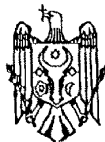




MD/EP 3428170 T2 2021.06.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3428170 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07D 498/14 (2006.01.01)
A61P 31/16 (2006.01.01)
A61K 31/5383 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

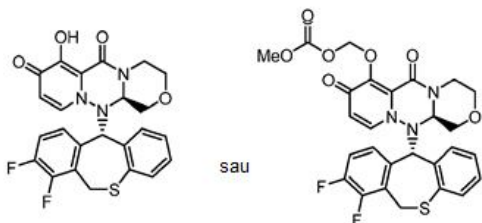
(21) Numărul de depozit: e 2019 0845 (22) Data de depozit: 2016.04.27 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18189193.8, 2016.04.27 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3428170, 2019.01.16 (31) Numărul cererii prioritare: 2015090909; 2015236844 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.04.28; 2015.12.03 (33) Țara cererii prioritare: JP; JP	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 06/2021, 2021.06.30 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 01/2021, 2021.01.06 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 09/2019, 2019.09.30
(71) Solicitant: SHIONOGI & CO., LTD, JP (72) Inventatori: KAWAI Makoto, JP; TOMITA Kenji, JP; AKIYAMA Toshiyuki, JP; OKANO Azusa, JP; MIYAGAWA Masayoshi, JP (73) Titular: SHIONOGI & CO. LTD, JP (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Derivat de piridonă policiclică anti-gripal și promedicament al acestuia

(57) Rezumat:

1
Prezenta invenție furnizează următorii compuși având activitate antivirală.

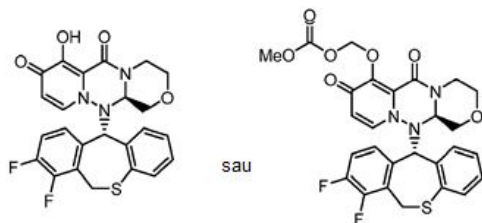
2
Revendicări: 4
Figuri: 2



(54) Anti-influenza polycyclic pyridone derivative and prodrug thereof**(57) Abstract:**

1
The present invention provides the following compounds having anti-viral activity.

2
Claims: 4
Fig.: 2



Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****[DOMENIUL TEHNIC]**

- 5 Această invenție se referă la derivați de piridonă policiclică substituită având activitate inhibitoare a endonucleazei cap-dependente, promedicamente ale acestora și compoziții farmaceutice care le includ pe acestea.

[STADIUL TEHNICII]

- 10 Gripa este o boală infecțioasă respiratorie acută cauzată de infecția cu un virus gripal. În Japonia, milioane de pacienți cu gripă-like sunt raportați în fiecare iarnă, iar gripa este însoțită de morbiditate și mortalitate ridicată. Gripa este o boală deosebit de importantă la o populație cu risc ridicat, cum ar fi bebelușii și vârstnicii, o rată de complicații cu pneumonie este mare la vârstnici, iar decesul de gripă este, în multe cazuri, prezent în rândul vârstnicilor.

- 15 Ca medicamente antigripale, sunt cunoscute Symmetrel (denumirea comercială: Amantadine) și Flumadine (denumirea comercială: Rimantadine), care inhibă procesul de denucleație a unui virus, și Oseltamivir (denumirea comercială: Tamiflu) și Zanamivir (denumirea comercială: Relenza), care sunt inhibitori ai neuraminidazei care suprimă înmugurirea virusului și eliberarea dintr-o celulă. Cu toate acestea, de vreme ce problemele apariției tulpinilor rezistente și a efectelor secundare și a unor epidemii mondiale cu un virus gripal de tip nou cu patogenitate și mortalitate ridicate sunt de temut, s-a dorit dezvoltarea unui medicament antigripal cu un mecanism nou.

- 20 Deoarece o endonuclează cap-dependentă, care este o enzimă derivată din virusul gripei, este esențială pentru proliferarea virusului și are activitate enzimatică specifică virusului, care nu este posedată de o gazdă, se crede că endonucleaza este potrivită pentru a fi ținta unui medicament anti-gripal. Endonucleaza cap-dependentă a unui virus gripal are ca substrat un precursor de ARNm gazdă și are activitatea endonucleazică pentru a produce un fragment de 9 până la 13 baze incluzând o structură de capăt (fără a include numărul de baze ale structurii de capăt). Acest fragment funcționează ca primer al unei ARN polimeraze virale și este utilizat în sintetizarea ARNm care codifică o proteină virală. Adică, se crede că o substanță care inhibă endonucleaza cap-dependentă inhibă sinteza unei proteine virale prin inhibarea sintezei de ARNm viral și, ca rezultat, inhibă proliferarea virusului.

- 25 Ca substanță care inhibă endonucleaza cap-dependentă, au fost raportate flutimida (documentul de brevet 1 și documentele non-brevet 1 și 2), acidul 2,4-dioxobutanoic 4-substituit (documentul de brevet 2 și documentele non-brevet 3 și 4), compușii descriși în documentele de brevet 3 până la 12 și altele asemenea, dar acestea nu au ajuns încă la utilizarea clinică drept medicamente anti-gripale. Documentele de brevet 9 și 12 descriu compuși având o structură similară cu cea din această invenție, dar nu descriu compușii la care se referă prezenta invenție. De asemenea, documentele de brevet 13 până la 15 descriu compuși având o structură similară cu cea din această invenție ca un compus cu activitate inhibitoare a integraziei, cu toate acestea, documentele nu descriu endonucleaza cap-dependentă. În plus, documentele de brevet 16 și 17 descriu o invenție referitoare la compuși având o structură similară cu cea din această invenție ca un compus cu activitate inhibitoare a endonucleazei cap-dependentă, care a fost depusă de solicitanți, dar nu descriu compușii la care se referă prezenta invenție.

45

[DOCUMENTE DIN STADIUL TEHNICII]**[DOCUMENTE DE BREVET]**

- 50 Document de brevet 1: GB2280435
 Document de brevet 2: US5475109
 Document de brevet 3: US20130090300
 Document de brevet 4: WO2013/057251
 Document de brevet 5: WO2013/174930
 Document de brevet 6: WO2014/023691
 55 Document de brevet 7: WO2014/043252
 Document de brevet 8: WO2014/074926
 Document de brevet 9: WO2014/108406
 Document de brevet 10: WO2014/108407
 Document de brevet 11: WO2014/108408
 60 Document de brevet 12: WO2015/038655

Document de brevet 13: WO2005/016927

Document de brevet 14: WO2006/066414

Document de brevet 15: WO2007/049675

Document de brevet 16: WO2010/147068

5 Document de brevet 17: WO2012/039414

[DOCUMENTE NON-BREVET]

Document non-brevet 1: Tetrahedron Lett 1995, 36 (12), 2005

10 Document non-brevet 2: Tetrahedron Lett 1995, 36 (12), 2009

Document non-brevet 3: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 19 decembrie 94, p. 2827-2837

Document non-brevet 4: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 19 mai 96, p. 1304-1307

[REZUMATUL INVENȚIEI]

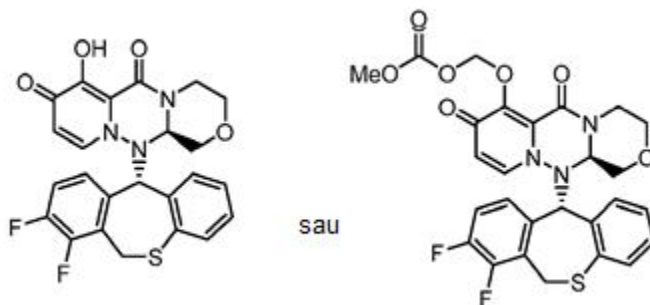
15 [PROBLEME CARE TREBUIE REZOLVATE DE INVENȚIE]

Un obiect al prezentei invenții este de a furniza compuși care au activități antivirale, în special inhibarea activității de creștere a virusului gripal. Un alt obiect al prezentei invenții este de a furniza un promedicament preparat din compuși utilizați pentru administrare in vivo (de exemplu, administrare orală), care este absorbit eficient în organism după administrare și care prezintă un efect farmacologic ridicat.

[MIJLOACE PENTRU REZOLVAREA PROBLEMELOR]

Prezenta invenție furnizează invenții prezentate mai jos.

(1) Un compus reprezentat prin următoarea formulă:



25

sau sarea sa acceptabilă farmaceutic.

(2) O compoziție farmaceutică cuprinzând compusul din (1) sau sarea sa acceptabilă farmaceutic.

(3) O compoziție farmaceutică conform (2), pentru utilizare în tratarea sau prevenirea unei infecții cu virus gripal.

30

(4) Un compus conform (1) sau sarea sa acceptabilă farmaceutic, pentru utilizare în tratarea sau prevenirea bolilor cauzate de un virus care are endonuclează cap-dependentă.

[EFECTUL INVENȚIEI]

35 Compusul conform prezentei invenții are o activitate inhibitoare asupra endonucleazei cap-dependente. Compusul mai preferat este un promedicament și promedicamentul devine un compus mamă care are o activitate inhibitoare asupra endonucleazei cap-dependente in vivo după administrare, astfel este eficient ca agent terapeutic și/sau agent preventiv pentru boala infecțioasă gripală.

40 [SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR]

[Figura 1] Figura 1 este un rezultat al măsurării concentrației plasmatice a compusului III-2, după administrarea orală a promedicamentului Compus II-6, al cărui compus mamă este Compusul III-2, la șobolan în condiții fără post.

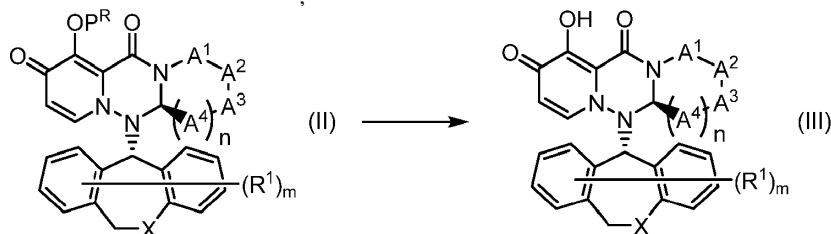
45 [Figura 2] Figura 2 este un rezultat al măsurării concentrației plasmatice a compusului II-6, după administrarea orală a promedicamentului Compus II-6, al cărui compus mamă este Compusul III-2, la șobolan în condiții fără post.

[CEL MAI BUN MOD DE REALIZARE A INVENȚIEI]

Semnificația fiecărui termen utilizat în prezenta descriere este explicată mai jos. Fiecare termen este folosit în sens unificat și este utilizat în același sens atunci când este utilizat singur sau când este utilizat în combinație cu alt termen.

Termenul „cuprinzând” înseamnă a nu restricționa cu componentele și a nu exclude factori nedescrși.

"Promedicament" se referă, în general, la un compus reprezentat prin formula (II) în următoarea formulă de reacție:



10 în care P^R este o grupare de promedicament;

A^1 este $CR^{1A}R^{1B}$, S sau O;

A^2 este $CR^{2A}R^{2B}$, S sau O;

A^3 este $CR^{3A}R^{3B}$, S sau O;

A^4 este fiecare, în mod independent, $CR^{4A}R^{4B}$, S sau O;

15 numărul de heteroatomi dintre atomii care constituie inelul care este format din A^1 , A^2 , A^3 , A^4 , atom de azot adiacent lui A^1 și atom de carbon adiacent lui A^4 , este 1 sau 2; R^{1A} și R^{1B} sunt fiecare, în mod independent, hidrogen, halogen, alchil, haloalchil, alchiloxi sau fenil;

R^{2A} și R^{2B} sunt fiecare, în mod independent, hidrogen, halogen, alchil, haloalchil, alchiloxi sau fenil;

20 R^{3A} și R^{3B} sunt fiecare, în mod independent, hidrogen, halogen, alchil, haloalchil, alchiloxi sau fenil;

R^{4A} și R^{4B} sunt fiecare, în mod independent, hidrogen, halogen, alchil, haloalchil, alchiloxi sau fenil;

25 R^{3A} și R^{3B} pot fi luați împreună cu un atom de carbon adiacent pentru a forma carbociclu non-aromatic sau heterociclu non-aromatic;

X este CH_2 , S sau O;

R^1 este fiecare, în mod independent, halogen, hidroxi, alchil, haloalchil sau alchiloxi;

m este orice număr întreg de la 0 la 2; și

n este orice număr întreg de la 1 la 2,

30 , sau sarea sa acceptabilă farmaceutic, și înseamnă un compus care prezintă activitate inhibitoare a endonucleazei cap-dependente (CEN) și/sau efect inhibitor al CPE prin transformarea într-un compus reprezentat prin formula (III) printr-o reacție de descompunere cauzată de enzimele de metabolizare a medicamentului, hidrolaze, acizi gastrici, enterobacterii etc., în condiții fiziologice in vivo.

35 Promedicamentul înseamnă mai preferabil un compus în care biodisponibilitatea și/sau ASC (aria sub curba concentrației în sânge) în administrare in vivo este îmbunătățită mai mult decât cele ale compusului reprezentat de formula (III).

Prin urmare, promedicamentul este absorbit în mod eficient în organism în stomac și/sau intestine după administrare in vivo (de exemplu, administrare orală), apoi transformat în compusul reprezentat de formula (III). Astfel, promedicamentul prezintă, de preferință, un efect de tratare și/sau prevenire a gripei mai mare decât compusul reprezentat de formula (III).

Prezenta invenție este caracterizată prin aceea că compusul izolat prin descompunere optică a compușilor tricyclici substituiți de cealaltă grupare tricyclică îmbunătățește activitatea inhibitoare a endonucleazei cap-dependente.

45 Prezenta invenție este, de asemenea, caracterizată prin aceea că prezentul compus este absorbit în mod eficient în corp după administrare (de exemplu, administrare orală) și prezintă o eficacitate ridicată prin introducerea unei grupări pentru a forma un promedicament.

Sărurile acceptabile farmaceutic ale compușilor prezentei invenții includ, de exemplu, săruri cu metal alcalin (de exemplu, litiu, sodiu, potasiu sau altele asemenea), metal alcalino pământos (de exemplu, calciu, bariu sau altele asemenea), magneziu, metal de tranziție (de exemplu, zinc, fier sau altele asemenea), amoniac, baze organice (de exemplu, trimetilamină, trietilamină, diciohexilamină, etanolamină, dietanolamină, trietanolamină, meglumină, etilendiamină, piridină, picolină, chinolină sau altele asemenea) sau aminoacizi sau săruri cu acizi anorganici (de exemplu, acid clorhidric, acid sulfuric, acid azotic, acid carbonic, acid bromhidric,

acid fosforic, acid iodhidric sau altele asemenea) sau acizi organici (de exemplu, acid formic, acid acetic, acid propionic, acid trifluoroacetic, acid citric, acid lactic, acid tartric, acid oxalic, acid maleic, acid fumaric, acid mandelic, acid glutaric, acid malic, acid benzoic, acid italic, acid ascorbic, acid benzensulfonic, acid p-toluensulfonic, acid metansulfonic, acid etansulfonic sau altele asemenea). În special, sunt incluse sărurile cu acid clorhidric, acid sulfuric, acid fosforic, acid tartric, acid metansulfonic și altele asemenea. Aceste săruri pot fi formate prin metodele uzuale.

Compușii prezentei invenții sau sărurile lor acceptabile farmaceutic pot forma solvați (de exemplu, hidrați sau altele asemenea) și/sau forme polimorfe de cristal. Prezentă invenție cuprinde diferiți solvați și forme polimorfe de cristal. "Solvați" pot fi cei în care orice număr de molecule de solvent (de exemplu, molecule de apă sau altele asemenea) sunt coordonate cu compușii prezentei invenții. Când compușii prezentei invenții sau sărurile lor acceptabile farmaceutic sunt lăsate să stea în atmosferă, compușii pot absorbi apa, rezultând atașarea apei adsorbite sau formarea de hidrați. Recristalizarea compușilor prezentei invenții sau a sărurilor lor acceptabile farmaceutic poate produce forme polimorfe de cristal.

(Metodă de producere a compusului din prezenta invenție)

O metodă generală pentru producerea compusului din prezenta invenție va fi exemplificată mai jos. În ceea ce privește extracția și purificarea, poate fi efectuat un tratament care se efectuează într-un experiment normal de chimie organică.

Sinteza compusului din prezenta invenție poate fi realizată prin referire la procedurile cunoscute în domeniu.

Ca un compus de materie primă, pot fi utilizați compuși disponibili comercial, compuși descriși în prezenta descriere, compuși descriși în referințele citate în prezenta descriere și alți compuși cunoscuți.

Când se dorește să se obțină o sare a compusului prezentei invenții, în cazul în care compusul prezentei invenții este obținut sub formă de sare, acesta poate fi purificat ca atare și, în cazul în care compusul din prezenta invenție se obține într-o formă liberă, se poate forma o sare printr-o metodă normală prin dizolvarea sau suspendarea compusului într-un solvent organic adecvat și adăugarea unui acid sau a unei baze.

În plus, compusul prezentei invenții și o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia sunt prezenți într-o formă de aducți (produși de adicție) cu apă sau diferiți solvenți (hidrat sau solvat) în unele cazuri, iar acești aducți sunt incluși în prezenta invenție.

Compusul prezentei invenții are activitate inhibitoare a endonucleazei cap-dependente și este util ca agent terapeutic sau preventiv pentru gripă.

Compusul prezentei invenții este util pentru simptome și/sau boli care sunt induse de virusul gripal. De exemplu, aceștia sunt utili pentru tratarea și/sau prevenirea sau îmbunătățirea simptomelor, simptomelor asemănătoare răcelii însoțitoare febră, frisoane, cefalee, durere musculară, stare generală de rău etc., simptome de inflamație a căilor respiratorii cum ar fi durere de gat, secreție nazală, congestie nazală, tuse, spută etc., simptome gastro-intestinale, cum ar fi dureri abdominale, vărsături, diaree etc. și, în plus, complicații care însoțesc infecția secundară, cum ar fi encefalopatia acută și pneumonia.

Compusul prezentei invenții nu numai că are activitate inhibitoare a endonucleazei cap-dependente, dar este, de asemenea, util ca medicament și are oricare sau toate dintre următoarele caracteristici excelente:

- a) Compusul este un inhibitor slab al enzimelor CYP (de exemplu, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 și altele asemenea).
- b) Compusul demonstrează o farmacocinetică bună, cum ar fi o biodisponibilitate ridicată, un clearance moderat și altele asemenea.
- c) Compusul are o stabilitate metabolică ridicată.
- d) Compusul nu are acțiune inhibitoare ireversibilă împotriva enzimelor CYP (de exemplu, CYP3A4) atunci când concentrația se încadrează în domeniul descris în prezenta descriere ca și condițiile de măsurare.
- e) Compusul nu are mutagenitate.
- f) Compusul este asociat cu un risc cardiovascular scăzut.
- g) Compusul are o solubilitate ridicată.
- h) Compusul nu are fototoxicitate.

În scopul tratării bolilor menționate mai sus la om, compușii prezentei invenții pot fi administrați oral sub formă de pulbere, granule, tablete, capsule, pastile, lichid și altele asemenea, sau parenteral sub formă de injecție, supozitoare, medicament percutanat, un inhalant și altele asemenea. Dozele eficiente ale compușilor prezenți pot fi amestecate cu excipienți adecvați pentru forma de dozare, cum ar fi umpluturi, lianți, umectanți, dezintegratori și lubrifianți, după caz,

pentru a forma preparate farmaceutice. Pentru pregătirea unei injecții, sterilizarea se efectuează cu un purtător adecvat.

Compozițiile farmaceutice conform prezentei invenții pot fi administrate fie oral, fie parenteral. Pentru administrare orală, forme de dozare utilizate în mod obișnuit, cum ar fi tablete, granule, pulbere și capsule, pot fi preparate în conformitate cu metodele convenționale. Pentru administrare parenterală, orice formă de dozare frecvent utilizată, cum ar fi o injecție, poate fi utilizată în mod adecvat. Compușii conform prezentei invenții pot fi utilizați, în mod adecvat, ca preparate orale datorită absorbabilității lor orale ridicate.

Dozele eficiente ale compușilor prezentei invenții pot fi amestecate cu diverși excipienți farmaceutici adecvați pentru forma de dozare, cum ar fi umpluturi, lianți, dezintegratori și lubrifianți, după caz, pentru a forma compoziții farmaceutice.

Doza depinde de starea de boală, de calea de administrare sau de vârsta sau greutatea pacientului. Doza orală uzuală pentru adulți este de 0,1 până la 100 mg/kg pe zi, de preferință 1 până la 20 mg/kg pe zi.

Doza din compoziția farmaceutică conform prezentei invenții este determinată, de preferință, în funcție de vârsta și greutatea pacientului, tipul și severitatea bolii, calea de administrare și altele asemenea. Doza orală uzuală pentru adulți este cuprinsă între 0,05 și 100 mg/kg pe zi, de preferință 0,1 până la 10 mg/kg pe zi. Doza parenterală pentru adulți variază semnificativ în funcție de calea de administrare, dar este, de obicei, în intervalul 0,005 până la 10 mg/kg pe zi, de preferință 0,01 până la 1 mg/kg pe zi. Doza poate fi administrată o dată pe zi sau poate fi împărțită în doze zilnice multiple.

Compusul conform prezentei invenții poate fi utilizat în combinație cu alte medicamente sau altele asemenea (denumite în continuare medicamente combinate) pentru a crește activitatea compusului, pentru a reduce doza de compus sau altele asemenea. În cazul tratării gripei, compusul poate fi utilizat combinat cu sau într-o formulare cuplată cu inhibitor de neuraminidază (de exemplu, Oseltamivir, Zanamivir, Peramivir, Inabiru și altele asemenea); inhibitor de ARN polimerază dependent de ARN (de exemplu, Favipiravir); inhibitor de proteină M2 (de exemplu, amantadină); inhibitor al legării la capăt PB2 (de exemplu, VX-787); anticorp anti-HA (de exemplu, MHAA4549A); agonști imuni (de exemplu, nitazoxanidă) sunt, de asemenea, posibili. În acest caz, programarea în timp a administrării pentru un compus al prezentei invenții și medicamentul combinat nu este limitată. Acestea pot fi administrate subiecților care urmează să fie tratați, în același timp sau la momente diferite. Mai mult, un compus al prezentei invenții și medicamentul combinat pot fi administrate ca două sau mai multe formulări cuprinzând, în mod independent, fiecare ingredient activ sau o singură formulare cuprinzând fiecare ingredient activ.

Doza pentru medicamentele combinate poate fi selectată în mod corespunzător în raport cu doza clinică. Raportul de combinare a compușilor prezentei invenții și a medicamentelor co-administrate poate fi selectat, în mod corespunzător, în funcție de subiectul care urmează să fie tratat, calea de administrare, boala de tratat, simptome, combinația de medicamente și altele asemenea. Pentru administrare la om, de exemplu, o parte în greutate a compușilor prezentei invenții poate fi utilizată în combinație cu 0,01 până la 100 părți în greutate de medicamente administrate concomitent.

Prezenta invenție va fi explicată mai detaliat mai jos, prin intermediul exemplelor, precum și a Exemplelor de testare ale prezentei invenții, dar prezenta invenție nu este limitată de acestea.

Analiza RMN obținută în exemplu a fost efectuată la 300 MHz și a fost măsurată folosind DMSO-d₆, CDCl₃.

În exemple, semnificația fiecărei abrevieri este după cum urmează.

Boc: terț-butoxicarbonil

DBU: diazabicycloundecenă

DMA: N,N-dimetilacetamidă

DMF: N,N-dimetilformamidă

OBn: benziloxi

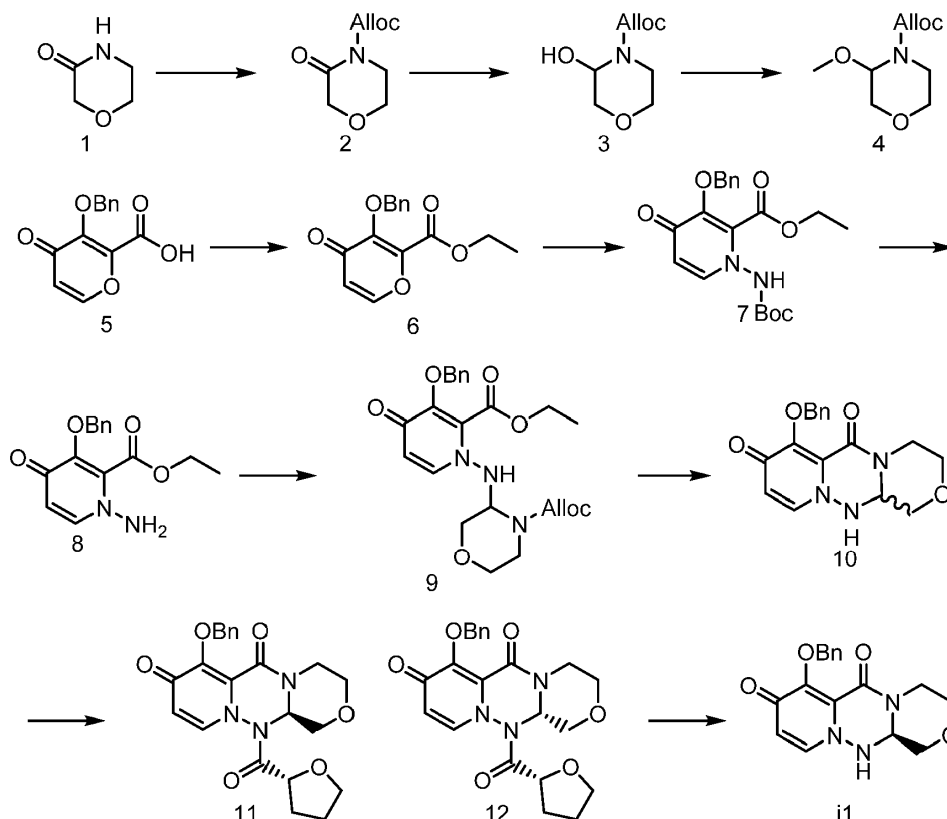
THF: tetrahidrofuran

T3P: anhidridă propil fosfonică

Sensul ascendent și sensul descendent ale „penei” și „penei cu linie întreruptă” indică configurația absolută.

Exemplul 1-1

8



Prima etapă

La o soluție de compus **1** (5,0 g, 49,5 mmol) în THF (100 mL) s-a adăugat prin picurare 1,62 mol/L n-butilitru în hexan (30,5 mL, 49,5 mmol) la -78°C sub atmosferă de azot și amestecul a fost agitat la -78°C timp de 2 ore. O soluție de alil cloroformiat (5,96 g, 49,5 mmol) în THF (20 ml) a fost adăugată prin picurare la acesta și amestecul a fost agitat la -78°C timp de 2 ore. Amestecul a fost stins cu o soluție apoasă saturată de clorură de amoniu, încălzit la temperatura camerei și extras cu acetat de etil. Stratul organic obținut a fost spălat cu saramură, uscat pe sulfat de magneziu anhidru și concentrat sub presiune redusă pentru a obține Compusul **2** (5,66 g, 62%).

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 3,83 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 3,92 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 4,26 (s, 2H), 4,78 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 5,30 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 5,44 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 5,93-6,03 (m, 1H), a doua etapă

La o soluție de compus **2** (6,6 g, 35,6 mmol) în THF (66 ml) s-a adăugat prin picurare 1,03 mol/L DIBAL-H în hexan (45,0 ml, 46,3 mmoli) și amestecul a fost agitat la -78°C timp de 1 oră. Amestecul a fost stins cu acetonă, la aceasta s-a adăugat o soluție apoasă de sare Rochelle. Amestecul a fost agitat și extras cu acetat de etil. Stratul organic obținut a fost spălat cu saramură, uscat pe sulfat de magneziu anhidru și concentrat sub presiune redusă pentru a obține Compusul **3** (6,21 g, 93%).

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 3,44 (br, 1H), 3,50-3,64 (m, 2H), 3,71 (br, 1H), 3,95 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 4,64 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 5,24 (d, J = 12,0 Hz, 1H), 5,40 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 5,47 (d, J = 4 Hz, 1H), 5,87-6,00 (m, 1H)

A treia etapă

La o soluție de compus **3** (6,2 g, 33,1 mmoli) în metanol (65 ml) s-a adăugat acid p-toluensulfonic monohidrat (0,63 g, 3,31 mmoli) și amestecul a fost agitat la temperatura camerei peste noapte. Amestecul a fost stins cu o soluție apoasă de carbonat acid de sodiu, concentrat și extras cu acetat de etil. Stratul organic obținut a fost spălat cu saramură, uscat pe sulfat de magneziu anhidru și concentrat sub presiune redusă pentru a obține Compusul **4** (5,77 g, 87%).

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 3,34 (s, 3H), 3,55 (br, 2H), 3,73-3,99 (m, 3H), 4,64 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 5,10-5,20 (m, 1H), 5,25 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,33 (d, J = 16 Hz, 1H), 5,88-6,05 (m, 1H)

A patra etapă

La o soluție de compus **5** (20,0 g, 81 mmol) în DMF (100 ml) s-au adăugat iodură de etil (22,8 g, 146 mmoli) și diazabicycloundecenă (18,4 ml, 122 mmoli) și amestecul a fost agitat la temperatura camerei peste noapte. Amestecul a fost turnat într-o soluție apoasă 10% de clorură de amoniu și extras cu acetat de etil. Stratul organic obținut a fost spălat cu saramură, uscat pe sulfat

de magneziu anhidru și concentrat sub presiune redusă pentru a obține Compusul 6 (22,3 g, 100%).

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1,23 (t, J = 8,0Hz, 3H), 4,28 (q, J = 8,0Hz, 2H), 5,16 (s, 2H), 6,57 (d, J = 4,0Hz, 1H), 7,28-7,48 (m, 5H), 8,21 (d, J = 4,0Hz, 1H).

5 A cincea etapă

La o soluție de compus 6 (500 mg, 1,82 mmol) în DMA (5,0 mL) s-au adăugat p-toluensulfonat de piridiniu (1,37 g, 5,47 mmol) și Boc-hidrazină (361 mg, 2,74 mmol) și amestecul a fost agitat la 60°C timp de 14 ore. La amestec a fost adăugată apă și amestecul a fost extras cu acetat de etil. Stratul organic obținut a fost spălat cu o soluție apoasă saturată de clorură de amoniu și saramură, uscat pe sulfat de magneziu anhidru și concentrat sub presiune redusă. Reziduul obținut a fost purificat prin cromatografie pe coloană de silicagel (cloroform-metanol) pentru a obține Compusul 7 (519 mg, 73%).

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1,24 (t, J = 8,0Hz, 3H), 1,46 (s, 9H), 4,26 (q, J = 8,0Hz, 2H), 5,28 (s, 2H), 6,40 (d, J = 8,0Hz, 1H), 7,27-7,38 (m, 4H), 7,40-7,45 (m, 2H).

15 A șasea etapă

Compusul 7 (500 mg, 1,29 mmol) a fost dizolvat în 4mol/L clorură acidă în acetat de etil (5 mL) și amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 1 oră. Amestecul a fost concentrat sub presiune redusă. La reziduul obținut s-a adăugat o soluție apoasă saturată de carbonat acid de sodiu și amestecul a fost extras cu diclormetan. Stratul organic obținut a fost spălat cu saramură, uscat pe sulfat de magneziu anhidru și concentrat sub presiune redusă pentru a obține compusul 8 (369 mg, 99%).

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1,26 (t, J = 8,0Hz, 3H), 4,31 (q, J = 8,0Hz, 2H), 5,24 (s, 2H), 6,47 (d, J = 8,0, 1H), 7,28-7,44 (m, 5H), 7,64 (d, J = 8,0, 1H).

A șaptea etapă

La o soluție de compus 8 (365 mg, 1,27 mmol) și compus 4 (306 mg, 1,52 mmol) în acetonitril (8 mL) s-a adăugat în picătură clorură de staniu (0,223 mL, 1,90 mmol) la -25°C sub o atmosferă de azot și amestecul a fost agitat la -25°C timp de 45 de minute. Amestecul a fost stins cu o soluție apoasă saturată de carbonat acid de sodiu și la acesta s-a adăugat diclormetan. Amestecul a fost agitat la temperatura camerei și filtrat prin celită și filtratul a fost extras cu diclormetan. Stratul organic obținut a fost spălat cu saramură, uscat pe sulfat de magneziu anhidru și concentrat sub presiune redusă pentru a obține compusul 9 brut. Compusul 9 obținut a fost dizolvat în THF (8 mL), morfolină (1,10 mL, 12,7 mmoli) și tetrakis(trifenilfosfin) paladiu (146 mg, 0,127 mmol) s-au adăugat la acesta și amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 2 ore. La amestec s-a adăugat dietil eter (16 mL) și solidul precipitat a fost filtrat și uscat pentru a obține compusul 10 (418 mg, 100%). ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 2,90-2,99 (m, 1H), 3,13 (t, J = 12,0Hz, 1H), 3,40-3,46 (m, 1H), 4,00-4,08 (m, 1H), 4,14 (d, J = 12,0Hz, 1H), 5,07 (s, 2H), 6,22 (d, J = 8,0Hz, 1H), 7,29-7,40 (m, 3H), 7,56 (d, J = 8,0Hz, 2H), 7,71 (d, J = 8,0Hz, 1H) A opta etapă

La o suspensie de acid (R)-2-tetrahidrofuroic (855 mg, 7,36 mmol) și compusul 10 (2,00 g, 6,11 mmol) în acetat de etil (9 mL) s-au adăugat piridină (4,00 mL, 49,6 mmol) și T3P (50 % în acetat de etil, 11,0 mL, 18,5 mmol) la temperatura camerei și amestecul a fost agitat peste noapte. Solidul precipitat a fost filtrat și spălat cu acetat de etil (4 mL) și etanol (4 mL). Solidul obținut a fost suspendat în etanol (6 mL) și suspensia a fost agitată la temperatura camerei timp de 6,5 ore. Suspensia a fost filtrată și solidul obținut a fost spălat cu etanol (2 mL) de două ori pentru a obține Compusul 11 (1,18 g, 45,4%).

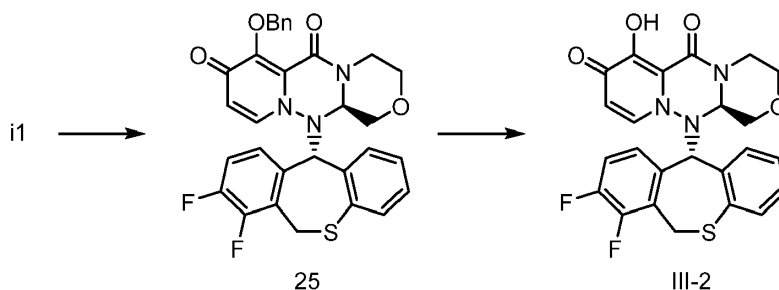
¹H-RMN (DMSO) δ: 1,80-1,94 (m, 2H), 1,95-2,14 (m, 2H), 3,21-3,35- (m, 2H), 3,50-3,6 0 (m, 1H), 3,70-3,82 (m, 3H), 4,00-4,05 (m, 1H), 4,32-4,38 (m, 1H), 5,14 (dd, J = 10,8Hz, 21,6Hz, 2H), 5,76-5,81 (m, 1H), 6,29 (d; J = 4,8Hz, 1H), 7,28-7,39 (m, 3H), 7,48-7,54 (m, 2H), 7,64-7,75 (m, 1H)

A noua etapă

La o suspensie de compus 11 (500 mg, 1,18 mmol) în etanol (3,5 mL) s-a adăugat DBU (0,0035 mL, 0,023 mmol) la temperatura camerei și amestecul a fost agitat timp de 30 minute. La suspensia obținută s-a adăugat diizopropileter (6,5 mL) și amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 30 de minute. Solidul precipitat s-a filtrat și s-a spălat cu acetat de etil (1,5 mL) de două ori pentru a se obține Compusul 11 (346 mg, 89,9%).

¹H-RMN (DMSO) δ: 2,80-3,00 (m, 1H), 3,10-3,18 (m, 1H), 3,38-3,50 (m, 1H), 3,98-4,0 8 (m, 2H), 4,10-4,20 (m, 1H), 4,76-4,84 (m, 1H), 5,04-5,14 (m, 2H), 6,22 (m, J = 7,6Hz, 1H), 7,27-7,40 (m, 4H), 7,56-7,60 (m, 2H), 7,70 (d, J = 7,6 Hz, 1 H)

Exemplul 1-2



Prima etapă

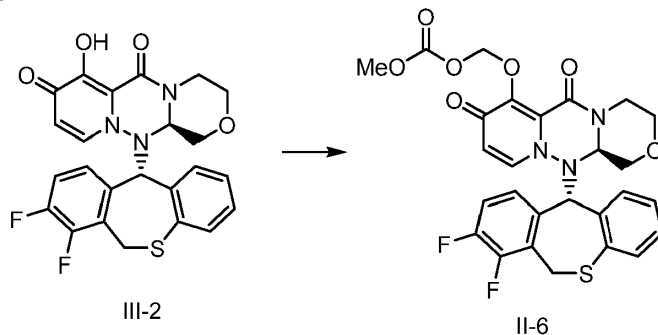
Compusul i1 (1100 g, 3360 mmol) și 7,8-difluoro-6,11-dihidrodibenzotiepin-11-ol (977 g, 3697 mmol) au fost suspendate în 50%, în greutate, T3P în acetat de etil (3208 g, 5041 mmol) și etil acetat (1,1 L). La amestec s-a adăugat acid metansulfonic (436 ml, 6721 mmol) la temperatura camerei și amestecul a fost agitat la 70°C timp de 5,5 ore. La amestec s-a adăugat apă sub baie de gheață-apă și amestecul s-a agitat la temperatura camerei timp de 1 oră. La aceasta s-a adăugat THF și amestecul a fost extras cu acetat de etil. Stratul organic obținut a fost spălat cu apă și soluție apoasă 8% de carbonat acid de sodiu, uscat pe sulfat de sodiu anhidru și concentrat sub presiune redusă. Reziduul obținut dizolvat în THF (5,5 L) și carbonat de potasiu (790 g, 5713 mmol), a fost adăugat la acesta. Amestecul a fost încălzit până la 50°C, bromura de benzil (240 ml, 2016 mmol) a fost adăugată prin picurare la acesta și amestecul a fost agitat la 60°C timp de 8,5 ore. La amestec s-a adăugat prin picurare 2mol/L soluție apoasă de acid clorhidric sub baie de gheață-apă și amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de 10 minute și extras cu acetat de etil. Stratul organic obținut a fost spălat cu apă și soluție apoasă 8% de carbonat acid de sodiu și uscat pe sulfat de magneziu anhidru. La acesta s-a adăugat un cărbune activ (Norit SX-2, 240 g), amestecul a fost filtrat prin celită și filtratul a fost concentrat sub presiune redusă. 25 (1019 g, 1776 mmol, 53%).

¹H-RMN (CDCl₃) δ: 2,88 (1H, t, J = 11,2 Hz), 3,28-3,39 (2H, m), 3,72 (1H, d, J = 12,6 Hz), 3,86 (1H, d, J = 9,6 Hz), 4,03 (1H, d, J = 13,9 Hz), 4,45 (1H, d, J = 8,6 Hz), 4,67 (1H, d, J = 13,1 Hz), 5,19-5,26 (2H, m), 5,45 (1H, d, J = 10,9 Hz), 5,63 (1H, d, J = 10,9 Hz), 5,77 (1H, d, J = 7,6 Hz), 6,40 (1H, d, J = 7,8 Hz), 6,68 (1H, t, J = 6,9 Hz), 6,94-7,01 (2H, m), 7,03-7,12 (3H, m), 7,29-7,38 (3H, m), 7,61 (2H, d, J = 7,1 Hz).

A doua etapă

La o soluție de compus 25 (1200 g, 2092 mmol) în DMA (3,6 L) s-a adăugat clorură de litiu (443g, 10,5 mol) la temperatura camerei și amestecul a fost agitat la 80°C timp de 3 ore. La amestec s-au adăugat acetonă (1,2 L), 0,5 ml/L soluție apoasă de acid clorhidric (6,0 L) și apă (2,4 L) sub baie de apă de gheață și amestecul a fost agitat timp de 1 oră. Solidul precipitat a fost filtrat. Solidul obținut a fost dizolvat în cloroform, s-a adăugat eter izopropilic și solidul presipitat a fost filtrat pentru a obține compusul III-2 (950 g, 1965 mmol, 94%). ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 2,99 (1H, dt, J = 17,5, 6,8 Hz), 3,47 (1H, td, J = 11,9, 2,5 Hz), 3,60 (1H, t, J = 10,6 Hz), 3,81 (1H, dd, J = 11,9, 3,3 Hz), 3,96 (1H, dd, J = 11,0, 2,9 Hz), 4,07 (1H, d, J = 13,8 Hz), 4,58 (1H, dd, J = 10,0, 2,9 Hz), 4,67 (1H, dd, J = 13,5, 1,9 Hz), 5,26-5,30 (2H, m), 5,75 (1H, d, J = 7,8 Hz), 6,69 (1H, d, J = 7,7 Hz), 6,83-6,87 (1H, m), 6,99-7,04 (2H, m), 7,07-7,15 (3H, m).

Exemplul 2



La o suspensie de compus III-2 (1,00 g, 2,07 mmol) în DMA (5 ml) s-au adăugat clorometil metil carbonat (0,483 g, 3,10 mmol), carbonat de potasiu (0,572 g, 4,14 mmol) și iodură de potasiu (0,343 g, 2,07 mmol) și amestecul a fost agitat la 50°C timp de 6 ore. La amestec s-a adăugat DMA (1 ml) și amestecul a fost agitat timp de 6 ore. Amestecul a fost răcit la temperatura camerei, s-a adăugat DMA (6 ml) la acesta și amestecul a fost agitat la 50°C timp de 5 minute. Amestecul a fost filtrat. La filtratul obținut s-au adăugat 1mol/L soluție apoasă de acid clorhidric (10 ml) și apă (4 ml) și amestecul a fost agitat timp de 1 oră. Solidul precipitat a fost filtrat și uscat

sub presiune redusă la 60°C timp de 3 ore pentru a obține Compusul II-6 (1,10 g, 1,93 mmol, 93%).

1H-RMN (DMSO-D6) δ : 2,91-2,98 (1H, m), 3,24-3,31 (1H, m), 3,44 (1H, t, J = 10,4 Hz), 3,69 (1H, dd, J = 11,5, 2,8 Hz), 3,73 (3H, s), 4,00 (1H, dd, J = 10,8, 2,9 Hz), 4,06 (1H, d, J = 14,3 Hz), 4,40 (1H, d, J = 11,8 Hz), 4,45 (1H, dd, J = 9,9, 2,9 Hz), 5,42 (1H, dd, J = 14,4, 1,8 Hz), 5,67 (1H, d, J = 6,5 Hz), 5,72-5,75 (3 H, m), 6,83-6,87 (1 H, m), 7,01 (1 H, d, J = 6,9 Hz), 7,09 (1 H, dd, J = 8,0, 1,1 Hz), 7,14-7,18 (1 H, m), 7,23 (1 H, d, J = 7,8 Hz), 7,37-7,44 (2H, m).

Deoarece compusul II-6 al prezentei invenții este un promedicament și, prin urmare, are avantajele că absorbabilitatea orală este ridicată, prezintă o bună biodisponibilitate, prezintă un clearance bun și tranzitivitatea pulmonară este mare, el poate fi un medicament excelent. Deoarece compusul III-2 mamă al prezentei invenții are efecte cum ar fi o activitate inhibitorie ridicată asupra endonucleazei dependente de structura capacului și o selectivitate ridicată datorită unei enzime specifice virusului, acesta poate fi un medicament cu efecte secundare reduse.

Mai mult, compușii II-6 și III-2 ai prezentei invenții prezintă, de asemenea, avantajele că stabilitatea metabolismului este ridicată, solubilitatea este ridicată, absorbabilitatea orală este ridicată, prezintă o bună biodisponibilitate, prezintă un clearance bun, tranzitivitatea pulmonară este mare, perioada de înjumătățire este lungă, lipsa de legare la proteine este mare, inhibarea canalului hERG este scăzută, inhibarea CYP este scăzută, efectul inhibitor al CPE (Efect CitoPatic) este recunoscut și/sau este prezentată negativitate într-un test de fototoxicitate, un test Ames și un test de toxicitate genică, sau toxicitate cum ar fi afectarea ficatului nu este provocată. Prin urmare, compușii în legătură cu prezenta invenție pot fi medicamente excelente.

Exemplul de test 1: Măsurarea activității inhibitoare a endonucleazei cap-dependente (CEN)

1) Pregătirea substratului

ARN 30mer (5'-pp-[m2'-O]GAA UAU (-Cy3) GCA UCA CUA GUAAGC UUU GCU CUA-BHQ2-3': fabricat de Japan Bio Services Co., LTD.) în care G la capătul 5' este modificată cu difosfat, o grupare hidroxil în poziția 2' este modificată prin metoxilare, U al șaselea de la capătul 5' este marcat cu Cy3 și un capăt 3' este marcat cu BHQ2 și s-a adăugat o structură de capăt folosind sistem ScriptCap fabricat de EPICENTER (un produs a fost m7G [5']-ppp-[5'] [m2'-O]GAA UAU (-Cy3) GCA UCA CUA GUA AGC UUU GCU CUA (-BHQ2-3')). Acesta a fost separat și purificat prin electroforeză în gel de poliacrilamidă denaturată și utilizat ca substrat.

2) Prepararea enzimei

RNP a fost preparată dintr-o particulă de virus folosind metoda standard (document de referință: VIROLOGY (1976) 73, p327-338 OLGA M. ROCHOVANSKY). Mai exact, virusul A/WSN/33 (1 x 10³ PFU/ml, 200 μ l) a fost inoculat într-un ou de pui embrionat cu vârsta de 10 zile. După incubare la 37°C timp de 2 zile, fluidul alantoidian al oului de pui a fost recuperat. O particulă de virus a fost purificată prin ultracentrifugare folosind zaharoză 20%, solubilizată folosind TritonX-100 și lizolecitină și o fracție RNP (fracție de glicerol 50-70%) a fost colectată prin ultracentrifugare utilizând un gradient de densitate glicerol 30-70% și a fost utilizată ca o soluție enzimatică (care conține aproximativ 1 nM complex PB1-PB2-PA).

3) Reacție enzimatică

O soluție de reacție enzimatică (2,5 μ l) (compoziție: Tris-clorhidrat 53 mM (pH 7,8), 1 mM MgCl₂, 1,25 mM diotitol, 80 mM NaCl, 12,5% glicerol, soluție enzimatică 0,15 μ l) a fost distribuită într-o placă cu 384 godeuri realizată din polipropilenă. Apoi, 0,5 μ l dintr-o soluție de compus de testat care a fost diluată în serie cu dimetil sulfoxid (DMSO) a fost adăugată pe placă. Ca un martor pozitiv (PC) sau un martor negativ (NC), s-au adăugat la placă 0,5 μ l de DMSO. Fiecare placă a fost amestecată bine. Apoi, s-au adăugat 2 μ l dintr-o soluție de substrat (ARN de substrat 1,4 nM, 0,05% Tween20) pentru a iniția o reacție. După incubarea la temperatura camerei timp de 60 de minute, 1 μ l din soluția de reacție a fost colectat și adăugat la 10 μ l dintr-o soluție de formamidă Hi-Di (care conține GeneScan 120 Liz Size Standard ca marker de dimensionare: fabricat de Applied Biosystems (ABI)) pentru a opri reacția. Pentru NC, reacția a fost oprită în prealabil prin adăugarea de EDTA (4,5 mM) înainte de inițierea reacției (toate concentrațiile descrise mai sus sunt concentrații finale).

3) Măsurarea raportului de inhibare (valoare IC₅₀)

Soluția pentru care s-a oprit reacția a fost încălzită la 85°C timp de 5 minute, răcită rapid pe gheață timp de 2 minute și analizată cu un analizor genetic ABI PRISM 3730. Un vârf al produsului endonuclează cap-dependente a fost cuantificat prin software-ul de analiză ABI Genemapper, s-a obținut un raport de inhibare a reacției CEN (%) a unui compus testat prin stabilirea intensităților fluorescente ale PC și NC ca fiind 0% inhibare și, respectiv, 100% inhibare, o valoare IC₅₀ a fost obținută utilizând software-ul de ajustare a curbei (XLfit2.0: Model 205 (fabricat de IDBS) etc.).

Exemplul de test 2: testul de confirmare a efectului inhibitor al CPE

<Material>

- ☐ 2% FCS E-MEM (preparat prin adăugarea de kanamicină și FCS la MEM (mediu esențial minim) (Invitrogen))
- ☐ 0,5% BSA E-MEM (preparat prin adăugarea de kanamicină și BSA la MEM (mediu esențial minim) (Invitrogen))
- ☐ HBSS (soluție de sare echilibrată Hanks')
- ☐ Celula MDBK
- Celulele au fost ajustate la numărul de celule adecvat (3×10^5 / ml) cu 2% FCS E-MEM.
- ☐ Celula MDCK
- După spălare cu HBSS de două ori, celulele au fost ajustate la numărul corespunzător de celule (5×10^5 / ml) cu 0,5% BSA E-MEM.
- ☐ Soluție de tripsină
- Tripsina din pancreas porcine (SIGMA) a fost dizolvată în PBS (-) și filtrată cu un filtru de 0,45 μ m.
- ☐ EnVision (PerkinElmer)
- ☐ Kit WST-8 (Kishida Chemical Co., Ltd.)
- ☐ 10% Soluție SDS

<Procedura de operare>

• Diluarea și distribuirea probei de testat

- Ca mediu de cultură, 2% FCS E-MEM a fost utilizat la utilizarea celulelor MDBK și 0,5% BSA E-MEM a fost utilizat la utilizarea celulelor MDCK. În continuare, pentru diluarea virusului, a celulelor și a unei probe de testare, a fost utilizat același mediu de cultură.

- O probă de test a fost diluată cu un mediu de cultură până la o concentrație adecvată în prealabil și apoi s-a preparat o diluție în serie de 2 până la 5 ori pe o placă cu 96 de godeuri (50 μ l/godeu). Au fost preparate două plăci, una pentru măsurarea activității anti-gripale și cealaltă pentru măsurarea citotoxicității. Fiecare test a fost efectuat în triplicat pentru fiecare medicament.

La utilizarea celulelor MDCK, Tripsina a fost adăugată la celule încât să fie o concentrație finală de 3 μ g/ml numai pentru măsurarea activității anti-gripale.

• Diluarea și distribuirea virusului gripal

- Un virus gripal a fost diluat cu un mediu de cultură la o concentrație adecvată în avans și fiecare 50 μ l/godeu a fost distribuit pe o placă cu 96 de godeuri conținând o substanță de testat. Fiecare 50 μ l/godeu dintr-un mediu de cultură a fost distribuit pe o placă conținând o substanță de testat pentru măsurarea citotoxicității.

• Diluarea și distribuirea celulelor

- Fiecare 100 μ l/godeu de celule care fuseseră ajustate la numărul de celule adecvat a fost distribuit pe o placă cu 96 de godeuri conținând o probă de testare.

Aceasta a fost amestecată cu un mixer de plăci și incubată într-un incubator cu CO₂ timp de 3 zile pentru măsurarea activității anti-gripale și măsurarea citotoxicității.

• Distribuția WST-8

- Celulele din placa cu 96 de godeuri care au fost incubate timp de 3 zile, au fost observate vizual la microscop și au fost verificate aspectul celulelor, prezența sau absența unui cristal de substanță de testat. Supernatantul a fost îndepărtat astfel încât celulele să nu fie absorbite din placă.

- Kitul WST-8 a fost diluat de 10 ori cu un mediu de cultură și fiecare 100 μ l a fost distribuit în fiecare godeu. După amestecarea cu un mixer de plăci, celulele au fost incubate într-un incubator cu CO₂ timp de 1 până la 3 ore.

După incubare, examinarea plăcii pentru măsurarea activității anti-gripale, fiecare 10 μ l/godeu dintr-o soluție SDS 10% a fost distribuit pentru a inactiva un virus.

• Măsurarea absorbantei

- După amestecarea plăcii cu 96 de godeuri, absorbanta a fost măsurată cu EnVision la două lungimi de undă de 450 nm/620 nm.

<Calculul valorii fiecărui element de măsurare>

Valoarea a fost calculată utilizând Microsoft Excel sau un program având capacitatea echivalentă de calcul și procesare, pe baza următoarei ecuații de calcul.

- Calcularea concentrației de inhibare eficientă pentru a obține 50% moarte a celulelor infectate cu virus gripal (EC₅₀)

$$EC_{50} = 10^Z$$

$$Z = (50\% - \% \text{ ridicat}) / (\% \text{ ridicat} - \% \text{ redus}) \times \{ \log(\text{concentrație ridicată}) - \log(\text{concentrație redusă}) \} + \log(\text{concentrație ridicată})$$

Compusul III-2: CEN IC₅₀ = 1,93 nM, CPE EC₅₀ = 1,13 nM

- Pe baza rezultatelor de mai sus, compusul mamă III-2 prezintă activitate inhibitoare a endonucleazei cap-dependente (CEN) mare și/sau efect inhibitor al CPE ridicat și astfel poate fi un

agent util pentru tratamentul și/sau prevenirea simptomelor și/sau a bolii induse prin infectarea cu virusul gripal.

Exemple de teste biologice pentru compuşii prezentei invenții au fost descrise mai jos.

Exemplul de test 3: Testul de inhibare a CYP

5 Utilizarea microzomului hepatic uman combinat disponibil în comerț și folosirea, ca markeri, a 7-etoxiresorufin O-deetilării (CYP1A2), tolbutamid metil-hidroxilare (CYP2C9), mefenitoin 4'-hidroxilare (CYP2C19), dextrometorfan O-demetorfan hidroxilarea terfenedinei (CYP3A4) ca reacții tipice de metabolizare a substratului principalelor cinci forme de enzimă CYP umane (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4), a fost evaluat un grad inhibitor al cantității de producție
10 a fiecărui metabolit de către un compus din prezenta invenție.

Condițiile de reacție au fost după cum urmează: substrat, 0,5 $\mu\text{mol/L}$ etoxiresorufină (CYP1A2), 100 $\mu\text{mol/L}$ tolbutamidă (CYP2C9), 50 $\mu\text{mol/L}$ S-mefenitoinmefenitoină (CYP2C19), 5 $\mu\text{mol/L}$ dextrometorfan (CYP2D6), 1 $\mu\text{mol/L}$ terfenedină (CYP3A4); timp de reacție, 15 minute; temperatura de reacție, 37°C; enzimă, microzom hepatic uman combinat 0,2 mg proteină/ml;
15 concentrația unui compus conform prezentei invenții, 1, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$ (patru puncte).

Fiecare cinci tipuri de substraturi, microzom hepatic uman sau un compus al prezentei invenții în 50 mmol/L tampon Hepes ca soluție de reacție a fost adăugat la o placă cu 96 de godeuri la compoziția descrisă mai sus, NADPH, ca un cofactor a fost adăugat pentru a iniția reacții de metabolism ca markeri și, după incubarea la 37°C timp de 15 minute, s-a adăugat o
20 soluție de metanol/acetonitril = 1/1 (v/v) pentru a opri reacția. După centrifugare la 3000 rpm timp de 15 minute, rezorufina (metabolitul CYP1A2) din supernatant a fost cuantificată printr-un contor fluorescent multietichetă și hidroxid de toltributamidă (metabolit CYP2C9P), hidroxid de mefenitoină 4' (metabolit CYP2C19), dextrometorfan (metabolit CYP2D6) și alcoolul terfenadină (metabolitul CYP3A4) au fost cuantificate prin LC/MS/MS.

Adiția doar a DMSO fiind un solvent care dizolvă un compus al prezentei invenții la un sistem de reacție a fost adoptată ca un control (100%), activitatea rămasă (%) a fost calculată la fiecare concentrație a unui compus conform prezentei invenții adăugat ca soluție și IC50 a fost calculat prin prezumție inversă de către un model logistic utilizând o concentrație și o rată de inhibare.

(Rezultat)

Compusul III-2: cinci tipuri >20 $\mu\text{mol/L}$

Exemplul de test 4: test BA

Materiale și metode pentru experimente pentru evaluarea absorbției orale

- (1) Animale experimentale: s-au folosit șoareci sau șobolani SD.
- 35 (2) Condiții de creștere: șoarecilor sau șobolanilor SD li s-a permis accesul liber la hrana solidă și la apa de la robinet sterilizată.
- (3) Setarea dozei și gruparea: Administrarea orală și administrarea intravenoasă au fost efectuate cu doza predeterminată. Gruparea a fost setată după cum urmează. (Dozajul a fost modificat pe compus)
- 40 Administrare orală 1 până la 30 mg/kg (n = 2 până la 3)
Administrare intravenoasă 0,5 până la 10 mg/kg (n = 2 până la 3)
- (4) Pregătirea soluțiilor de administrare: Administrarea orală a fost efectuată ca soluție sau suspensie. Administrarea intravenoasă a fost efectuată după solubilizare.
- (5) Căi de administrare: Administrarea orală a fost efectuată obligatoriu în stomac prin sondă
45 orală. Administrarea intravenoasă a fost efectuată din vena caudală prin seringi cu ac.
- (6) Elemente de evaluare: Sangele a fost colectat în serie și concentrația unui compus conform prezentei invenții în plasmă a fost măsurată prin LC/MS/MS.
- (7) Analiză statistică: Pentru tranziția concentrației unui compus conform prezentei invenții în plasmă, aria de sub curba concentrației plasmatice versus timp (ASC) a fost calculată prin
50 programul metodei pătratelor minime non-liniare, WinNonlin (o marcă înregistrată) și biodisponibilitatea (BA) unui compus al prezentei invenții a fost calculată din ASC ale grupului de administrare orală și grupului de administrare intravenoasă.

(Rezultat)

Compusul II-6: 14,9%

55 Compusul III-2: 4,2%

Pe baza rezultatelor de mai sus, promedicamentul a avut o biodisponibilitate îmbunătățită, alta decât compusul mamă.

Prin urmare, compusul conform prezentei invenții are o capacitate excelentă de absorbție orală și poate fi un agent util pentru tratamentul și/sau prevenirea simptomelor și/sau a bolii induse
60 de infecția cu virusul gripal.

Exemplul de test 5: Testul de stabilitate a metabolismului

Utilizand microzomi hepatici umani comasați disponibili în comerț, un compus din prezenta invenție a reacționat pentru un timp constant și s-a calculat o rată rămasă prin compararea unei probe reacționate și a unei probe nereacționate, prin urmare, a fost evaluat un grad de metabolism în ficat.

- 5 S-a efectuat o reacție (reacție oxidativă) la 37°C timp de 0 minut sau 30 minute în prezența de 1 mmol/L NADPH în 0,2 ml de tampon (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7,4, 150 mmol/l clorură de potasiu, 10 mmol/l clorură de magneziu) conținând 0,5 mg proteină/ml de microzomi hepatici umani. După reacție, 50 μl din soluția de reacție au fost adăugați la 100 μl de metanol/acetonitril = 1/1 (v/v), amestecați și centrifugați la 3000 rpm timp de 15 minute.
- 10 Compusul prezentei invenții în supernatant a fost cuantificat prin LC/MS/MS sau Extracție în Fază Solidă (SPE)/MS și s-a calculat o cantitate rămasă de compus conform prezentei invenții după reacție, lăsând o cantitate de compus la 0 minute timpul de reacție să fie 100%. Reacția de hidroliză a fost efectuată în absența NADPH, iar reacția de glucuronidare a fost în prezența acidului UDP-glucuronic 5 mM în locul NADPH, urmată de operații similare.
- 15 (Rezultat) % de inhibare a fost prezentată la 2 μmol/l de compus testat.

Compusul III-2: 90,1%

Exemplul de test 6: testul MBI fluorescent cu CYP3A4

- Testul MBI fluorescent cu CYP3A4 este un test de investigare a creșterii inhibării CYP3A4 a unui compus conform prezentei invenții printr-o reacție de metabolism și testul a fost efectuat folosind, ca enzimă CYP3A4 exprimată în *Escherichia coli* și folosind, ca indicator, o reacție în care 7-benziloxitri fluorometilcumarină (7-BFC) este debenzilată de enzima CYP3A4 pentru a produce un metabolit, 7-hidroxitri fluorometilcumarină (HFC) care emite lumină fluorescentă.
- 20

- Condițiile de reacție au fost după cum urmează: substrat, 5,6 μmol/l de 7-BFC; timp de pre-reacție, 0 sau 30 de minute; timp de reacție, 15 minute; temperatura de reacție, 25°C (temperatura camerei); Conținutul de CYP3A4 (exprimată în *Escherichia coli*), la pre-reacție 62,5 pmol/ml, la reacție 6,25 pmol/ml (la diluție de 10 ori); concentrația medicamentului de testat a unui compus conform prezentei invenții, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 μmol/l (șase puncte).
- 25

- O enzimă într-un tampon K-Pi (pH 7,4) și o soluție a unui compus conform prezentei invenții ca soluție de pre-reacție au fost adăugate la o placă cu 96 de godeuri la compoziția de mai sus a pre-reacției, o parte a acesteia a fost transferat pe o altă placă cu 96 de godeuri astfel încât să fie diluat 1/10 cu un substrat și un tampon K-Pi, s-a adăugat NADPH ca cofactor pentru a iniția o reacție ca un indice (fără preincubare) și, după o perioadă prestabilită a reacției, s-a adăugat acetonitril/0,5 mol/L Tris (trishidroxiametanometan) = 4/1 (V/V) pentru a opri reacția. În plus, NADPH a fost adăugat la o soluție de preincubare rămasă pentru a iniția o preincubare (cu preincubare) și, după un timp prestabilit de preincubare, o parte a fost transferată pe o altă placă astfel încât să fie diluată 1/10 cu un substrat și un tampon K -Pi pentru a iniția o reacție ca indicator. După un timp predeterminat al unei reacții, s-a adăugat acetonitril/0,5 mol/l Tris(trishidroxiametanometan) = 4/1 (V/V) pentru a opri reacția. Pentru placa pe care a fost efectuată fiecare reacție indicatoare, s-a măsurat o valoare fluorescentă a 7-HFC care este un metabolit cu un cititor de plăci fluorescente. (Ex = 420 nm, Em = 535 nm).
- 30
- 35
- 40

- Adăugarea numai de DMSO care este un solvent care dizolvă un compus al prezentei invenții la un sistem de reacție a fost adoptată ca martor (100%), activitatea rămasă (%) a fost calculată la fiecare concentrație a unui compus conform prezentei invenții adăugat ca soluție și IC₅₀ a fost calculată prin presupunere-inversă de către un model logistic utilizand o concentrație și o rată de inhibare. Când o diferență între valorile IC₅₀ este de 5 μmol/l sau mai mult, aceasta a fost definită ca (+) și, când diferența este de 3 μmol/l sau mai puțin, aceasta a fost definită ca (-).
- 45

(Rezultat)

Compusul III-2: (-)

- 50 **Exemplul de test 7: Testul Ames de fluctuație**

A fost evaluată mutagenitatea compușilor prezentei invenții.

- 20 μl de bacil tifoidic de șobolan depozitat prin congelare (tulpina *Salmonella typhimurium* TA98, tulpina TA100) a fost inoculat pe 10 ml dintr-un mediu nutritiv lichid (2,5% bulion nutritiv Oxoid nr. 2), iar acesta a fost cultivat înainte de agitare la 37°C timp de 10 ore. S-au centrifugat 9 ml dintr-o soluție bacteriană a tulpinei TA98 (2000 × g, 10 minute) pentru a îndepărta o soluție de cultură. Bacteria a fost suspendată în 9 ml dintr-un tampon Micro F (K₂HPO₄: 3,5 g/l, KH₂PO₄: 1 g/l, (NH₄)₂SO₄: 1 g/l, citrat trisodic deshidratat: 0,25 g/l, MgSO₄ • 7H₂O: 0,1 g/l), suspensia a fost adăugată la 110 ml dintr-un mediu de expunere (tampon Micro F conținând biotină: 8 μg/ml, histidină: 0,2 μg/ml, glucoză: 8 mg/ml). Tulpina TA100 a fost adăugată la 120 ml mediu de expunere relativ la 3,16 ml soluție bacteriană pentru a prepara o soluție bacteriană testată. Fiecare 12 μl de soluție DMSO a unui compus conform prezentei
- 55
- 60

invenții (diluare în mai multe etape de la doza maximă 50 mg/ml la un raport de 2 până la 3 ori), DMSO ca martor negativ și 50 µg/ml de soluție de 4-nitrochinolin-1-oxid DMSO pentru tulpina TA98, 0,25 µg/mL soluție de 2-(2-furil)-3-(5-nitro-2-furil)acrilamidă DMSO pentru tulpina TA100 în condiții de activare fără metabolizare, 40 µg/mL soluție de 2-aminoantracen DMSO pentru tulpina TA98, 20 µg/mL soluție de 2-aminoantracen DMSO pentru tulpina TA100 în condiția activării metabolismului ca control pozitiv și 588 µL de soluție bacteriană testată (o soluție mixtă de 498 Pl de soluție bacteriană testată și 90 pl de amestec S9 în condiția de activare a metabolismului) au fost amestecate, iar aceasta a fost cultivată la agitare la 37°C timp de 90 de minute. 460 µl din soluția bacteriană expusă la un compus conform prezentei invenții au fost amestecate cu 2300 µl dintr-un mediu indicator (tampon Micro F conținând biotină: 8 µg/ml, histidină: 0,2 µg/ml, glucoză: 8 mg/ml, Bromo Cresol Purple: 37,5 µg/ml), fiecare 50 µl a fost distribuit în microplacă cu 48 godeuri/doză, iar aceasta a fost supusă cultivării staționare la 37°C timp de 3 zile. Deoarece un godeu care conține o bacterie care a obținut capacitatea de proliferare prin mutația unei gene enzimice de sinteză a aminoacidului (histidina) se transformă din violet în galben datorită unei modificări a pH-ului, godeul de proliferare a bacteriei care a devenit galben în 48 de godeuri pe doză este contorizat și a fost evaluat prin compararea cu un grup martor negativ. (-) înseamnă că mutagenitatea este negativă și (+) este pozitivă.

(Rezultat)

Compusul III-2: (-)

20 Exemplul de test 8: testul cu hERG

În scopul evaluării riscului unei prelungiri a intervalului QT de pe electrocardiogramă al compusului conform prezentei invenții, efectele compusului prezentei invenții asupra curentului K⁺ rectificator intarziat (I_{Kr}), care joacă un rol important în procesul de repolarizare ventriculară, a fost studiat utilizând celule HEK293 care exprimă canalul genei înrudite cu eter-a-go-go umane (hERG).

După ce o celulă a fost reținută la un potențial de membrană de -80 mV prin metoda de fixare cu plasturi de celule întregi utilizând un sistem automat de fixare a plasturilor (PatchXpress 7000A, Axon Instruments Inc.), a fost înregistrată I_{Kr} indusă prin stimularea impulsului de depolarizare la +40 mV timp de 2 secunde și, în continuare, stimularea impulsului de repolarizare la -50 mV timp de 2 secunde. După stabilizarea curentului generat, soluția extracelulară (NaCl: 135 mmol/L, KCl: 5,4 mmol/L, NaH₂PO₄: 0,3 mmol/L, CaCl₂ • 2H₂O: 1,8 mmol/L, MgCl₂ • 6H₂O: 1 mmol/L, glucoză: 10 mmol/L, HEPES (acid 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetsulfonic): 10 mmol/L, pH = 7,4), în care fusese dizolvat compusul prezentei invenții la o concentrație obiectivă, a fost aplicată pe celulă la temperatura camerei timp de 10 minute. Din înregistrarea I_{Kr}, o valoare absolută a curentului de vârf de coadă a fost măsurată pe baza valorii curente la potențialul de membrană de repaus utilizând software-ul de analiză (DataXpress ver.1, Molecular Devices Corporation). Mai mult, s-a calculat procentul de inhibare relativ la curentul de vârf de coadă înainte de aplicarea compusului din prezenta invenție și s-a comparat cu grupul la care s-a aplicat vehiculul (soluție de dimetil sulfoxid 0,1%) pentru a evalua influența compusului prezentei invenții asupra I_{Kr}.

(Rezultat) % de inhibare a fost prezentată la 0,3 până la 10 µM de compus testat.

Compusul III-2: 7,9%

Exemplul de test 9: Test de solubilitate

Solubilitatea compusului conform prezentei invenții a fost determinată în condiții de adăugare de DMSO 1%. O soluție de 10 mmol/l a compusului a fost preparată cu DMSO și s-au adăugat, respectiv, 2 µl din soluția compusului conform prezentei invenții la 198 µl de soluție JP-1 (s-a adăugat apă la 2,0 g clorură de sodiu și 7,0 ml de acid clorhidric pentru a ajunge la 1000 ml) și soluție JP-2 (1 volum de apă a fost adăugat la 1 volum de soluție din care 3,40 g fosfat diacid de potasiu și 3,55 g fosfat acid disodic anhidru pentru a ajunge la 1000 ml). Amestecul a fost agitat timp de 1 oră la temperatura camerei și amestecul a fost filtrat. Filtratul a fost diluat de zece ori cu metanol/apă = 1/1 (v/v) și concentrația compusului din filtrat a fost măsurată cu LC/MS sau SPE/MS prin metoda de calibrare absolută.

(Rezultat)

Compusul III-2: 42,2 µmol/l

55 Exemplul de test 10: Test de solubilitate a pulberii

Cantități adecvate de compus conform prezentei invenții au fost introduse în flacoane și 200 µl de JP-1st fluid (a fost adăugată apă la 2,0 g de clorură de sodiu în 7,0 ml de acid clorhidric pentru a ajunge la 1000 ml), JP-2 fluid (a fost adăugată apă) la 500 ml de soluție tampon de fosfat cu un pH de 6,8) și 20 mmol/l taurocolat de sodiu (TCA)/JP-2nd fluid (JP-2nd fluid a fost adăugat la 1,08 g de TCA în JP-2nd fluid pentru a ajunge la 100 ml) la fiecare fiolă. Când compusul a fost complet dizolvat, s-a adăugat o cantitate adecvată de compus. După agitare timp de 1 oră la 37°C,

amestecul a fost filtrat și 100 μ l de metanol au fost adăugați la 100 μ l din fiecare filtrat (diluare dublă). Mărirea diluției a fost modificată, dacă este necesar. După ce s-a confirmat dacă există flacoane de aer și precipitate în flacoane, flacoanele au fost agitate cu dop strâns. Concentrația compusului a fost determinată cu HPLC prin metoda de calibrare absolută.

5 **(Rezultat)**

Compusul III-2: soluție JP-1; 7,1 μ g/ml, soluție JP-2; 4,4 μ g/ml, 20 mmol/l soluție TCA/JP-2; 16,1 μ g/ml

Exemplul de test 11: testul Ames

10 Testul Ames a fost efectuat folosind salmonele (*Salmonella typhimurium*) TA 98, TA100, TA1535 și TA1537 și *Escherichia coli* WP2uvrA ca tulpini de testare cu sau fără activare metabolică în metoda de pre-incubare pentru a verifica prezența sau absența mutagenității genice a compușilor din prezenta invenție.

(Rezultat)

Compusul III-2: (-)

15 **Exemplul de test 12: Test de hemoliză la lumină**

Compusul prezentei invenții a fost dizolvat la concentrații țintă și a fost amestecat cu o suspensie de 2,5 % volum/volum de celule roșii sanguine preparate dintr-un sange de oaie defibrinat pe o microplacă la concentrații de 0,0008 până la 0,1% greutate/volum. Amestecurile au fost expuse la 10 J/cm² de iradiere UV într-un interval de lungime de undă 290 până la 400 nm, UVA și UVB utilizând lămpi fluorescente ultraviolete, lămpi GL20SE și FL20S-BLB fabricate de Sankyo Denki Co., Ltd. și respectiv Panasonic Corporation. După finalizarea iradierii, amestecurile au fost centrifugate și un supernatant al amestecului a fost colectat și a fost localizat pe o microplacă. Fototoxicitatea a fost evaluată prin măsurarea unei absorbante la lungimea de undă de 540 nm și 630 nm în supernatant. Datele de absorbantă la lungimea de undă de 540 nm și 630 nm au fost utilizate ca indicatori de deteriorare a biomembranelor (fotohemoliză%) și respectiv, hiperoxidarea membranei lipidice (formarea methemoglobinei). Criteriile de fototoxicitate au fost următoarele; S-a considerat că nu este fototoxic (-) cand s-au observat fotohemoliza % <10 și modificarea maximă a absorbantei la 630 nm (Δ OD) <0,05. S-a considerat că nu este fototoxic (+) atunci când fotohemoliza a fost mai mare de 10% și modificarea maximă a absorbantei la 630 nm (Δ OD) a fost mai mare de 0,05.

(Rezultat)

Compusul III-2: (-)

35 Figurile 1 și 2 prezintă un rezultat al măsurării concentrației plasmatice a compusului III-2 și a compusului II-6 după administrarea orală de promedicament Compus II-6, pentru care compusul mamă este compusul III-2, la șobolan, în condiții fără postire.

În plus, concentrația compusului II-6 în toate probele de plasmă a fost o limită de determinare sau mai mică. Prin urmare, promedicamentul Compus II-6, al cărui compus mamă este Compusul III-2 se dovedește că s-a schimbat rapid în Compusul III-2 in vivo după administrare (vezi Figura 2).

40 Pe baza rezultatelor testelor de mai sus, s-a dezvăluit că compusul transformat într-un promedicament a fost absorbit în organism după administrarea orală și rapid transformat într-un compus mamă în sânge. Prin urmare, compusul prezentei invenții poate fi un agent util pentru tratamentul și/sau prevenirea simptomelor și/sau bolii induse de infecția cu virusul gripal.

Exemplul de test 13: Test de administrare intravenoasă

45 Materiale experimentale examinate și metoda testului de administrare intravenoasă

(1) Animale utilizate: au fost folosiți șobolani SD.

(2) Condiții de creștere: Șobolanii SD au fost hrăniți cu pelete și apă sterilizată de la robinet la discreție.

50 (3) Dozare și grupare: O doză predeterminată a fost administrată intravenos. Grupurile au fost stabilite după cum urmează. (Doze variate pentru fiecare compus)

Administrare intravenoasă 0,5-1 mg/kg (n = 2-3)

(4) Pregătirea soluției de administrare: Administrarea intravenoasă a fost efectuată după solubilizare.

55 (5) Metoda de administrare: Administrarea intravenoasă a fost efectuată cu o seringă echipată cu ac pe vena caudală.

(6) Repere: Sangele a fost colectat în timp și concentrația plasmatică a compusului conform prezentei invenții a fost măsurată folosind LC/MS/MS.

60 (7) Analiză statistică: Pentru tranziția concentrației plasmatice a compusului conform prezentei invenții, clearance-ul total în corp (CL_{tot}) și timpul de înjumătățire prin eliminare (t_{1/2}, z) au fost calculate utilizând programul de pătrate minime non-liniare WinNonlin (R).

(Rezultate)

Compusul nr. III-2:**CLtot: 16,4 ml/min/kg****t_{1/2}, z: 3,4 ore**

5 Din rezultatele de mai sus, s-a constatat că Compusul III-2 este un compus cu un clearance total în corp redus și un timp de înjumătățire lung.

Prin urmare, compusul prezentei invenții are o persistență excelentă și poate fi un agent util pentru tratamentul și/sau prevenirea simptomelor și/sau a bolilor induse de infecția cu virusul gripal.

Exemplu de formulare

10 Următoarele exemple de formulare sunt doar exemplificate și nu sunt destinate să limiteze scopul invenției.

Exemplul de formulare 1: Tablete

15 Compușii prezentei invenții, lactoză și stearat de calciu sunt amestecate. Amestecul este zdrobit, granulat și uscat pentru a obține o dimensiune adecvată a granulelor. Apoi, stearatul de calciu este adăugat la granule și amestecul este comprimat și modelat pentru a obține tablete.

Exemplul de formulare 2: Capsule

20 Compușii prezentei invenții, lactoza și stearatul de calciu sunt amestecați uniform pentru a obține medicamente sub formă de pulbere sub formă de pulberi sau granule fine. Medicamentele în formă de pulbere sunt umplute în recipiente în formă de capsule pentru a obține capsule.

Exemplul de formulare 3: Granule

25 Compușii prezentei invenții, lactoza și stearatul de calciu sunt amestecate uniform și amestecul este comprimat și turnat. Apoi, este zdrobit, granulat și cernut pentru a obține dimensiuni adecvate ale granulelor.

Exemplul de formulare 4: comprimate dezintegrate oral

30 Compușii prezentei invenții și celuloză cristalină sunt amestecate, granulate și sunt fabricate tablete pentru a obține tablete dezintegrate oral.

Exemplul de formulare 5: siropuri anhidre

35 Compușii prezentei invenții și lactoză sunt amestecate, zdrobite, granulate și cernute pentru a obține dimensiuni adecvate ale siropurilor anhidre.

Exemplul de formulare 6: Injecții

40 Compușii prezentei invenții și tampon fosfat sunt amestecate pentru a obține o injecție.

Exemplul de formulare 7: Perfuzii

45 Compușii prezentei invenții și tampon fosfat sunt amestecate pentru a obține o injecție.

Exemplul de formulare 8: Inhalații

50 Compusul prezentei invenții și lactoză sunt amestecate și zdrobite fin pentru a obține inhalații.

Exemplul de formulare 9: Unguente

55 Compușii prezentei invenții și vaselină sunt amestecate pentru a obține unguente.

Exemplul de formulare 10: Plasturi

60 Compușii prezentei invenții și o bază, cum ar fi plasture adeziv sau altele asemenea, sunt amestecate pentru a obține plasturi.

[Aplicabilitate industrială]

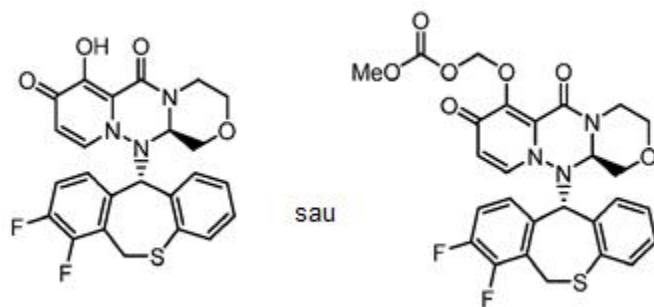
65 Compusul conform prezentei invenții are activitate inhibitoare a endonucleazei cap-dependente (CEN) după absorbție în organism. Compusul conform prezentei invenții poate fi un agent util pentru tratamentul și/sau prevenirea unui simptom și/sau a unei boli induse de infecția cu virusul gripal.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- EP-A1- 2 620 436

(57) Revendicări:

1. Compus reprezentat de următoarea formulă:



sau sarea sa acceptabilă farmaceutic.

2. Compoziție farmaceutică cuprinzând compusul conform revendicării 1 sau sarea sa acceptabilă farmaceutic.

3. Compoziție farmaceutică conform revendicării 2, pentru utilizare în tratarea sau prevenirea unei infecții cu virus gripal.

4. Compus conform revendicării 1 sau sarea sa acceptabilă farmaceutic, pentru utilizare în tratarea sau prevenirea unei boli cauzate de un virus care are endonuclează cap-dependentă.

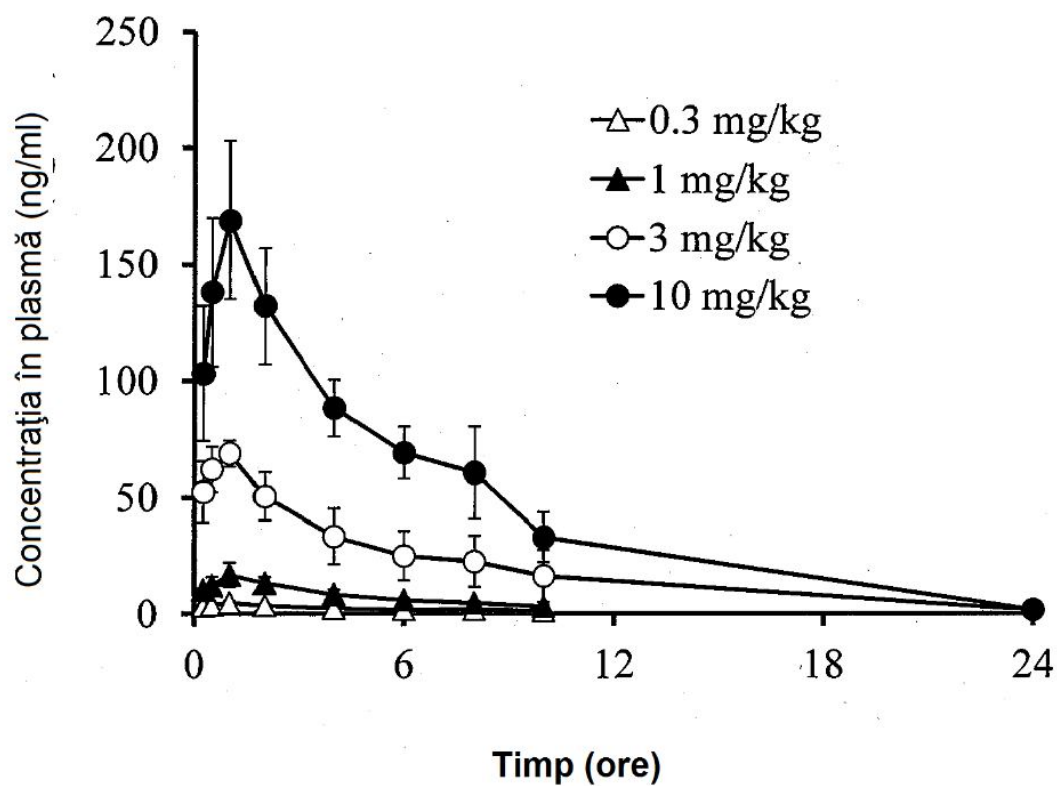


Fig. 1

Timp (ore)	Concetrația în plasmă (ng/ml)			
	0.3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg
0.25	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
0.5	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
4	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
6	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
10	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
24	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ: sub limita inferioară a cuantificării (< 0.500 ng/mL)

Fig. 2