целом, метод состоит в следующем: среду для анализа полностью удаляли из клеток и в каждую лунку 96-луночного планшета с культурой клеток добавляли по 100 мкл RLT-буфера (Qiagen[®]), содержащего 143 мМ β-меркаптоэтанол. Микропланшет осторожно встряхивали в течение 20 с. Затем в каждую лунку микропланшета добавляли по 100 мкл 70%-ного этанола и перемешивали пипетированием. Лизат удаляли и вносили в лунки планшета, содержащего RNeasy 96 (Qiagen[®]), который помещали в верхнюю часть блока с квадратными лунками (Qiagen[®] Square-Well Block). Планшет с RNeasy 96 запечатывали скотчем и устройство Square-Well Block с содержащим RNeasy 96 планшетом помещали в держатель и вносили в роторный резервуар центрифуги 4K15C. Образец центрифугировали при 6000 об./мин (~5600 x g) в течение 4 мин при комнатной температуре. Скотч удаляли с планшета и в каждую лунку планшета с RNeasy 96 вносили по 0,8 мл RW1-буфера (Qiagen[®] набор RNeasy 96). Содержащий RNeasy 96 планшет запечатывали новым куском скотча и центрифугировали при 6000 об./мин в течение 4 мин при комнатной температуре. Содержащий RNeasy 96 планшет помещали в верхнюю часть другого чистого блока с квадратными лунками (типа Square-Well Block), скотч удаляли и в каждую лунку содержащего RNeasy 96 планшета вносили по 0,8 мл RPE-буфера (Qiagen[®] набор RNeasy 96). Содержащий RNeasy 96 планшет запечатывали новым куском скотча и центрифугировали при 6000 об./мин в течение 4 мин при комнатной температуре. Скотч удаляли и в каждую лунку содержащего RNeasy 96 планшета вносили еще по 0,8 мл RPE-буфера (Qiagen[®] набор RNeasy). Содержащий RNeasy 96 планшет запечатывали новым куском скотча и центрифугировали при 6000 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Скотч удаляли, содержащий RNeasy 96 планшет помещали в верхнюю часть адаптора, содержащего предназначенные для сбора образцов микроцентрифужные пробирки объемом 1,2 мл. РНК элюировали, добавляя в каждую лунку по 50 мкл свободной от РНКазы воды, запечатывая планшет новым куском скотча и инкубируя в течение 1 мин при комнатной температуре. Планшет затем центрифугировали при 6000 об./мин в течение 4 мин при комнатной температуре. Стадию элюирования повторяли, используя второй объем, равный 50 мкл свободной от РНКазы воды. Микроцентрифужные пробирки с общей клеточной РНК хранили при -70°.

Количественная оценка общей клеточной РНК.

РНК оценивали количественно с помощью системы STORM[®] (Molecular Dynamics[®]), используя набор для количественной оценки РНК типа RiboGreen[®] (Molecular Probes[®]). В целом, метод состоит в следующем: реагент RiboGreen разбавляли в 200 раз ТЭ (10 мМ Трис-HCl, pH=7,5, 1 мМ ЭДТК). Как правило, 50 мкл реагента разбавляли 10 мл ТЭ. Образцы рибосомной РНК для построения стандартной кривой разбавляли в ТЭ до 2 мкл/мл и затем предварительно определенные количества (100, 50, 40, 20, 10, 5, 2 и 0 мкл) раствора рибосомной РНК переносили в новый 96-луночный планшет (COSTAR № 3997) и объем доводили до 100 мкл с помощью ТЭ. Как правило, колонку 1 96-луночного планшета использовали для построения стандартной кривой, а другие лунки использовали для количественной оценки образцов РНК. По 10 мкл каждого образца РНК, подлежащего количественной оценке, переносили в соответствующую лунку 96-луночного планшета и добавляли по 90 мкл ТЭ. В каждую лунку 96-луночного планшета вносили по одному объему (100 мкл) разбавленного реагента RiboGreen и инкубировали в течение 2-5 мин при комнатной температуре, защищая от света (10 мкл образца РНК в 200 мкл конечного объема, т.е. 20-кратное разбавление). Интенсивность флуоресценции каждой лунки оценивали с помощью системы STORM[®] (Molecular Dynamics[®]). Стандартные кривые получали на основе известных количеств рибосомной РНК и соответствующей им интенсивности флуоресценции. Концентрацию РНК в экспериментальных образцах определяли исходя из стандартной кривой и корректировали с учетом 20-кратного разбавления.

Реагенты и материалы.

Продукт	Компания	Каталожный №	Условия хранения
DEPC	Sigma	D5758	4°C
ЭДТК	Sigma	E5134	К.Т.
Основание Trizma	Sigma	T8524	К.Т.
Trizma-HCl	Sigma	T7149	К.Т.
Адапторы с пробирками для сбора	Qiagen	19562	К.Т.
Набор для количественной оценки РНК типа Ribogreen	Molecular Probe	R11490	-20°C
Набор типа RNeasy 96	Qiagen	74183	К.Т.
Блоки с квадратными лунками	Qiagen	19573	К.Т.

ОТ-ПЦР, проводимая в реальном времени.

ОТ-ПЦР в реальном времени осуществляли с помощью системы для анализа последовательности ABI Prism 7700 с использованием набора TaqMan EZ R.T.-PCR (фирмы Perkin-Elmer Applied Biosystems®). ОТ-ПЦР оптимизировали для количественной оценки 5'-IRES РНК HCV с помощью технологии Таоман (фирма Roche Molecular Diagnostics Systems), которая аналогична методу, описанному ранее у Martell и др., J. Clin. Microbiol. 37, 1999, сс. 327-332). Система основана на 5'-3' нуклеолитической активности ДНК-полимеразы AmpliTaq. В целом, метод состоит в следующем: для его осуществления использовали фторогенный гибридизующийся зонд с двойной меткой (PUTR-зонд), который специфично ренатурирует матрицу между ПЦР-праймерами (праймеры 8125 и 7028). 5'-Конец зонда содержит флуоресцентный репортер (6-карбоксифлуоресцин [FAM]), а 3'-конец содержит гаситель флуоресценции (6-карбокситетраметилродамин [TAMRA]). Спектр испускания репортера FAM подавляли гасителем на неповрежденном гибридизующемся зонде. Расщепление гибридизующегося зонда высвобождало репортер, что приводило к повышению испускания флуоресценции. С помощью анализатора последовательности типа ABI Prism 7700 непрерывно осуществляли определение повышения испускания флуоресценции в процессе ПЦР-амплификации, при этом количество амплифицированного продукта прямо пропорционально сигналу. Зависимость амплификации от времени анализировали на ранней стадии реакции, в момент времени, соответствующий логарифмической фазе накопления продукта. Точку, представляющую собой определенный порог обнаружения повышения сигнала флуоресценции, связанного с экспоненциальным увеличением количества ПЦР-продукта для анализатора последовательности, обозначали как порог цикла (C_T). Значения C_T обратно пропорциональны количеству введенной РНК HCV; т.е. при одинаковых условиях ПЦР чем больше исходная концентрация РНК HCV, тем ниже значение C_T . Стандартную кри-ую строили автоматически с помощью системы обнаружения ABI Prism 7700 путем построения графика зависимости C_T от каждого стандартного разведения с известной концентрацией РНК HCV.

В каждый планшет для осуществления ОТ-ПЦР вносили эталонные образцы для стандартной кри-ой. РНК репликона HCV синтезировали (посредством транскрипции T7) *in vitro*, очищали и количественно оценивали по величине ОП₂₆₀. С учетом того, что в 1 мкг этой РНК содержится $2,15 \times 10^{11}$ копий РНК, осуществляли такие разведения, чтобы получать 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 или 10^2 копий геномной РНК/5 мкл. В каждое разведение включали также общую клеточную РНК линии Huh-7 (50 нг/5 мкл). 5 мкл каждого эталонного образца (РНК репликона + РНК Huh-7) объединяли с 45 мкл реагента Mix и применяли в проводимой в реальном времени ОТ-ПЦР.

Проводимую в реальном времени ОТ-ПЦР осуществляли также с использованием экспериментальных образцов, которые очищали в содержащих RNeasy 96 лунках планшета, объединяя 5 мкл каждого образца общей клеточной РНК с 45 мкл реагента Mix.

Реагенты и материалы.

Продукт	Компания	Каталожный №	Условия хранения
Набор TaqMan EZ R.T.-PCR	PE Applied Biosystems	N808-0236	-20°C
Оптические колпачки типа MicroAmp	PE Applied Biosystems	N801-0935	К.Т.
Оптический 96-луночный реакционный планшет типа MicroAmp	PE Applied Biosystems	N801-0560	К.Т.

Состав для приготовления реагента Mix.

Компонент	Объем для 1 образца (мкл)	Объем для одного планшета (мкл) (объем для 91 образца + «мертвый» объем)	Конечная концентрация
Свободная от РНКазы вода	16,5	1617	
5×буфер TaqMan EZ	10	980	1×
Mn(OAc) ₂ (25мМ)	6	588	3мМ
дАТФ (10мМ)	1,5	147	300мкМ
дЦТФ (10мМ)	1,5	147	300мкМ
дГТФ (10мМ)	1,5	147	300мкМ
дУТФ (20мМ)	1,5	147	600мкМ
«Прямой» праймер (10мкМ)	1	98	200нМ
«Обратный» праймер (10мкМ)	1	98	200нМ
PUTR-зонд (5мкМ)	2	196	200нМ
ДНК-полимераза rTth (2,5 ед./мкл)	2	196	0,1 ед./мкл
AmpErase UNG (1 ед./мкл)	0,5	49	0,01 ед./мкл
Общий объем	45	4410	

Последовательность «прямого» праймера (SEQ ID. 1):

5'-ACG CAG AAA GCG TCT AGC CAT GGC GTT AGT-3'

Последовательность «обратного» праймера (SEQ ID NO. 2):

5'-TCC CGG GGC ACT CGC AAG CAC CCT ATC AGG-3'

Примечание. Эти праймеры обеспечивают амплификацию области, состоящей из 256 нуклеотидов, которая присутствует в 5'-нетранслируемой области HCV.

Последовательность PUTR-зонда (SEQ ID NO. 3):

6FAM - TGG TCT GCG GAA CCG GTG AGT ACA CC - TAMRA

Не содержащие матрицы контроли (НМК): на каждом планшете по 4 лунки использовали в качестве «НМК». Для получения таких контролей в каждую лунку вместо РНК вносили 5 мкл воды.

Условия проведения реакции в термоячейке:

50°C 2 мин

60°C 30 мин

95°C 5 мин

95°C 15 с }
60°C 1 мин } 2 цикла

90°C 15 с } 40 циклов
60°C 1 мин }

После завершения ОТ-ПЦР для анализа данных необходимо определять порог обнаружения сигнала флуоресценции для ПЦР-планшета и для этого получали стандартную кривую путем построения графика зависимости значения C_t от количества копий РНК, применяемых в каждой эталонной реакции. Значения C_t , полученные для анализируемых образцов, использовали для определения путем интерполяции количества копий РНК на основе стандартной кривой.

И, наконец, количество копий РНК стандартизовали (на основе количественной оценки РНК, экстрагируемой из лунки с клеточной культурой, с помощью набора RiboGreen RNA) и выражали в виде геномных эквивалентов/мкг общей РНК [г.э./мкг].

Количество копий РНК [г.э./мкг] для каждой лунки планшета с культурой клеток принимали за меру количества реплицирующейся РНК HCV в присутствии различных концентраций ингибитора. Ингибирование в % рассчитывали с помощью следующего уравнения:

100-[$(\text{г.э./мкг инг.}) / (\text{г.э./мкг контр.}) \times 100$].

Для обработки данных зависимости ингибирования от концентрации применяли основанную на модели Хилла аппроксимацию нелинейной кривой и значения концентрации, обеспечивающей 50%-ную эффективность (50%-ное ингибирование) (EC_{50}) рассчитывали с помощью программного обеспечения SAS (Statistical Software System; SAS Institute, Inc. Кэри, шт. Северная Каролина).

Пример 12. Анализы специфичности.

Анализы специфичности, применяемые для оценки избирательности действия указанного соединения, соответствуют описанным в WO 00/09543.

Пример 13. Фармакокинетические свойства.

Соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, обладают также удовлетворительными фармакокинетическими свойствами, такими как значительные уровни в плазме крыс через 1 и 2 ч после орального введения дозы 5 мг/кг.

Более конкретно, для оценки уровней в плазме крыс тестируемых соединений после орального введения применяли следующий анализ, основанный на оценке *in vivo* абсорбции после орального введения.

Материалы и методы.

1. Метод, применяемый для группировки соединений (отбор с помощью «кассет»).

Отбор соединений, предназначенных для объединения в «кассету», был основан на их структурном сходстве и физикохимических свойствах. Был разработан метод твердофазной экстракции, применимый для всех отобранных соединений. Данные начального тестирования, при котором каждое соединение вводили в плазму крыс и с помощью ЖХВР или ЖХВР-МС анализировали каждое соединение, взятое в концентрации 0,5 мкМ, с определением времени удерживания, ионной массы и возможности разделения соединений с помощью ЖХВР и/или ЖХВР/МС, использовали для объединения 3-4 соединений в одну «кассету».

2. Подготовка носителя и соединения для орального введения.

Каждая «касseta» содержала 3-4 соединения, каждое в концентрации 5 или 4 мг/кг. Кассету приготавливали в виде суспензии для орального введения, содержащей 0,5% водной метилцеллюлозы и 0,3% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата (Твин-80). Объем вводимой дозы составлял 10 мл/кг, и ее вводили через оральный желудочный зонд.

3. Применяемые дозы и отбор образцов плазмы.

Самцов крыс Sprague Dawley содержали в индивидуальных клетках в течение ночи, и животные имели доступ к водной 10%-ной декстрозе. Каждую «касsetu» вводили 2 крысам. Образцы плазмы (~1 мл) получали через 1 и 2 ч после обработки у каждой из двух крыс и объединяли для экстракции и анализа.

4. Экстракция и анализ соединений.

Для каждой «касsetы» образцы плазмы, полученные через 1 и 2 ч, образцы контрольной плазмы, образцы контрольной плазмы, в которую вводили все соединения, каждое в концентрации 0,5 мкМ, экстрагировали с помощью метода твердофазной экстракции. Для сравнения образцы анализировали с помощью ЖХВР и ЖХВР/МС. Концентрации в плазме определяли на основе одной концентрации стандарта, составляющей 0,5 мкМ.

Таблица 1

Соединение №	R ¹	R ²	R ³	МС (М-Н)-
101	OH	цикlopентил	цикlopентил	799,3
102	OH	циклогексил	цикlopентил	813,4
103	NH-SO ₂ -циклогексил	цикlopентил	цикlopентил	n/d

При оценке соединений, предлагаемых в настоящем изобретении, с помощью описанных выше ферментативных анализов и анализов клеточных культур выявлена их высокая активность. Более конкретно, установлено, что значения IC₅₀ соединений составляли менее 0,01 мкМ при анализе NS3-NS4A-протеазы, а значения EC₅₀ составляли менее 0,01 мкМ при анализе репликации РНК HCV на культуре клеток.

При анализе специфичности соединений установлено, что соединения формулы (I) обладают изби-

рательным действием, т.е. они не обладают выраженной ингибирующей активностью в отношении эластазы человеческих лейкоцитов и катепсина B.

При осуществлении фармакокинетического анализа на крысах неожиданно было установлено, что при использовании дозы 5 мг/кг в метоцеле:Твин20® (0,5%:0,3%) получали высокие концентрации в плазме. Для соединений 101 и 102 величина площади под кривой (AUC) составляла 16 и 18 мкМ·ч соответственно, в то время как для их ближайших аналогов величина AUC составляла 0,8-4,5 мкМ·ч. Это неожиданное и важное повышение проникновения соединений в плазму крыс делает эти соединения очень перспективными в качестве возможных лекарственных средств, которые можно вводить оральным путем.

Перечень последовательностей

<110> Бёрингер Ингельхайм (Канада) Лтд.

<120> Макроциклические пептиды, обладающие активностью в отношении вируса гепатита С

<130> 13/092

<150> 2,369,711

<151> 2002-01-30

<160> 3

<170> FastSEQ для версии Windows 4.0

<210> 1

<211> 30

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> прямой праймер

<400> 1

acsgcagaaag cgtctagcca tggcgtagt

30

<210> 2

<211> 30

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> обратный праймер

<400> 2

tcccggggca ctcgcaagca ccctatcagg

30

<210> 3

<211> 26

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> PUTR-зонд

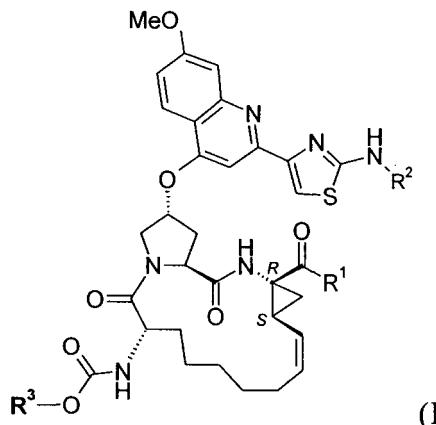
<400> 3

tggtctgcgg aaccggtag tacacc

26

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



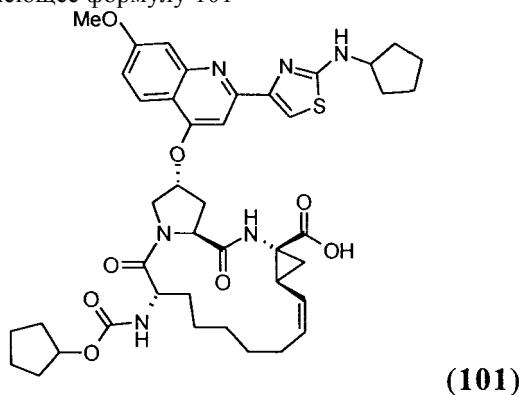
в котором R¹ обозначает гидрокси или NHSO₂R^{1A}, где R^{1A} обозначает метил, этил, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопропилметил, циклогексил, CCl₃, CF₃, фенил, 2-фторфенил или 4-метилфенил, R² обозначает C₅-C₆циклоалкил и R³ обозначает циклопентил; или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, в котором R^{1A} обозначает циклопропил.

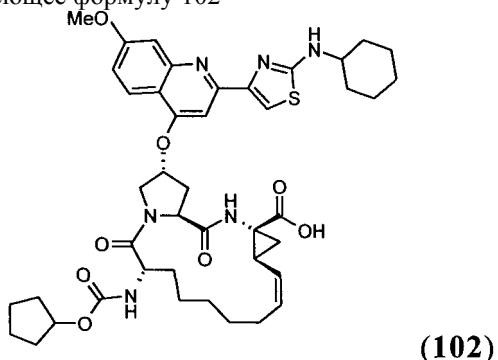
3. Соединение по п.1 или 2, в котором R¹ обозначает гидрокси.

4. Соединение по одному из пп.1-3, в котором R² обозначает циклопентил.

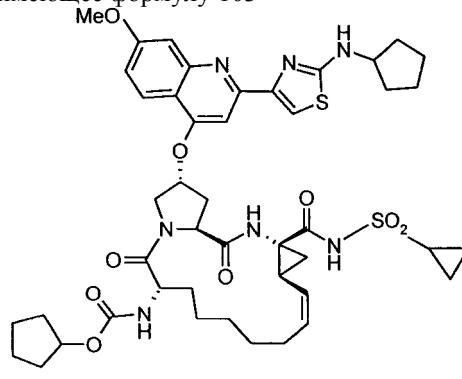
5. Соединение по п.1, имеющее формулу 101



6. Соединение по п.1, имеющее формулу 102



7. Соединение по п.1, имеющее формулу 103



(103)

8. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное в отношении вируса гепатита С количество соединения формулы (I) по одному из пп.1-7 или его фармацевтически приемлемой соли в смеси с фармацевтически приемлемой средой носителя или вспомогательным веществом.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, дополнительно содержащая терапевтически эффективное количество одного или нескольких других агентов, обладающих активностью в отношении HCV.

10. Фармацевтическая композиция по п.9, в которой другой агент, обладающий активностью в отношении HCV, выбирают из α -интерферона или пэгилированного α -интерферона.

11. Фармацевтическая композиция по п.9 или 10, в которой другой агент, обладающий активностью в отношении HCV, представляет собой рибавирин.

12. Фармацевтическая композиция по пп.9, 10 или 11, в которой другой агент, обладающий активностью в отношении HCV, выбирают из ингибиторов: геликазы, NS2/3-протеазы и внутреннего сайта входа в рибосому (IRES).

13. Способ лечения или предупреждения инфекции, вызываемой вирусом гепатита С у млекопитающего, заключающийся в том, что млекопитающему вводят эффективное в отношении вируса гепатита С количество соединения формулы (I) по одному из пп.1-7 или его фармацевтически приемлемой соли.

14. Способ лечения или предупреждения инфекции, вызываемой вирусом гепатита С у млекопитающего, заключающийся в том, что млекопитающему вводят эффективное в отношении вируса гепатита С количество композиции по одному из пп.10-12.

15. Способ лечения или предупреждения инфекции, вызываемой вирусом гепатита С у млекопитающего, заключающийся в том, что млекопитающему вводят эффективное в отношении вируса гепатита С количество соединения формулы (I) по одному из пп.1-7 или его терапевтически приемлемой соли в сочетании с одним или несколькими другими агентами, обладающими активностью в отношении HCV.

16. Способ по п.15, заключающийся в том, что другой агент, обладающий активностью в отношении HCV, выбирают из α -интерферона или пэгилированного α -интерферона.

17. Способ по п.15 или 16, заключающийся в том, что другой агент, обладающий активностью в отношении HCV, представляет собой рибавирин.

18. Способ по пп.15, 16 или 17, заключающийся в том, что другой агент, обладающий активностью в отношении HCV, выбирают из ингибиторов: геликазы, NS2/3-протеазы и внутреннего сайта входа в рибосому (IRES).

19. Применение соединения формулы (I) по одному из пп.1-7 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения или предупреждения инфекции, вызываемой вирусом гепатита С.

