



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **110918**

(13) **C2**

(51) МПК

C07D 219/04 (2006.01)

C07D 221/16 (2006.01)

C07D 409/06 (2006.01)

A61K 31/473 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

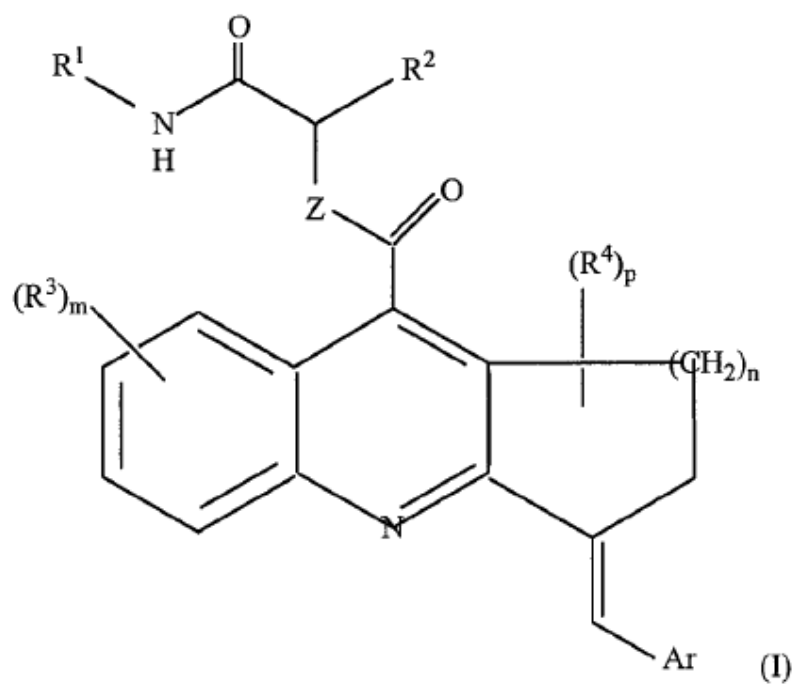
(21) Номер заявки:	а 2010 13424	(72) Винахідник(и):	Нехай Сергей (US), Ковальський Дмитро Борисович (UA)
(22) Дата подання заявки:	14.04.2009	(73) Власник(и):	ХОВАРД ЮНІВЕРСІТІ, 2400 Sixth Street NW, Suite 321, Washington, DC 20059, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.03.2016	(74) Представник:	Федорова Ірина Олександрівна, реєстр. №11
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/045,561	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 6593324 B2 (WURSTER et al.), 15.07.2003 US 7307083 B2 (ROSINI et al.), 11.12.2007 US 6831086 B1 (BERNHARDT), 14.12.2004 US 5175172 A (DIETLIN et al.), 29.12.1992 ROBERT E. LUTZ AND J. MILTON SANDERS: "Antimalarials. 11. 2-Vinylogs of substituted 2-aryl-4-quinoline amino alcohols", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 19, no. 3, 1976, pages 407-410
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	16.04.2008		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.02.2011, Бюл.№ 4		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.03.2016, Бюл.№ 5		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2009/040495, 14.04.2009		

(54) ІНГІБІТОРИ ПРОТЕЇНФОСФАТАЗИ-1 ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Було показано, що інгібітори протеїнфосфатази-1 уповільнюють реплікацію ВІЛ-1, Описуються інгібітори ПФ-1 і їх застосування в лікуванні або попередженні інфекцій ВІЛ-1.

UA 110918 C2



Перехресне посилання на споріднену заявку

Даний винахід претендує на пріоритет попередньої патентної заявки США № 61/045,561, поданої 16 квітня 2008 р., і включає її за посиланням у всій повноті.

Ця робота була частково підтримана грантом на наукове дослідження NIC UHI HL03679 від Національного інституту серця, легень і крові і частково грантом (RCMI-NIH 5G 12RR03048) від Національного центру науково-дослідної бази, що є складовою частиною NIC. Федеральний уряд може мати певні права на ці винаходи.

Даний винахід стосується інгібіторів протеїнфосфатази-1 (ПФ-1) і медичного застосування таких інгібіторів. Більш конкретно, тут пропонується клас сполук, які пригнічують ПФ-1. Також пропонуються методи застосування інгібіторів ПФ-1 для лікування інфекцій ВІЛ-1.

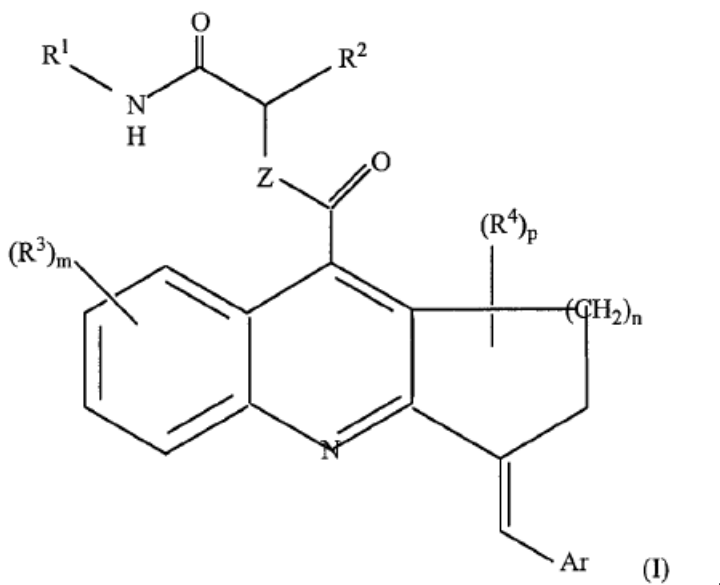
Рівень знань

Дослідження останнього часу показали, що протеїнфосфатаза-1 (ПФ-1) є необхідною для транскрипції ВІЛ-1 (Ammosova, et al., J. Biol. Chem. 280, 36,364-71 (2005)). Очевидно, Tat (транскрипційний фактор) ВІЛ-1 зв'язується з ПФ-1 через послідовність Q³⁵VCF³⁸ Tat і здійснює транслокацію до ядра інфікованої клітини. Висувалось припущення про те, що низькомолекулярний інгібітор зв'язування ПФ-1 з Tat ВІЛ-1 має пригнічувати транскрипцію ВІЛ-1. Це, в свою чергу, має забезпечити шлях до лікування суб'єктів, інфікованих ВІЛ-1.

Короткий опис винаходу

Пропонуються сполуки, які пригнічують транскрипцію ВІЛ-1. Не зв'язуючись будь-якою теорією, можна вважати, що такі сполуки пригнічують взаємодію між ПФ-1 і Tat ВІЛ-1, тим самим пригнічуючи транскрипцію ВІЛ-1. Було показано, що ці сполуки пригнічують транскрипцію ВІЛ-1 в живих клітинах. Отже, такі сполуки є корисними для лікування або попередження інфекцій ВІЛ-1.

Згідно з одним аспектом цього винаходу, пропонуються сполуки формули (I), де формула (I) має наступний вигляд:



де n - це 1 або 2;

Ar є фенолом або тіснілом і є факультативно заміщеним;

кожний R¹ є незалежно R⁶, C(O)R⁶, C(O)-OR⁶ або C(O)N(R⁶)₂;

R² є H або факультативно заміщеним алкілом C1-C6, або групою формули -C(O)NH-R¹;

R³ вибирається незалежно в кожному випадку з гало, NO₂, CN, R, OR, NR₂, S(O)_qR, COOR і CONR₂, де кожний R є незалежно H, алкілом C1-C4 або галоалкілом C1-C4;

m є 0-4;

R⁴ є R⁶, гало, =O, COOR⁶, CO N(R⁶)₂, S(O)_qR⁶, N(R⁶)₂ або OR⁶;

p є 0-2;

кожний q є незалежно 0-2;

Z є 0 або NR⁵;

R⁵ є R⁶ або C(O)R⁶; і

R⁶ вибирається незалежно в кожному випадку з H, алкілу C1-C6, арилу C5-C6 і алкілу (C5-C6-арил)-C1-C6, де кожний алкіл і арил є факультативно заміщеним; за умови, що n є 2, Z є 0 і Ar є представленим пара-галофенолом; або його фармацевтично прийнятна сіль.

Пропонуються фармацевтичні композиції, які включають щонайменше одну сполуку формули (I) та інші описані тут сполуки, змішані з фармацевтично прийнятною допоміжною

речовиною. Пропонується застосування сполук формули (I) та інших описаних тут сполук для виробництва лікарського препарату, зокрема лікарського препарату для лікування ВІЛ-інфікованих суб'єктів.

Згідно з іншим аспектом даного винаходу, пропонуються способи для лікування або попередження інфекції ВІЛ-1 шляхом введення суб'єкту, який того потребує, ефективної кількості сполуки формули (I) та інших описаних тут сполук. Ці способи передбачають різні шляхи введення сполуки формули (I) та інших описаних тут сполук, а також застосування сполуки формули (I) в комбінації з іншими терапевтичними агентами, що є ефективними в лікуванні або попередженні інфекцій ВІЛ-1.

Докладний опис винаходу

Як вони тут використовуються, терміни «алкіл», «алкеніл» і «алкініл» включають гідрокарбілові (нециклічні вуглеводневі залишки різного ступеня насиченості) радикали з лінійним ланцюгом, розгалуженим ланцюгом і циклічні одновалентні радикали, які містять тільки С і Н, коли вони є незаміщеними. Приклади включають метил, етил, ізобутил, циклогексил, циклопентилетил, 2-пропеніл, 3-бутиніл і т.п. Загальна кількість атомів вуглецю в кожній такій групі деколи зазначається тут. Наприклад, коли якась така група може містити до десяти атомів вуглецю, вона може бути представлена як 1-10 С або як C1-C10 або C1-10. Коли допускається заміна атомів вуглецю гетероатомами (типово, N, O і S), як в гетероалкільних групах, цифри, якими позначаються ці групи, як наприклад C1-C6, представляють суму кількості атомів вуглецю в даній групі плюс кількість тих гетероатомів, які включені як заміщення атомів вуглецю в кільце або ланцюг, що описується.

Типово, алкільні, алкенільні та алкінільні заміщення в даному винаході містять 1-10 С (алкіл) або 2-10 С (алкеніл або алкініл). Переважно вони містять 1-8 С (алкіл) або 2-8 (алкеніл або алкініл). Окрема група може включати більше ніж один тип многократного зв'язку або більше ніж один многократний зв'язок; такі групи є включеними в дефініцію терміну «алкеніл», коли вони містять щонайменше один подвійний зв'язок вуглець-вуглець, або в дефініцію терміну «алкініл», коли вони містять щонайменше один потрійний зв'язок вуглець-вуглець.

Алкільні, алкенільні та алкінільні групи часто заміщуються до такої міри, що таке заміщення вже має хімічне значення. Типові заміщення включають, не обмежуючись ними, гало, =O, =N-CN, =N-OR, =NR, OR, NR₂, SR, SO₂R, SO₂NR₂, NRSO₂R, NRCONR₂, NRCOOR, NRCOR, CN, COOR, CONR₂, OOCR, COR і NO₂, де кожний R є незалежно Н, алкіл C1-C8, гетероалкіл C2-C8, ацил C1-C8, гетероацил C2-C8, C2-C8 алкеніл, гетероалкеніл C2-C8, C2-C8 алкініл, гетероалкініл C2-C8, арил C6-C10 або гетероарил C5-C10 і кожний R є факультативно заміщеним на гало, =O, =N-CN, =N-OR', =NR', OR', NR'₂, SR', SO₂R', SO₂NR'₂, NR'¹SO₂R', NR'CONR'₂, NR'COOR', NR'COR', CN, COOR', CONR'₂, OOCR', COR' і NO₂, де кожний R' є незалежно Н, алкіл C1-C8, гетероалкіл C2-C8, ацил C1-C8, гетероацил C2-C8, арил C6-C10 або гетероарил C5-C10. Алкільні, алкенільні та алкінільні групи можуть також заміщуватись на ацил C1-C8, гетероарил C2-C8, арил C6-C10 або гетероарил C5-C10, кожний з яких може заміщуватись заміщеннями, що є відповідними для даної конкретної групи.

«Гетероалкіл», «гетероалкеніл» і «гетероалкініл» і т.п. визначаються подібно до відповідних гідрокарбильних (алкільних, алкенільних і алкінільних) груп, але терміни «гетеро» стосуються груп, які містять 1-30 гетероатомів S або N або їх комбінацій в каркасному залишку; отже, щонайменше один атом вуглецю відповідної алкільної, алкенільної або алкінільної групи заміщується одним з вказаних гетероатомів для утворення гетероалкільної, гетероалкенільної або гетероалкінільної групи. Типові і переважні розміри для гетероатомів алкільних, алкенільних і алкінільних груп є загалом такими ж, як описані вище для гідрокарбильних груп. З міркувань хімічної стабільності зрозуміло також, що, якщо не зазначається інше, такі групи не включають більше двох суміжних гетероатомів, крім випадку, коли на N або S присутня оксо-група, як в нітро або сульфонільній групі.

Хоча термін «алкіл», як він тут використовується, включає групи циклоалкіл і циклоалкілалкіл, термін «циклоалкіл» може використовуватись тут для позначення карбоциклічної неароматичної групи, що з'єднується з молекулою через алкільний лінкер. Подібно до цього, «гетероцикліл» може використовуватись тут для позначення неароматичної циклічної групи, яка містить щонайменше один гетероатом в якості кільцевого елементу і яка з'єднується з молекулою через кільцевий атом, яким може бути С або N. «Гетероциклілалкіл» може використовуватись тут для позначення такої групи, яка з'єднується з іншою молекулою через лінкер. Розміри і заміщення, що є придатними для циклоалкільної, циклоалкілалкільної, гетероциклільної і гетероциклілалкільної груп, є такими ж, як описані вище для алкільних груп. Як вони тут використовуються, ці терміни включають також кільця, які містять один подвійний зв'язок або два, якщо дане кільце не є ароматичним.

Як він тут використовується, термін «ацил» охоплює групи, що містять алкільний, алкенільний, алкінільний, арильний або арилалкільний радикал, приєднаний в одній з двох наявних валентних позицій карбонільного атому вуглецю, іншому ніж карбонільний вуглець, заміщений гетероатомом, вибраним з N, O і S. Відповідно, гетероацил включає, наприклад, -

5 $C(=O)OR$ і $C(=O)NR_2$, а також $-C(=O)-$ гетероарил.

Ацильна і гетероацильна групи зв'язуються з будь-якою групою або молекулою, до якої вони приєднуються, через відкриту валентність карбонільного атому вуглецю. Типово, вони є ацильними групами C1-C8, які включають формил, ацетил, півалоїл і бензоїл, і гетероацильними групами, які включають метоксикарбоніл і 4-піридиноїл.

10 Гідрокарбильні групи, арильні групи і гетероформи таких груп, які містять ацильну або гетероацильну групу, можуть бути заміщеними заміщеннями, описаними тут як загалом придатні заміщення для кожного відповідного компоненту ацильної або гетероацильної групи.

«Ароматична» складова або «арильна» складова стосується моноциклічної або зрощеної біциклічної складової, яка має добре відомі характеристики ароматичності; приклади включають феніл і нафтил. «Арил» може включати ароматичні кільцеві системи, що містять тільки вуглець, а також ароматичні кільцеві системи, що містять один або більше гетероатомів (O, N або S) в якості кільцевих елементів. Подібно до цього, визначення «гетероароматичний» і «гетероарильний» стосуються таких моноциклічних або зрощених біциклічних кільцевих систем, які в якості кільцевих елементів містять один або більше гетероатомів, вибраних з O, S і N.

20 Включення гетероатому забезпечує ароматичність в 5-членних кільцях, а також 6-членних кільцях. Типові гетероароматичні системи включають моноциклічні ароматичні групи C5-C6, такі як піридил, піримідил, піразиніл, тіоніл, фураніл, піроліл, піразоліл, тіазоліл, оксазоліл і імідазоліл, і зрощені біциклічні фрагменти, утворені зрощенням однієї з цих моноциклічних груп з фенільним кільцем або з будь-якою з гетероароматичних моноциклічних груп з утворенням біциклічної групи C8-C10, такої як індоліл, бензімідазоліл, індазоліл, бензотриазоліл, ізохіноліл, хіноліл, бензотіазоліл, бензофураніл, піразолопіридил, хіназолініл, хіноксалініл, цинозоліл і т.п.

25 В це визначення включається будь-яка моноциклічна або зрощена кільцева біциклічна система, що має характеристики ароматичності з точки зору розподілу електронів по кільцевій системі. Воно включає також біциклічні групи, де щонайменше кільце, що є безпосередньо приєднаним до решти молекули, має характеристики ароматичності. Типово, такі кільцеві системи містять 5-12 атомів в гетероциклі. Краще моноциклічні гетероарили містять 5-6 членні кільця, і біциклічні гетероарили містять 8-10 членні кільця.

Арильні і гетероарильні складові можуть заміщуватись різноманітними заміщеннями, включаючи алкіл C1-C8, алкеніл C2-C8, алкініл C2-C8, арил C5-C12, ацил C1-C8 та їх гетероатоми, кожний з яких може сам заміщуватись далі; інші заміщення для арильних і гетероарильних складових включають гало, OR, NR₂, SR, SO₂R, SO₂NR₂, NRSO₂R, NRCONR₂, NRCONR₂, NRCOR, CN, COOR, CONR₂, OOCR, COR і NO₂, де кожний R є незалежно H, алкілом C1-C8, гетероалкілом C2-C8, алкенілом C2-C8, гетероалкенілом C2-C8, алкінілом C2-C8, гетероалкінілом C2-C8, арилом C6-C10, гетероарилом C5-C10, арилалкілом C7-C12 або гетероарилалкілом C6-C12, і кожний R факультативно заміщується, як описано вище, на алкільні групи. Групи заміщення на арильній або гетероарильній групі можуть звичайно заміщуватись далі групами, описаними тут як придатні для кожного типу таких заміщень або для кожного компоненту такого заміщення. Так, наприклад, арилалкільне заміщення може бути заміщеним на арильній частині заміщеннями, описаними тут як типові для арильних груп, і воно може бути далі заміщеним на алкільній частині заміщеннями, описаними тут як типові або придатні для алкільних груп.

Подібно до цього, «арилалкіл» і «гетероарилалкіл» стосуються ароматичних і гетероароматичних кільцевих систем, які з'єднуються зі своєю точкою приєднання через зв'язувальну групу, таку як алкілен, включаючи заміщені або не заміщені, насичені або ненасичені, циклічні або ациклічні лінкери. Типово, такий лінкер є алкілом C1-C8 або його гетероформою. Ці лінкери можуть включати також карбонільну групу, що робить їх здатними на заміщення, як ацильна або гетероацильна складова. Арильне або гетероарильне кільце в арилалкільній або гетероарилалкільній групі може заміщуватись тими ж заміщеннями, які були описані тут для арильних груп. Переважно, арилалкільна група включає фенольне кільце, факультативно заміщене групами, визначеними вище для арильних груп, і алкілен C1-C4, що є незаміщеним або заміщується однією або двома алкільними групами C1-C4 або гетероалкільними групами, де ці алкільні або гетероалкільні групи можуть факультативно циклізуватись з утворенням кільця, такого як циклопропан, диоксолан або оксациклопентан.

50 Подібно до цього, гетероарилалкільна група переважно включає моноциклічну гетероарильну групу C5-C6, яка факультативно заміщується групами, описаними вище як заміщення, типові на

арильних групах, і алкілен C1-C4, що є незаміщеним або заміщується однією або двома алкільними групами C1-C4 або гетероалкільними групами, або вона включає факультативно заміщене фенольне кільце або моноциклічний гетероарил C5-C6 і гетероалкілен C1-C4, що є незаміщеним або заміщується однією або двома алкільними групами C1-C4 або гетероалкільними групами, де ці алкільні або гетероалкільні групи можуть факультативно циклізуватись з утворенням кільця, такого як циклопропан, диоксолан або оксациклопентан.

Коли арилалкільна або гетероарилалкільна група описується як факультативно заміщена, ці заміщення можуть бути на алкільній або гетероалкільній частині або на арильній або гетероарильній частині цієї групи. Заміщення, факультативно присутні на алкільній або гетероалкільній частині, є такими ж, як описані вище для алкільних груп загалом; заміщення, факультативно присутні на арильній або гетероарильній частині є такими ж, як описані вище для арильних груп загалом.

«Арилалкільні» групи, як цей термін тут використовується, є гідрокарбильними групами, коли вони не заміщені, і описуються загальною кількістю атомів вуглецю в кільці і алкіленовим або подібним лінкером. Так, бензолна група є C7-арилалкільною групою, а феніл етил є C8-арилалкілом.

«Гетероарилалкіл», як описано вище, стосується фрагменту, що містить арильну групу, приєднану через зв'язувальну групу, і відрізняється від арилалкілу тим, що принаймні один кільцевий атом арильної складової або один атом у зв'язувальній групі є гетероатомом, вибраним з N, O і S. Гетероарилалкільні групи описуються тут із зазначенням загальної кількості атомів у кільці і лінкері, і вони включають арильні групи, зв'язані через гетероалкільний лінкер; гетероарильні групи, зв'язані через гідрокарбильний лінкер, такий як алкілен; і гетероарильні групи, зв'язані через гетероалкільний лінкер. Так, наприклад, C7-гетероарилалкіл буде включати піридилметил, фенокси і N-піролілметокси.

«Алкілен», як цей термін тут використовується, стосується двохвалентної гідрокарбильної групи; оскільки вона є двохвалентною, то може зв'язувати до купи дві інші групи. Типово, алкілен стосується $-(CH_2)_n-$, де $n \in 1-8$, а переважно $n \in 1-4$, хоча, де це зазначається, він може заміщуватись також іншими групами і може бути іншої довжини, а відкриті валентності не обов'язково повинні бути на протилежних кінцях ланцюга. Отже, $-CH(Me)-$ і $-C(Me)_2-$ також можуть бути віднесені до алкіленів, як і циклічна група, така як циклопропан-1,1-діл. Коли алкіленова група є заміщеною, такі заміщення включають ті, що типово присутні на алкільних групах, як тут описано.

Загалом, будь-яка алкільна, алкенільна, алкінільна, ацильна, арильна або арилалкільна група або будь-яка гетероформа однієї з цих груп, що знаходиться в заміщенні, сама може бути факультативно заміщеною додатковими заміщеннями. Природа цих заміщень є подібною до тих, що були наведені у відношенні самих первинних заміщень, коли ці заміщення інакше не описуються. Отже, коли втіленням, наприклад, R7 є алкіл, то цей алкіл факультативно може заміщуватись рештою заміщень, перелічених як втілення для R7, де це має хімічний смисл і де це не підриває порогу розміру, передбаченого для самого алкілу. Наприклад, алкіл, заміщений алкілом або алкенілом, буде просто розширяти верхню межу атомів вуглецю для цих втілень і не включається в даний винахід. Однак алкіл, заміщений арилом, аміно, алкокси, $=O$ і т.п., буде включатись в об'єм цього винаходу, і атоми цих груп заміщення не враховуються в тій кількості атомів, яка використовується для позначення тієї алкільної, алкенільної і т.д. групи, що описується. Коли кількість заміщень не зазначається, кожна така алкільна, алкенільна, алкінільна, ацильна або арильна група може заміщуватись низкою заміщень у відповідності до наявних в ній валентностей; зокрема, будь-яка з цих груп може заміщуватись, наприклад, атомами фтору на будь-якій або всіх своїх наявних валентностях. В певних варіантах здійснення, де кількість заміщень не зазначається, ця кількість переважно становить 0-2.

«Гетероформа», як цей термін тут використовується, стосується похідного такої групи, як алкіл, арил або ацил, де щонайменше один атом вуглецю означеної карбоциклічної групи є заміщеним гетероатомом, вибраним з N, O і S. Отже, гетероформами алкілу, алкенілу, алкінілу, ацилу, арилу і арилалкілу є гетероалкіл, гетероалкеніл, гетероалкініл, гетероацил, гетероарил і гетероарилалкіл, відповідно. Зрозуміло, що звичайно не більше двох атомів N, O або S можуть бути з'єднаними послідовно, крім випадку, коли до N або S приєднана оксо група з утворенням нітро групи або сульфонільної групи.

«Факультативно заміщений», як цей термін тут використовується, вказує, що конкретна описувана група або групи можуть не мати не водневих заміщень або що ця група або групи можуть мати одне або більше не водневих заміщень. Коли інше не зазначається, загальна кількість таких заміщень, що можуть бути присутніми, дорівнює кількості атомів H, присутніх на незаміщеній формі описуваної групи. Коли факультативне заміщення є приєднаним через

подвійний зв'язок, такий як карбонільний кисень ($=O$), така група займає дві наявні валентності, так що загальна кількість можливих заміщень зменшується у відповідності до кількості наявних валентностей.

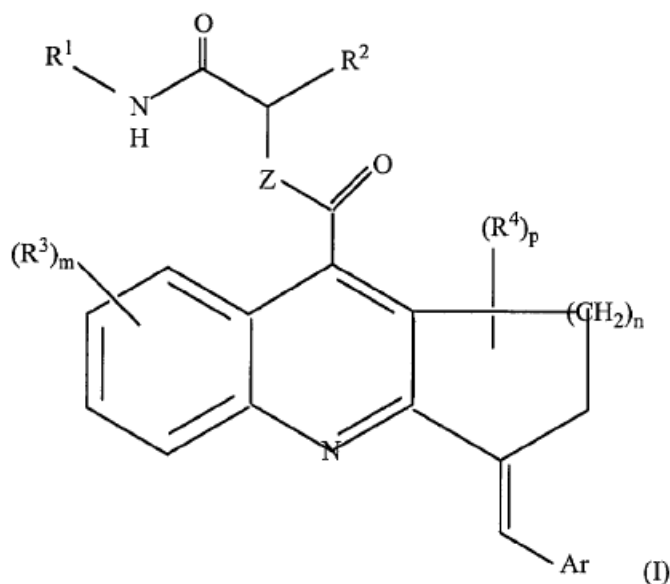
«Гало», як цей термін тут використовується, включає фторо, хлоро, бромо і йодо. Часто перевагу віддають фторо і хлоро.

«Галоалкіл», як цей термін тут використовується, включає алкільні групи, які мають одне або більше галогенових заміщень. Приклади включають трифторметил, 2,2,2-трифторетил, 2-хлоретил, 2-фторетил і т.п.

«Аміно», як цей термін тут використовується, стосується NH_2 , але, коли аміно описується як «заміщений» або «факультативно заміщений», цей термін включає $NR'R''$, де кожний R' і R'' є незалежно H або є алкільною, алкенільною, алкінільною, ацильною, арильною або арилалкільною групою або гетероатомом однієї з цих груп, а кожна з цих алкільної, алкенільної, алкінільної, ацильної, арильної або арилалкільної груп або гетероатомів однієї з цих груп факультативно заміщується заміщеннями, описаними тут як придатні для відповідної групи. Цей термін включає також форми, де R' і R'' є зв'язаними разом з утворенням 3-8-членного кільця, яке може бути насиченим, ненасиченим або ароматичним, яке містить 1-3 гетероатоми, незалежно вибрані з N, O і S, в якості кільцевих елементів і яке факультативно заміщується заміщеннями, описаними тут як придатні для алкільних груп, або, коли $NR'R''$ є ароматичною групою, або факультативно заміщується заміщеннями, описаними тут як типові для гетероарильних груп.

Коли можливими є ізомери, даний винахід включає кожний окремий ізомер, а також суміші ізомерів. В разі наявності хірального центру, даний винахід включає кожний окремий енантіомер в цьому хіральному центрі, а також суміші енантіомерів, включаючи рацемічні суміші.

У відповідності до одного свого аспекту, даний винахід пропонує сполуки, які пригнічують ПФ1. В певних варіантах здійснення ці сполуки є сполуками формули (I):



де n - це 1 або 2;

Ar є фенілом або тіснілом і є факультативно заміщеним;

кожний R^1 є незалежно R^6 , $C(O)R^6$, $C(O)-OR^6$ або $C(O)N(R^6)_2$;

R^2 є H або факультативно заміщеним алкілом C1-C6, або групою формули $-C(O)NH-R^1$;

R^3 вибирається незалежно в кожному випадку з гало, NO_2 , CN , R , OR , NR_2 ; $S(O)_qR$, $COOR$ і $CONR_2$, де кожний R є незалежно H, алкілом C1-C4 або галоалкілом C1-C4;

m є 0-4;

R^4 є R^6 , гало, $=O$, $COOR^6$, $CO N(R^6)_2$, $S(O)_qR^6$, $N(R^6)_2$ або OR^6 ;

p є 0-2;

кожний q є незалежно 0-2;

Z є 0 або NR^5 ;

R^5 є R^6 або $C(O)R^6$; і

R^6 вибирається незалежно в кожному випадку з H, алкілу C1-C6, арилу C5-C6 і алкілу (C5-C6-арил)-C1-C6, де кожний алкіл і арил є факультативно заміщеним; за умови, що n є 2, Z є 0 і Ar є представленим пара-галофенілом; або його фармацевтично прийнятною сіллю.

В певних варіантах здійснення Z є NR^5 . В таких варіантах здійснення R^5 є інколи H, а інколи - $\text{C}(\text{O})\text{R}'$, де R' є алкілом C1-C4 або галоалкілом C1-C4. В інших варіантах здійснення Z є O або NH; переважно, Z є O.

В певних варіантах здійснення Ag є фенілом, який є факультативно заміщеним. Переважно, коли n є 1, Ag не є 4-галофенілом.

В інших варіантах здійснення Ag є тієнілом, який може бути факультативно заміщеним. Тієніл може бути приєднаним в позиції 2 або в позиції 3 тіофенового кільця. В інших варіантах здійснення Ag є 2-тієнілом і є факультативно заміщеним. В інших варіантах здійснення Ag є факультативно заміщеним 3-тієнілом.

В певних варіантах здійснення n є 1. В певних варіантах здійснення n є 2.

В певних варіантах здійснення R^2 є H або алкілом C1-C4 або галоалкілом C1-C4. Переважно, R^2 є H, метилом або етилом.

В певних варіантах здійснення m є 0. В інших варіантах здійснення m є 1-2.

В певних варіантах здійснення m не є 0, щонайменше один R^3 є гало, алкілом C1-C4 або галоалкілом C1-C4.

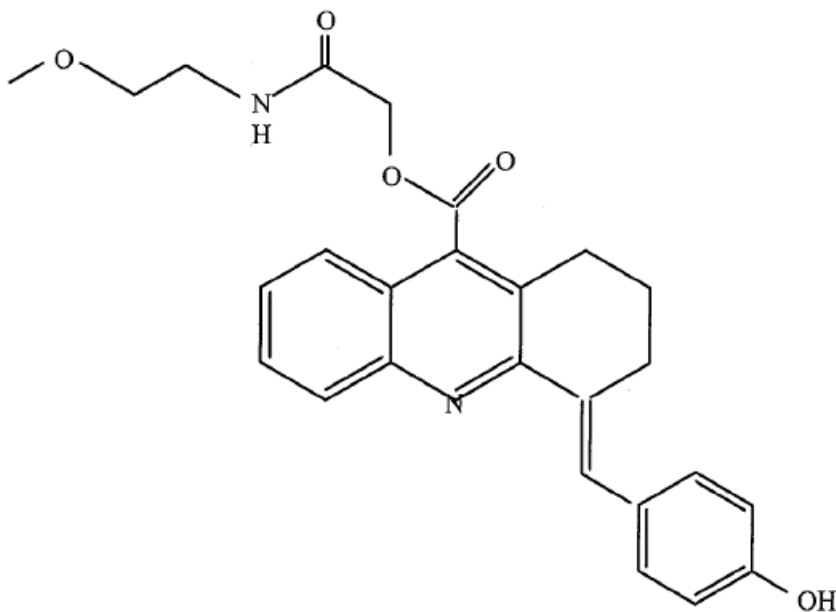
В певних варіантах здійснення p є 0. В інших варіантах здійснення p є 1-2.

Коли p не є 0, в певних варіантах здійснення щонайменше один R^4 є =O, алкілом C1-C4 або галоалкілом C1-C4.

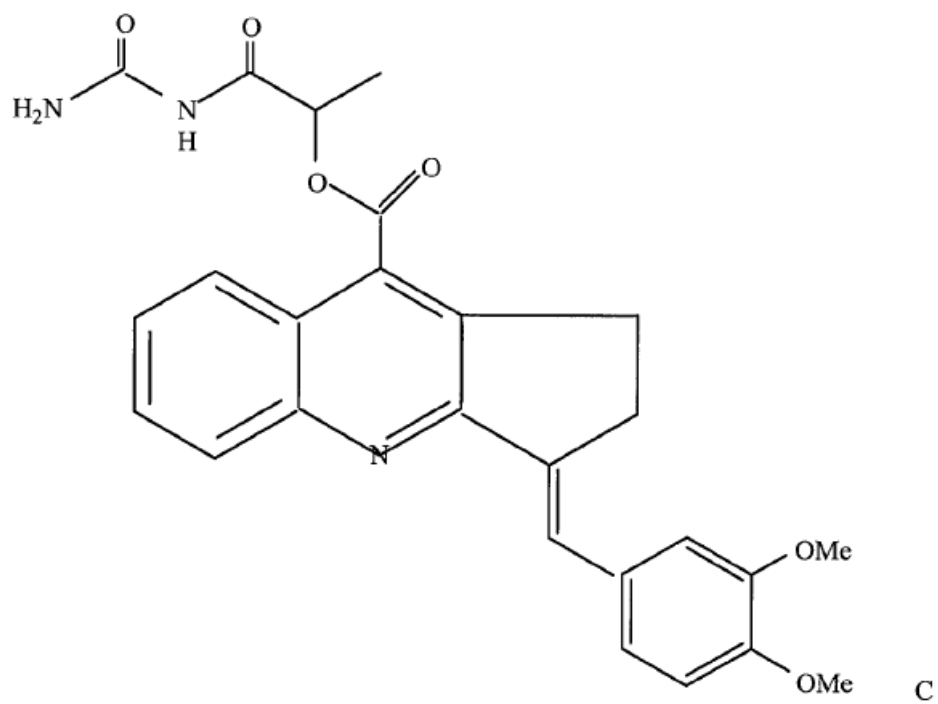
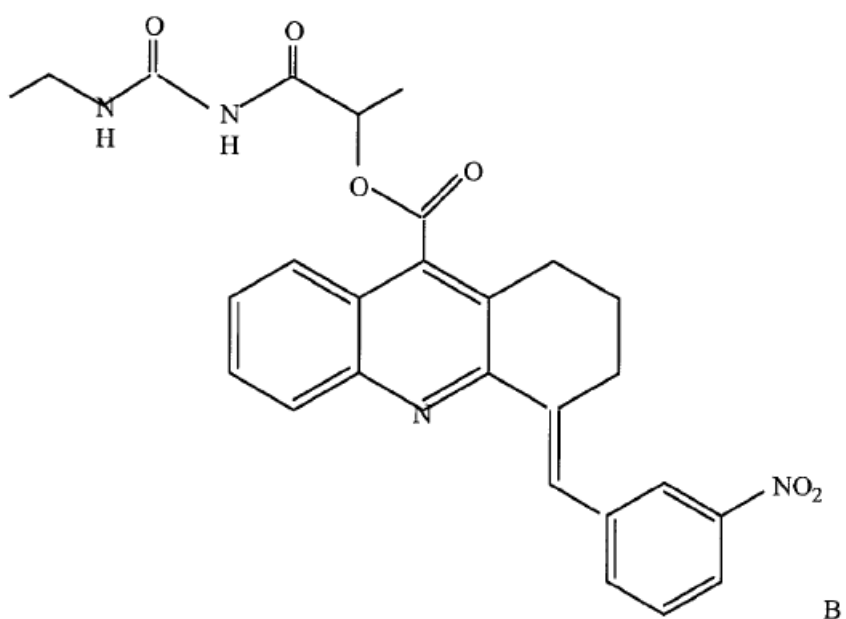
В певних варіантах здійснення R^1 є факультативно заміщеним алкілом C1-C6. В інших варіантах здійснення R^1 є $\text{C}(\text{O})\text{R}^6$. В інших варіантах здійснення R^1 є $\text{C}(\text{O})\text{NHR}^6$.

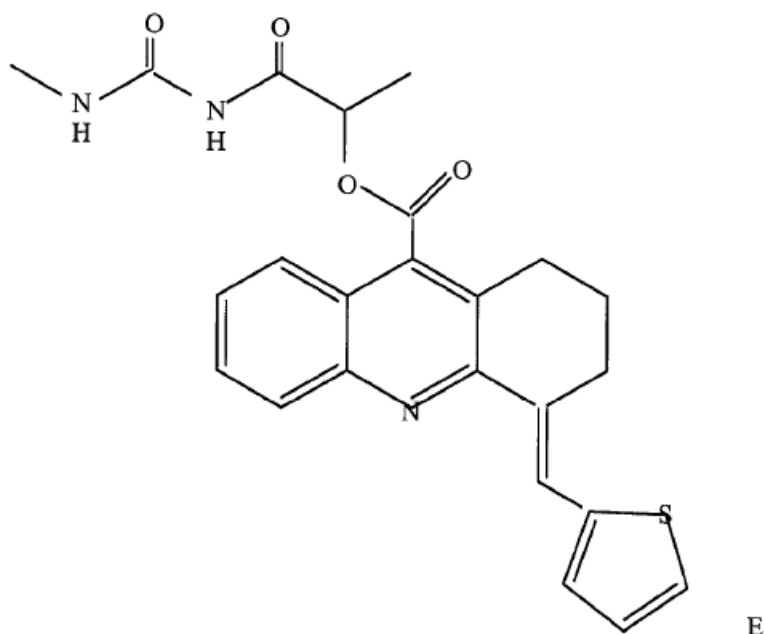
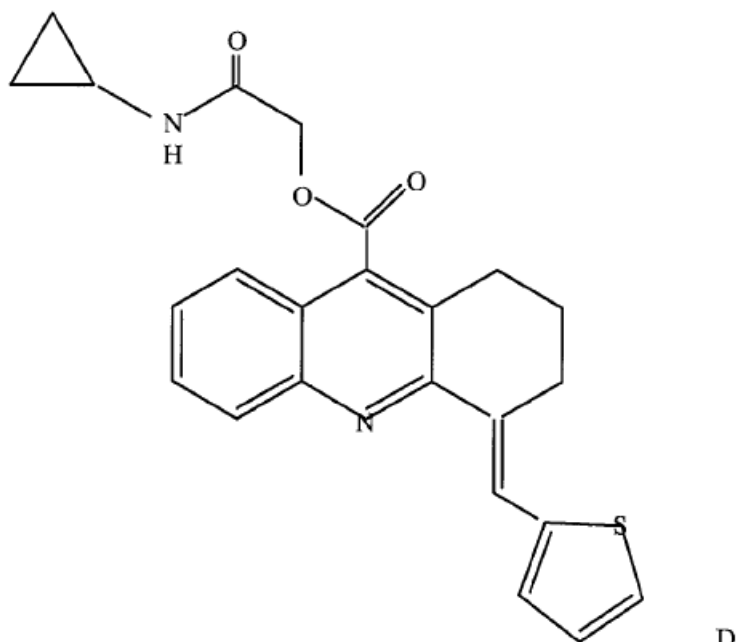
Сполуки формули (I) легко утворюють солі приєднання кислоти. В певних варіантах здійснення сполукою формули (I) є сіль приєднання кислоти. В багатьох варіантах здійснення цією сіллю приєднання кислоти є фармацевтично прийнятна сіль.

Деякі конкретні сполуки, у відношенні яких було показано, що вони пригнічують транскрипцію ВІЛ-1 при ефективній концентрації (IC-50) біля 10 мікромолів або менше, включають:



A





В Таблиці 1 наведені певні дані, які показують ефективність вибраних сполук щодо пригнічення Tat-індукованої транскрипції ВІЛ-1 в двох клітинних лініях. Вона також дозволяє
 5 якісно оцінити токсичність даних сполук в цих клітинних лініях і показує, що одна сполука (Сполука А) пригнічувала реплікацію ВІЛ-1 на 50% при концентрації 10 мкМ.

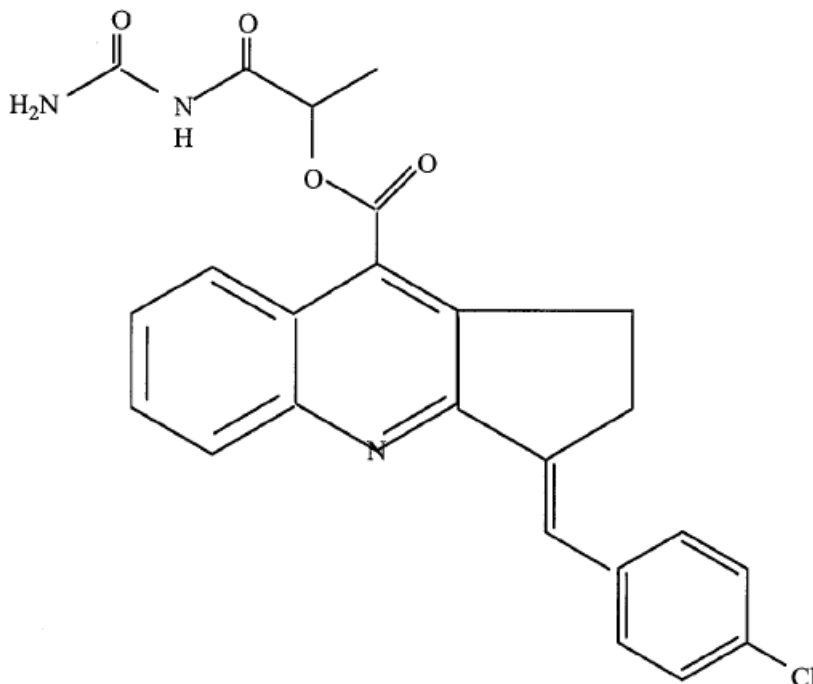
Таблиця 1

Дані щодо біологічної активності вибраних сполук

Сполука	Пригнічення транскрипції в клітинах СЕМ (IC-50)	Пригнічення транскрипції в клітинах 293Т (IC-50)	50% пригнічення реплікації ВІЛ	Токсичність в клітинах СЕМ	Токсичність в клітинах 293Т
А	10 мкМ	5 мкМ	10 мкМ	Немає	Немає
В	2 мкМ	3 мкМ	N/A	Немає	Немає
С	N/A	1 мкМ	N/A	Немає	Немає

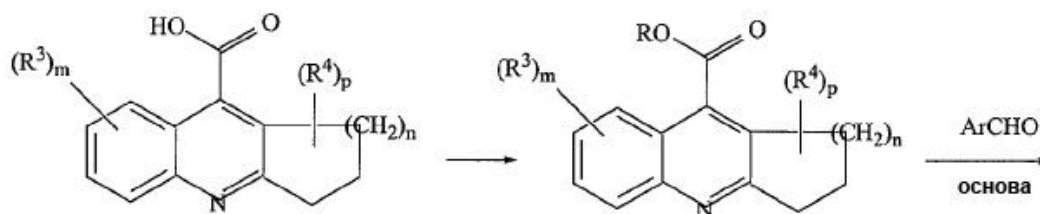
N/A = Дані не визначались

Наступна сполука з подібною структурою виявилась неефективною щодо пригнічення транскрипції ВІЛ-1 і, більш того, навіть прискорювала транскрипцію. Через відсутність бажаної активності цю сполуку виключено з об'єму даного винаходу; відповідно, сполуки, в яких Ar є 4-гало, виключались, коли $n \in 1$ і $Z \in 0$.



Описані тут сполуки можуть бути отримані за допомогою добре відомих реакцій, з доступних вихідних матеріалів, таких як 1,2,3,4-тетрагідроакридин-9-карбонова кислота, як показано на Схемі 1. Цю кислоту можна легко перетворити на складний ефір або амід, щоб приготувати сполуки, в яких $Z \in O$ або N , відповідно, при використанні стандартних умов, що є добре відомим в цій галузі. Широкий спектр наявних спиртів і амінів дає можливість синтезувати багато сполук з включеними різними групами R^1 і R^2 . Після утворення з карбоксилату складного ефіру або амиду, цей проміжний ефір або амід можна конденсувати різними наявними альдегідами, щоб ввести групу «Ar-CH=» в насичене кільце, використовуючи основу, таку як калію *tert*-бутоксид, в полярному апротонному розчиннику, такому як ДМСО, ДМФ, ДМЕ або ТГФ, або в не нуклеофільному протонному розчиннику, такому як *t*-бутанол. Можна також утворити зв'язаний ефір вихідної карбонової кислоти, такий як *t*-бутиловий ефір, і конденсувати такий акридиновий ефір альдегідом, як вже описувалось, після чого гідролізувати цей ефір, щоб отримати проміжну сполуку карбонової кислоти, що має групу Ar-CH= на місці. Цей проміжний продукт може потім контактувати з різними наявними або легко доступними спиртами або амінами і утворювати продукти формули (I). Методи здійснення таких реакцій сполучення є добре відомими в цій галузі.

Схема 1: Синтез сполук формули (I)





Показано, що описані тут сполуки є ефективними інгібіторами реплікації ВІЛ-1 в клітинних лініях. Відповідно, ці сполуки є корисними для лікування або попередження ВІЛ-1 інфекцій у тварин, включаючи людей. Використання цих сполук включає введення суб'єкту, який того потребує, ефективної кількості сполуки формули (I) або інших сполук, описаних тут, або їх фармацевтичних композицій. Пропонуються фармацевтичні композиції, що містять ефективну кількість щонайменше однієї сполуки формули (I) або інших описаних тут сполук. Вони включають щонайменше одну сполуку формули (I) або інші описані тут сполуки, змішані з щонайменше однією фармацевтично прийнятною допоміжною речовиною. В певних варіантах здійснення ці методи включають ідентифікацію суб'єкта, який потребує такого лікування. Описані тут сполуки можуть використовуватись для виготовлення лікарських препаратів і для виготовлення лікарського препарату для лікування ВІЛ-1.

Сполуки формули (I) та інші описані тут сполуки можуть вводитись оральним, парентеральним (наприклад, внутрішньом'язова, інтраперитонеальна, внутрішньовенна, інтрацистернальна ін'єкція або інфузія, підшкірна ін'єкція або імплантат), інгаляційним, назальним, вагінальним, ректальним, сублінгвальним або місцевим шляхами і можуть входити в рецептуру окремо або разом, в дозованих лікарських формах, які містять звичайні нетоксичні носії, ад'юванти і розчинники відповідно до шляху введення препарату. Методи і препарати для кожного з цих шляхів введення входять до компетенції звичайного спеціаліста в даній галузі.

Також припускається, що сполуки за цим винаходом можуть застосовуватись в комбінаціях з одним або більше агентами, які застосовуються в попередженні або лікуванні інфекції ВІЛ. Приклади таких агентів включають: (1) нуклеотидний інгібітор зворотної транскриптази, такий як зидовудин, диданозин, ламівудин, залцитабін, абакавір, ставудин, адефовір, адефовір дипівоксил, фозівудин тодоксил і т.п.; (2) нунуклеотидний інгібітор зворотної транскриптази (включаючи агент, що має антиокислювальну активність, такий як імунокал, олтипраз і т.п.), такий як невірапін, делавірдин, ефавіренц, ловірид, імунокал, олтипраз і т.п.; і (3) інгібітори протеази, такі як саквінавір, рітонавір, індінавір, нелфінавір, ампренавір, палінавір, лазінавір і т.п.

Коло комбінацій сполук формули (I) та інших описаних тут сполук з іншими препаратами для лікування ВІЛ не обмежується (1), (2) та/або (3), а включає в принципі будь-яку комбінацію з будь-якою фармацевтичною композицією, що застосовується для лікування ВІЛ-інфекцій. Більш того, при такому комбінаційному лікуванні сполуки за цим винаходом та інші препарати для лікування ВІЛ-інфекцій можуть вводитись окремо або разом, як єдина композиція або як окремі композиції. До того ж, введення одного елементу може передувати введенню іншого препарату, здійснюватись одночасно з ним або після нього.

Сполуки формули (I) та інші описані тут сполуки застосовуються для лікування тварин, включаючи, але не обмежуючись ними, мишей, щурів, коней, велику рогату худобу, овець, собак, кішок і мавп. Описані тут сполуки є ефективними також при застосуванні у людей.

Сполуки формули (I) та інші описані тут сполуки можуть утворювати гідрати або сольвати, які є включеними в об'єм формули винаходу. Коли сполуки формули (I) та інші описані тут сполуки існують як регіоізмери, конфігураційні ізомери, конформери або діастероізомерні форми, всі такі форми і їх суміші є включеними у відтворені тут формули. При бажанні можна виділити окремі ізомери, користуючись відомими методами розділення і очистки. Наприклад, коли сполука формули (I) є рацематом, цей рацемат можна розділити на (S)-сполуку і (R)-сполуку шляхом розщеплення оптичних ізомерів. Окремі оптичні ізомери та їх суміші є включеними в об'єм відтворених тут формул.

Сполуки за цим винаходом можуть застосовуватись в своїй нейтральній формі або як сіль.

Сполуки формули (I) та інші описані тут сполуки легко утворюють солі приєднання кислоти, і в певних варіантах здійснення таким солям приєднання кислоти віддають перевагу при застосуванні в способах і композиціях за цим винаходом. Отримання таких солей входить до компетенції спеціаліста в цій галузі і може здійснюватись шляхом контактування сполуки формули (I) та інших описаних тут сполук з відповідною кислотою. Використовувана сіль може бути будь-якою стабільною сіллю. В певних варіантах здійснення кислота вибирається так, щоб забезпечити отримання фармацевтично прийнятної солі. Прикладами фармацевтично прийнятних солей є органічні солі приєднання кислоти, утворені кислотами, що дають фізіологічно прийнятний аніон, наприклад тозилат, метансульфонат, безилат, ацетат, формат, цитрат, малонат, тарtrat, сукцинат, бензоат, аскорбат, а-кетоглутарат, лактат і а-гліцерофосфат. Придатні неорганічні солі також можуть отримуватись, включаючи гідрохлорид, сульфат, бісульфат, фосфат, нітрат, гідробромід і т.п.

Пропонуються композиції, які включають фармацевтично прийнятний носій або розріджувач і ефективну кількість сполуки формули (I) або інших описаних тут сполук. Фармацевтичні композиції переважно містять щонайменше один прийнятний розріджувач або допоміжну речовину, іншу ніж вода, метиловий спирт, етиловий спирт або ДМСО. В певних варіантах здійснення фармацевтична композиція містить щонайменше одну допоміжну речовину, вибрану з буферу, сольового розчину і моно- або дисахариду.

Сполуки формули (I) та інші описані тут сполуки можуть вводитись окремо або як суміш з фармацевтично прийнятним носієм (наприклад, як тверді препарати, такі як таблетки, капсули, гранули, порошки і т.п.; рідкі препарати, такі як сиропи, ін'єкції і т.п.) і можуть призначатись для орального або не орального введення. Приклади не оральних препаратів включають ін'єкції, краплі, супозиторії і песарії.

При лікуванні або попередженні станів у суб'єкта-людини відповідний рівень дози буде загалом становити приблизно від 0,01 до 500 мг на кг ваги тіла пацієнта в день, і ця доза може вводитись за один прийом або за кілька разів. Переважно, рівень дози буде становити від приблизно 0,1 до приблизно 100 або від приблизно 0,1 до приблизно 10 мг/кг на добу. Має бути зрозумілим, що конкретний рівень дози і частота введення для кожного окремого пацієнта можуть бути різними і будуть залежати від різноманітних факторів, включаючи активність конкретної сполуки, що застосовується, метаболічну стабільність і тривалість дії цієї сполуки, вік, вагу тіла, загальний стан здоров'я, стать, раціон харчування, спосіб і час введення, швидкість екскреції, комбінацію препаратів, тяжкість стану, що лікується, і терапію, яку приймає даний пацієнт.

В одному варіанті здійснення сполука вводиться системно (наприклад, орально) в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм, таким як інертний розріджувач або їстівна основа, що асимілюється. Сполуки можуть вкладатись в капсули з твердою або м'якою желатиною оболонкою, пресуватись в таблетки або включатись безпосередньо в їжу, яку споживає пацієнт. Для орального терапевтичного введення активна сполука може комбінуватись з однією або більше допоміжними речовинами і використовуватись у формі таблеток, які ковтають, защічних таблеток, пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, облаток і т.п. Такі композиції і препарати повинні містити щонайменше 0,1% активної сполуки. Цей відсоток може коливатись в композиціях і препаратах і звичайно знаходиться в межах від приблизно 2 до приблизно 60% даної дозованої лікарської форми. Кількість активної сполуки в таких терапевтично використовуваних композиціях є такою, щоб забезпечувався ефективний рівень дози.

Таблетки, пастилки, пігулки, капсули і т.п. можуть містити також наступне: зв'язувальні речовини, такі як трагакантова камедь, гуміарабік, кукурудзяний крохмаль або желатин; допоміжні речовини, такі як кальцію фосфат; агент для дезінтеграції, такий як кукурудзяний крохмаль, картопляний крохмаль, альгінова кислота і т.п.; лубрикант, такий як магнію стеарат; і підсолоджувач, такий як сахароза, фруктоза, лактоза або аспартам, або ароматизатор, такий як м'ята перцева, вінтергринова олія або вишневий смаковий ароматизатор. Коли дозованою лікарською формою є капсула, вона може містити, крім вищезазначених матеріалів, рідкий носій, такий як рослинна олія або поліетилен гліколь. Різні інші матеріали можуть бути присутніми як покриття або для того, щоб по-іншому модифікувати фізичну форму дозованої лікарської форми. Наприклад, таблетки, пігулки або капсули можуть покриватись желатином, воском, шелаком, цукром і т.п. Сироп або еліксир може містити активну сполуку, сахарозу або фруктозу в якості підсолоджувача, метил- і пропилпарабен в якості консервантів, барвник і ароматизатор, такий як вишневий або помаранчевий. Будь-який матеріал, використовуваний для приготування дозованої лікарської форми, має бути фармацевтично прийнятним і суттєво нетоксичним в тій кількості, в якій він застосовується. Крім того, активна сполука може включатись в препарати пролонгованої дії і пристрої, що забезпечують введення таких

препаратів.

Активна сполука може вводиться також внутрішньовенно або інтраперитонеально шляхом інфузії або ін'єкції. Розчини активної сполуки або її солей можуть готуватись як буферні розчини, часто з фосфатного-сольовим буферним розчином, факультативно змішаним з нетоксичним сурфактантом. Дисперсії можуть готуватись також в гліцерині, рідких поліетилен гліколях, триацетині та їх сумішах а також в оліях. В звичайних умовах зберігання і застосування такі препарати містять консервант для попередження росту мікроорганізмів. Деколи сполуку готують для введення як препарат, що містить поліматрицю (наприклад, ліпосоми або мікросоми). Ліпосоми є описаними, наприклад, в патенті США № 5,703,055 (Feigner, et al.) і в книзі Gregoriadis, Liposome Technology vols. I to II (2nd ed. 1993).

Фармацевтичні дозовані лікарські форми, призначені для ін'єкції або інфузії, можуть включати стерильні водні розчини або дисперсії або стерильні порошки, що містять активний інгредієнт, які готують для негайного прийому у вигляді стерильних розчинів для ін'єкції або інфузії, факультативно інкапсулюючи їх в ліпосоми. У всіх випадках кінцева лікарська форма має бути стерильною, рідкою і стабільною в умовах виготовлення і зберігання. Рідкий носій або розріджувач може бути розчинником або рідким середовищем для диспергування, що є, наприклад, водою, етиловим спиртом, поліолом (наприклад, гліцерином, пропилен гліколем, рідкими поліетилен гліколями і т.п.), рослинними оліями, нетоксичними ефірами гліцерину та їх прийнятними сумішами. Відповідна текучість може підтримуватись, наприклад, шляхом утворення ліпосом, забезпеченням певного розміру часток у випадку дисперсій або шляхом використання сурфактантів. Розвиток мікроорганізмів може досягатись шляхом застосування різних антибактеріальних і антифунгальних препаратів, наприклад парабенів, хлорбутанолу, фенолу, сорбінової кислоти, тімерозалу і т.п. В багатьох випадках корисним буде включення ізотонічних агентів, наприклад цукрів, буферів або натрію хлориду. Пролонговане всмоктування ін'єкційних композицій може досягатись шляхом використання в цих композиціях агентів, які уповільнюють всмоктування, наприклад алюмінію моностеарату і желатину.

Стерильні ін'єкційні розчини готують шляхом включення активної сполуки в необхідній кількості у відповідний розчинник з різними іншими інгредієнтами, переліченими вище, які є необхідними, з наступною стерилізацією фільтрацією. У випадку стерильних порошків для приготування стерильних ін'єкційних розчинів кращими методами приготування є вакуумна сушка і сушка виморожуванням, які дають порошок активного інгредієнту плюс будь-який додатковий бажаний інгредієнт, присутній в попередньо стерилізованих фільтрацією розчинах.

Для місцевого введення сполуки за цим винаходом можуть застосовуватись в рідкій формі. Сполуки часто вводяться як композиції або препарати в комбінації з дерматологічно прийнятним носієм, який може бути твердим або рідким. Приклади придатних дерматологічних композицій, використовуваних для доставки сполук до шкіри, є відомими (дивись, наприклад, Jacquet, et al. (патент США № 4,608,392), Geria (патент США № 4,992,478), Smith, et al. (патент США № 4,559,157) і Wortman (патент США № 4,820,508)).

Сполуки можуть комбінуватись з твердим носієм, який може включати дрібнодисперсні тверді речовини, такі як тальк, глина, мікрокристалічна целюлоза, кремнезем або глинозем і т.п. Придатні рідкі носії включають воду, спирти або гліколи або суміші вода-спирт/гліколь, в яких сполуки за цим винаходом можуть розчинятись або диспергуватись в ефективній концентрації, факультативно з застосуванням нетоксичних сурфактантів. Ад'юванти, такі як ароматизатори і додаткові антимікробні агенти, можуть додаватись з метою оптимізації властивостей для даного застосування. Результуючі рідкі композиції можуть наноситись з подушечок з абсорбентом, застосовуватись для просочування бандажів та інших пов'язок або розпилюватись на вражену ділянку за допомогою аерозольного розпилювача. Згущувачі, такі як синтетичні полімери, жирні кислоти, солі і ефіри жирних кислот, жирні спирти, модифіковані целюлози або модифіковані мінеральні матеріали, також можуть застосовуватись з рідкими носіями для отримання паст, що намазуються, гелів, мазей, мила і т.п., які наносяться безпосередньо на шкіру користувача.

Загалом, концентрація сполуки в рідкій композиції часто становить від приблизно 0,1 ваг. % до приблизно 25 ваг. %, деколи від приблизно 0,5 ваг. % до приблизно 10 ваг. %. Концентрація в напівтвердій або твердій композиції, такої як гель або порошок, часто становить від приблизно 0,1 ваг. % до приблизно 5 ваг. %, деколи від приблизно 0,5 ваг. % до приблизно 2,5 ваг. %. Композиція, що містить сполуку за цим винаходом, може бути приготовленою як дозована лікарська форма, яка отримується у відповідності до звичайних методів, відомих в фармацевтичній промисловості. В загальних рисах, такі методи включають забезпечення зв'язку між сполукою і фармацевтичним носієм та/або допоміжною речовиною в рідкій формі або дрібнодисперсній твердій формі, або в обох формах, з наступним наданням продукту певної форми, коли це необхідно. Композиція, що містить сполуку за цим винаходом, може бути

приготовленою як будь-яка дозована лікарська форма, така як таблетки, капсули, рідкі сиропи, м'які гелі, супозиторії і клізми. Композиції можуть готуватись також як суспензії у водному, неводному або змішаному середовищі. Водні суспензії можуть додатково містити речовини, які підвищують в'язкість, включаючи, наприклад, карбоксиметилцелюлозу натрію, сорбітол та/або декстран. Така суспензія може містити також один або більше стабілізаторів.

Методи для оцінки активності сполук за цим винаходом щодо транскрипції ВІЛ-1 є добре відомими в цій галузі і використовувались для тестування сполук за цим винаходом на активність.

Наступні приклади описують різні аспекти даного винаходу. Ці приклади не слід інтерпретувати як такі, що обмежують об'єм даного винаходу, як він описаний в супроводжуючій формулі винаходу. Якщо інше не зазначається, всі частини і відсотки є ваговими, а наведені результати вимірювань і інші дані були отримані в звичайних умовах оточуючого середовища.

Приклади

Приклад 1: Скринінг сполук

Підготовка бази даних сполук: Рентгенівські координати послідовності RVSF пептиду Gm, зв'язаного з ПФ1 (люб'язно надані David Barford (Egloff et al., 1997)), були використані для віртуального скринінгу вихідної колекції Enamine (www.enamine.net) із застосуванням QXP в якості інструменту для стикування і початкових фільтрів для обробки даних. Матеріал Enamine було оброблено згідно правил, подібних до тих, які застосовуються для ліків, з двома винятками: (i) $280 < MW < 550$ (MW = молекулярна вага) і (ii) Поворотні зв'язки < 10 . Понад 300000 сполук було проаналізовано *in silico*, щоб створити цілеспрямовану бібліотеку з 262 низькомолекулярних сполук (MW -500 Da).

Ідентифікація інгібіторних сполук: Цю бібліотеку було проаналізовано щодо пригнічення транскрипції ВІЛ-1 з застосуванням репортерних клітин CEM GFP (люб'язно наданих AIDS Reagents Program, NIH), які були інфіковані аденовірусом, що експресує білок-активатор Tat ВІЛ-1 (Ad-Tat), як раніше описувалось (Nekhai et al., 2007). Інфікування клітин CEM-GFP Adeno-Tat індукувало транскрипцію ВІЛ-1, що оцінювалось за збільшенням флуоресценції GFP (GFP = зелений флуоресцентний білок) (Nekhai et al., 2007). Сполуки додавались в концентрації 25 мкМ до клітин CEM-GFP, інфікованих Ad-Tat, та інкубувались впродовж 24-48 годин. Цитотоксичність оцінювали за захопленням пропідію йодиду (ПІ). Початковий скринінг ідентифікував понад 70 сполук, які пригнічували транскрипцію ВІЛ-1 щонайменше на 75% при концентрації 25 М (дивись Таблицю 2 далі).

Таблиця 2: Аналіз 262 низькомолекулярних сполук у відношенні пригнічення транскрипції ВІЛ-1 в клітинах CEM GFP. Наведено відсоток пригнічення. Сполуки, відібрані для подальшого аналізу, виділено сірим кольором.

Пластина 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	92	7.7	1.4	0.1	77.5	26.9	64.7	31.5	80.3	30	23.1	96.1
B	46	24.4	42.3	41.6	69	73.9	99.1	53.1	34.2	25.4	72.5	17.2
C	95.1	54.3	54.5	58.7	56.4	52.2	98.1	40.8	60.7	32	52.8	64.3
D	56.8	81.8	56.5	55.6	54.4	70.9	46.1	48.6	39.2	14.2	54.7	93.1
E	45.6	40.4	29.7	59.6	53.8	48.9	74.2	41.1	38.7	64.1	34.7	20.9
F	42.2	51.9	49.5	55.7	52.3	50.9	60.4	63.1	45.6	36.3	93.5	97.8
G	32.8	45	79.1	50.3	45.6	41.4	45.5	-0.2	45.9	93.7	32.1	77.8
H	52.7	85.8	51.4	95.7	32.8	72.3	93.9	35.7	56.2	69.3	51.9	21.4

Пластина 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	60.1	2.4	-1.1	59.2	47.5	78.6	12.6	59.1	28	26	5.1	7.1
B	31.1	67.5	33.7	66.5	83.7	69.1	95	83.6	80.9	65.2	59.8	34.2
C	63.1	101.9	92	99	90.7	7	86	69.3	76.5	80.3	55.5	81.8
D	65.5	79.7	82	94.3	82.3	68.1	68.8	96	64.3	61.3	59.7	80.9
E	61.1	83.3	76.2	77.1	69.2	69.2	76.4	71.5	95.4	69.2	54.9	56.9
F	65.5	73.9	90.9	69	76.9	71.2	82.7	65.8	71.1	80	61.3	42.4
G	90.7	64.4	3	92.5	69.9	94.6	73.6	72.7	77.9	100	73.6	63.1
H	68.9	75.7	75.7	69.3	102	54.7	68.7	73.5	82.9	64.7	54	54.7

Пластина 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	24.3	82.6	80	83	42.2	91.2	38.5	93.5	77.5			
B	23.4	57.2	55.9	52.7	62.8	44.7	70	74	92.5			
C	84.4	96.4	51.2	77.8	75	41.7	61.1	93.7	63.7			
D	59.3	62.4	52.9	74.6	48.4	40.3	87.2	57.3	54.3			
E	96.6	76.2	74.2	57.2	51.5	48.1		41.6	51.4			
F	75.7	52.5	75.7	66	62.2	61.6	56	95.1	47.7			
G	97.7	79.4	51	51.8	58.7	45.7	45.4	46.8				
H	47.5	43.6	42.7	71.9	79.1	70.6	89.5	89.8				

- 5 Відібрані сполуки (69 з Таблиці 1, відмічені сірим кольором) були піддані подальшій оцінці для визначення їх IC50, а також клітинної токсичності. Аналіз цих сполук ідентифікував низку сполук, що були інгібіторними (Таблиця 2).

Таблиця 3

Відібрані сполуки, які демонстрували пригнічення транскрипції ВІЛ-1.
Нетоксичні сполуки з IC50 нижче 10 мкМ виділено сірим кольором

Номер пластини	лунка	IC50 в клітинах CEM-GFP	IC50 в 293T	Токсичність (PI)
Пластина 01	G03	~ 7 мкМ	> 40 мкМ	-
Пластина 01	H04	~ 10 мкМ	~ 5 мкМ	-
Пластина 01	B07	~25 мкМ		-
Пластина 01	C07	- 10 мкМ	> 10 мкМ	+
Пластина 01	G10	-20 мкМ		-
Пластина 01	D12	-20 мкМ		-
Пластина 02	D02	-25 мкМ		-
Пластина 02	C03	-25 мкМ	> 10 мкМ	+
Пластина 02	D03	< 10 мкМ, але тільки 50%		+
Пластина 02	G03	- 17 мкМ		+
Пластина 02	C04	> 10 мкМ		-
Пластина 02	C05	> 10 мкМ	> 10 мкМ	-
Пластина 02	B07	~ 6 мкМ		-
Пластина 02	E09	- 25 мкМ	> 10 мкМ	-
Пластина 02	G10	-25 мкМ		-
Пластина 02	D12	~ 6 мкМ		-
Пластина 03	E01	-25 мкМ		-
Пластина 03	G01	-25 мкМ		+
Пластина 03	C02	> 10 мкМ		-
Пластина 03	F03	> 10 мкМ		-
Пластина 03	A06	> 10 мкМ	> 10 мкМ	-
Пластина 03	A08	> 10 мкМ	> 10 мкМ	-
Пластина 03	C08	> 10 мкМ	> 10 мкМ	+

Сполуки з Таблиці 2 було піддано подальшій оцінці з використанням клітин 293Т, трансфікованих LTR-LacZ Tat- і ВІЛ-1. На Фіг. 1А показано приклад пригнічення транскрипції і визначення цитотоксичності для сполук, позначених як 1Н4, 3С8, 1G3 і 1С7. Сполуки 1Н4 і 3С8 не були токсичними і пригнічували транскрипцію ВІЛ-1 (Фіг. 1А). З іншого боку, сполука 1С7 сильно пригнічувала транскрипцію ВІЛ-1, але демонструвала високу цитотоксичність (Фіг. 1А). Сполука 1G3 не була ні токсичною, ні інгібіторною (Фіг. 1А). Сполуки 1Н4, 3С8 і 1G3 були піддані подальшому тестуванню з використанням клітин 293Т, трансфікованих Tat-експресуючим вектором, репортером LTR-LacZ ВІЛ-1 і репортером CMV-EGFP. Інгібіторні властивості цих сполук оцінювались з використанням клітин 293Т, трансфікованих Tat-експресуючим вектором, репортером LTR-LacZ ВІЛ-1 і репортером CMV-EGFP (Ammosova et al., 2005a). Клітини 293Т трансфікувались ліпофектаміном, після чого оброблялись кожною з відібраних сполук впродовж 18 годин. Потім клітини піддавали лізису і визначали активність GFP (GFP = зелений флуоресцентний білок) і β-галактозидази, як нами вже описувалось раніше (Ammosova et al., 2005a). Сполука 1Н4 була найбільш інгібіторною з IC50 = 5 мкМ (Фіг. 1В). Сполука 1С7 не пригнічувала індуковану Tat транскрипцію ВІЛ-1 в цій системі (не показано). Жодна зі сполук не була цитотоксичною, як визначено за допомогою аналізу LDH (LDH = лактатдегідрогеназа) (не показано).

Реплікація ВІЛ-1 пригнічується низькомолекулярним міметиком пептиду QVCF. Сполуку 1Н4 тестували для визначення того, або може вона пригнічувати реплікацію ВІЛ-1. Клітини MT4 інфікували рекомбінантним рNL4-3 ВІЛ-1 і обробляли різними концентраціями сполуки 1Н4 і, в якості контролю, сполуки 1G3. Сполука 1Н4 пригнічувала реплікацію ВІЛ-1 в концентрації 10 мкМ або 25 мкМ (Фіг. 2). Сполука 1G3 не пригнічувала реплікацію ВІЛ-1, а натомість індукувала її приблизно 2-кратно (Фіг. 2). Отже, сполука 1Н4 пригнічує реплікацію ВІЛ-1.

Сполука 1Н4 стикується з ПФ1 і пригнічує взаємодію Tat-ПФ1 *in vitro*. Типова регуляторна субодинація ПФ1 містить щонайменше один мотив RVxF, який безпосередньо взаємодіє з гідрофобною кишенею на поверхні ПФ1. Взаємодію сполуки 1Н4 з ПФ1 аналізували, вивчаючи її стикування за допомогою комп'ютерного моделювання. Стикування показує, що сполука 1Н4 займає гідрофобні сайти пептиду RVTF, але взаємодіє з ПФ1 також через додаткові сайти зв'язування.

Для визначення того, або сполука 1Н4 зв'язується безпосередньо з кишенею ПФ1, що зв'язує RVxF, було проведено конкурентний аналіз з Tat, стосовно якого попередньо було показано, що він зв'язується з кишенею RVxF ПФ1 *in vitro* (Ammosova et al., 2005b). Конкурентні аналізи виконувались з 4 нМ ПФ1 в гліцилгліциновому буфері. Надлишок Tat пригнічував ПФ1 (Фіг. 3А, смуга 3), тоді як мутант Tat QACA не пригнічував ПФ1 (Фіг. 3А, смуга 4). Додавання 50 мкМ сполуки 1Н4 до Tat і ПФ1 допомагало опосередкованому Tat пригніченню ПФ1 (Фіг. 3А, смуга 5), тоді як 50 мкМ сполуки 1G3 не впливали на опосередковане Tat пригнічення ПФ1 (Фіг. 3А, смуга 6). Щоб проаналізувати, або сполука 1Н4 чинить вплив на активність CDK2, ми інкубували рекомбінантний CDK2/циклін Е пістону Н1 без додавання або з додаванням зростаючих концентрацій сполуки 1Н4. Як показано на Фіг. 4В, сполука 1Н4 не чинила суттєвого впливу на активність CDK2, засвідчуючи, що пригнічення транскрипції ВІЛ-1 сполукою 1Н4 не обумовлюється пригніченням CDK2.

Ідентифікація інгібіторів приєднання. Сполуку 1Н4 було використано для створення другої бібліотеки сполук, які мали б каркас, подібний до 1Н4. Ця друга бібліотека містила 143 сполуки. Ці сполуки тестувались щодо пригнічення транскрипції ВІЛ-1 і токсичності в СЕМ Т-клітинах і клітинах 293Т, подібно до того, як описано вище для аналізу першої бібліотеки. Були відібрані дві сполуки, а саме 1Е07 (Т5236177) і 2F02 (Т5430740) (затушовано), оскільки вони не були токсичними в пробі на захоплення пропідію йодиду і пригнічували транскрипцію ВІЛ-1, як в СЕМ клітинах, так і в клітинах 293Т.

Таблиця 4

Відібрані з бібліотеки на основі 1Н4 сполуки, які демонстрували пригнічення транскрипції ВІЛ-1

Ідентифікаційний номер	Номер пластини	лунка	Пригнічення транскрипції ВІЛ-1 СЕМ IC ₅₀	Пригнічення транскрипції ВІЛ-1 293Т IC ₅₀	Токсичність в клітинах СЕМ (PI)	Токсичність в клітинах СЕМ (трипан синій)	Токсичність в клітинах СЕМ (кальцеїн)
T0507-8302	Пластина 01	A02	3 мкМ	>> 10 мкМ	нетоксична	13 мкМ	
T0515-1487	Пластина 01	B04	7,5 мкМ	>> 10 мкМ	нетоксична		
T0515-5982	Пластина 01	D04	10 мкМ	5 мкМ	нетоксична		
T0516-0241	Пластина 01	H04	10 мкМ	>> 10 мкМ	нетоксична		
T0516-8237	Пластина 01	B05	10 мкМ	4 мкМ	нетоксична		
T0519-1220	Пластина 01	D05	10 мкМ	0,1 мкМ	токсична	2 мкМ	2 мкМ
T5227431	Пластина 01	E06	10 мкМ	5 мкМ	нетоксична		
T5229576	Пластина 01	G06	5 мкМ	4 мкМ	нетоксична		
T5236177	Пластина 01	E07	2 мкМ	3 мкМ	нетоксична	9 мкМ	10 мкМ
T5333787	Пластина 01	D09	15 мкМ	4 мкМ	нетоксична		
T5399927	Пластина 01	C10	8 мкМ	>> 10 мкМ	нетоксична		
T5400634	Пластина 01	D10	8 мкМ	4 мкМ	нетоксична		
T5423152	Пластина 02	C02	6 мкМ	4 мкМ	нетоксична		
T5430740	Пластина 02	F02	6 мкМ	0,2 мкМ	нетоксична	17 мкМ	
T5434998	Пластина 02	B03	10 мкМ	6 мкМ	нетоксична		
T5448953	Пластина 02	A05	5 мкМ	0,1 мкМ	токсична	26 мкМ	
T5578540	Пластина 02	A06	12 мкМ	10 мкМ	нетоксична		
T5754083	Пластина 02	A08	1 мкМ	3 мкМ	токсична	2 мкМ	2 мкМ

5 Були створені диверсифіковані бібліотеки сполук на основі структури 1Е07 (80 сполук). Ці сполуки були проаналізовані щодо пригнічення транскрипції ВІЛ-1 в клітинах 293Т. Результати, наведені в Таблиці 5, показали, що дві сполуки є інгібіторними, а саме В03 (Т5251792) і Е06 (Т5294712). Однак їх IC₅₀ були подібними до сполук 1Е07 і 2F02.

Таблиця 5

Відібрані з диверсифікованої бібліотеки на основі 1E07 сполуки, які демонстрували пригнічення транскрипції ВІЛ-1

Ідентифікаційний номер	лунка	IC50 в клітинах 293Т	Коментарі	Токсичність в СЕМ (трипановий синій)	Токсичність в СЕМ (кальцеїн)
T5236177	A01	~ 2 мкМ	1E07 (друга бібліотека) 2F2 (друга бібліотека)		
T5430740	B01	~ 2 мкМ			
T5219456	A02	> 5 мкМ			
T5251792	B03	~ 1 мкМ		~ 100 мкМ	> 1 мМ
T5402355	G04	>10 мкМ			
T5762096	D06	> 10 мкМ			
T5294712	E06	~ 2 мкМ		~ 100 мкМ	
T0519-1220	A09	> 10 мкМ			
T5230167	E09	> 10 мкМ			

5 Сполуки 1H4, 1E07, B03 і сполука 1G3 в якості контролю аналізувались щодо пригнічення реплікації ВІЛ-1, і результати показані в Таблиці 6. Сполуки 1H4 і 1E07 пригнічували реплікацію ВІЛ-1 з IC50, подібною до тих IC50, які ми спостерігали для пригнічення транскрипції ВІЛ-1 в клітинах СЕМ і 293Т. Неочікувано, сполука B03 не була інгібіторною, що суперечило спостереженням.

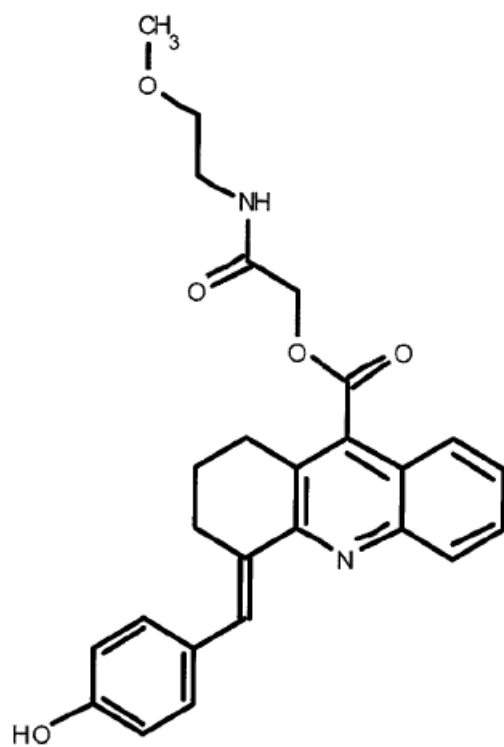
Таблиця 6

Пригнічення реплікації ВІЛ-1 сполуками 1H4 і 1E07

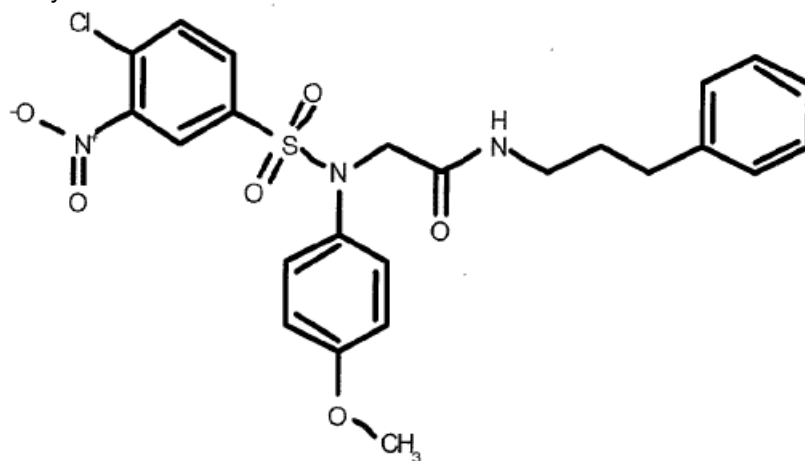
Ідентифікаційний номер	Сполука	IIIIB, IC50	Q148R, IC50	N155H, IC50
T0513-4428	1G3	37 мкМ	42 мкМ	59 мкМ
T0516-8237	1H4	9,4 мкМ	4,7 мкМ	8 мкМ
T5236177	1E07	2,5 мкМ	1,5 μМ	3,2 мкМ
T5251792	B03	N/A	N/A	N/A

10 N/A = Дані відсутні

Структури сполук, описаних в Прикладах, є наступними:
Сполука 1H4

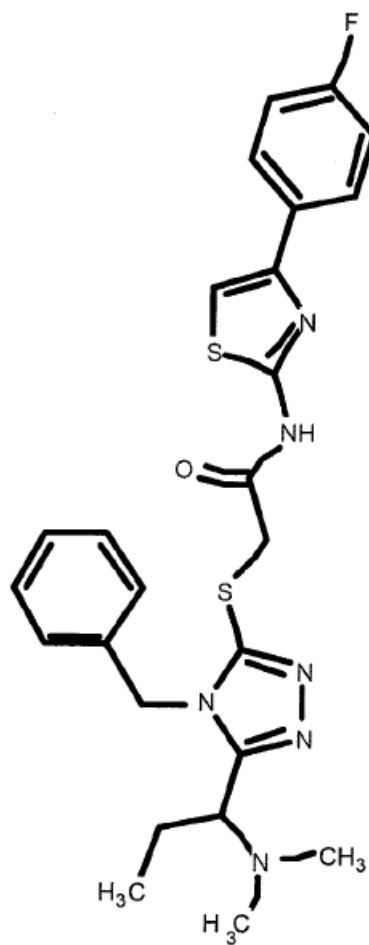


Сполука 1G3

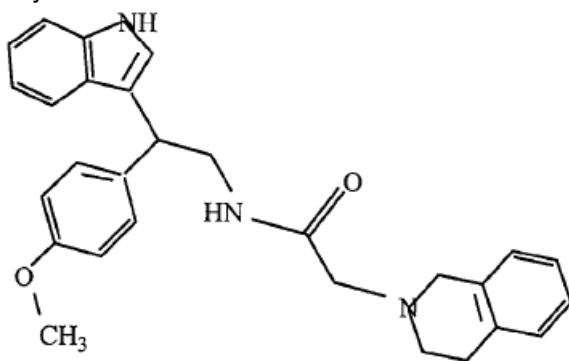


5

Сполука 1C7



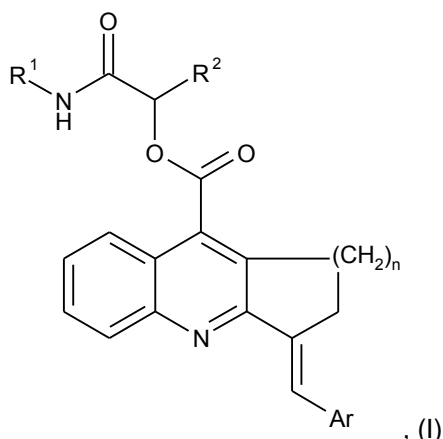
Сполука 3C8



5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Фармацевтична композиція для пригнічення реплікації ВІЛ-1, що містить сполуку формули (I)



де n дорівнює 1 або 2;

Ar є фенолом, заміщеним одним замісником, вибраним з групи, що складається з OH і NO₂, або двома замісниками OR, або тієнілом;

5 R^1 вибраний з групи, що складається з R⁶, C(O)N(R⁶)₂ і C₁-C₆алкілу, заміщеного OR;

R^2 є H або C₁-C₆алкілом;

R⁶ незалежно в кожному випадку вибирають з H і C₁-C₆алкілу;

кожен R незалежно являє собою C₁-C₈алкіл;

або її фармацевтично прийнятну сіль,

10 змішану принаймні з однією фармацевтично прийнятною допоміжною речовиною або розріджувачем.

2. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій n дорівнює 1.

3. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій n дорівнює 2.

4. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій R^2 є H або C₁-C₄алкілом.

15 5. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій Ar є 2-тієнілом.

6. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій Ar є 3-тієнілом.

7. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій R^1 вибраний з групи, що складається з CH₂CH₂OCH₃, CONHCH₂CH₃, CONH₂ і CH₃.

8. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій R^1 є H або C₁-C₆алкілом.

20 9. Спосіб лікування суб'єкта, що інфікований ВІЛ-1 або має підвищений ризик інфікування ВІЛ-1, який включає введення суб'єктові, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції за будь-яким з пп. 1-8.

10. Спосіб за п. 9, в якому R^1 вибраний з групи, що складається з CH₂CH₂OCH₃, CONHCH₂CH₃, CONH₂ і CH₃, R^2 є H або C₁-C₄алкілом, і Ar вибраний з групи, що складається з фенолу, заміщеного одним замісником, вибраним з групи, що складається з OH і NO₂, або двома замісниками OR, 2-тієнілу або 3-тієнілу.

25 11. Спосіб пригнічення реплікації вірусу ВІЛ-1, який включає приведення в контакт вірусу ВІЛ-1 або клітини, що містить вірус ВІЛ-1, з фармацевтичною композицією за будь-яким з пп. 1-8.