



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 113201

(13) C2

(51) МПК

C07C 279/16 (2006.01)

A61K 31/155 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

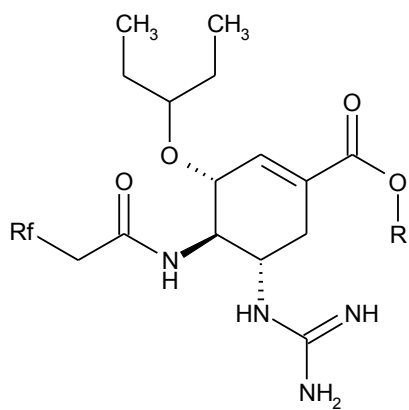
(21) Номер заявки:	а 2014 10979	(72) Винахідник(и):	Іващенко Олександр Васильєвич (RU)
(22) Дата подання заявки:	07.05.2013	(73) Власник(и):	Іващенко Олександр Васильєвич, Московское шоссе, 3, г. Долгопрудный, Московская обл., 141700, Российская Федерация (RU), АСАВІ, ЛЛС, 1835 East Hallandale Beach, # 442, Hallandale Beach, Florida, 33009, USA (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	26.12.2016	(74) Представник:	Янішевська Антоніна Леонідівна, реєстр. №133
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	2012119272	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 5 952 375 A, 14.09.1999 ZHENG MINGYUE ET AL., "QSAR analyses on avian influenza virus neuraminidase inhibitors using CoMFA, CoMSIA, and HQSAR.", JOURNAL OF COMPUTER-AIDED MOLECULAR DESIGN, (2006), vol. 20, no. 9, pages 549 - 566 DU OI-SHI ET AL., "Fragment-based quantitative structure-activity relationship (FB- QSAR) for fragment-based drug design.", JOURNAL OF COMPUTATIONAL CHEMISTRY, (2009), vol. 30, no. 2, pages 295 - 304
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	12.05.2012		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	RU		
(41) Публікація відомостей про заявку:	12.01.2015, Бюл.№ 1		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	26.12.2016, Бюл.№ 24		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/RU2013/000384, 07.05.2013		

(54) ФТОРЗАМІСНІ (3R,4R,5S)-5-ГУАНІДИНО-4-ФТОРАЦИЛАМІНО-3-(ПЕНТАН-3-ІЛОКСИ)ЦИКЛОГЕКСЕН-1-КАРБОНОВІ КИСЛОТИ, ЇХ ЕФІРИ І СПОСІБ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Даний винахід належить до нових інгібіторів активності нейрамінідази і їх використання для профілактики і лікування інфекції грипу, а саме до фторзамісних 4-ациламіно-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонових кислот та їх ефірів загальної формули 1, і їх фармацевтично прийнятних солей і / або гідратів,

UA 113201 C2



1

де R являє собою водень, необов'язково заміщений C_1 - C_3 алкіл, Rf являє собою CH_2F або CHF_2 .
Наводиться фармацевтична композиція, спосіб її отримання та спосіб профілактики і лікування вірусних захворювань.

Область техніки

Даний винахід відноситься до нових сполук - фторзамісних (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-ациламіно-3-(пентан-3-ілокси) циклогексен-1-карбонових кислот та їх ефірів - інгібіторів активності нейрамінідази.

5 Попередній рівень техніки

Багато мікроорганізмів, що містять нейрамінідазу, патогенні по відношенню до людини і тварин, таких як птахи, коні, свині, тюлені. Такі патогенні мікроорганізми включають вірус грипу. Нейрамінідаза пов'язана з патогенністю вірусу грипу.

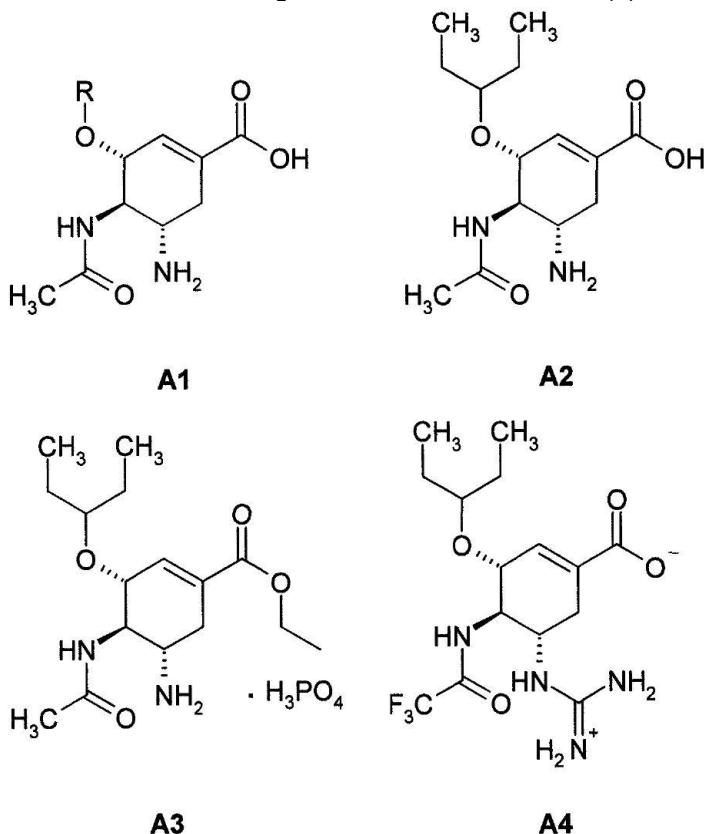
10 У цьому зв'язку нові фторзамісні (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-ациламіно-3-(пентан-3-ілокси) циклогексен-1-карбонові кислоти та їх ефіри представляють інтерес в якості лікарських субстанцій для створення нових препаратів, призначених для профілактики та лікування грипу. Відомі інгібітори нейрамінідази - (3R,4R,5S)-5-аміно-3-алкілокси-4-ацетиламіноциклогексен-1-карбонові кислоти A1, причому, найбільш активною з них є (3R,4R,5S)-5-аміно-4-ацетиламіно-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонова кислота A2, яка, як показують рентгеноструктурні дані

15 для комплексу кислоти з нейрамінідазою вірусу грипу, ефективно зв'язується з активним центром ферменту (Oseltamivir Carboxylate) [C. U. Kim, W. Lew, M. A. Williams, et al. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 681-690.].

Етиловий ефір озельтамівір карбоксилату A3, відомий як озельтамівір фосфат або таміфлю (Oseltamivir Phosphate, Tamiflu) [J. C. Rohloff, K. M. Kent, M. J. Postich, et al. J. Org. Chem. 1998,

20 63, 4545.], є лікарським попередником озельтамівір карбоксилату A2. Відома також (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-трифторацетиламіно-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонова кислота A4, що володіє активністю по відношенню до нейрамінідази H5N1 вірусу грипу [Q.-S. Du, R.-B. Huang, Y.-T. Wei, Z.-W. Pa, L.-Q. Du, K.-C. Chou. Fragment-Based Quantitative Structure-Activity Relationship (FB-QSAR) for Fragment-Based Drug Design. J. Comput. Chem. 2008, 30 (2), 295-304].

25 Відома 5-(ацетиламіно)-4-[(аміноімінометил)аміно]-2,6-ангідро-3,4,5-тридеокси-D-гліцерино-D-галактонон-2-енонова кислота (zanamivir), що володіє активністю по відношенню до нейрамінідази вірусів грипу A і B, а також вірусу грипу H1N1 [J. M. Woods, R. C. Bethell, J. A. Coates, et al. 4-Guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza A and B viruses in vitro. Antimicrob Agents Chemother. 1993, 37 (7), 1473-1479].



Пошук високоефективних протигрипозних лікарських препаратів, у тому числі, які володіють підвищеною активністю по відношенню до резистентних вірусів грипу, як і раніше є одним з

основних напрямів створення нових фармакологічних засобів для лікування грипу. У цьому зв'язку актуальною є розробка нових протигрипозних субстанцій, фармацевтичних композицій і лікарських препаратів, а також способів їх отримання і застосування.

Розкриття винаходу

5 Нижче наведені визначення термінів, які використані в описі цього винаходу. «Алкеніл» означає аліфатичну лінійну або розгалужену вуглеводневу групу, що містить від 2 до 7 атомів вуглецю і включає, принаймні, один вуглець-вуглецевий подвійний зв'язок. Розгалужена означає, що до лінійного алкенільного ланцюга приєднані один або кілька нижчих алکیلних груп, таких як метил, етил або пропіл. Алکیلна група може мати один або кілька замісників, 10 наприклад, таких як галоген, алкенілокси, циклоалкіл, ціано, гідрокси, алкокси, карбокси, алкінілокси, аралкокси, арілокси, арілоксикарбоніл, алкілтіо, гетероаралкілокси, гетероцикліл, гетероцикліалкілокси, алкоксикарбоніл, аралкоксикарбоніл, гетероаралкілоксикарбоніл або $R_k^a R_{k+1}^a N-$, $R_k^a R_{k+1}^a NC(=O)-$, $R_k^a R_{k+1}^a NSO_2-$, де R_k^a і R_{k+1}^a незалежно один від одного представляють собою «замісники аміногрупи», значення яких визначено в даному розділі, 15 наприклад, атом водню, алкіл, арил, аралкіл, гетероаралкіл, гетероцикліл або гетероарил, або R_k^a і R_{k+1}^a разом з атомом N, з яким вони пов'язані, утворюють через R_k^a і R_{k+1}^a 4-7 членний гетероцикліл або гетероцикленіл. Переважними алکیلними групами є метил, трифторметил, циклопропілметил, циклопентілметил, етил, н-пропіл, ізо-пропіл, н-бутил, трет-бутил, н-пентил, 3-пентил, метоксіетил, карбоксиметил, метоксикарбонілметил, бензілоксикарбонілметил і 20 піридилметилоксикарбонілметил. Переважними алкенільними групами є етеніл, пропеніл, н-бутеніл, ізо-бутеніл, 3-метилбутен-2-еніл, н-пентеніл, і циклогексилбутеніл.

«Алкіл» означає аліфатичну вуглеводневу лінійну або розгалужену групу з 1-12 атомами вуглецю в ланцюзі. Розгалужена означає, що алکیلний ланцюг має один або кілька «нижчих алکیلних» замісників. Алкіл може мати один або кілька однакових або різних замісників 25 («алکیلних замісників») включаючи галоген, алкенілокси, циклоалкіл, арил, гетероарил, гетероцикліл, ароіл, ціано, гідрокси, алкокси, карбокси, алкінілокси, аралкокси, арілокси, арілоксикарбоніл, алкілтіо, гетероарілтіо, аралкілтіо, арилсульфоніл, алкілсульфонілгетероаралкілокси, анельований гетероарілциклоалкеніл, анельований гетероарілциклоалкіл, анельований гетероарілгетероцикленіл, анельований гетероарілгетероцикліл, анельований арилциклоалкеніл, анельований арилциклоалкіл, анельований арилгетероцикленіл, анельований арилгетероцикліл, алкоксикарбоніл, аралкоксикарбоніл, гетероаралкілоксикарбоніл або $R_k^a R_{k+1}^a N-$, $R_k^a R_{k+1}^a NC(=O)-$, $R_k^a R_{k+1}^a NC(=S)-$, $R_k^a R_{k+1}^a NSO_2-$, де R_k^a і R_{k+1}^a незалежно один від одного представляють собою «замісники аміно 30 групи», значення яких визначено в даному розділі, наприклад, водень, алкіл, арил, аралкіл, гетероаралкіл, гетероцикліл або гетероарил, або R_k^a і R_{k+1}^a разом з атомом N, з яким вони пов'язані, утворюють через R_k^a і R_{k+1}^a 4-7 членний гетероцикліл або гетероцикленіл. Переважними алکیلними групами є метил, трифторметил, циклопропілметил, циклопентілметил, етил, н-пропіл, ізо-пропіл, н-бутил, трет-бутил, н-пентил, 3-пентил, метоксіетил, карбоксиметил, метоксикарбонілметил, етоксикарбонілметил, 40 бензілоксикарбонілметил, метоксикарбонілметил і піридилметилоксикарбоніл-метил. Переважними «алکیلними замісниками» є циклоалкіл, арил, гетероарил, гетероцикліл, гідрокси, алкокси, алкоксикарбоніл, аралкокси, арілокси, алкілтіо, гетероарілтіо, аралкілтіо, алкілсульфоніл, арилсульфоніл, алкоксикарбоніл, аралкоксикарбоніл, гетероаралкілоксикарбоніл або $R_k^a R_{k+1}^a N-$, $R_k^a R_{k+1}^a NC(=O)-$, анельований арилгетероцикленіл, анельований арилгетероцикліл. 45

«Алкиніл» означає аліфатичну лінійну або розгалужену вуглеводневу групу, що містить від 2 до 12 атомів вуглецю і включає, принаймні, один вуглець-вуглецевий потрійний зв'язок. Розгалужена означає, що до лінійного алкінільного ланцюга приєднані одна або кілька нижчих алکیلних груп, таких як метил, етил або пропіл. Алکیلна група може мати один або кілька замісників, наприклад, таких як галоген, алкенілокси, циклоалкіл, ціано, гідрокси, алкокси, алкінілокси, аралкокси, арілокси, арілоксикарбоніл, алкілтіо, гетероаралкілокси, гетероцикліл, гетероцикліалкілокси, алкоксикарбоніл, аралкоксикарбоніл, гетероаралкілоксикарбоніл або $R_k^a R_{k+1}^a N-$, $R_k^a R_{k+1}^a NC(=O)-$, $R_k^a R_{k+1}^a NSO_2-$, де R_k^a і R_{k+1}^a незалежно один від одного представляють собою «замісники аміно групи», значення яких визначено в даному розділі, 50 наприклад, атом водню, алкіл, арил, аралкіл, гетероаралкіл, гетероцикліл або гетероарил, або R_k^a і R_{k+1}^a разом з атомом N, з яким вони пов'язані, утворюють через R_k^a і R_{k+1}^a 4-7 членний гетероцикліл або гетероцикленіл. Переважними алکیلними групами є метил, трифторметил, циклопропілметил, циклопентілметил, етил, н-пропіл, ізо-пропіл, н-бутил, трет-бутил, н-пентил, 3-пентил, метоксіетил, карбоксиметил, метоксикарбонілметил, бензілоксикарбонілметил і 55

піридилметилоксикарбоніл-метил. Переважними алкінільними групами є етиніл, пропініл, н-бутиніл, ізо-бутиніл, 3-метилбутен-2-ініл, н-пентиніл, бута-1,3-диін і гекса-1,3,5-триін.

«Гідрат» означає стехіометричну або нестехіометричну композицію сполуки або її солі з водою.

5 «Лікарське начало» (лікарська субстанція, лікарська речовина, drug-substance) означає фізіологічно активну речовину синтетичного або іншого (біотехнологічного, рослинного, тваринного, мікробного та іншого) походження, що володіє фармакологічною активністю і що є активним началом фармацевтичної композиції, використаної для виробництва та виготовлення лікарського препарату (засобу).

10 «Лікарський засіб (препарат)» - речовина (або суміш речовин у вигляді фармацевтичної композиції), у вигляді таблеток, капсул, ін'єкцій, мазей та ін. готових форм, призначена для відновлення, виправлення або зміни фізіологічних функцій у людини і тварин, а також для лікування та профілактики хвороб, діагностики, анестезії, контрацепції, косметології та іншого.

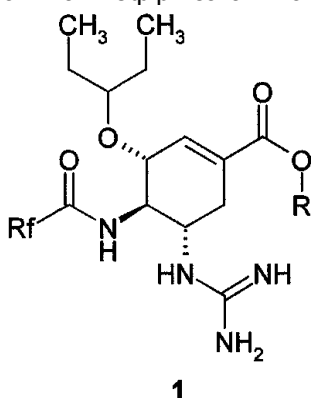
15 Нейрамінідаза (сіалідаза, ацилнейрамініл гідролаза та ЄС 3.2.1.18) є звичайним для тварин і ряду мікроорганізмів ферментом. Вона являє собою глікогідролазу, яка відщеплює альфакетосідикально пов'язані сіалові кислоти від глікопротеїнів, гліколіпідів і олігосахаридів. Багато з мікроорганізмів, що містять нейрамінідазу, патогенні по відношенню до людини і інших тварин, включаючи птицю, коней, свиней і тюленів. Такі патогенні організми включають вірус грипу. Нейрамінідаза пов'язана з патогенністю вірусу грипу. Імовірно вона сприяє елююванню знову синтезованих віріонів з інфікованих клітин і руху вірусу (завдяки її гідролазній активності) через слиз респіраторного тракту.

20 «Фармацевтична композиція» означає композицію, що включає в себе сполуку формули 1 і, принаймні, один з компонентів, обраних з групи, що складається з фармацевтично придатних і фармакологічно сумісних наповнювачів, розчинників, розріджувачів, носіїв, допоміжних, розподільчих і сприймаючих засобів, засобів доставки, таких як консерванти, стабілізатори, наповнювачі, подрібнювачі, зволожувачі, емульгатори, суспендуючі агенти, загусники, підсолоджувачі, віддушки, ароматизатори, антибактеріальні агенти, фунгіциди, лубриканти, регулятори пролонгованої доставки, вибір і співвідношення яких залежить від природи і способу призначення і дозування. Прикладами суспендуючих агентів є етоксильований ізостеариловий спирт, поліоксиетилен, сорбітол і сорбітовий ефір, мікрокристалічна целюлоза, метатігроксид алюмінію, бентоніт, агар-агар і трагакант, а також суміші цих речовин. Захист від дії мікроорганізмів може бути забезпечений за допомогою різноманітних антибактеріальних і протигрибкових агентів, наприклад, таких як, парабени, хлорбутанол, сорбінова кислота та подібні їм сполуки. Композиція може включати також ізотонічні агенти, наприклад, цукр, хлористий натрій і їм подібні. Пролонгована дія композиції може бути забезпечена за допомогою агентів, які уповільнюють абсорбцію активного начала, наприклад, моностеарат алюмінію і желатин. Прикладами підходящих носіїв, розчинників, розріджувачів і засобів доставки є вода, етанол, поліспирти, а також їх суміші, рослинні олії (такі, як оливкова олія) і ін'єкційні органічні складні ефіри (такі, як етилолеат). Прикладами наповнювачів є лактоза, молочний цукор, цитрат натрію, карбонат кальцію, фосфат кальцію і їм подібні. Прикладами подрібнювачів і розподільчих засобів є крохмаль, алгінова кислота і її солі, силікати. Прикладами лубрикантів є стеарат магнію, лаурилсульфат натрію, тальк, а також поліетиленгліколь з високою молекулярною вагою. Фармацевтична композиція для перорального, сублінгвального, трансдермального, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, підшкірного, місцевого або ректального введення активного начала, одного або в комбінації з іншим активним початком, може бути введена тваринам і людям в стандартній формі введення, у вигляді суміші з традиційними фармацевтичними носіями. Придатні стандартні форми введення включають пероральні форми, такі як таблетки, желатинові капсули, пігулки, порошки, гранули, жувальні гумки і пероральні розчини або суспензії, сублінгвальні і трансбукальні форми введення, аерозолі, імпланти, місцеві, трансдермальні, підшкірні, внутрішньом'язові, внутрішньовенні, інтраназальні або внутрішньоочні форми введення і ректальні форми введення.

50 «Фармацевтично прийнятна сіль» означає відносно нетоксичні органічні та неорганічні солі кислот і основ, заявлених в даному винаході. Ці солі можуть бути отримані in situ в процесі синтезу, виділення або очистки сполук або приготовлені спеціально. Зокрема, солі основ можуть бути отримані спеціально, виходячи з очищеної вільної основи заявленої сполуки і підходящої органічної або неорганічної кислоти. Прикладами отриманих таким чином солей є гідрохлориди, гідроброміди, сульфати, бісульфати, фосфати, нітрати, ацетати, оксалати, валеріати, олеати, пальмітати, стеарати, лаурати, борати, бензоати, лактати, тозілати, цитрати, малеати, фумарати, сукцинати, тартрати, мезілати, малонати, саліцилати, пропіонати,

етансульфонати, бензолсульфонати, сульфамати і їм подібні (Детальний опис властивостей таких солей дано в Berge SM, et al., "Pharmaceutical Salts" J. Pharm. Sci. 1977, 66: 1-19). Солі заявлених кислот також можуть бути спеціально отримані реакцією очищеної кислоти з підходящою основою, при цьому можуть бути синтезовані солі металів і амінів. До металевих відносяться солі натрію, калію, кальцію, барію, цинку, магнію, літію та алюмінію, найбільш бажаними з яких є солі натрію і калію. Підходящими неорганічними основами, з яких можуть бути отримані солі металів, є гідроксид, карбонат, бікарбонат і гідрид натрію, гідроксид і бікарбонат калію, поташ, гідроксид літію, гідроксид кальцію, гідроксид магнію, гідроксид цинку. В якості органічних основ, з яких можуть бути отримані солі заявлених кислот, обрані аміни та амінокислоти, які мають достатню основність, щоб утворити стійку сіль, і придатні для використання в медичних цілях (зокрема, вони повинні володіти низькою токсичністю). До таких амінів відносяться аміак, метиламін, диметиламін, триметиламін, етиламін, диетиламін, триетиламін, бензиламін, дібензиламін, дициклогексиламін, піперазин, етилпіперидин, трис(гідроксиметил)амінометан і подібні їм. Крім того, для солеутворення можуть бути використані гідрооксиди тетраалкіламонію, наприклад, такі як, холін, тетраметиламоній, тетраетиламоній і їм подібні. В якості амінокислот можуть бути використані основні амінокислоти - лізин, орнітин і аргінін.

Автори виявили нові інгібітори нейрамінідази, що представляють собою невідомі раніше фторзамісні (3R,4R,5S)-4-ациламіно-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонові кислоти та їх ефіри загальної формули 1 і їх фармацевтично прийнятні солі та/або гідрати.



де R являє собою водень, необов'язково заміщений C₁-C₅алкіл, C₂-C₅алкеніл або C₂-C₅алкініл; R_f являє собою CH₂F або CHF₂ радикал.

Нові сполуки загальної формули 1, як встановили автори, несподівано опинилися в 5-259 разів ефективнішими інгібіторами нейрамінідази інших штамів вірусів грипу, ніж відомий озельтамівір карбоксилат A2 (Табл. 1).

Таблиця 1

Антинейрамінідазна активність (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-фторацетиламіно-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонова кислота 1.1 і озельтамівір карбоксилату A2 на панелі штамів вірусів грипу

Вірус	№ інгібітора		IC ^{A2} ₅₀ / IC ^{1.1} ₅₀
	A2	1.1	
	IC ₅₀ , nM (кількість експериментів)		
A/Каліфорнія /07/09 (H1N1)	0,86±0,42 (8)	0,18 ±0,08 (6)	5
A/Курка/Ростов на Дону /35/07/ (H5N1)	1,78±0,09 (2)	0,20±0,00 (2)	9
A/Перт/261/2009 (H1N1 pdm09; 275Y)	360±87 (4)	1,39±0,38 (4)	259
B/Brisbane/60/2008	25,42±0,51 (2)	1,27±0,14 (2)	20
B/Перт/211/2001 (197D)	39,24±2,44 (4)	2,08±0,71 (4)	19
B/Перт/211/2001 (197E)	230,2±62.6 (4)	6.65±0.90 (4)	35

Нові сполуки загальної формули 1, як встановили автори, виявилися більш ефективними інгібіторами нейрамінідази вірусів грипу, ніж відомий Zanamivir (Zan) (Табл. 2).

Таблиця 2

Антинейрамінідазна активність (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-фторацетиламіно-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонова кислота 1.1 і Zanamivir (Zan) на панелі штамів відповідних вірусів грипу

Вірус	Інгібітор		IC ₅₀ ^{Zan} / IC ₅₀ ^{1.1}
	Zan	1.1	
	IC ₅₀ , nM (кількість експериментів)		
A/Каліфорнія /07/09 (H1N1)	0,26±0,32 (6)	0,18±0,08 (6)	1.4
A/Аічи/2/69 (H3N2)	0,60±0,45 (6)	0,69±0,19 (6)	0.9
A/Курка/Ростов на Дону /35/07/ (H5N1)	0,59±0,07 (2)	0,20±0,00 (2)	3
A/Перт/265/2009 (H1N1; 275H)	0,46±0,07 (4)	0,07±0,05 (4)	6.6
B/Brisbane/60/2008	1,87±0,02 (2)	1,27±0,14 (2)	1.4
B/Перт/211/2001 (197D)	3,67±0,20 (4)	2,08±0,71 (4)	1.8
B/Перт/211/2001 (197E)	21.98±5.88 (4)	6.65±0.90 (4)	3.2

І, нарешті, автори встановили, що нові сполуки більш ефективні в культурі клітин MDCK щодо штамів вірусу грипу Іа / California / 07/09 (H1N1) і високопатогенного штаму Іа / duck / MN /1525/81 (H5N1) в порівнянні з Озельтамівіром карбоксилатом і Zanamivir (Tabl. 3). Зокрема (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-фторацетиламіно-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонова кислота 1.1 щодо штаму Іа / California / 07/09 (H1N1) в 13 разів активніше Озельтамівіру карбоксилату (А2) і в 20 разів активніше Zanamivir (Zan), а щодо високопатогенного штаму Іа / duck / MN /1525/81 (H5N1) - в 24 рази активніше Озельтамівіру карбоксилату і в 16 разів активніше Zanamivir (Zan).

(3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-(2-трифторацетиламіно)-3-(пентан-3-ілокси)-циклогексен-1-карбонова кислота А4 показала нейрамінідазну активність по відношенню до вірусу А / Каліфорнія /04/09 $IK_{50} = 80$ nM, а до вірусу А / Владивосток/16/09 А4 $IK_{50} > 1000$ nM. Невідома раніше (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-фторацетиламіно-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонова кислота 1.1 має нейрамінідазну активність по відношенню до вірусу А / Каліфорнія / 04/09 в 400 разів більше, ніж А4, а по відношенню до вірусу А / Владивосток /16/09 - нова кислота 1.1 має $IK_{50} = 4$ nM, тобто в 250 разів активніше свого відомого 4-(2-трифторацетильного) аналога. Більш високу нейрамінідазну активність, ніж аналог А4 має і (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-дифторацетиламіно-3-(пентан-3-ілокси) циклогексен-1-карбонова кислота 1.4: по відношенню до вірусу А/Каліфорнія/04/09, відповідну $IK_{50} = 0,3$ nM (тобто в 2,7 рази активніше А2 і в 267 разів активніше А4); по відношенню до вірусу А / Владивосток /16/09 - нова кислота 1.4 має $IK_{50} = 7$ nM (тобто в 118 рази активніше А2 і більш ніж в 140 разів активніше А4).

Таблиця 3

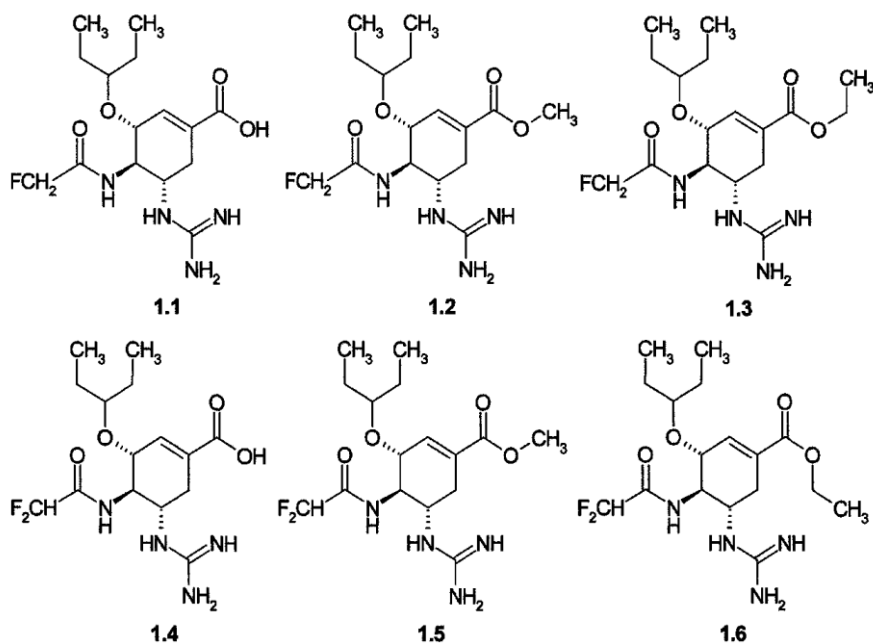
Специфічна активність (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-фторацетиламіно-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонова кислота (1.1) в культурі клітин MDCK щодо штамів вірусу грипу Іа / California / 07/09 (H1N1) і високопатогенного штаму Іа / duck / MN /1525/81 (H5N1) в порівнянні з озельтамівіром карбоксилатом (А2) і Занамівіром (Zan)

Препарат	Штам вірусу грипу			
	H1N1 Іа/California/07/09		H5N1 Іа/duck/MN/1525/81	
	Активність,			
	IC ₅₀ , μM	IC ₅₀ /IC ^{1.1} ₅₀	IC ₆₀ , μM	IC ^{Zan} ₅₀ / IC ^{1.1} ₅₀
A2	9,9	16,3	77,5	24,2
Zan	16,0	20,5	51,2	16,0
1.1	0.78		3.2	

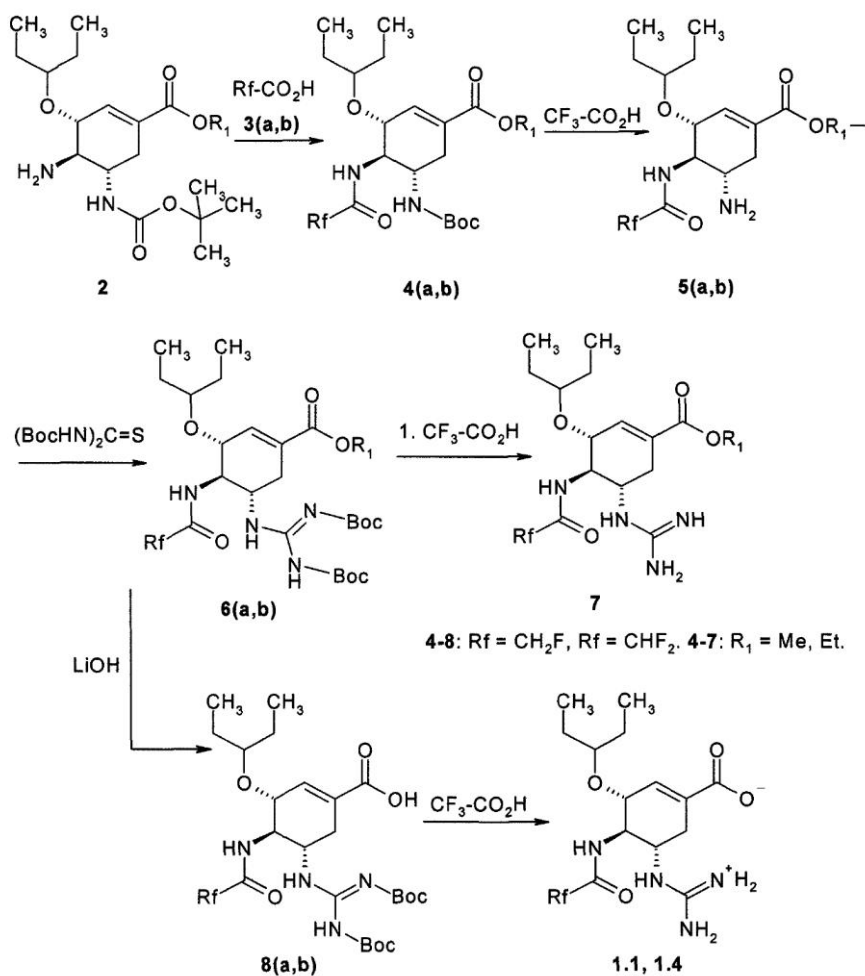
Згідно з винаходом переважними є сполуки загальної формули 1, в яких R являє собою водень, метил або етил.

Згідно з винаходом більш переважними сполуками загальної формули 1 є: (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-фторацетиламіно-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонова кислота 1.1, її метиловий ефір 1.2 і етиловий 1.3 ефір, (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-дифторацетиламіно-3-

(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонова кислота 1.4, її метиловий ефір 1.5 і етиловий 1.6 ефір.



Інгібітори нейрамінідази вірусів грипу загальної формули 1 отримують, виходячи з алкіл 4-аміно-5-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-(пентан-3-ілокси) циклогексен-1-карбоксилата загальної формули 2 за нижченаведеною схемою.



Нові інгібітори нейрамінідази вірусів грипу, що представляють собою невідомі раніше (3R,4R,5S)-4-(2-фторацетиламіно)- і (3R,4R,5S)-4-(2,2-діфторацетиламіно)-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси) циклогексен-1-карбонові кислоти та їх ефіри загальної формули 1 і їх фармацевтично прийнятні солі проявили також високу протигрипозну активність на тваринних моделях грипозної пневмонії.

Антинеірамінідазну активність сполук визначали за методом, описаним в [Who Collaborating Centre for Reference & Research on Influenza, Australia, Standard Operating Procedure WHO - 025. Reviewed by: Aeron Hurt, Senior Scientist Review Date: 13/3/2009].

Згідно з винаходом нові сполуки загальної формули 1 являють собою лікарське начало для приготування фармацевтичної композиції і готових лікарських форм для профілактики та лікування грипу у теплокровних тварин і людей.

Предметом даного винаходу є фармацевтична композиція, що включає в якості лікарського начала сполуки загальної формули 1 або їх фармацевтично прийнятні солі в терапевтично ефективній кількості.

Фармацевтичні композиції можуть включати фармацевтично прийнятні ексципієнти. Під фармацевтично прийнятними ексципієнтами розуміють застосовувані в сфері фармацевтики розріджувачі, допоміжні агенти та/або носії. Фармацевтична композиція поряд із сполукою загальної формули 1 або їх фармацевтично прийнятною сіллю і/або гідратом даного винаходу може включати й інші активні субстанції, у тому числі, що володіють протигрипозною активністю, за умови, що вони не викликають небажаних ефектів.

При необхідності використання фармацевтичної композиції даного винаходу в клінічній практиці вона може змішуватися з традиційними фармацевтичними носіями.

Носії, використовувані в фармацевтичних композиціях даного винаходу, являють собою носії, які застосовуються у сфері фармацевтики для отримання поширених форм, в тому числі: в пероральних формах використовуються зв'язувальні речовини, змащувальні агенти, дезінтегратори, розчинники, розріджувачі, стабілізатори, суспендуючі агенти, безбарвні агенти, коригенти смаку; в формах для ін'єкцій використовуються антисептичні агенти, солюбілізатори, стабілізатори; в місцевих формах використовуються основи, розріджувачі, змащувальні агенти, антисептичні агенти.

Предметом даного винаходу є спосіб отримання фармацевтичної композиції змішуванням з інертним наповнювачем і/або розчинником, принаймні, одного лікарського начала (субстанції) загальної формули 1 або його фармацевтично прийнятної солі в терапевтично ефективній кількості.

Предметом даного винаходу є також лікарський засіб, що володіє протигрипозною активністю, у формі таблеток, капсул або ін'єкцій, поміщених у фармацевтично прийнятну упаковку, призначений для профілактики лікування грипу у людей і теплокровних тварин, який включає до свого складу протигрипозне лікарське начало (субстанцію) загальної формули 1 або фармацевтичну композицію, що включає нове лікарське начало загальної формули 1 в терапевтично ефективній кількості.

Предметом даного винаходу є також терапевтичні коктейлі для лікування грипу, що включають в якості одного з компонентів новий лікарський засіб або нову фармацевтичну композицію, що містять в якості активного компонента, принаймні, одну сполуку загальної формули 1 або її фармацевтично прийнятну сіль і/або гідрат.

Терапевтичний коктейль для лікування грипу, поряд з лікарським засобом за даним винаходом, може включати інші відомі препарати, призначені для лікування грипу, або препарати, що підсилюють імунну систему пацієнта.

У відповідності до даного винаходу спосіб профілактики і лікування грипу у тварин і людей полягає у введенні пацієнту нового лікарського засобу, нової фармацевтичної композиції або нового терапевтичного коктейлю.

Лікарські засоби можуть вводитися через інгалятор, перорально або парентерально (наприклад, внутрішньовенно, підшкірно, внутрішньочеревно або місцево). Клінічне дозування засобу загальної формули 1 у пацієнтів може коригуватися в залежності від терапевтичної ефективності та біодоступності активних інгредієнтів в організмі, швидкості їх обміну та виведення з організму, а також залежно від віку, статі та стадії захворювання пацієнта, при цьому добова доза у дорослих зазвичай становить 10 ~ 500 мг, переважно - 50 ~ 300 мг. Тому під час приготування з фармацевтичної композиції лікарського засобу даного винаходу у вигляді одиниць дозування необхідно враховувати вищезазначене ефективне дозування, при цьому кожна одиниця дозування препарату повинна містити 10 ~ 500 мг засобу загальної формули 1, переважно - 50 ~ 300 мг. Відповідно до вказівок лікаря або фармацевта дані препарати можуть

прийматися кілька разів протягом певних проміжків часу (переважно - від одного до шести разів).

Предметом даного винаходу є також спосіб інгібування активності нейрамінідази в природних умовах, в тому числі нейрамінідази грипу, що включає стадію контактування сполуки загальної формули 1 і нейрамінідази.

Даний винахід ілюструється, але не обмежується наступними прикладами.

Приклад 1. Отримання (3R,4R,5S)-етил 4-(2,2-дифторацетамідо)-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилату мезилату $1.6 \cdot \text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$. (3R,4R,5S)-етил 4-аміно-5-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилат (2 г, 0.0054 моль, 1 екв), 1Н-бензо [d] [1,2,3] триазол-1-ол (0.867 г, 0.0065 моль, 1.2 екв), N1-((етиліміно) метилен)-N2, N2-діметилетан-1,2-діамін гідрохлорид (1.239 г, 0.0065 моль, 1.2 екв) і діізопропілетил-амін (2.212 г, 0.0178 моль, 3.3 екв) розчиняють в 20 мл ТГФ і по краплях додають 2,2-дифтороцтову кислоту 3b (0.624 г, 0.0065 моль, 1.2 екв). Реакційну масу перемішують при кімнатній температурі протягом чотирьох годин. Потім розчинники відганяють у вакуумі, олію, що залишилася, розчиняють в етилацетаті, промивають 5% розчином NaHCO_3 , сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і сушать у вакуумі. Вихід (3R,4R,5S)-етил 5-(трет-бутоксикарбоніламіно)-4-(2,2-дифторацетамідо)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилата 4b становить 89% (2.15 г). LCMS (M + H): Знайдено 449; Обчислено 448.51. Отриманий продукт 4b (2.15 г, 0.0048 моль) розчиняють в 20 мл 10% розчину трифтороцтової кислоти в хлористому метилені і перемішують при кімнатній температурі протягом 12 годин. Потім розчинники відганяють у вакуумі, олію, що залишилася, розчиняють в етилацетаті, промивають 5% розчином NaHCO_3 , сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і сушать у вакуумі. Вихід продукту становить 96% (1.605 г). Додаткову очистку проводять методом колонкової хроматографії - елюент етилацетат / ТГФ або перекристалізацією з гексану. Отримують (3R,4R,5S)-етил 5-аміно-4-(2,2-дифторацетамідо)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилат 5b, який розчиняють в хлористому метилені і додають еквівалентну кількість метансульфонової кислоти. Через 10 хвилин розчинник відганяють, отриманий продукт промивають гексаном і сушать у вакуумі. Вихід мезилату $5b \cdot \text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ 90%. LCMS (M + H): Знайдено 349; Обчислено 348.39. 1Н ЯМР (DMSO-d_6), 400 МГц: 8.91 (д, J = 13,2 Гц, 1H), 7.83 (уш, 3H), 6.74 (с, 1H), 6.22 (т, J = 54 Гц, 1H), 4.31 (д, J = 8.4 Гц, 1H), 4.16 (к, J = 7,2 Гц, 2H), 3.45 (м, 1H), 3.15 (Д.Д., J1 = 11.2 Гц, J2 = 8,8 Гц, 1H), 2.59 (д.д., J1 = 18 Гц, J2 = 6 Гц, 1H), 2.38 (м, 1H), 2.31 (с, 3H), 1.66 (м, 1H), 1.57 (м, 1H), 1.47 (м, 1H), 1.39 (м, 1H), 1.22 (т, J = 7.6 Гц, 3H), 0.891 (т, J = 7.2 Гц, 3H), 0.842 (т, J = 7.2 Гц, 3H). (3R,4R,5S)-етил 5-аміно-4-(2,2-дифторацет-амідо)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилата 5b (1.6 г; 0.004598 моль; 1 екв) розчиняють в 16 мл ДМФА і охолоджують у крижаній бані. Потім додають триетиламін (2.57 г; 0.0253 моль; 5.5 екв), N,N'-ді-бос-тіомочевину (0.00505 моль; 1.35 г; 1.1 екв) і хлорид ртуті (II) (0.0055 моль; 1.49 г; 1.2 екв). Отриману суміш перемішують при охолодженні в крижаній бані протягом 1.5 годин. По закінченні реакції осад відфільтровують через селіт, ДМФА відганяють у вакуумі, отриману олію розчиняють в етилацетаті, промивають 5% розчином NaHCO_3 , сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і сушать у вакуумі. Отримують 1.82 г (67%) (3R,4R,5S)-етил 5-((2)-2,3-біс(трет-бутоксикарбоніл)гуанідино)-4-(2,2-дифторацетамідо)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилата 6b. LCMS (M + H): Знайдено 591; Обчислено 590.67. (3R,4R,5S)-етил 5-((Z)-2,3-біс(трет-бутоксикарбоніл)гуанідино)-4-(2,2-дифторацетамідо)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилат 6b (1.82 г; 0.00308 моль) розчиняють в 20 мл 10% розчину трифтороцтової кислоти у хлористому метилені і перемішують при кімнатній температурі протягом 12 годин. Потім розчинники відганяють у вакуумі, олію, що залишилася, розчиняють в етилацетаті, промивають 5% розчином NaHCO_3 , сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і сушать у вакуумі. Отримують 1.1 г (92%) (3R,4R,5S)-етил 4-(2,2-дифторацет-амідо)-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилата 1.6. Отриманий продукт розчиняють у хлористому метилені і додають еквівалентну кількість метансульфонової кислоти. Через 10 хвилин розчинник відганяють, отриманий продукт промивають гексаном і сушать у вакуумі. Отримують (3R,4R,5S)-етил 4-(2,2-дифторацетамідо)-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилату мезилату $1.6 \cdot \text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$, вихід 95%. LCMS (M + H): Знайдено 391; Обчислено 390.43. 1Н ЯМР (DMSO-d_6), 400 МГц: 8.67 (д, J = 8,4 Гц, 1H), 7.63 (д, J = 9.6 Гц, 1H), 6.65 (с, 1H), 6.27 (т, J = 53.6 Гц, 1H), 4.14 (к, J = 7,2 Гц, 2H), 4.12 (м, 7H), 3.54 (м, 1H), 3.41 (м, 1H), 2.6 (м, 1H), 2.36 (с, 3H), 1.66 (м, 1H), 1.44 (м, 4H), 1.22 (т, J = 7.2 Гц, 3H), 0.856 (т, J = 7.6 Гц, 3H), 0.795 (т, J = 7.6 Гц, 3H).

Використовуючи як вихідну сполуку 2 (3R,4R,5S)-аліл-4-аміно-5-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилаті (3R,4R,5S)-проп-2-ініл-4-аміно-5-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилат аналогічно отримували аліловий ефір (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-(2,2-дифторацетамідо)-3-(пентан-3-

ілокси)циклогексен-1-карбонової кислоти 1.7 (LCMS (M + H): знайдено 354; обчислено 353.44, по відношенню до вірусу A / Каліфорнія / 04/09 $IK_{50} < 1$ nM) і проп-2-ініловий ефір (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-(2,2-дифторацетамідо)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонової кислоти 1.8 (LCMS (M + H): знайдено 352; обчислено 351.42, по відношенню до вірусу A / Каліфорнія / 04/09 $IK_{50} < 1$ nM).

Використовуючи як вихідну сполуку відповідний (3R,4R,5S)-4-аміно-5-(трет-бутоксикарбоніламин)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилат2 отримували:

2-циклогексилетиловий ефір (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-(2,2-дифторацетамідо)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонової кислоти 1.9 (LCMS (M + H): знайдено 460; обчислено 459.55, по відношенню до вірусу A / Каліфорнія / 04/09 $IK_{50} < 1$ nM);

2-фенілетиловий ефір (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-(2,2-дифторацетамідо)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонової кислоти 1.10 (LCMS (M + H): знайдено 454; обчислено 453.51, по відношенню до вірусу A / Каліфорнія / 04/09 $IK_{50} < 1$ nM);

2-піридин-3-ілетиловий ефір (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-(2,2-дифторацетамідо)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонової кислоти 1.11 (LCMS (M + H): знайдено 455; обчислено 454.49, по відношенню до вірусу A / Каліфорнія / 04/09 $IK_{50} < 1$ nM);

2-метоксиетиловий ефір (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-(2,2-дифторацетамідо)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонової кислоти 1.12 (LCMS (M + H): знайдено 422; обчислено 421.46, по відношенню до вірусу A / Каліфорнія / 04/09 $IK_{50} < 1$ nM).

Приклад 2. (3R,4R,5S)-етил 4-(2-фторацетамідо)-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилата мезілат $1.3 \cdot CH_3SO_3H$ отримують за методикою, наведеною в прикладі 1 з використанням монофтороцтової кислоти як ацилюючого агента. LCMS (M + H): Знайдено 373; Обчислено 372.44.

Приклад 3. (3R,4R,5S)-4-(2,2-дифторацетамідо)-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонова кислота 1.4. До розчину 250 мг (3R,4R,5S)-етил 5-((2,2,3-біс(трет-бутоксикарбоніл)гуанідино)-4-(2,2-дифторацетамідо)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилата 6b в 5 мл діоксану додають 2,5 мл 5% розчину гідроксиду літію і перемішують реакційну масу при кімнатній температурі протягом 45 хвилин. Потім гідроксид літію пасивують додаючи 300 мкл оцтової кислоти, розчинники відганяють у вакуумі. Отриманий осад екстрагують ізопропіловим спиртом, екстракт сушать над Na_2SO_4 і в вакуумі. Отримують 200 мг (84%) (3R,4R,5S)-5-((Z)-2,3-біс(трет-бутоксикарбоніл)гуанідино)-4-(2,2-дифторацетамідо)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксильної кислоти 8b. LCMS (M + H): Знайдено 563; Обчислено 562.62. Розчиняють 200 мг отриманої кислоти 8b в 2 мл 10% розчину трифтороцтової кислоти у хлористому метилені і перемішують при кімнатній температурі протягом 12 годин. Потім розчинники відганяють у вакуумі. (3R,4R,5S)-4-(2,2-дифторацетамідо)-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонову кислоту 1.4 виділяють методом HPLC. LCMS (M + H): Знайдено 363; Обчислено 362.28. 1H ЯМР (DMSO- d_6), 400 МГц: 8.68 (д, J = 8,4 Гц, 1H), 7.6д (д, J = 10 Гц, 1H), 7.26 (уш, 2H), 6.91 (уш, 2H), 6.63 (с, 1H), 6.27 (т, J = 53.6 Гц, 1H), 4.18 (д, J = 8 Гц, 2H), 4.09 (м, 1H), 3.54 (к, J = 10 Гц, 1H), 3.39 (м, 2H), 2.57 (д, J = 18 Гц, J2 = 6 Гц, 1H), 2.31 (м, 1H), 1.44 (м, 4H), 0.85 (т, J = 8 Гц, 3H), 0.795 (т, J = 7.6 Гц, 3H).

Приклад 4. (3R,4R,5S)-4-(2-фторацетамідо)-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонову кислоту 1.1 отримують аналогічно прикладу 3. LCMS (M + H): Знайдено 345; Обчислено 345. 1H ЯМР (DMSO- d_6), 400 МГц: 8.16 (д, J = 10 Гц, 1H), 7.56 (д, J = 9.6 Гц, 1H), 6.64 (с, 1H), 4.80 (д, J = 47.3 Гц, 2H), 4.21 (д, J = 8,4 Гц, 1H), 3.89 (к, J = 10.4 Гц, 1H), 3.71 (м, 1H), 2.67 (м, 1H), 2.25 (м, 1H), 1.42 (м, 4H), 0.85 (т, J = 7.2 Гц, 3H), 0.78 (т, J = 7.2 Гц, 3H).

Приклад 5. (3R,4R,5S)-метил 4-(2-фторацетамідо)-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилата мезілат $1.2 \cdot CH_3SO_3H$ був отриманий за методикою, наведеною в прикладі 1 з використанням як вихідного (3R,4R,5S)-метил 4-аміно-5-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилата і монофтороцтової кислоти як ацилюючого агента. LCMS (M + H): Знайдено 359; Обчислено 358.42.

Приклад 6. (3R,4R,5S)-метил 4-(2,2-дифторацетамідо)-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилата мезілат $1.5 \cdot CH_3SO_3H$ був отриманий за методикою, наведеною в прикладі 1 з використанням як вихідного (3R,4R,5S)-метил 4-аміно-5-(трет-бутоксикарбоніламіно)-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбоксилата і діфтороцтової кислоти як ацилюючого агента. LCMS (M + H): Знайдено 373; Обчислено 372.44.

Приклад 7. Отримання фармацевтичної композиції у формі таблеток. Змішують 1600 мг крохмалю, 1600 мг подрібненої лактози, 400 мг тальку і 1000 мг (3R,4R,5S)-4-(2-фторацетамідо)-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонової кислоти 1.1. Отриманий брусок подрібнюють в гранули і просівають через сита, збираючи гранули розміром 14-16 меш. Отримані гранули таблетують в підходящу форму таблетки вагою 560 мг кожна.

Приклад 8. Отримання фармацевтичної композиції у формі капсул. Ретельно змішують (3R,4R,5S)-4-(2-фторацетамідо)-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонової кислоти 1.1 із порошком лактози в співвідношенні 2:1. Отриману порошкоподібну суміш упаковують по 300 мг в желатинові капсули відповідного розміру.

Приклад 9. Отримання фармацевтичної композиції для внутрішньом'язових, внутрішньочеревних або підшкірних ін'єкцій. Змішують 500 мг (3R,4R,5S)-4-(2-фторацетамідо)-5-гуанідино-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонової кислоти 1.1 із 300 мг хлорбутанолу, 2 мл пропіленгліколя і 100 мл ін'єкційної води. Отриманий розчин фільтрують і поміщають по 1 мл в ампули, які запаюють.

Приклад 10. Визначення активності сполук загальної формули 1 по відношенню до нейрамінідази вірусів грипу. В попередніх експериментах були визначені робочі розведення для штамів алантоїсних вірусів грипу A / California / 07/09 (H1N1) і A / Аічи / 2/69 (H3N2), а також для отриманого в культурі клітин озельтамівір-резистентного вірусу грипу A / Владивосток /16/09 (H1N1). Для цього було приготовано по 60 мкл кожного дворазово розведеного вірусу на реакційній буферній суміші (РБС, 50 мМ MES, 5 мМ CaCl₂, pH 6,5) в 96-лунковому планшеті з круглим дном. З цього планшета по 50 мкл дворазово розведеного вірусу було перенесено в 96-лункові планшети з плоским дном для виміру флуоресценції (FluoroNunc, чорні, кат. No. 237105), далі до них був доданий рівний обсяг субстратного буфера (СБ, 12,5 мМ 2'-(4-метилумбеліферіл)- α -DN-ацетилнейрамінової кислоти, Sigma, на 40 мМ ацетатного буфера pH = 5,8). Як контроль були використані лунки, до яких замість вірусу було додано по 50 мкл РБС. Після інкубації планшета при 37° протягом 1 години при слабкому погойдуванні до кожної лунки планшета було додано по 100 мкл стоп-розчину (2.225mL 0.824M NaOH в 11.0mL етанолу), після чого було проведено вимірювання флуоресценції на приладі Varioskan Flach (Thermo Scientific) при λ_{ex} = 360 нм і λ_{em} = 448 нм. Для подальшої роботи були обрані ті розведення вірусів, які відповідали середині лінійної ділянки кривої залежності розведення вірусу від величини флуоресценції. Для визначення антинейрамінідазної активності сполук в 96-лункові планшети з плоским дном для виміру флуоресценції (FluoroNunc, чорні, кат. No. 237105) в лунки рядів від В до Н було додано по 50 мкл приготованих на РБС розведень сполук загальної формули 1 і аналогів формули А2 і формули А4 (концентрації 0,03; 0,3; 3; 30; 300; 3000; 30000 нм - кожна концентрація на ряд). В якості вірусного контролю були використані лунки ряду А, до яких було додано по 50 мкл РБС. Далі до відповідних лунок було додано 50 мкл обраних робочих розведень кожного з вірусів на РБС. Як контроль були використані лунки, до яких замість вірусу був доданий такий же обсяг РБС. Після перемішування і інкубації при кімнатній температурі протягом 45 хвилин до всіх лунок був доданий рівний обсяг СБ. Після перемішування і інкубації планшета при 37° протягом 1 години до кожної лунки планшета було додано по 100 мкл стоп-розчину. Вимірювання флуоресценції було проведено на приладі Varioskan Flach (Thermo Scientific) при λ_{ex} = 360 нм і λ_{em} = 448 нм. Всі визначення проводилися не менш ніж у двох повторях (дві лунки планшета). Відсоток інгібування нейрамінідазної активності досліджуваною речовиною загальної формули 1 визначали за формулою: відсоток інгібування = 100 (УЕФ досліду - УЕФ контролю / УЕФ вірусного контролю у відсутності сполук - УЕФ контролю). Концентрація препарату, яка зменшує значення величини УЕФ на 50%, приймалася за інгібуючу концентрацію 50 (ІК50).

Приклад 11. Вивчення протигрипозної активності сполук загальної формули 1 (1.1,1.3, 1.4 і 1.6) на моделі грипозної пневмонії мишей. Попередньо зважені миші (самки нелінійні, середня вага 12-15 г) інфікувалися інтраназально під легким ефірним наркозом вірусом грипу A / Аічи / 2/69 (H3N2) (10 ЛД₅₀ в 50 мкл). В попередньому досліді було проведено визначення ЛД₅₀ шляхом титрування алантоїсного вірусу на таких же мишах, які потім використовувалися в основному досліді. Була використана наступна схема лікування сполуками: за 24 години до інфікування, за 1 годину до інфікування, через 24 години і далі 1 раз на день протягом 5 днів. Для перорального введення використовували одноразовий інсуліновий шприц зі спеціальною голкою (лаваж), досліджувався ефект наступних доз: 25 мг/кг/день сполук в обсязі 100 мкл. Як препарат порівняння був використаний Таміфлю в дозах від 5 мг/кг/день до 30 мг/кг/день. У групі «вірусного контролю», в групах «лікованих сполуками» загальної формули 1 і Таміфлю формули А3 було по 10 мишей в кожній.

За лікованими і контрольними тваринами велося щоденне спостереження, в перші 5 днів після інфікування мишей зважували кожен день, далі - через день. Хіміотерапевтичну активність сполук на моделі грипозної пневмонії мишей оцінювали за показником захисту від смертельної вірусної інфекції, і зниженню ваги в групах тварин, лікованих препаратом, порівняно з контрольною групою. Зменшення або збільшення ваги розраховувалося окремо для кожної миші і виражалось у відсотках. При цьому за 100% приймалась вага тварини перед

інфікуванням. Для всіх мишей однієї групи визначалося середнє значення відсотка втрати або збільшення ваги.

В попередньому досліді визначають дозу вірусу, що містить 10 ЛД₅₀ в обсязі 100 мкл. Усіх тварин в досліді заражають цією дозою вірусу. Ефективність дії сполук загальної формули 1 на моделі грипозної пневмонії мишей оцінювалася за кількістю тварин, які вижили після інфікування вірусом, середньою тривалістю життя і зміною ваги інфікованих тварин.

Було встановлено, що на 7-й день спостереження всі миші, які були заражені вірусом і не пройшли лікування зазначеними сполуками (група «вірусного контролю»), загинули.

Проведені експерименти показали, що до останнього дня загибелі тварин з групи «вірусного контролю» лікування зазначеними сполуками загальної формули 1 і Таміфлю тварин з груп «лікуваних сполуками» дозволило запобігти їхній загибелі повністю.

Протигрипозна ефективність вивчених препаратів загальної формули 1 і Таміфлю формули А3 виражається в зниженні темпів втрати ваги в групах лікуваних мишей у порівнянні з групою «вірусного контролю». Втрата ваги тварини є однією з клінічних ознак прояву грипозної пневмонії. Більше зниження ваги тварини свідчить про більш важке протікання захворювання. Зважування мишей проводилося на 1, 2, 3, 4, 5 дні після інфікування, а далі через день до 15 дня спостереження. Було встановлено, що в групі вірусного контролю тварини найбільше втрачали вагу на 5 день після інфікування (близько 10%). На відміну від вірусного контролю в групах тварин, що проходять лікування усіма зазначеними сполуками загальної формули 1 і Таміфлю, в середньому не спостерігалася втрати ваги. Починаючи з 9 дня, всі тварини в групах «лікуваних сполуками» активно і стабільно набирали у вазі.

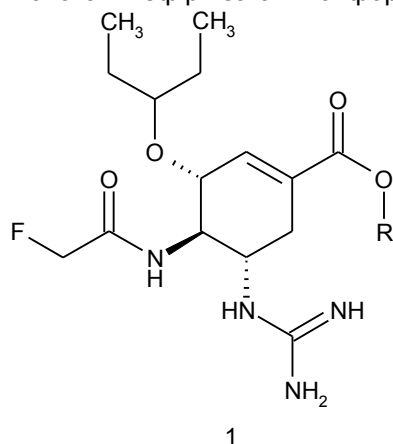
Таким чином, показана висока ефективність лікування грипозної пневмонії мишей сполуками формули 1.1, 1.3, 1.4 і 1.6.

Промислова придатність

Винахід може бути використано в медицині та ветеринарії.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-фторацетиламіно-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонова кислота і її ефіри загальної формули 1, і їх фармацевтично прийнятні солі:



де R являє собою водень, C₁-C₃алкіл.

2. Сполука за п. 1, що являє собою:

(3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-фторацетиламіно-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонову кислоту 1.1,

метильовий ефір (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-фторацетиламіно-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонової кислоти 1.2,

етильовий ефір (3R,4R,5S)-5-гуанідино-4-фторацетиламіно-3-(пентан-3-ілокси)циклогексен-1-карбонової кислоти 1.3.

3. Лікарське начало, яке має активність щодо нейрамінідази вірусу грипу, що являє собою сполуку за будь-яким з пунктів 1, 2.

4. Фармацевтична композиція, що має противірусну активність і призначена для лікування грипу і супутніх захворювань, викликаних вірусом грипу, що включає лікарське начало за п. 3 в терапевтично ефективній кількості.

5. Фармацевтична композиція за п. 4 у формі таблеток, капсул або ін'єкцій, поміщених у фармацевтично прийнятну упаковку.

6. Фармацевтична композиція за будь-яким з пунктів 4 або 5, для лікування пневмонії, зумовленої вірусом грипу, в ефективній кількості.
7. Спосіб інгібування активності нейрамінідази вірусу грипу для лікування пневмонії, що полягає в контактуванні нейрамінідази із сполукою за будь-яким з пунктів 1, 2.
- 5 8. Спосіб профілактики та лікування грипу і захворювань, обумовлених вірусом грипу, що полягає у введенні терапевтично ефективної кількості лікарського начала за п. 3 або фармацевтичної композиції за будь-яким з пунктів 4-6.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601