

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039123**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.08

(21) Номер заявки
201791356

(22) Дата подачи заявки
2015.12.07

(51) Int. Cl. **C07H 19/06** (2006.01)
A61K 31/7052 (2006.01)

(54) ФОСФОРАМИДАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

(31) **62/091,686; 62/094,117; 62/201,974**

(32) **2014.12.15; 2014.12.19; 2015.08.06**

(33) **US**

(43) **2017.12.29**

(86) **PCT/US2015/064338**

(87) **WO 2016/099982 2016.06.23**

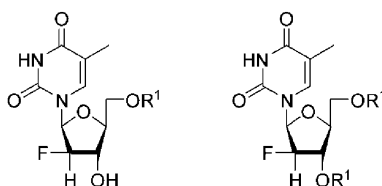
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМОРИ ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:
**Де Ла Роса Абел, Пейнтер Джордж,
Блумлинг Грегори Р. (US)**

(74) Представитель:
Чабань Ю.М. (RU)

(56) PUBCHEM-CID 330407 Create Date: 26
March 2005 (26.03.2005) pg. 3, Fig
US-A-5587362
US-A-3687931
US-A1-20040229839

(57) Раскрыты фосфорамидатные пролекарственные соединения клевудина, имеющие структурную формулу



или их фармацевтически приемлемые соли, фармацевтические композиции, содержащие указанные соединения, и способы лечения или профилактики вирусных инфекций, вызываемых ДНК-вирусами, с применением указанных соединений клевудина, без проблем миопатии.

B1**039123****039123****B1**

Уровень техники

Вирус гепатита В (HBV) представляет собой инфекционное заболевание, которое поражает печень, приводя к острой инфекции, симптомы которой возникают через 45-160 дней, или к хронической инфекции, которой поражено 350 миллионов человек во всем мире. Согласно оценкам, ежегодно регистрируется 600000 смертельных случаев в результате последствий HBV-инфекции. HBV несет геном в виде рыхлой кольцевой ДНК (ркДНК) размером 3,2 тыс. нуклеотидов, которая используется для образования ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК) в клетке-хозяине. Затем кзкДНК транскрибируется РНК-полимеразой II, ДНК-зависимой РНК-полимеразой хозяина с образованием прегеномной РНК (пгРНК). Далее пгРНК используется кодируемой вирусом обратной транскриптазой для образования ркДНК. Цель современных способов лечения хронической HBV-инфекции состоит в уменьшении репликации HBV и снижении тяжести поражения печени.

Современные средства для лечения хронической HBV-инфекции включают пегилированный α -интерферон и нуклеозидные/нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ). НИОТ превращается в соответствующий 5'-трифосфат, или дифосфат в случае фосфонатсодержащих НИОТ, и уменьшает репликацию вируса путем ингибирования кодируемой HBV полимеразы. Клевудин представляет собой НИОТ, который больше не рассматривается для лечения хронического HBV из-за связанных с лекарственным средством скелетных миопатий, которые возникают в результате митохондриальной дисфункции у пациентов. Интересно, что клевудина трифосфат, как было показано, является конкурентным несубстратным ингибитором кодируемой HBV полимеразы, и за счет длительного периода полувыведения из клетки способен подавлять репликацию HBV в течение продолжительного периода времени после отмены лекарственного средства.

Таким образом, необходимы новые соединения для лечения HBV. Композиции и способы, раскрытые в настоящем документе, направлены на удовлетворение этой и других потребностей.

Краткое описание сущности изобретения

В соответствии с целями описанных материалов и методов, реализованных и подробно описанных в настоящем изобретении, раскрытый объект изобретения в одном аспекте относится к соединениям, композициям и способам получения и применения соединений и композиций. В конкретных аспектах раскрытый объект изобретения относится к производным клевудина и способам получения и применения таких производных. Кроме того, раскрыты способы лечения инфекций HBV описанными соединениями. Дополнительные преимущества будут изложены частично в описании, которое следует ниже, и частично будут очевидными из описания или могут быть изучены посредством осуществления на практике аспектов, описанных ниже. Описанные ниже преимущества будут реализованы и достигнуты с помощью элементов и комбинаций, конкретно указанных в прилагаемой формуле изобретения. Необходимо понимать, что как предшествующее общее описание, так и последующее подробное описание являются только иллюстративными и пояснительными, но не являются ограничивающими.

Краткое описание графических материалов

Прилагаемые графические материалы, которые включены в настоящий документ и составляют часть настоящего документа, иллюстрируют несколько аспектов, описанных ниже.

Фиг. 1 представляет собой график, иллюстрирующий средние уровни клевудина 5'-трифосфата в тканях крыс, которым п/о вводили EIDD-2173;

фиг. 2 - график, иллюстрирующий захват и метаболизм EIDD-02173 (20 мкМ) клетками Nuh-7;

фиг. 3 - график, иллюстрирующий уровни нуклеозида клевудина в тканях крыс, которым п/о вводили EIDD-2173 (5'-фосфорамидат).

Подробное описание сущности изобретения

Материалы, соединения, композиции и способы, описанные в данном документе, будут лучше поняты со ссылкой на следующее подробное описание конкретных аспектов раскрытого объекта изобретения, фигур и примеров, включенных в настоящий документ.

Прежде чем описывать и раскрывать материалы, соединения, композиции и способы, подчеркнем, что необходимо понимать, что аспекты, описанные ниже, не ограничиваются конкретными способами синтеза или конкретными реагентами, поскольку они могут варьировать. Кроме того, необходимо понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, служит только для описания конкретных аспектов и не предназначена для ограничения.

Кроме того, в настоящем документе приведены ссылки на различные публикации. Описания указанных публикаций включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки с целью более полного описания уровня техники в области, к которой относятся раскрытые вещества. Кроме того, раскрытые ссылки также индивидуально и конкретно включены в настоящий документ посредством ссылки на содержащийся в них материал, который обсуждается в предложении, где приведена ссылка.

Общие определения.

В настоящем описании и формуле изобретения ниже будут сделаны ссылки на ряд терминов, которые должны быть определены как имеющие следующее значение.

В описании и формуле изобретения слово "содержать" и другие формы этого слова, такие как "содержащий" и "содержит", обозначают, включая, но не ограничиваясь этим, и не предназначены для ис-

ключения, например, других добавок, компонентов, целых чисел или стадий.

В описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не диктует иного. Таким образом, например, ссылка на "композицию" включает смеси двух или более таких композиций, ссылка на "антибиотик" включает смеси двух или более таких антибиотиков, ссылка на "соединение" включает смеси двух или более таких соединений и т.п.

"Необязательный" или "необязательно" означает, что описанное далее событие или обстоятельство может произойти или не произойти, и что описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда оно не происходит.

Несмотря на то, что численные диапазоны и параметры, устанавливающие широкий объем изобретения, являются приблизительными, численные значения, приведенные в конкретных примерах, указаны настолько точно, насколько это возможно. Любое численное значение, однако, по своей природе содержит определенные ошибки, обязательно вытекающие из стандартного отклонения, обнаруживаемого в соответствующих экспериментальных данных. Кроме того, если в настоящем документе приведены численные диапазоны варьирующего объема, предусматривается, что может применяться любая комбинация этих значений, включающая указанные значения. Кроме того, диапазоны в настоящем документе могут быть выражены как от "около" одного конкретного значения и/или до "около" другого конкретного значения. Если указан такой диапазон, то другой аспект включает от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Подобным образом, если величины выражаются как приближенные с помощью стоящего перед ними слова "около", то необходимо понимать, что конкретное значение образует другой аспект. Кроме того, необходимо понимать, что конечные точки каждого диапазона являются значимыми как относительно другой конечной точки, так и независимо от другой конечной точки. Если не указано иное, термин "около" означает в пределах 5% (например, в пределах 2% или 1%) от конкретного значения, модифицированного термином "около".

Термин "уменьшать" или другие формы слова, такие как "уменьшение" или "уменьшающий", подразумевают снижение интенсивности события или характеристики (например, вирусной инфекции). Необходимо понимать, что это обычно оценивается относительно некоторого стандартного или ожидаемого значения, другими словами, это является относительным, но стандартное или относительное значение не всегда должно упоминаться. Например, "уменьшение вирусной инфекции" означает снижение количества бактерий относительно стандартного или контрольного количества.

Термин "предотвращать" или другие формы слова, такие как "предотвращение" или "предупреждение", предусматривают остановку конкретного события или характеристики, стабилизацию или замедление развития, или прогрессирование конкретного события или характеристики, или минимизацию вероятности того, что конкретное событие или характеристика будет иметь место. Предотвращение не требует сравнения с контролем, поскольку обычно оно является более абсолютным, чем, например, уменьшение. В настоящем документе что-то можно уменьшить, но не исключить, а что-то, что уменьшено, также может быть предотвращено. Аналогичным образом, что-то может быть предотвращено, но не уменьшено, а что-то, что предотвращено, также может быть уменьшено. Необходимо понимать, что в случае употребления термина уменьшить или предотвратить, употребление другого слова также явно раскрыто, если специально не указано иное.

В настоящем документе термин "лечение" относится к получению полезных или желаемых клинических результатов. Полезные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваясь этим, любое одно или более из облегчения одного или нескольких симптомов (например, инфекции), уменьшения степени инфицирования, стабилизации (т.е. отсутствие ухудшения) инфекции, предотвращения или замедления распространения инфекции, предотвращения или замедления возникновения, или рецидива инфекции и задержки или замедления прогрессирования инфекции.

Термин "пациент" предпочтительно относится к человеку, нуждающемуся в лечении антибиотиком или лечении любого назначения, и более предпочтительно к человеку, нуждающемуся в таком лечении для лечения вирусной инфекции. Однако термин "пациент" дополнительно может относиться к животным, кроме человека, предпочтительно млекопитающим, таким как собаки, кошки, лошади, коровы, свиньи, овцы и приматы, кроме человека, среди прочего, которые нуждаются в лечении антибиотиками.

Необходимо понимать, что в настоящем документе идентификаторы "первый" и "второй" применяются только для простоты распознавания различных компонентов и стадий раскрытого объекта изобретения. Идентификаторы "первый" и "второй" не предусматривают какого-либо конкретного порядка, количества, предпочтения или значимости компонентов, или стадий, модифицированных этими терминами.

Химические определения.

В настоящем документе термин "композиция" обозначает продукт, содержащий определенные ингредиенты в определенных количествах, а также любой продукт, который получается, непосредственно или опосредованно, в результате сочетания определенных ингредиентов в определенных количествах.

Ссылки в описании и формуле изобретения на массовые доли конкретного элемента или компонента в композиции обозначают массовое соотношение между элементом или компонентом и любыми дру-

гими элементами или компонентами композиции, или изделия, при котором часть выражена по массе. Таким образом, в смеси, содержащей 2 мас.ч. компонента X и 5 мас.ч. компонента Y, X и Y находятся в массовом соотношении 2:5 и присутствуют в таком соотношении независимо от содержания в смеси дополнительных компонентов.

Массовый процент (мас.%) компонента, если конкретно не указано иное, основывается на общей массе состава или композиции, в состав которых включен компонент.

В настоящем документе термин "замещенный" предусматривает все допустимые заместители органических соединений. В широком понимании допустимые заместители включают ациклические и циклические, разветвленные и неразветвленные, карбоциклические и гетероциклические, ароматические и неароматические заместители органических соединений. Иллюстративные примеры заместителей включают, например, те, которые описаны ниже. Допустимые заместители могут быть единичными или множественными, одинаковыми или разными для соответствующих органических соединений. Для целей настоящего изобретения гетероатомы, такие как азот, могут содержать водородные заместители и/или любые допустимые заместители органических соединений, описанных в настоящем документе, которые соответствуют валентности гетероатомов. Настоящее описание никоим образом не ограничивается только допустимыми заместителями органических соединений. Кроме того, термины "замещение" или "замещенный" включают подразумеваемое условие, что такая замена находится в соответствии с допустимой валентностью замещенного атома и заместителя, и что замещение приводит к стабильному соединению, например соединению, которое не претерпевает спонтанных превращений, таких как реакции перегруппировки, циклизации, отщепления и т.д.

Термин "алифатический" в настоящем документе относится к неароматической углеводородной группе и включает разветвленные и неразветвленные, алкильные, алкенильные или алкинильные группы.

Термин "алкил" в настоящем документе означает разветвленную или неразветвленную насыщенную углеводородную группу, содержащую от 1 до 24 атомов углерода, такую как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, пентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил, додецил, тетрадецил, гексадецил, эйкозил, тетракозил и т.п. Алкильная группа может быть замещенной или незамещенной. Алкильная группа может быть замещена одной или несколькими группами, включая, но не ограничиваясь этим, алкил, галогенированный алкил, алкокси, алкенил, алкинил, арил, гетероарил, альдегид, amino, карбоновая кислота, сложный эфир, простой эфир, кетон, галоген, гидроксиль, нитро, силил, сульфо-оксо, сульфонил, сульфон, сульфоксид или тиол, как описано ниже.

Символы Aⁿ используются в настоящем документе только как обобщенный заместитель в приведенных ниже определениях.

Термин "алкокси" в настоящем документе означает алкильную группу, присоединенную через одностороннюю концевую эфирную связь; т.е. "алкокси" может быть определен как -OA¹, где A¹ представляет собой алкил, как определено выше.

Термин "алкенил" в настоящем документе означает углеводородную группу, содержащую от 2 до 6 атомов углерода, со структурной формулой, содержащей по меньшей мере одну двойную углерод-углеродную связь.

Асимметричные структуры, такие как (A¹A²)C=C(A³A⁴) предусматривают включение как E-, так и Z-изомеров. Это может подразумеваться в структурных формулах в настоящем документе, где присутствует асимметричный алкен, или может быть явно обозначено символом связи C=C. Алкенильная группа может быть замещена одной или более группами, включая, но не ограничиваясь этим, алкил, галогенированный алкил, алкокси, алкенил, алкинил, арил, гетероарил, альдегид, amino, карбоновую кислоту, сложный эфир, простой эфир, кетон, галоген, гидроксиль, нитро, силил, сульфо-оксо, сульфонил, сульфон, сульфоксид или тиол, как описано ниже.

Термин "алкинил" в настоящем документе означает углеводородную группу, содержащую от 2 до 6 атомов углерода, со структурной формулой, содержащей по меньшей мере одну тройную углерод-углеродную связь. Алкинильная группа может быть замещена одной или несколькими группами, включая, но не ограничиваясь этим, алкил, галогенированный алкил, алкокси, алкенил, алкинил, арил, гетероарил, альдегид, amino, карбоновую кислоту, сложный эфир, простой эфир, галогенид, гидроксиль, кетон, нитро, силил, сульфо-оксо, сульфонил, сульфон, сульфоксид или тиол, как описано ниже.

Термин "арил" в настоящем документе означает группу, которая содержит любую ароматическую группу на основе углерода, в том числе, но не ограничиваясь этим, бензол, нафталин, фенил, бифенил, феноксibenзол и т.п. Термин "гетероарил" означает группу, которая содержит ароматическую группу, содержащую по меньшей мере один гетероатом в кольце ароматической группы. Примеры гетероатомов включают, но не ограничиваясь этим, азот, кислород, серу и фосфор. Термин "не гетероарильный", который включен в термин "арил", определяет группу, которая содержит ароматическую группу, не содержащую гетероатом. Арильные и гетероарильные группы могут быть замещенными или незамещенными. Арильные и гетероарильные группы могут быть замещены одной или несколькими группами, включая, но не ограничиваясь этим, алкил, галогенированный алкил, алкокси, алкенил, алкинил, арил, гетероарил, альдегид, amino, карбоновую кислоту, сложный эфир, простой эфир, кетон, галоген, гидроксиль, нитро, силил, сульфо-оксо, сульфонил, сульфон, сульфоксид или тиол, как описано в настоящем документе.

Термин "биарил" представляет конкретный тип арильной группы и включен в определение арила. Биарил относится к двум арильным группам, которые соединены друг с другом через конденсированную циклическую структуру, как в нафталине, или которые соединены через одну или более углерод-углеродных связей, как в бифениле.

Термин "циклоалкил" в настоящем документе представляет собой неароматическое углеродное кольцо, состоящее по меньшей мере из трех атомов углерода. Примеры циклоалкильных групп включают, но не ограничиваясь этим, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т.д. Термин "гетероциклоалкил" означает циклоалкильную группу, как определено выше, где по меньшей мере один из атомов углерода кольца заменен гетероатомом, таким как, но не ограничиваясь этим, азот, кислород, сера или фосфор. Циклоалкильная группа и гетероциклоалкильная группа могут быть замещенными или незамещенными. Циклоалкильная группа и гетероциклоалкильная группа могут быть замещены одной или более группами, включая, но не ограничиваясь этим, алкил, алкокси, алкенил, алкинил, арил, гетероарил, альдегид, amino, карбоновую кислоту, сложный эфир, простой эфир, кетон, галоген, гидрокси, нитро, силил, сульфо-оксо, сульфонил, сульфон, сульфоксид или тиол, как описано в настоящем документе.

Термин "циклоалкенил" в настоящем документе представляет собой неароматическое углеродное кольцо, состоящее по меньшей мере из трех атомов углерода и содержащее по меньшей мере одну двойную связь, т.е. $C=C$. Примеры циклоалкенильных групп включают, но не ограничиваясь этим, циклопропенил, циклобутенил, циклопентенил, циклопентадиенил, циклогексенил, циклогексадиенил и т.п. Термин "гетероциклоалкенил" обозначает вид циклоалкенильной группы, как определено выше, где по меньшей мере один из атомов углерода кольца замещен гетероатомом, таким как, но не ограничиваясь этим, азот, кислород, сера или фосфор. Циклоалкенильная группа и гетероциклоалкенильная группа могут быть замещенными или незамещенными. Циклоалкенильная группа и гетероциклоалкенильная группа могут быть замещены одной или несколькими группами, включая, но не ограничиваясь этим, алкил, алкокси, алкенил, алкинил, арил, гетероарил, альдегид, amino, карбоновую кислоту, сложный эфир, простой эфир, кетон, галоген, гидрокси, нитро, силил, сульфо-оксо, сульфонил, сульфон, сульфоксид или тиол, как описано в настоящем документе.

В настоящем документе термин "циклическая группа" употребляется для обозначения как арильных групп, так и неарильных групп (т.е. циклоалкильных, гетероциклоалкильных, циклоалкенильных и гетероциклоалкенильных групп) или и того, и другого. Циклические группы содержат одну или более систем колец, которые могут быть замещенными или незамещенными. Циклическая группа может содержать одну или более арильных групп, одну или более неарильных групп или одну или более арильных групп и одну или более неарильных групп.

Термин "альдегид" в настоящем документе представлен формулой $-C(O)H$. В настоящем документе " $C(O)$ " является сокращенным обозначением $C=O$.

В настоящем документе термины "амин" или "амино" представлены формулой $NA^1A^2A^3$, где A^1 , A^2 и A^3 независимо могут представлять собой водород, алкил, галогенированный алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил, циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклоалкильную или гетероциклоалкенильную группу, описанную выше.

В настоящем документе термин "карбоновая кислота" представлен формулой $-C(O)OH$. В настоящем документе термин "карбоксилат" представлен формулой $-C(O)O$.

Термин "сложный эфир" в настоящем документе представлен формулой $-OC(O)A^1$ или $-C(O)OA^1$, где A^1 может быть алкилом, галогенированным алкилом, алкенилом, алкинилом, арилом, гетероарилом, циклоалкилом, циклоалкенилом, гетероциклоалкильной или гетероциклоалкенильной группой, описанной выше.

Термин "простой эфир" в настоящем документе представлен формулой A^1OA^2 , где A^1 и A^2 независимо могут представлять собой алкил, галогенированный алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил, циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклоалкильную или гетероциклоалкенильную группу, описанную выше.

Термин "кетон" в настоящем документе представлен формулой $A^1C(O)A^2$, где A^1 и A^2 независимо друг от друга могут быть алкилом, галогенированным алкилом, алкенилом, алкинилом, арилом, гетероарилом, циклоалкилом, циклоалкенилом, гетероциклоалкильной или гетероциклоалкенильной группой, описанной выше.

Термин "галоген" в настоящем документе относится к галогенам фтору, хлору, бром и йоду.

Термин "гидрокси" в настоящем документе представлен формулой $-OH$.

Термин "нитро" в настоящем документе представлен формулой $-NO_2$.

Термин "пиано" в настоящем документе представлен формулой $-CN$.

Термин "азидо" в настоящем документе представлен формулой $-N_3$.

В настоящем документе термин "сульфонил" употребляется для обозначения сульфо-оксо группы, представленной формулой $-S(O)_2A^1$, где A^1 может быть водородом, алкилом, галогенированным алкилом, алкенилом, алкинилом, арилом, гетероарилом, циклоалкилом, циклоалкенилом, гетероциклоалкильной или гетероциклоалкенильной группой, описанной выше.

Термин "сульфониламино" или "сульфонамид" в настоящем документе представлен формулой

-S(O)₂NH₂.

Термин "тиол" в настоящем документе, представлен формулой -SH.

Необходимо понимать, что соединения, представленные в настоящем документе, могут содержать хиральные центры. Такие хиральные центры могут быть либо (R-) или (S-) конфигурацией. Соединения, представленные в настоящем документе, могут быть энантимерно чистыми или могут представлять собой диастереомерные или энантиомерные смеси. Необходимо понимать, что хиральные центры соединений по изобретению могут подвергаться эпимеризации *in vivo*. Таким образом, специалисту в данной области техники будет понятно, что введение соединения в (R-) форме является эквивалентным, для соединений, которые подвергаются эпимеризации *in vivo*, введению соединения в (S-) форме.

В настоящем документе термин "по существу чистый" означает достаточно однородный для того, чтобы по данным стандартных методов анализа, таких как тонкослойная хроматография (ТСХ), ядерный магнитный резонанс (ЯМР), гель-электрофорез, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и масс-спектрометрия (МС), газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС) и подобные, применяемые специалистами в данной области техники для оценки такой чистоты, выглядеть не содержащим легко поддающихся обнаружению примесей. Или достаточно чистый настолько, что дальнейшая очистка не вызывает обнаружимого изменения физических и химических свойств, таких как ферментативная и биологическая активность указанного вещества. Как традиционные, так и современные способы очистки соединений для получения, по существу, химически чистых соединений известны специалистам в данной области техники. Однако, по существу, химически чистое соединение может быть смесью стереоизомеров.

Если не указано иное, формула с химическими связями, которые обозначены только сплошными линиями, без клиньев или пунктирных линий, охватывает каждый из возможных изомеров, например каждый энантиомер, диастереомер и мезосоединение, а также смеси изомеров, например рацемические или скалемические смеси.

Термин "фармацевтически приемлемый" компонент означает компонент, который подходит для применения у человека и/или животных без нежелательных побочных эффектов (таких как токсичность, раздражение и аллергическая реакция), соразмерно с разумным соотношением пользы/риска.

"Фармацевтически приемлемая соль" означает соль, которая является фармацевтически приемлемой и обладает желаемыми фармакологическими свойствами. Такие соли включают в себя соли, которые могут быть образованы, если присутствующие в соединении кислотные протоны способны реагировать с неорганическими или органическими основаниями. Подходящие соли неорганических оснований включают соли, образованные щелочными металлами, например натрием, калием, магнием, кальцием и алюминием. Подходящие соли органических оснований включают соли, образованные органическими основаниями, такими как аминные основания, например этаноламин, диэтиламин, триэтиламин, триметамин, N-метилглюкамин и т.п. Такие соли также включают кислотно-аддитивные соли, образованные неорганическими кислотами (например, хлористоводородной и бромистоводородной кислотой) и органическими кислотами (например, уксусной кислотой, лимонной кислотой, малеиновой кислотой, алкан- или аренсульфоновыми кислотами, такими как метансульфоновая кислота и бензолсульфоновая кислота). Если присутствуют две кислотные группы, то фармацевтически приемлемая соль может представлять собой монокислоту-моносоль или дисоль; аналогично, если присутствует более двух кислотных групп, некоторые или все такие группы могут быть превращены в соли.

"Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" означает вспомогательное вещество, которое обычно применяют при получении фармацевтической композиции и которая обычно является безопасной, нетоксичной и желательной и включает вспомогательные вещества, которые являются приемлемыми для ветеринарного применения, а также для фармацевтического применения у человека. Такие вспомогательные вещества могут быть твердыми, жидкими, полутвердыми или, в случае аэрозольной композиции, газообразными.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает носитель, такой как растворитель, суспендирующий агент или основа для введения описанных соединений пациенту. Носитель может быть жидким или твердым, причем его выбирают в соответствии с планируемым способом введения. Липосомы также представляют собой фармацевтический носитель. В настоящем документе термин "носитель" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, основы, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, буферные вещества, растворы носителей, суспензии, коллоиды и т.п. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какая-либо обычная среда или агент несовместимы с активным ингредиентом, его применение в терапевтических композициях включено.

Термин "терапевтически эффективное количество" в настоящем документе означает такое количество активного соединения или фармацевтического агента, которое вызывает биологический или медицинский ответ в ткани, системе, организме животного или человека, ожидаемый исследователем, ветеринаром, врачом или другим клиницистом.

Эффективные количества соединения или композиции, описанных в настоящем документе для ле-

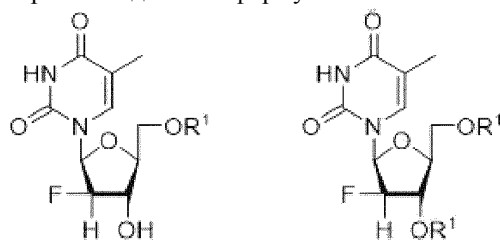
чения млекопитающего, могут включать от около 0,1 до около 1000 мг/кг массы тела субъекта в сутки, например от около 1 до около 100 мг/кг/сутки, в частности от около 10 до около 100 мг/кг/сутки. Дозы могут быть срочными или постоянными. Широкий диапазон доз композиции считается как безопасным, так и эффективным.

Ниже будут приведены подробные ссылки на конкретные аспекты раскрытых материалов, соединений, композиций, изделий и способов, примеры которых проиллюстрированы в сопроводительных примерах и на фигурах.

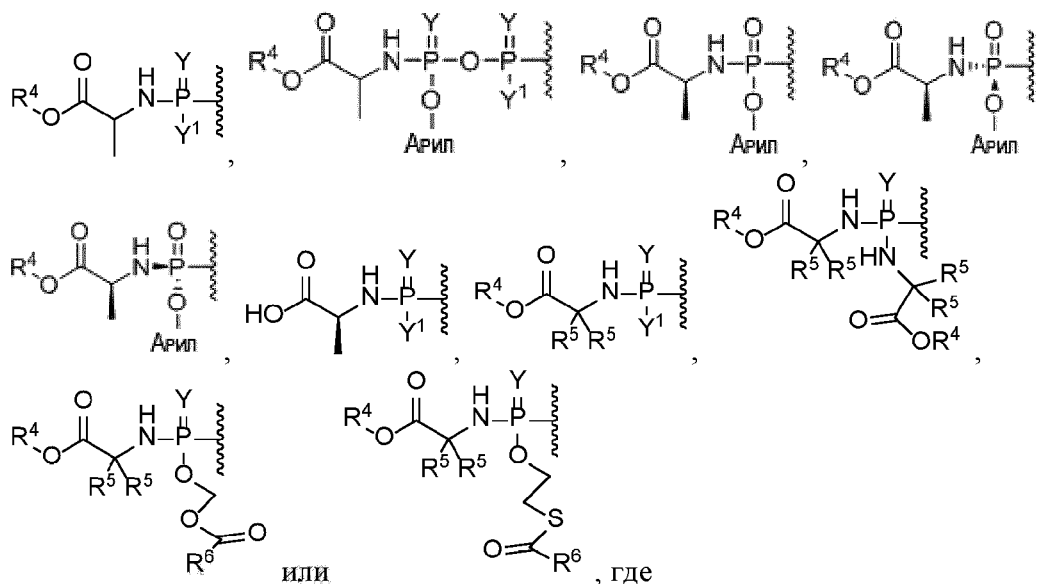
Композиции.

Для решения миопатических проблем, связанных с клевудином, осуществлен синтез (S,S) и (S,R) диастереомеров клевудина фосфорамидата. Фосфорамидатный фрагмент был применен для доставки клевудина в форме 5'-монофосфата в печень с целью снижения: 1) системного воздействия клевудина; и 2) возможности скелетной миопатии. Оба фосфорамидата продемонстрировали анти-HBV активность, подобную активности клевудина, причем активность (S,S)-диастереомера несколько выше.

В конкретном примере раскрыто соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый R^1 независимо выбран из одной из формул



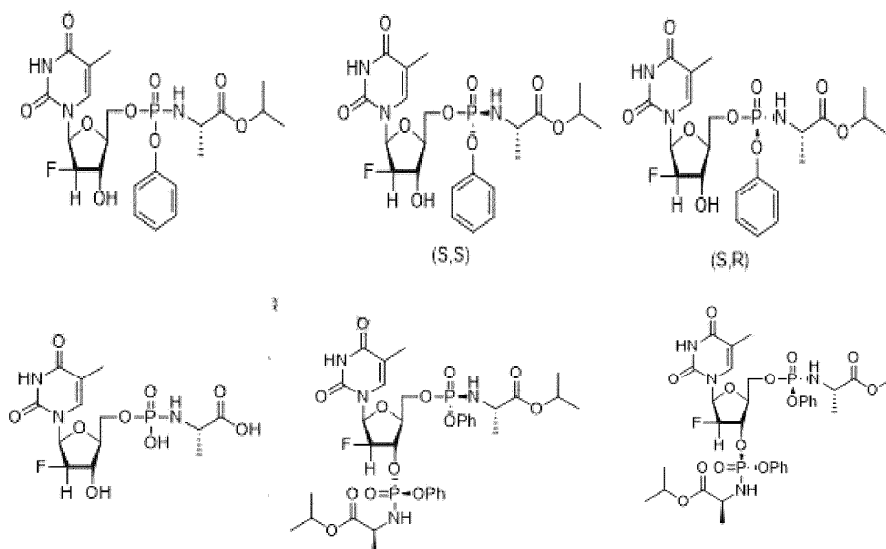
R⁴ представляет собой водород, бензил, C₁₋₆алкил или циклоалкил;

R⁵ представляет собой водород, дейтерий, гидроксил, циано, азидо, amino, замещенный amino, арил, гетероарил, замещенный арил, C₁₋₆алкокси, C₁₋₆алкил, C₂₋₆ алкенил, C₂₋₆алкинил или замещенный гетероарил; и

R^6 представляет собой C_{1-6} алкокси, C_{1-6} алкил, циклоалкил, арил или замещенный арил,

при этом, когда группа замещена, она замещена одним или более из следующего: C₁₋₆алкилом, галогенированным C₁₋₆алкилом, C₁₋₆алкокси, C₂₋₆ алкенилом, C₂₋₆алкинилом, арилом, гетероарилом, -C(O)N-амино, -C(O)OH, -OC(O)A¹ или -C(O)OA¹, A¹OA², галогенидом, гидрокси, A¹C(O)A², нитро, сульфо-оксо, сульфонил, сульфеном, сульфоксидом или тиолом, где A¹ и A² независимо выбраны из C₁₋₆алкила, галогенированного C₁₋₆алкила, C₂₋₆алкенила, C₂₋₆алкинила, арила, гетероарила или циклоалкила, где арил представляет собой нафталин, фенил, бифенил или феноксибензол, циклоалкил представляет собой циклопропил, циклобутил, цикlopентил или циклогексил, гетероарил представляет собой ароматическую группу, содержащую гетероатом, выбранный из азота, кислорода, серы или фосфора.

Раскрыты соединения



или их фармацевтически приемлемая соль.

Способы применения.

Соединения, представленные в настоящем документе, можно применять для лечения вирусных инфекционных заболеваний. Примеры вирусных инфекций включают, но не ограничиваясь этим, инфекции, вызванные РНК-вирусами (включая РНК-вирусы с отрицательной спиралью, РНК-вирусы с положительной спиралью, двунитевые РНК вирусы и ретровирусы) или ДНК-вирусами. Все штаммы, типы и подтипы РНК-вирусов и ДНК-вирусов включены в настоящее изобретение.

Вирусы являются инфекционными агентами, которые обычно могут реплицироваться внутри живых клеток организмов. Вирусные частицы (вирионы) обычно состоят из нуклеиновых кислот, белкового покрытия, и в некоторых случаях липидной оболочки, которая окружает белковое покрытие. Формы вирусов варьируют от простых спиральных и икосаэдрических форм до более сложных структур. Кодированные вирусом субъединицы белка самостоятельно собираются с образованием капсида, что обычно требует присутствия вирусного генома. Сложные вирусы могут кодировать белки, которые помогают сборке капсида. Белки, ассоциированные с нуклеиновой кислотой, известны как нуклеопротеины, причем комплекс капсидных белков вируса с вирусной нуклеиновой кислотой носит название нуклеокапсида.

Вирусы передаются различными способами, включая прямую передачу или контакт с биологической жидкостью, такой как кровь, слезная жидкость, сперма, предсперма, слюна, молоко, вагинальные выделения, очаги поражения; капельный контакт, фекально-оральный контакт или в результате укуса животного или рождения. Вирус содержит ДНК или РНК гены и носит название ДНК-вируса или РНК-вируса соответственно. Вирусный геном является однонитевым или двухнитевым. Некоторые вирусы содержат геном, который является частично двухнитевым и частично однонитевым. Для вирусов с однонитевой ДНК или РНК спирали носят название положительно-смысловых (так называемые плюс-спирали) или отрицательно-смысловых (так называемые минус-спирали) в зависимости от того, комплементарны ли они матричной РНК вируса (мРНК). Положительно-смысловая РНК вируса идентична мРНК вируса и, таким образом, может непосредственно транслироваться клеткой-хозяином. Отрицательно-смысловая РНК вируса комплементарна мРНК и, следовательно, перед трансляцией должна быть преобразована в положительно-смысловую РНК с помощью РНК-полимеразы. Номенклатура ДНК аналогична номенклатуре РНК в том смысле, что кодирующая цепь для вирусной мРНК является комплементарной к ней (отрицательной), а не кодирующая цепь представляет собой ее копию (положительная).

Антигенная изменчивость или реассортация может давать новые штаммы. Вирусы подвергаются генетической модификации по нескольким механизмам. Такие механизмы включают процесс под названием генетический дрейф, в ходе которого отдельные основания в ДНК или РНК мутируют на другие основания. Антигенный сдвиг происходит в случае значительного изменения в геноме вируса. Это может быть результатом рекомбинации или реассортации. РНК-вирусы часто существуют в виде квазивидов или скоплений вирусов одного и того же вида, но с небольшими отличиями в нуклеозидных последовательностях генома.

В разных типах вирусов генетический материал вирусов и способ репликации материала варьируют. Репликация генома большинства ДНК-вирусов происходит в ядре клетки. Если на поверхности клетки присутствует соответствующий рецептор, то указанные вирусы проникают в клетку путем слияния с клеточной мембраной или путем эндоцитоза. Большинство ДНК-вирусов полностью зависят от аппарата синтеза ДНК и РНК хозяина и аппарата процессинга РНК. Репликация обычно происходит в цитоплазме. РНК-вирусы, как правило, используют свои собственные ферменты репликазы РНК для создания копий своего генома.

Балтиморская классификация вирусов основана на механизме получения мРНК. Для получения белков и саморепликации вирусы должны генерировать мРНК из своего генома, но для достижения этого используются разные механизмы. Вирусные геномы могут быть одноцепочечными (оц) или двухцепочечными (дц), РНК или ДНК, а также могут использовать или не использовать обратную транскриптазу (ОТ). Кроме того, оцРНК вирусов могут находиться в смысловой (плюс) или антисмысловой (минус) последовательности. В такой классификации вирусы делят на семь групп: I, дцДНК-вирусы (например, аденовирусы, вирусы герпеса, поксвирусы); II, оцДНК-вирусы с (плюс)смысловой ДНК (например, парвовирусы); III, дцРНК вирусы (например, реовирусы); IV, (плюс)оцРНК вирусы с (плюс)смысловой РНК (например, пикорнавирусы, тогавирусы); V (минус)оцРНК вирусы с (минус)смысловой РНК (например, ортомиксовирусы, рабдовирусы); VI, оцРНК-ОТ вирусы с (плюс)смысловой РНК и промежуточной ДНК в жизненном цикле (например, ретровирусы); и VII, дцДНК-ОТ вирусы (например, гепаднавирусы).

Вирус гепатита В является гепаднавирусом. Вирусная частица (вирион) состоит из внешней липидной оболочки и икосаэдрического нуклеокапсидного ядра, состоящего из белка. Геном HBV состоит из кольцевой ДНК, но ДНК не полностью двухцепочечной. Один конец цепи соединен с вирусной ДНК-полимеразой. Вирус реплицируется путем обратной транскрипции через промежуточную форму РНК. Репликация обычно происходит в печени, где он вызывает воспаление (гепатит). Вирус распространяется в кровь, где у инфицированных людей обнаруживаются специфические белки вируса и антитела к ним. Анализы крови для обнаружения указанных белков и антител применяются для диагностики инфекции.

Вирус гепатита В проникает в клетку путем эндоцитоза. Поскольку вирус размножается посредством РНК, синтезированной ферментом хозяина, вирусная геномная ДНК должна быть перенесена в ядро клетки шаперонами хозяина. После этого частично двухцепочечная вирусная ДНК становится полностью двухцепочечной и трансформируется в ковалентно замкнутую кольцевую ДНК (кзкДНК), которая служит матрицей для транскрипции вирусной мРНК. Вирус включает четыре основных серотипа (ad_r, ad_w, au_r, au_w), выделенные на основании антигенных эпитопов, представленных на оболочечных белках, и восемь генотипов (А-Н) в соответствии с общими вариациями нуклеотидной последовательности генома.

Поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), как правило, используют для скрининга на наличие этой инфекции. Это первый поддающийся выявлению вирусный антиген, который появляется в ходе инфекции. Однако на ранних стадиях инфекции этот антиген может отсутствовать, а также он не обнаруживается на более поздних стадиях инфекции, если организм хозяина удаляет его. Инфекционный вирион содержит внутреннюю "ядерную частицу", в которую заключен вирусный геном. Икосаэдрическая ядерная частица состоит из ядерного белка, альтернативно известного как ядерный антиген гепатита В или HBcAg. IgM антитела к ядерному антигену гепатита В (анти-HBc IgM) может применяться в качестве серологического маркера. Может появиться антиген е гепатита В (HBeAg). Присутствие HBeAg в сыворотке хозяина связано с высокими скоростями вирусной репликации. Некоторые варианты вируса гепатита В не вырабатывают антиген "е".

Если организм хозяина способен элиминировать инфекцию, то уровни HBsAg обычно снижаются ниже порога обнаружения, и появляются антитела IgG к поверхностному антигену гепатита В и ядерному антигену (анти-HBs и анти-HBc IgG). Промежуток времени между исчезновением HBsAg и появлением анти-HBs называется серонегативным окном. Лицо с серонегативным результатом HBsAg и серопозитивным результатом анти-HBs устранило инфекцию или было вакцинировано ранее. Лица, которые остаются HBsAg серопозитивными на протяжении по меньшей мере шести месяцев, считаются носителями гепатита В. У носителей вируса может присутствовать хронический гепатит В, проявляющийся повышенными уровнями сывороточной аланинаминотрансферазы и воспалением печени, которое можно выявить с помощью биопсии. Для обнаружения и измерения количества ДНК HBV в клинических образцах были разработаны тесты на нуклеиновую кислоту (ПЦР).

Острая инфекция вирусом гепатита В сопровождается острым вирусным гепатитом. Острый вирусный гепатит обычно начинается с симптомов общего недомогания, потери аппетита, тошноты, рвоты, болей в теле, умеренной лихорадки, окрашивания мочи в темный цвет и прогрессирует до появления желтухи. Хроническая инфекция вирусом гепатита В может быть бессимптомной или может сопровождаться хроническим воспалением печени (хронический гепатит), которое может приводить к циррозу. При хронической инфекции гепатитом В повышается заболеваемость гепатоклеточной карциномой (рак печени).

В ходе инфекции HBV иммунный ответ хозяина вызывает как повреждение клеток печени, так и клиренс вируса. Адаптивный иммунный ответ, в частности вирусоспецифические цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), вносит свой вклад в большинство случаев поражения печени, связанных с инфекцией HBV. Уничтожая инфицированные клетки и вырабатывая противовирусные цитокины, способные изгнать HBV из жизнеспособных гепатоцитов, ЦТЛ элиминируют вирус. Хотя именно ЦТЛ инициируют и опосредуют поражение печени, неспецифические в отношении антигена воспалительные клетки могут ухудшать индуцированную ЦТЛ иммунопатологию, причем активированные тромбоциты в месте инфекции могут способствовать накоплению ЦТЛ в печени.

Терапевтические агенты могут остановить репликацию вируса, таким образом, минимизируя поражение печени. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемое относится к описанным в

настоящем документе способам лечения субъекта с диагнозом HBV путем введения соединения, раскрытого в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект является иммунокомпрометированным. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение вводят в сочетании с другим противовирусным агентом, таким как ламивудин, адефовир, тенофовир, телбивудин и энтекавир, и/или модуляторами иммунной системы интерфероном α -2a и пегилированным интерфероном α -2a (Pegasys). В некоторых вариантах реализации изобретение относится к предотвращению HBV-инфекции у субъекта с ослабленным иммунитетом, подверженного риску инфекции, путем введения фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем документе, и необязательно одного или более противовирусных средств. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект подвержен риску инфекции вследствие того, что его сексуальным партнером является субъект с диагнозом HBV.

Соединения по настоящему изобретению могут вводиться в сочетании со вторым противовирусным агентом, таким как абакавир, ацикловир, адефовир, амантадин, ампренавир, амплиген, арбидол, атазанавир, атрипла, боцепревир, цидофовир, комбивир, дарунавир, делавирдин, диданозин, докозанол, эдоксудин, эфавиренз, эмтрицитабин, энфувиртид, энтекавир, фамцикловир, фомивирсен, фосампренавир, фоскарнет, фосфонет, ганцикловир, ибацитабин, имуновир, идоксуридин, имихимод, индинавир, инозин, интерферон типа III, интерферон типа II, интерферон типа I, ламивудин, лопинавир, ловирид, маравирок, мороксидин, метисазон, нелфинавир, невирапин, нексавер, осельтамивир, пегинтерферон α -2a, пенцикловир, перамивир, плеконарил, подофиллотоксин, ралтегравир, рибавирин, ремантадин, ритонавир, пирамидин, саквинавир, софосбувир, ставудин, теллапревир, телбивудин, тенофовир, тенофовир дизопроксил, типранавир, трифлуридин, тризивир, тромантадин, трувада, валацикловир, валганцикловир, викри-вирок, видарабин, вирамидин, зальцитабин, занамивир или зидовудин и их комбинации.

Составы.

Фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, могут принимать форму фармацевтически приемлемых солей, как в общем описано ниже. Некоторыми предпочтительными, но не ограничивающими примерами подходящих фармацевтически приемлемых органических и/или неорганических кислот являются хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, уксусная кислота и лимонная кислота, а также другие фармацевтически приемлемые кислоты, сами по себе известные (которые упоминаются в источнике, приведенном ниже).

Если соединения по изобретению содержат как кислотную группу, так и основную группу, то соединения по настоящему изобретению могут дополнительно образовывать внутренние соли, причем такие соединения включены в объем изобретения. Если соединение по настоящему изобретению содержит гетероатом-донор водорода (например, NH), то изобретение дополнительно включает соли и/или изомеры, образованные путем переноса атома водорода на основную группу или атом в молекуле.

Фармацевтически приемлемые соли соединений включают их кислотно-аддитивные соли и основно-аддитивные соли. Подходящие кислотно-аддитивные соли образуются из кислот, которые образуют нетоксичные соли. Примеры включают соли ацетат, адипат, аспартат, бензоат, безилат, бикарбонат/карбонат, бисульфат/сульфат, борат, камзилат, цитрат, цикламат, эдизилат, эзилат, формиат, фумарат, глюцептат, глюконат, глюкуронат, гексафторфосфат, гибензат, гидрохлорид/хлорид, гидробромид/бромид, гидройодид/йодид, изетионат, лактат, малат, малеат, малонат, мезилат, метилсульфат, нафтиллат, 2-напзилат, никотинат, нитрат, оротат, оксалат, пальмитат, памоат, фосфат/гидрофосфат/дигидрофосфат, пироглутамат, сахарат, стеарат, сукцинат, таннат, тартрат, тозилат, трифторацетат и ксинофоат. Подходящие основные соли получают из оснований, которые образуют нетоксичные соли. Примеры включают соли алюминия, аргинина, бензатина, кальция, холина, диэтиламина, диоламина, глицина, лизина, магния, меглумина, оламина, калия, натрия, трометамин и цинка. Дополнительно могут быть образованы гемисоли кислот и оснований, например гемисульфатные и гемикальциевые соли. Обзор подходящих солей см. в Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, 2002), которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Соединения, описанные в настоящем документе, можно вводить в форме пролекарства. Пролекарство может включать ковалентно присоединенный носитель, который высвобождает активное исходное лекарственное средство при введении млекопитающему. Пролекарства могут быть получены путем модификации функциональных групп, присутствующих в соединениях, таким образом, что модифицирующие группы отщепляются при обычных манипуляциях или *in vivo* с образованием исходного соединения. Пролекарства включают, например, соединения, в которых гидроксильная группа связана с любой группой, которая при введении млекопитающему отщепляется с образованием свободной гидроксильной группы. Примеры пролекарств включают, но не ограничиваясь этим, ацетатные, формиатные и бензоатные производные спиртовых функциональных групп в соединениях. Способы конструирования соединения в качестве пролекарства известны, например, из Testa and Mayer, Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism, Wiley (2006). Типичные пролекарства образуют активный метаболит путем трансформации пролекарства под действием гидролитических ферментов, например, путем гидролиза амида, лактамов, пептидов, сложных эфиров карбоновых кислот, эпоксидов или расщепления сложных эфиров неоргани-

ческих кислот. Было показано, что сложноэфирные пролекарства легко разлагаются в организме с высвобождением соответствующего спирта. См., например, Imai, *Drug Metab Pharmacokinet.* (2006) 21(3): 173-85, под заголовком "Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design".

Фармацевтические композиции для применения в настоящем изобретении обычно содержат эффективное количество соединения и подходящий фармацевтически приемлемый носитель. Составы могут быть получены известным способом, который обычно включает смешивание по меньшей мере одного соединения в соответствии с изобретением с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, и, при желании, в комбинации с другими фармацевтически активными соединениями, при необходимости в асептических условиях. См. патент США № 6369086, патент США № 6372778, патент США № 6369087 и патент США № 6372733 и другие источники, упомянутые выше, а также стандартные справочники, такие как последнее издание *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Как правило, для фармацевтического применения соединения могут быть введены в фармацевтический препарат, содержащий по меньшей мере одно соединение и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество и при необходимости одно или более дополнительных фармацевтически активных соединений.

Фармацевтические препараты по настоящему изобретению предпочтительно имеют однодозовую форму и могут быть соответственно упакованы, например, в коробку, блистер, флакон, бутылку, саше, ампулу или любой другой подходящий однодозовый или многодозовый держатель или емкость (которые могут быть должным образом маркированы), необязательно с одним или более листов-вкладышей, содержащих информацию и/или инструкцию по применению продукта. Обычно такие стандартные дозы будут содержать от 1 до 1000 мг, обычно от 5 до 500 мг по меньшей мере одного соединения по изобретению, например около 10, 25, 50, 100, 200, 300 или 400 мг в единичной дозе.

Соединения можно вводить различными способами, включая пероральный, офтальмологический, ректальный, трансдермальный, подкожный, внутривенный, внутримышечный или назальный, в зависимости, главным образом, от конкретного состава. Соединение обычно вводят в "эффективном количестве", что означает любое количество соединения, после соответствующего введения являющееся достаточным для достижения желаемого терапевтического или профилактического эффекта у субъекта, которому его вводят. Обычно в зависимости от состояния, которое подлежит предупреждению или лечению, и способа введения такое эффективное количество будет составлять от 0,01 до 1000 мг на 1 кг массы тела пациента в сутки, чаще от 0,1 до 500 мг, например от 1 до 250 мг, например около 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 или 250 мг на 1 кг массы тела пациента в сутки, которые могут быть введены в виде одной суточной дозы, разделенной на один или более приемов в сутки. Количество(а) для введения, способы введения, а также схема лечения могут быть определены лечащим врачом в зависимости от таких факторов, как возраст, пол и общее состояние пациента, природа и тяжесть заболевания/симптомов, подлежащих лечению. См. патент США № 6372778, патент США № 6369087, патент США № 6369086 и патент США № 6372733 и другие источники, упомянутые выше, а также стандартные справочники, такие как последнее издание *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

В случае формы для перорального введения соединения может быть смешано с подходящими добавками, такими как вспомогательные вещества, стабилизаторы или инертные разбавители, причем с помощью обычных способов ему может быть придана подходящая для введения форма, такая как таблетки, таблетки, покрытые оболочкой, твердые капсулы, водные, спиртовые или масляные растворы. Примерами подходящих инертных носителей являются аравийская камедь, магнезия, карбонат магния, фосфат калия, лактоза, глюкоза или крахмал, в частности кукурузный крахмал. В этом случае состав может обрабатываться как в виде сухих, так и влажных гранул. Подходящими масляными вспомогательными веществами или растворителями являются растительные или животные масла, такие как подсолнечное масло или рыбий жир. Подходящими растворителями для водных или спиртовых растворов являются вода, этанол, растворы сахаров или их смеси. Полиэтиленгликоли и полипропиленгликоли также являются пригодными в качестве дополнительных вспомогательных веществ для других форм введения. В случае таблеток немедленного высвобождения указанные композиции могут содержать микрокристаллическую целлюлозу, дикальция фосфат, крахмал, стеарат магния и лактозу и/или другие вспомогательные вещества, связующие вещества, наполнители, дезинтегранты, разбавители и смазки, известные из уровня техники.

В случае введения с помощью назального аэрозоля или ингаляции композиции могут быть получены в соответствии с методиками, хорошо известными в области фармацевтических препаратов, и могут быть приготовлены в виде растворов в физиологическом растворе, с применением бензилового спирта или других подходящих консервантов, стимуляторов абсорбции для повышения биодоступности, фторуглеродов и/или других солюбилизирующих или диспергирующих агентов, известных из уровня техники. Подходящие фармацевтические композиции для введения в виде аэрозолей или спреев представляют собой, например, растворы, суспензии или эмульсии соединений по настоящему изобретению или их физиологически переносимых солей в фармацевтически приемлемом растворителе, таком как этанол или вода, или в смеси таких растворителей. Если необходимо, препарат может дополнительно содержать другие фармацевтические вспомогательные вещества, такие как поверхностно-активные вещества,

эмульгаторы и стабилизаторы, а также пропеллент.

В случае подкожного или внутривенного введения соединения, при необходимости, вместе с обычными веществами, такими как солюбилизаторы, эмульгаторы или другие вспомогательные вещества, вводят в раствор, суспензию или эмульсию. Кроме того, соединения можно лиофилизировать и полученные лиофилизаты применять, например, для получения инъекционных или инфузионных препаратов. Подходящими растворителями являются, например, вода, физиологический раствор хлорида натрия или спирты, например этанол, пропанол, глицерин, растворы сахаров, такие как растворы глюкозы или маннита, или смеси различных указанных растворителей. Инъекционные растворы или суспензии могут быть составлены в соответствии с известным уровнем техники, с применением подходящих нетоксичных, подходящих для парентерального введения разбавителей или растворителей, таких как маннит, 1,3-бутандиол, вода, раствор Рингера или изотонический раствор хлорида натрия, или подходящих диспергирующих или увлажняющих и суспендирующих агентов, таких как стерильные, легкие, нелетучие масла, в том числе синтетические моно- или диглицериды, и жирные кислоты, включая олеиновую кислоту.

При ректальном введении в форме свечей составы могут быть получены путем смешивания соединений формулы I с подходящим нераздражающим наполнителем, таким как масло какао, сложные эфиры синтетических глицеридов или полиэтиленгликоли, которые являются твердыми при обычных температурах, но плавятся и/или растворяются в полости ректальной кишки с высвобождением лекарственного средства.

В некоторых вариантах реализации изобретения предполагается, что указанные композиции могут представлять собой составы замедленного высвобождения. В типичных составах замедленного высвобождения применяется кишечнорастворимое покрытие. Как правило, на лекарственное средство для перорального применения наносят барьер, контролирующий место всасывания лекарственного средства в пищеварительной системе.

Кишечнорастворимые покрытия не дают лекарственному средству высвободиться раньше, чем оно достигнет тонкой кишки. Кишечнорастворимые покрытия могут содержать полимеры полисахаридов, такие как мальтодекстрин, ксантан, склероглюкан, декстран, крахмал, альгинаты, пуллулан, гиалуроновая кислота, хитин, хитозан и т.п.; другие природные полимеры, такие как белки (альбумин, желатин и т.д.), поли-L-лизин; натрий полиакрилат; поли(гидроксикалкиметакрилаты) (например, поли(гидроксиэтилметакрилат); карбоксиполиметилена (например, Carborol™); карбомер; поливинилпирролидон; камеди, такие как гуаровая камедь, аравийская камедь, камедь карайи, камедь гатти, камедь плодов рожкового дерева, тамариндовая камедь, геллановая камедь, трагакантовая камедь, агар, пектин, клейковина и т.п.; поливиниловый спирт; сополимер этилена и винилового спирта, полиэтиленгликоль (ПЭГ); и простые эфиры целлюлозы, такие как гидроксиметилцеллюлоза (ГМЦ), гидроксиэтилцеллюлоза (ГЭЦ), гидроксипропилцеллюлоза (ГПЦ), метилцеллюлоза (МЦ), этилцеллюлоза (ЭЦ), карбоксиэтилцеллюлоза (КЭЦ), этилгидроксиэтилцеллюлоза (ЭГЭЦ), карбоксиметилгидроксиэтилцеллюлоза (КМГЭЦ), гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ), гидроксипропилэтилцеллюлоза (ГПЭЦ) и натрий карбоксиметилцеллюлоза (Na-КМЦ); а также сополимеры и/или (простые) смеси любых из указанных выше полимеров. Некоторые из вышеупомянутых полимеров могут быть поперечно сшиты с помощью стандартных методик.

Выбор полимера будет определяться природой активного ингредиента/лекарственного средства, которое применяется в композиции по изобретению, а также желаемой скоростью высвобождения. В частности, как будет понятно специалисту в данной области, например, в случае ГПМЦ большая молекулярная масса будет, в общем, обеспечивать меньшую скорость высвобождения лекарственного средства из композиции. Кроме того, в случае ГПМЦ различная степень замещения метоксильных групп и гидроксипропоксильных групп будет вызывать изменение скорости высвобождения лекарственного средства из композиции. В этом отношении, как указано выше, может быть желательным создание композиций по изобретению в виде покрытий, в которых полимерный носитель выполнен с применением смеси двух или более полимеров, например, с различной молекулярной массой для получения конкретно требуемого или желаемого профиля высвобождения.

Микросферы из полилактида, полигликолида и их поли(лактид-со-гликолид) сополимеров можно применять для получения систем доставки белка с замедленным высвобождением. Белки могут быть заключены в поли(лактид-со-гликолид) микросферы депо несколькими способами, включая образование эмульсии вода-в-масле с белком в водной фазе и полимером в фазе органического растворителя (эмульсионный способ), образование суспензии твердого вещества в масле, в которой твердый белок диспергирован в растворе полимера на основе растворителя (суспензионный способ), или путем растворения белка в растворе полимера на основе растворителя (способ растворения). К белкам можно присоединить поли(тиленгликоль) (ПЭГилирование) для увеличения периода полувыведения *in vivo* циркулирующих терапевтических белков и снижения вероятности иммунного ответа.

Дополнительно липосомальные суспензии (включая липосомы, нацеленные на вирусные антигены) могут быть получены обычными способами получения фармацевтически приемлемых носителей. Это может быть подходящим в случае доставки свободных нуклеозидов, ацилнуклеозидов или фосфатно-эфирных пролекарственных форм нуклеозидных соединений по настоящему изобретению.

Необходимо понимать, что нуклеозиды по настоящему изобретению содержат несколько хиральных центров и могут существовать и быть выделены в оптически активной и рацемической формах. Некоторые соединения могут проявлять полиморфизм. Необходимо понимать, что настоящее изобретение включает любую рацемическую, оптически активную, диастереомерную, полиморфную или стереоизомерную форму соединения по изобретению или их смеси, которые обладают полезными свойствами, описанными в настоящем документе. Из уровня техники хорошо известно, как получить оптически активные формы (например, путем разделения рацемической формы с помощью способов перекристаллизации, путем синтеза из оптически активных исходных материалов, хиральным синтезом или хроматографическим разделением с применением хиральной неподвижной фазы).

Атомы углерода в нуклеозиде являются хиральными, их неводородные заместители (основание и группы CHOR соответственно) могут находиться в положении цис (по одну сторону) или транс (по разные стороны) по отношению к системе сахарного кольца. Следовательно, четыре оптических изомера представлены следующими конфигурациями (при ориентации сахарного фрагмента в горизонтальной плоскости таким образом, что атом кислорода находится сзади): цис (обе группы "вверху", что соответствует конфигурации природных β -D-нуклеозидов), цис (обе группы "внизу", что соответствует искусственной β -L-конфигурации), транс (заместитель C2' "вверху" и C4' заместитель "внизу") и транс (заместитель C2' "внизу" и заместитель C4' "вверху"). "D-нуклеозиды" представляют собой цис-нуклеозиды в природной конфигурации, а "L-нуклеозиды" представляют собой цис-нуклеозиды в искусственной конфигурации.

Аналогично, большинство аминокислот являются хиральными (обозначают как L- или D-, причем L-энантиомер является природной конфигурацией) и могут существовать в виде отдельных энантиомеров.

Примеры способов получения оптически активных материалов известны из уровня техники и включают, по меньшей мере, следующее: i) физическое отделение кристаллов - методика, в соответствии с которой макроскопические кристаллы отдельных энантиомеров отделяют вручную. Этот способ может быть применен, если кристаллы отдельных энантиомеров существуют, т.е. материал представляет собой конгломерат, а кристаллы визуально отличаются; ii) одновременная кристаллизация - методика, в соответствии с которой отдельные энантиомеры по отдельности кристаллизуют из раствора рацемата, ее проведение возможно только в том случае, если последний представляет собой конгломерат в твердом состоянии; iii) ферментативное разделение - методика частичного или полного разделения рацемата, основанная на различной скорости реакции энантиомеров с ферментом; iv) ферментативный асимметричный синтез - методика синтеза, в соответствии с которой по меньшей мере на одной стадии синтеза применяется ферментативная реакция для получения энантиомерно чистого или обогащенного синтетического прекурсора целевого энантиомера; v) химический асимметричный синтез - методика синтеза, в соответствии с которой целевой энантиомер синтезируют из ахирального прекурсора в условиях, которые дают асимметрию (т.е. хиральность) в продукте, что может быть достигнуто с применением хиральных катализаторов или хиральных вспомогательных веществ; vi) разделение диастереомеров - методика, в соответствии с которой рацемическое соединение вводят в реакцию с энантиомерно чистым реагентом (хиральное вспомогательное вещество), который преобразует индивидуальные энантиомеры в диастереомеры. Полученные диастереомеры разделяют хроматографией или кристаллизацией на основании более выраженных структурных различий, а затем удаляют хиральный вспомогательный реагент с получением целевого энантиомера; vii) асимметричное превращение первого и второго порядка - методика, в соответствии с которой диастереомеры из рацемата уравнивают с получением преобладания в растворе диастереомера из целевого энантиомера или с предпочтительной кристаллизацией диастереомера из целевого энантиомера, что нарушает равновесие таким образом, что, в конечном счете, практически весь материал превращают в кристаллический диастереомер из требуемого энантиомера. Затем целевой энантиомер высвобождают из диастереомера; viii) кинетическое разделение - этот метод относится к достижению частичного или полного разделения рацемата (или дальнейшего разделения частично разделенного соединения) на основании неравных скоростей реакции энантиомеров с хиральным нерацемическим реагентом или катализатором в кинетических условиях; ix) энантиоселективный синтез из нерацемических прекурсоров - метод синтеза, благодаря которому целевой энантиомер получают из нехиральных исходных материалов и в котором стереохимическая целостность не нарушается или только минимально нарушается в ходе синтеза; x) хиральная жидкостная хроматография - методика, в соответствии с которой энантиомеры рацемата разделяют в жидкой подвижной фазе на основе отличий в их взаимодействии с неподвижной фазой. Неподвижная фаза может быть изготовлена из хирального материала, или подвижная фаза может содержать дополнительный хиральный материал, чтобы индуцировать отличия во взаимодействии; xi) хиральная газовая хроматография - методика, в соответствии с которой рацемат испаряется, и энантиомеры разделяют на основе отличий в их взаимодействии в газообразной подвижной фазе с колонкой, содержащей неподвижную фазу нерацемического хирального адсорбента; xii) экстракция хиральными растворителями - методика, в соответствии с которой энантиомеры разделяют на основе избирательного растворения одного из энантиомеров в конкретном хиральном растворителе; xiii) транс-

порт сквозь хиральные мембраны - методика, в соответствии с которой рацемат приводят в контакт с тонкой барьерной мембраной. Барьер обычно разделяет две смешивающиеся жидкости, одна из которых содержит рацемат, причем движущая сила, такая как разница концентрации или давления, вызывает предпочтительный транспорт сквозь барьерную мембрану. Разделение происходит в результате нерацемической хиральной природы мембраны, которая пропускает только один энантиомер из рацемата. В одном варианте реализации изобретения применяется хиральная хроматография, включая хроматографию с псевдосжиженным слоем. Коммерчески доступен широкий спектр хиральных стационарных фаз.

Некоторые соединения, описанные в настоящем описании, содержат олефиновые двойные связи и, если не указано иное, то включены как E, так и Z геометрические изомеры.

Кроме того, некоторые нуклеозиды, описанные в настоящем документе, могут существовать в виде таутомеров, таких как кето-енольные таутомеры. Соединения по настоящему изобретению включают отдельные таутомеры, а также их смеси.

Примеры

Следующие примеры представлены для иллюстрации способов, композиций и результатов в соответствии с раскрытым объектом изобретения. Эти примеры не предназначены для охвата всех аспектов объекта изобретения, раскрытого в настоящем документе, но скорее иллюстрируют типичные способы, композиции и результаты. Эти примеры не предназначены для исключения эквивалентов и вариаций настоящего изобретения, которые являются очевидными для специалиста в данной области техники.

Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но некоторые погрешности и отклонения должны учитываться. Если не указано иное, части являются частями по массе, температура приведена в °C или как комнатная температура, а давление является атмосферным или близким к атмосферному. Существуют многочисленные вариации и комбинации условий реакции, например температуры, давления, концентрации компонентов, и других диапазонов, и условий реакции, которые можно применять для оптимизации чистоты и выхода продукта, получаемого в результате описанного процесса. Для оптимизации таких условий процесса потребуется только разумное и рутинное проведение экспериментов.

Пример 1. Анализ HBV.

Клетки HepG2.2.15 (100 мкл) в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, помещают во все лунки 96-луночного планшета при плотности 1×10^4 клеток на лунку, и планшет инкубируют при 37°C в среде, содержащей 5% CO₂, в течение 24 ч. После инкубации шесть десятикратных серийных разведений исследуемого соединения в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, добавляют в отдельные лунки планшета в трех параллельных экспериментах. В качестве контроля в шесть лунок на планшете добавляют среду, содержащую только вирус. Планшет инкубируют в течение 6 дней при 37°C в среде, содержащей 5% CO₂. Питательную среду на 3 день заменяют средой, содержащей указанные концентрации каждого соединения. Сто микролитров супернатанта отбирают из каждой лунки для анализа вирусной ДНК с помощью кПЦР, и цитотоксичность оценивают с помощью ХТТ окрашивания монослоя культуры клеток на шестой день.

Десять микролитров супернатанта клеточной культуры отбирают на шестой день, разбавляют буфером для разведения кПЦР (40 мкг/мл фрагментированной ДНК спермы лосося) и кипятят в течение 15 мин. Количественную ПЦР в реальном времени проводят в 386-луночных планшетах с применением системы секвенирования Applied Biosystems 7900HT и вспомогательного программного обеспечения SDS 2.4. Пять микролитров (5,0 мкл) прокипяченной ДНК для каждого образца и серийных 10-кратных разведений количественного стандарта ДНК обрабатывают ПЦР в реальном времени с применением смеси для количественной ПЦР Q-Platinum SuperMix-UDG (Invitrogen) и специфичных олигонуклеотидных праймеров ДНК (IDT, Коралвилл, Айова) HBV-AD38-qF1 (5'-CCG TCT GTG CCT TCT CAT CTG-3') (SEQ ID NO: 1), HBV-AD38-qR1 (5'-AGT CCA AGA GTY CTC TTA TRY AAG ACC TT-3') (SEQ ID NO: 2) и HBV-AD38-qP1 (5'-FAM CCG TGT GCA /ZEN/CTT CGC TTC ACC TCT GC-3'-BHQ1) (SEQ ID NO: 3) при конечной концентрации 0,2 мкМ для каждого праймера в общем объеме реакционной смеси 15 мкл. Количество копий ДНК HBV в каждом образце интерполируют по данным стандартной кривой с помощью программного обеспечения SDS.24, а данные импортируют в Excel для анализа.

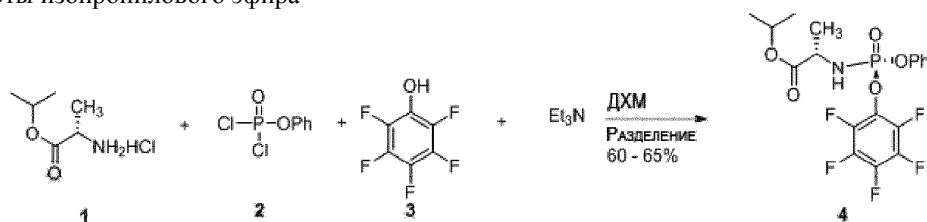
50% цитотоксичную концентрацию для исследуемых материалов получают, измеряя восстановление тетразолиевого красителя ХТТ на обработанных планшетах для культуры тканей. ХТТ метаболизируется митохондриальным ферментом НАДФН-оксидазой до растворимого формазанового продукта в метаболически активных клетках. Раствор ХТТ ежедневно готовят в виде исходного раствора 1 мг/мл в ФСБ. Исходный раствор метосульфата феназина (МСФ) готовят как 0,15 мг/мл в ФСБ и хранят в темноте при -20°C. Раствор ХТТ/МСФ готовят непосредственно перед применением путем добавления 40 мкл МСФ на 1 мл раствора ХТТ. Пятьдесят микролитров ХТТ/МСФ добавляют в каждую лунку планшета, и планшет инкубируют в течение 2-4 ч при 37°C. Период инкубации 2-4 ч эмпирически определен как находящийся в диапазоне линейной характеристики для восстановления красителя ХТТ с указанным количеством клеток для каждого анализа. Вместо крышек применяют приспособления для заклеивания планшета. Герметично закрытый планшет переворачивают несколько раз для перемешивания растворимого формазанового продукта, и планшет считывают при 450 нм (эталонная длина волны 650 нм) с по-

мощью спектрофотометра Molecular Devices SpectraMax Plus 384. Данные регистрируют с помощью программного обеспечения Softmax 4.6 и импортируют в Excel для анализа. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1

Структура и номер	Анализ эффективности против HBV		Цитотоксичность (CC ₅₀ мкМ)									
	EC ₅₀ (мкМ)	HepG2 CC ₅₀ (мкМ)	Huh-7	HepG2	BxPC3	CEM	A204	IEC-6	H9c	A549	Vero	
EIDD-02020 КЛЕВУДИН	0,46	>100	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	
EIDD-02173	1,71	>100	>400	>400	>400	140	330	307	344	>400	>400	
EIDD-02174	4,29	>100	290	>400	>400	>400	374	338	311	>400	>400	
EIDD-02308	2,9	>100										
EIDD-02309	2,39	85,1										
EIDD-02333-1	>100	>100										
EIDD-02334-1	>100	>100										
EIDD-02335-1	>100	>100										
3ТС (Ламивудин)	0,14	>10	>400	>400	>400							

Пример 2. Получение (S')-2-[-(S)-2-(2,3,4,5,6-пентафторфенокси)феноксифосфориламино]пропионовой кислоты изопропилового эфира



В колбу, содержащую (S)-изопропил-2-аминопропаноата гидрохлорид (72,0 г, 430 ммоль) помещают фенольный эфир дихлорангидрида фосфорной кислоты (64,2 мл, 430 ммоль) и дихлорметан (ДХМ, 1200 мл). Смесь охлаждают от -70 до -78°C на бане с сухим льдом в ацетоне и затем обрабатывают добавлением по каплям триэтиламина (120 мл, 859 ммоль) на протяжении 30 мин. Смесь перемешивают при температуре от -70 до -78°C в течение 30 мин, затем дают нагреться до комнатной температуры и перемешивают в течение 1 ч.

Далее реакционную смесь охлаждают до $0-5^{\circ}\text{C}$ на ледяной бане и на протяжении 30 мин добавляют к раствору 2,3,4,5,6-пентафторфенола (79 г, 430 ммоль) и триэтиламина (59,9 мл, 430 ммоль) в 100 мл дихлорметана. Полученную смесь перемешивают при температуре от -70 до -78°C в течение 30 мин, затем нагревают до температуры окружающей среды и перемешивают в течение 2 ч.

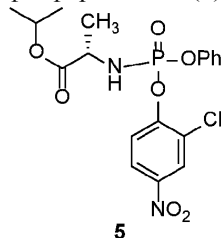
Твердые вещества отфильтровывают и твердый осадок промывают 200 мл этилацетата. Фильтрат и промывные воды концентрируют с помощью вакуумной перегонки до состояния полутвердого остатка. Полутвердый остаток растворяют в 500 мл этилацетата и промывают водой и раствором хлорида натрия. Водные слои повторно экстрагируют 50 мл этилацетата. Объединенный органический слой сушат над безводным MgSO_4 и концентрируют с получением 210 г неочищенного рацемического продукта (выход 100%). По данным ЯМР исследования рацемический продукт, по-видимому, является смесью двух диастереомеров 1:1.

Кинетическое разделение рацемического продукта с получением целевого SS-диастереомера осуществляют на основании следующего протокола.

1) Неочищенную рацемическую смесь суспендируют в 500 мл 20% этилацетата/гексана и добавляют к раствору 5 г пентафторфенола, 10 мл триэтиламина и 100 мг диметиламинопиридина в 20 мл 20% этилацетата/гексана. Реакционную смесь нагревают при $45-50^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин и суспензию перемешивают в течение ночи. Белое твердое вещество отделяют фильтрацией и промывают 200 мл 20% этилацетата/гексана и 100 мл гексана. Продукт сушат при 40°C под вакуумом с получением белого твердого вещества (масса: 98 г). По данным ЯМР исследования продукт, по-видимому, по существу, представляет собой SS-диастереомер.

2) Фильтрат и промывные воды из описанной выше реакции объединяют и концентрируют с получением полутвердого вещества, которое по существу, представляет собой SS-диастереомер, как показано с помощью ЯМР, вместе с другими примесями. Полученный остаток растворяют в 150 мл этилацетата и промывают 50 мл 1н. HCl , водой и 5% раствором K_2CO_3 . Органический слой сушат и концентрируют. Белый остаток суспендируют в 100 мл 20% этилацетата/гексана и твердое вещество отделяют фильтрацией. Затем осадок промывают 20% этилацетата/гексана, гексаном и сушат. Масса полученного белого твердого вещества составляет 22 г. По данным ^1H - и ^{31}P -ЯМР-исследований продукт, по-видимому, в основном представляет собой SS-диастереомер. Общая масса продукта после разделения: 120 г (выход 61,6%).

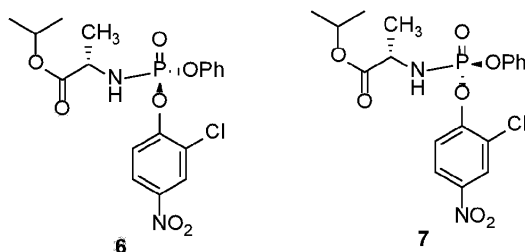
Пример 3. Синтез 2-хлор-нитрофенилфосфорамидата (5)



Раствор фенилдихлорфосфата (60 г, 42,5 мл, 284 ммоль) в дихлорметане (300 мл) охлаждают до 0°C и затем обрабатывают (S)-изопропил-2-аминопропаноата гидрохлоридом (47,7 г, 284 ммоль). Смесь дополнительно охлаждают до -78°C и обрабатывают по каплям раствором триэтиламина (57,6 г, 79 мл, 569 ммоль) в метиленхлориде (300 мл) в течение 1 ч. Реакционную смесь нагревают при 0°C в течение 30 мин и затем обрабатывают предварительно подготовленной смесью 2-хлор-4-нитрофенола (46,9 г, 270 ммоль) и триэтиламина (28,8 г, 39,6 мл, 284 ммоль) в дихлорметане (120 мл) в течение 20 мин. Через 2 ч при 0°C смесь фильтруют сквозь fritованную воронку, а собранный фильтрат концентрируют до сухого состояния. Неочищенную смолу растворяют в МТБЭ (500 мл) и последовательно промывают 0,2М раствором K_2CO_3 (2×100 мл), затем 10% раствором хлорида натрия (3×75 мл). Органический слой сушат

над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют до сухого состояния на роторном испарителе с получением смеси диастереомеров (100 г, 93%) в виде бледно-желтого масла.

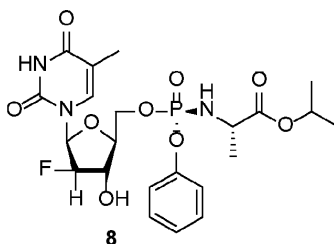
Пример 4. Разделение диастереомеров соединения 5



Диастереомерную смесь 5 (28 г, 63,2 ммоль) растворяют в смеси этилацетат:гексана 2:3 (100 мл) и охлаждают до -20°C . Через 16 ч полученное белое твердое вещество отделяют фильтрацией и сушат под глубоким вакуумом с получением смеси диастереомеров $S_p:R_p$ 16:1 (5,5 г, 19,6%). Маточный раствор концентрируют и полученный остаток растворяют в этилацетат:гексана 2:3 (50 мл). Через 16 ч при -10°C полученное белое твердое вещество собирают и сушат под глубоким вакуумом с получением смеси диастереомеров $S_p:R_p$ 1:6 (4 г, 14%). Смесь диастереомеров $S_p:R_p$ 16:1 (5,5 г, 12,4 ммоль) суспендируют в горячем гексане (50 мл) и медленно обрабатывают этилацетатом (приблизительно 10 мл) до полного растворения. После охлаждения до 0°C полученное белое твердое вещество отделяют фильтрацией, промывают гексаном и сушат под глубоким вакуумом с получением диастереомера S_p соединения 6 (4,2 г, 76%) в виде единственного изомера.

Смесь диастереомеров $S_p:R_p$ 1:6 (4 г, 12,4 ммоль) суспендируют в горячем гексане (50 мл) и медленно обрабатывают этилацетатом (приблизительно 5 мл) до полного растворения. После охлаждения до 0°C полученное белое твердое вещество отделяют фильтрацией, промывают гексаном и сушат под глубоким вакуумом с получением диастереомера R_p соединения 7 (3,2 г, 80%) в виде единственного изомера.

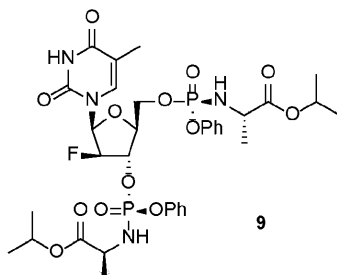
Пример 5. Синтез соединения 8



В сухую колбу емкостью 100 мл помещают 1-((2S,3S,4S,5S-3-фтор-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-5-метилпиримидин-2,4(1H,3H)-дион (300 мг, 1,153 ммоль) и ТГФ (15 мл). Суспензию охлаждают на ледяной бане в атмосфере азота. С помощью шприца добавляют трет-бутилмагний хлорид (2,260 мл, 2,260 ммоль) с образованием прозрачного раствора. Смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 30 мин и снова охлаждают до 0°C . Раствор соединения 4 в ТГФ (20 мл) добавляют с помощью шприца в течение 10 мин при 0°C . Полученный раствор желтого цвета перемешивают при комнатной температуре в течение ночи.

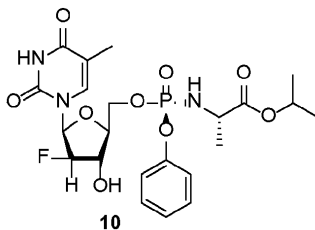
Реакционную смесь охлаждают до 0°C и гасят 5 мл 2н. HCl. Реакционную смесь оставляют нагреваться до комнатной температуры и перемешивают в течение 30 мин. Затем добавляют 30 мл толуола и образовавшиеся слои разделяют. Органический слой промывают 1н. HCl (1×20 мл), водой (20 мл), 5% водн. раствором K_2CO_3 (2×30 мл) и раствором хлорида натрия (30 мл). Все водные слои повторно экстрагируют толуолом (30 мл) и промывают 5% K_2CO_3 (1×30 мл) и раствором хлорида натрия (30 мл). Объединенные органические слои сушат над безводным MgSO_4 и концентрируют с получением маслянистого остатка. Продукт очищают на 15 г силикагеля, элюируя 1% и затем 2,5% MeOH/ДХМ. Продукт получают в 2,5% MeOH/ДХМ, как единственное пятно продукта.

Пример 6. Получение соединения 9



Соединение выделяют из реакционной смеси синтеза соединения 8.

Пример 7. Синтез соединения 10

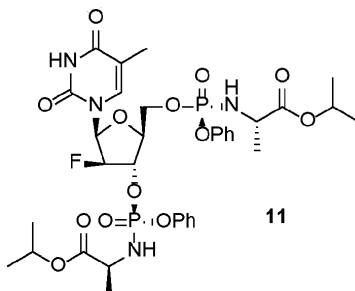


В сухую колбу емкостью 100 мл помещают 1-((2S,3S,4S,5S)-3-фтор-4-гидрокси-5-((гидроксииметил)тетрагидрофуран-2-ил)-5-метилпиримидин-2,4(1H,3H)-дион (400 мг, 1,537 ммоль) и ТГФ (20 мл), суспензию охлаждают на ледяной бане в атмосфере азота и трет-бутилмагний хлорид (1,691 мл, 1,691 ммоль) добавляют по каплям в течение 10 мин. Полученную смесь перемешивают при 0°C в течение 30 мин, затем дают нагреться до комнатной температуры и перемешивают в течение 30 мин. Раствор (2S)-изопропил-2-(((2-хлор-4-нитрофенокси)(фенокси)фосфорил)амино)пропаноата (817 мг, 1,845 ммоль) в ТГФ (150 мл) добавляют по каплям при комнатной температуре в течение 10-50 мин. Полученный раствор оставляют перемешиваться при температуре окружающей среды в течение ночи.

Реакционную смесь охлаждают до 0°C и гасят 5 мл 2н. HCl. Затем реакционной смеси дают нагреться до комнатной температуры и перемешивают в течение 30 мин. Затем добавляют 30 мл толуола и слои разделяют. Органический слой промывают 1н. HCl (1×20 мл), водой (20 мл), 5% водн. раствором K₂CO₃ (2×30 мл) и раствором хлорида натрия (30 мл). Все водные слои повторно экстрагируют толуолом (30 мл), промывают 5% раствором K₂CO₃ (1×30 мл) и раствором хлорида натрия (30 мл). Объединенные органические слои сушат над безводным MgSO₄ и концентрируют с получением маслянистого остатка.

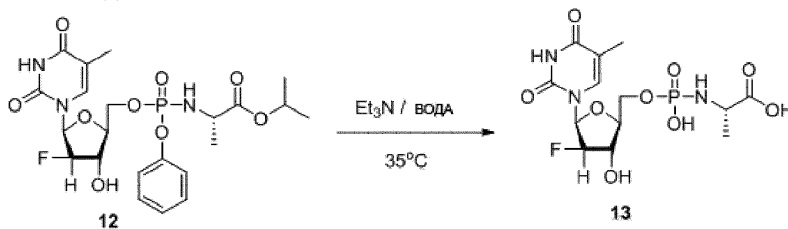
Продукт очищают на 15 г силикагеля, элюируя 1% и затем 2,5% MeOH/ДХМ. Продукт получают в 2,5% MeOH/ДХМ.

Пример 8. Получение соединения 11



Соединение выделяют из реакционной смеси синтеза соединения 10.

Пример 9. Синтез соединения 13



В герметизируемую напорную трубку устанавливают мешалку, помещают 12 (0,132 г, 0,25 ммоль), триэтиламин (12,5 мл) и воду (12,5 мл). Трубку герметизируют и нагревают при 35°C в течение ночи при перемешивании. Через 16 ч реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, трубку открывают и содержимое переносят в круглодонную колбу. Смесь концентрируют на роторном испарителе с получением 200 мг сырого продукта, который распределяют между водой и дихлорметаном (по 30 мл каждого). Органический слой отбрасывают, а водный слой концентрируют на роторном испарителе с получением ~150 мг неочищенного продукта, который растворяют в MeOH и иммобилизируют на целите. Автоматизированная флэш-хроматография на колонке Combiflash (12 г, градиент от iPrOH до iPrOH:конц. NH₄OH:вода 7:2:1) дает продукт в виде влажной соли алюминия. Твердое вещество растворяют в воде, замораживают на бане с сухим льдом и лиофилизируют с получением 13 (0,089 г, 81%) в виде хлопьевидного твердого вещества белого цвета, чистота которого по данным ¹H ЯМР анализа была определена как ~94%.

¹H ЯМР (400 МГц, MeOH-d₄) δ 7,66 (т, J=1,4 Гц, 1H), 6,18 (дд, J=15,4 Гц, 4,3 Гц, 1H), 5,00 (ддд, J=52,6 Гц, 4,2 Гц, 3,3 Гц, 1H), 4,42 (ддд, J=19,8 Гц, 4,7 Гц, 3,4 Гц, 1H), 4,05-3,95 (м, 3H), 3,76 (дк, J=8,9 Гц, 7,0 Гц, 1H), 1,92 (д, J=1,2 Гц, 3H), 1,35 (д, J=7,0 Гц, 1H);

¹H ЯМР (400 МГц, D₂O) δ 7,65 (т, J=1,3 Гц, 1H), 6,25 (дд, J=15,2 Гц, 4,4 Гц, 1H), 5,16 (ддд, J=51,9 Гц,

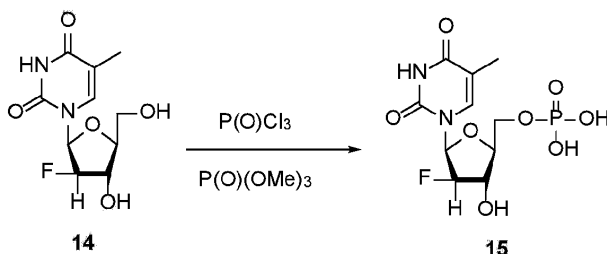
4,3 Гц, 3,5 Гц, 1Н), 4,48 (ддд, J=19,9 Гц, 5,4 Гц, 3,5 Гц, 1Н), 4,10-3,93 (м, 3Н), 3,62 (дк, J=8,7 Гц, 7,0 Гц, 1Н), 1,88 (д, J=1,2 Гц, 3Н), 1,28 (д, J=7,1 Гц, 3Н);

¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,64 (т, J=1,4 Гц, 1Н), 6,13 (дд, J=13,2 Гц, 4,9 Гц, 1Н), 5,07 (дт, J=53,3 Гц, 4,6 Гц, 1Н), 4,26 (дт, J=20,4 Гц, 4,7 Гц, 1Н), 3,92-3,75 (м, 3Н), 3,45-3,35 (м, 1Н, перекрывается с широким пиком воды), 1,80 (д, J=1,2 Гц, 3Н), 1,14 (д, J=7,2 Гц, 3Н);

¹³С ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆) δ 177,1, 163,8, 150,3, 136,5, 109,0, 95,4 (д, J=190,4 Гц), 82,1 (д, J=16,6 Гц), 81,9 (т, J=7,1 Гц), 72,9 (д, J=23,3 Гц), 62,6, 50,8, 19,8 (д, J=6,5 Гц), 12,1;

³¹Р ЯМР (162 МГц, ДМСО-d₆) δ 6,04 (с); ИЭР-МС: m/z 412,0 ([M+H]⁺).

Пример 10. Синтез соединения 15



В круглодонную колбу помещают клеудин (14) (0,143 г, 0,55 ммоль), и сушат в течение ночи при 50°C в вакуумной печи. Колбу вынимают и охлаждают до комнатной температуры в атмосфере азота, твердый остаток растворяют в триметилфосфате (1,375 мл) при перемешивании. Раствор охлаждают до 0°C и фосфорилтрихлорид (0,126 г, 0,825 ммоль) добавляют по каплям с помощью шприца. Реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 3 ч, после чего анализ методом ТСХ показывает незначительную степень протекания реакции. Вторую аликвоту фосфорилтрихлорида (0,422 г, 2,75 ммоль) добавляют по каплям с помощью шприца и смесь хранят при -5°C в морозильной камере в течение ночи. После прохождения 20 ч при указанной температуре смесь выливают в воду (20 мл) и водный слой промывают хлороформом (2×20 мл). Затем водный слой нейтрализуют путем добавления концентрированного водного раствора аммиака до pH 7, снова промывают хлороформом (1×20 мл) и концентрируют на роторном испарителе (температура бани 25°C). Полученное неочищенное полутвердое вещество суспендируют в MeOH и иммобилизуют на целите. Автоматизированная флэш-хроматография на колонке (12 г Combi-flash, градиент от iPrOH до iPrOH:конц. NH₄OH:воды 7:2:1), дает 200 мг влажного твердого вещества белого цвета. Твердое вещество растворяют в воде, замораживают на бане с сухим льдом и лиофилизируют с получением 15 (0,055 г, 29%) в виде хлопьевидного белого твердого вещества, чистота которого была определена как ~95% по данным анализа ¹Н ЯМР.

¹Н ЯМР (400 МГц, D₂O) δ 7,69 (т, J=1,5 Гц, 1Н), 6,28 (дд, J=15,6 Гц, 4,4 Гц, 1Н), 5,18 (ддд, J=51,8 Гц, 4,4 Гц, 3,3 Гц, 1Н), 4,51 (ддд, J=19,6 Гц, 5,2 Гц, 3,2 Гц, 1Н), 4,16-4,01 (м, 3Н), 1,89 (д, 1,2 Гц, 3Н);

¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,60 (с, 1Н), 6,11 (дд, J=13,8 Гц, 4,6 Гц, 1Н), 5,03 (дт, J=53,2 Гц, 4,4 Гц, 1Н), 4,29 (дт, J=20,2 Гц, 3,6 Гц, 1Н), 3,90 (ш м, 3Н), 1,79 (д, 1,2 Гц, 3Н);

¹³С ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆) δ 163,8, 150,3, 136,6, 109,0, 95,3 (д, J=190,0 Гц), 82,1 (д, J=16,5 Гц), 81,9 (т, J=6,4 Гц), 72,6 (д, J=23,5 Гц), 62,6, 12,2;

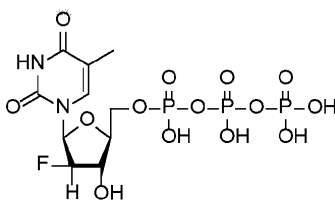
³¹Р ЯМР (162 МГц, ДМСО-d₆) δ 0,01 (с);

ИЭР-МС: m/z 339,0 ([M+H]⁺).

Пример 11. Общая методика получения 5'-трифосфатов.

Нуклеозидный аналог сушат под глубоким вакуумом при 50°C в течение 18 ч и затем растворяют в безводном триметилфосфате (0,3М). После добавления PROTON-SPONGE™ (1,5 мол.экв.) смесь охлаждают до 0°C и обрабатывают по каплям фосфорилхлоридом (1,3 мол.экв.) при помощи шприца в течение 15 мин. Смесь перемешивают при 0°C в течение 4-6 ч, контролируя с помощью ТСХ (изопропанол:конц. NH₄OH:вода 7:2:1). После достижения более чем 85% превращения в монофосфат реакционную смесь обрабатывают смесью бис(три-н-бутиламмонийпирофосфат) (3 мол.экв.) и трибутиламина (6 мол.экв.) в безводном ДМФА (1 мл). После прохождения 20 мин при 0°C с контролем ТСХ (NH₄OH:изопропанол:вода 11:7:2) смесь обрабатывают 20 мл 100 мМ раствором триэтиламмоний бикарбоната (ТЭАБ), перемешивают в течение 1 ч при комнатной температуре и затем экстрагируют простым эфиром (3×15 мл). Далее водный слой очищают с помощью анионообменной хроматографии на смоле DEAE SEPHADEX™ A-25 (11×200 мм) с применением градиента буфера от 50 мМ (400 мл) до 600 мМ (400 мл) ТЭАБ. Фракции по 10 мл анализируют с помощью ТСХ (NH₄OH:изопропанол:вода, 11:7:2). Содержащие трифосфат фракции (элюируются при 500 мМ ТЭАБ) объединяют и концентрируют с помощью роторного испарителя (баня <25°C). Полученное твердое вещество разбавляют деминерализованной водой (10 мл) и концентрируют лиофилизацией.

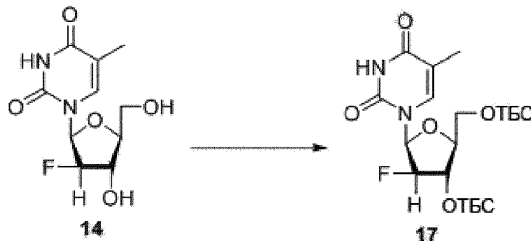
Пример 12. Синтез клеудин-5'-трифосфата (16)



16

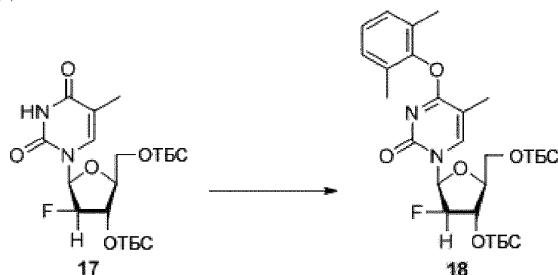
Соединение 16 синтезируют с применением общей методики для синтеза 5'-трифосфата.

Пример 13. Синтез соединения 17



К суспензии 14 (0,980 г, 3,77 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (37,7 мл) последовательно добавляют имидазол (0,769 г, 11,30 ммоль), ДМАП (0,046 г, 0,377 ммоль) и ТБС трифлат (2,162 мл, 9,42 ммоль) при 0°C в атмосфере аргона. Полученную реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 1 ч. Затем реакционную смесь нагревают до комнатной температуры и перемешивают в течение 24 ч. Реакционную смесь промывают водой, раствором хлорида натрия и сушат над Na_2SO_4 . После удаления растворителя полученный бесцветный остаток загружают на колонку ISCO (40 г силикагеля). Фракции, содержащие продукт, собирают и конденсируют на роторном испарителе, получая бесцветный остаток, который под глубоким вакуумом превращается в белую пену с получением 17 (1,8303 г, выход 99%).

Пример 14. Синтез соединения 18



К бесцветному раствору соединения 17 (1,830 г, 3,74 ммоль) в CH_2Cl_2 (30,0 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона последовательно добавляют ДМАП (0,915 г, 7,49 ммоль) и триэтиламин (1,096 мл, 7,86 ммоль). После охлаждения до 0°C добавляют 2,4,6-триизопропилбензол-1-сульфонилхлорид (2,268 г, 7,49 ммоль) в виде одной порции. Полученную реакционную смесь желтого цвета нагревают до комнатной температуры и перемешивают в течение 22 ч. ТСХ показывает непрореагировавшее исходное вещество, поэтому реакционную смесь нагревают до 40°C и перемешивают в течение еще 24 ч. Реакционную смесь охлаждают до 0°C , добавляют раствор 2,6-диметилфенола (1,372 г, 11,23 ммоль), DABCO (0,082 мл, 0,749 ммоль) и триэтиламина (1,566 мл, 1,23 ммоль) в CH_2Cl_2 (7,49 мл). По окончании добавления оранжевую реакционную смесь нагревают до кт и перемешивают в течение 2 дней. ТСХ показывает, что исходный нуклеозид полностью израсходован, поэтому реакционную смесь разбавляют CH_2Cl_2 , промывают раствором NaHCO_3 , раствором хлорида натрия и сушат над Na_2SO_4 . Органический слой конденсируют на роторном испарителе и полученный оранжевый остаток загружают на колонку ISCO (120 г силикагеля, 16×150 мм). Все фракции, содержащие целевой продукт, собирают и конденсируют на роторном испарителе с получением желтого остатка (2,07 г, выход 93%), который под глубоким вакуумом превращается в желтую пену.

Пример 15. Общие условия нуклеотидного сочетания.

Целевое нуклеиновое основание (5 экв.) переносят в сухую колбу в атмосфере аргона и суспендируют в ГМДС (2 мл/ммоль нуклеинового основания). Каталитическое количество сульфата аммония (1-3 мг) добавляют в реакционную емкость и суспензию кипятят с обратным холодильником в течение 1-8 ч. В ходе реакции белая суспензия становится прозрачной. Реакционную емкость оставляют охлаждаться до комнатной температуры, а избыток ГМДС удаляют при пониженном давлении. Полученный остаток растворяют в сухом ДХЭ (5 мл/ммоль углевода) с последующим добавлением целевого углевода при комнатной температуре. В конце, неразведенный TMSOTf (5,5 экв.) добавляют к раствору при перемешивании. Реакцию гасят насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяют, сушат над MgSO_4 , фильтруют и концентрируют при сниженном давлении. Целевой защищенный нуклеозид очищают на силикагеле, элюируя ДХМ/MeOH 9:1.

Пример 16. Общие условия нуклеотидного сочетания.

Целевое нуклеиновое основание (5 экв.) переносят в сухую колбу в атмосфере аргона и суспендируют в ГМДС (2 мл/ммоль нуклеинового основания). В реакционную емкость добавляют каталитическое количество сульфата аммония (1-3 мг) и суспензию кипятят с обратным холодильником в течение 1-8 ч. В ходе реакции белая суспензия становится прозрачной. Реакционную емкость оставляют охлаждаться до комнатной температуры, а избыток ГМДС удаляют при пониженном давлении. Полученный остаток растворяют в сухом ДХЭ (5 мл/ммоль углевода) с последующим добавлением целевого углевода при комнатной температуре. В конце, неразведенный TMSOTf (5,5 экв.) добавляют к раствору при перемешивании. Реакцию гасят насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяют, сушат над MgSO_4 , фильтруют и концентрируют при сниженном давлении. Целевой защищенный нуклеозид очищают на силикагеле, элюируя ДХМ/MeOH 9:1.

Пример 17. Общие условия реакции десилилирования.

Раствор защищенного нуклеозида в сухом ТГФ (10 мл/ммоль защищенного нуклеозида) обрабатывают тетрабутиламмоний фторидом (ТБАФ, 1М раствор в ТГФ, 1,1 экв.) и оставляют перемешиваться при комнатной температуре в течение 3 ч. Неочищенную смесь концентрируют под вакуумом и полученный остаток очищают на силикагеле (0-10% метанола в дихлорметане) с получением целевого нуклеозида.

Пример 18. Общие условия дебензоилирования.

К раствору защищенного нуклеозида, полученного в базовых условиях реакции конденсации (0,126 г, 0,315 ммоль), добавляют NH_3 в MeOH (7М, 1,573 мл, 11,01 ммоль). Реакционную смесь оставляют перемешиваться при комнатной температуре или при слабом нагревании в запаянной трубке в течение 4,5 ч. Раствор желтого цвета конденсируют на роторном испарителе и загружают на колонку ISCO (4 г, 8% $\rightarrow$ 15% MeOH/ CH_2Cl_2) с получением целевого нуклеозида.

Пример 19. Синтез 5'-дейтерированного нуклеозида.

Соответствующим образом защищенный нуклеозид суспендируют в метиленхлориде (40 мл, частично растворимый). После перемешивания при комнатной температуре в течение 30 мин смесь последовательно обрабатывают с PDC, уксусным ангидридом и затем трет-бутанолом. Смесь продолжают перемешивать при комнатной температуре. Через 4 ч данные ТСХ (5% метанола в ДХМ) и ЖХ-МС показывают только небольшое остаточное количество исходного материала. Смесь фильтруют сквозь слой силикагеля загруженного в фриттированную воронку емкостью 150 мл. Вещество на кремний диоксиде элюируют этилацетатом. Собранный фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Неочищенное темное масло очищают с помощью хроматографии на силикагеле (25 мм $\times$ 175 мм) с градиентом от смеси гексана:этилацетата 2:1 до этилацетата. Чистые фракции собирают и концентрируют с получением белой смолы. Материал помещают под глубокий вакуум на 2 дня и используют на следующей стадии без дополнительной очистки.

5'-Защищенный нуклеозид растворяют в этаноле 200, а затем обрабатывают твердым бордейтеридом натрия. Смесь становится гомогенной, ее затем нагревают до 80°C. Через 12 ч образуется белый/бледно-желтый осадок. Смесь оставляют охлаждаться до комнатной температуры. ТСХ (5% метанола в метиленхлориде) показывает полное превращение исходного материала. Смесь охлаждают до 0°C на ледяной бане и затем медленно гасят уксусной кислотой (приблизительно 1 мл). Прозрачный раствор нагревают до комнатной температуры и затем распределяют между этилацетатом (30 мл) и раствором хлорида натрия (3 мл). Органическую фазу концентрируют и затем очищают с помощью хроматографии на силикагеле (19 мм $\times$ 180 мм), применяя в качестве подвижной фазы 5% метанола в метиленхлориде.

Пример 20. Синтез бис-ПОМ-5'-монофосфатных пролекарств.

В колбу емкостью 50 мл помещают ((гидроксифосфорил)бис(окси))бис(метил)бис-(2,2-диметилпропаноат) (0,229 г, 0,703 ммоль), добавляют сухой ТГФ (4 мл) с получением бесцветного раствора. Колбу вакуумируют и заполняют аргоном. Затем по каплям добавляют триэтиламин (0,108 мл, 0,773 ммоль). После перемешивания в течение 30 мин при комнатной температуре добавляют целевой нуклеозидный аналог. Реакционную смесь охлаждают до 0°C и затем добавляют N-этил-N-изопропилпропан-2-амин (0,245 мл, 1,406 ммоль), бис-(2-оксооксазолидин-3-ил)фосфинхлорид (0,224 г, 0,879 ммоль) и 3-нитро-1Н-1,2,4-триазол (0,100 г, 0,879 ммоль). Реакционную смесь оставляют перемешиваться в течение ночи, постепенно нагревая до комнатной температуры. Затем реакционную смесь разбавляют этилацетатом и гасят насыщенным NaHCO_3 . Органический слой отделяют, сушат (Na_2SO_4), фильтруют и концентрируют под вакуумом. Неочищенный материал очищают колоночной хроматографией (колонка ISCO 12 г), элюируя с градиентом от 100% ДХМ до 5% MeOH в ДХМ с получением целевого продукта.

Пример 21. Синтез 2-замещенных-L-Ara-нуклеозидных аналогов.

В сухую колбу в атмосфере аргона помещают 1,3,5-три-O-бензоил-L- α -рибозу. Углевод растворяют в сухом ДХМ и реакционную колбу охлаждают до 0°C. Положение 2 активируют путем добавления трифторметансульфонового ангидрида, мезилхлорида или SO_2Cl_2 с последующим добавлением имидазола. Далее соответствующий нуклеофил добавляют в реакционную колбу при 0°C. После завершения реак-

ции по данным ТСХ реакционную смесь гасят водой. Реакционную смесь с водой помещают в делительную воронку. Органический слой отделяют и промывают раствором хлорида натрия. Органический слой сушат над сульфатом магния, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Продукт помещают на колонку ISCO и очищают. Далее продукт обрабатывают в базовых условиях реакции конденсации и общих условиях дебензоилирования с получением целевых нуклеозидных аналогов.

Пример 22. Синтез 2-фтор-L-Aга-нуклеозидных аналогов.

В сухую колбу в атмосфере аргона помещают 1,3,5-три-О-бензоил-L- α -рибозу. Углевод растворяют в сухом ДХМ и реакционную колбу охлаждают до 0°C. Положение 2 активируют путем добавления трифторметансульфонового ангидрида. Затем в реакционную колбу при 0°C добавляют тетрабутиламмоний фторид в MeCN. После завершения реакции по данным ТСХ реакционную смесь гасят водой. Реакционную смесь с водой помещают в делительную воронку. Органический слой отделяют и промывают раствором хлорида натрия. Органический слой сушат над сульфатом магния, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Продукт помещают на колонку ISCO и очищают. Далее продукт обрабатывают в базовых условиях реакции конденсации и общих условиях дебензоилирования с получением целевых нуклеозидных аналогов.

Пример 23. Синтез 2-хлор- или бром-L-Aга-нуклеозидных аналогов.

В сухую колбу в атмосфере аргона помещают 1,3,5-три-О-бензоил-L- α -рибозу. Углевод растворяют в сухом ДХМ и реакционную колбу охлаждают до 0°C. Затем в реакционную колбу при 0°C добавляют трифенилфосфин с четыреххлористым углеродом или четырехбромистым углеродом. После завершения реакции по данным ТСХ реакционную смесь гасят водой. Реакционную смесь с водой помещают в делительную воронку. Органический слой собирают и промывают раствором хлорида натрия. Органический слой сушат над сульфатом магния, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Продукт помещают на колонку ISCO и очищают. Далее продукт обрабатывают в базовых условиях реакции конденсации и общих условиях дебензоилирования с получением целевых нуклеозидных аналогов.

Пример 24. Синтез L-Aга-нуклеозидных аналогов с заместителями при углеродном атоме в положении 2.

В сухую колбу в атмосфере аргона помещают 1,3,5-три-О-бензоил-L- α -рибозу. Углевод растворяют в сухом ДХМ и реакционную колбу охлаждают до -78°C. Затем в реакционную колбу добавляют ДМСО и оксилаилхлорид. После перемешивания в течение 1 ч в реакционную колбу добавляют раствор триметиламина в ДХМ. После расходования исходного материала реакцию гасят водой. Органический слой отделяют, промывают раствором натрия хлорида, сушат над сульфатом магния, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Продукт помещают на колонку ISCO и очищают.

Полученное промежуточное 2-кетосоединение помещают в сухую колбу в атмосфере аргона и растворяют в сухом ТГФ. Затем реакционную колбу охлаждают до -78°C. После этого добавляют подходящий металлорганический реагент. После расходования исходного материала реакционную смесь гасят водой. Органический слой отделяют, промывают раствором хлорида натрия, сушат над сульфатом магния, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Продукт помещают на колонку ISCO и очищают.

При перемешивании к раствору защищенного углевода и 4-ДМАП в ацетонитриле при комнатной температуре в атмосфере азота с помощью шприца по каплям добавляют метил-2-хлор-2-оксоацетат. Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч и затем разбавляют EtOAc.

Полученный органический раствор последовательно промывают насыщ. водн. раствором NaHCO_3 , водой и раствором хлорида натрия (1×120 мл каждого), сушат над MgSO_4 , фильтруют и концентрируют на ротаторном испарителе. Полученный неочищенный продукт сушат под глубоким вакуумом в течение ночи с получением целевого продукта. Смесь неочищенного продукта полностью используют на следующей стадии, без дополнительной очистки.

При перемешивании к раствору вышеуказанного продукта и гидрида трибутилолова в толуоле при кипячении с обратным холодильником в атмосфере азота добавляют твердый AIBN в виде одной порции. Смесь кипятят с обратным холодильником в течение 2 ч и затем охлаждают до комнатной температуры. Летучие вещества удаляют выпариванием на ротаторном испарителе и неочищенный остаток растворяют в небольшом количестве PhMe. Флэш-хроматография на Combiflash дает целевой продукт, который далее обрабатывают в базовых условиях реакции конденсации и общих условиях дебензоилирования.

Пример 25. Методика инкубации и анализа клеток.

Клетки Nuh-7 высевают с плотностью $0,5 \times 10^6$ клеток на лунку в 1 мл полной среды в 12-луночных планшетах для культуры тканей. Клетки оставляют на ночь при 37°C/5% CO_2 . Исходный 40 мкМ раствор исследуемого продукта готовят в 100% ДМСО. Из 40 мкМ исходного раствора готовят 20 мкМ раствор исследуемого продукта в 25 мл полной DMEM среды. Для обработки соединением из лунок удаляют среду и в соответствующие лунки добавляют 1 мл 20 мкМ раствора в полной DMEM среде. Дополнительно готовят отдельный планшет с клетками, но без добавления соединения. Планшеты инкубируют при 37°C/5% CO_2 до следующих временных точек: 1, 3, 6 и 24 ч. После инкубации в указанных времен-

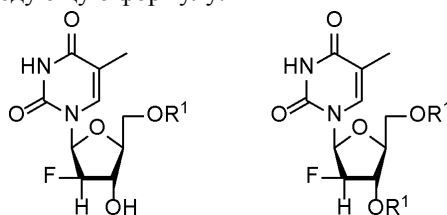
ных точках клетки дважды промывают 1 мл ДФСБ. Клетки экстрагируют путем добавления в каждую лунку, обработанную исследуемым продуктом, 500 мкл 70% метанола/30% воды с добавлением внутреннего стандарта. Необработанный холостой планшет экстрагируют 500 мкл 70% метанола/30% воды на лунку. Образцы центрифугируют при 16000 об/мин в течение 10 мин при 4°C. Образцы анализируют с помощью ЖХ-МС/МС с применением системы ЖХ-МС/МС ABSCIEX 5500 QTRAP и колонки Hypercarb (PGC).

Пример 26. Методика фармакокинетического эксперимента на крысах.

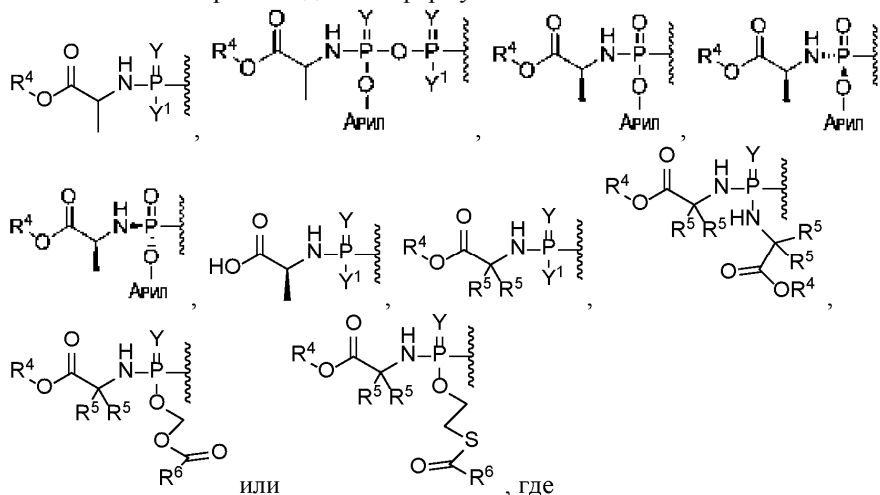
Крысам позволяют акклиматизироваться в течение 2 или более дней после прибытия. Крыс взвешивают в день перед введением дозы для вычисления объема дозы. Крысам вводят лекарственное средство п/о в дозе 50 мг/кг, 10 мг/кг и 5 мл/кг. Крыс для взятия образцов выбирают в 6 временных точках: через 1, 2, 3, 4, 6 и 24 ч (по 3 крысы на одну временную точку для исследуемого лекарственного средства). Крыс умерщвляют и органы извлекают (см. ниже). Для сбора крови крыс умерщвляют при помощи CO₂ в соответствующей временной точке, указанной выше. Кровь собирают путем пункции сердца (0,3 мл) в каждой временной точке. После сбора крови извлекают органы крыс (см. ниже). Кровь обрабатывают, осторожно переворачивая пробирки Li-гепарина с кровью 2 или 3 раза для тщательного перемешивания. Затем пробирки помещают в стойку в ледяной воде до тех пор, пока они станут пригодными для центрифугирования (≤ 1 ч). Как только они стали пригодными, кровь центрифугируют при $\sim 2000 \times g$ в течение 10 мин на охлаждаемой центрифуге для получения плазмы. Затем с помощью пипетки 200 мкл плазмы переносят в маркированную пробирку Эппендорфа емкостью 1,5 мл в ледяной воде. Плазму замораживают на сухом льду или в холодильнике. Образцы хранят при -80°C до анализа. Извлекают органы умерщвленных крыс. Органы (легкие, печень, почки, селезенку и сердце) извлекают, помещают в пробирку и немедленно замораживают в жидком азоте. Далее пробирки переносят на сухой лед. Образцы хранят в криогенных флаконах для тканей. Образцы анализируют с помощью ЖХ-МС/МС с применением системы ЖХ-МС/МС ABSCIEX 5500 QTRAP и колонки Hypercarb (PGC).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, имеющее следующую формулу:



или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый R¹ независимо выбран из одной из формул



R⁴ представляет собой водород, бензил, C₁₋₆алкил или циклоалкил;

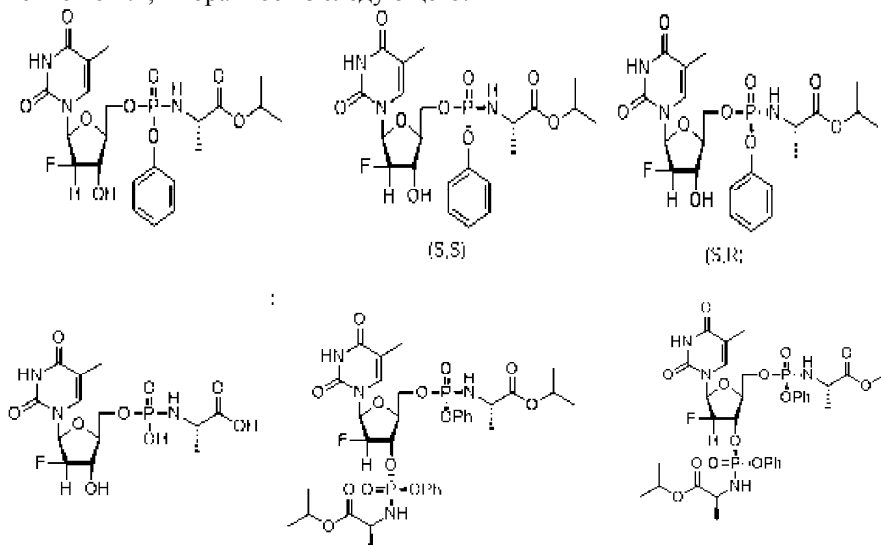
R⁵ представляет собой водород, дейтерий, гидроксил, циано, азидо, amino, замещенный amino, арил, гетероарил, замещенный арил, C₁₋₆алкокси, C₁₋₆алкил, C₂₋₆алкенил, C₂₋₆алкинил или замещенный гетероарил; и

R⁶ представляет собой C₁₋₆алкокси, C₁₋₆алкил, циклоалкил, арил или замещенный арил,

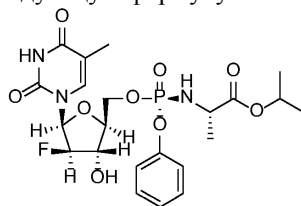
при этом, когда группа замещена, она замещена одним или более из следующего: C₁₋₆алкилом, галогенированным C₁₋₆алкилом, C₁₋₆алкокси, C₂₋₆алкенилом, C₂₋₆алкинилом, арилом, гетероарилом, -C(O)H, amino, -C(O)OH, -OC(O)A¹ или -C(O)OA¹, A¹C(O)A², галогенидом, гидроксидом, A¹C(O)A², нитро, сульфо-оксо, сульфонил, сульфеном, сульфоксидом или тиолом, где A¹ и A² независимо выбраны из C₁₋₆алкила,

галогенированного С₁-алкила, С₂₋₆-алкенила, С₂₋₆-алкенила, арила, гетероарила или циклоалкила, где арил представляет собой нафталин, фенил, бифенил или феноксибензол, циклоалкил представляет собой циклопропил, циклобутил, цикlopентил или циклогексил, гетероарил представляет собой ароматическую группу, содержащую гетероатом, выбранный из азота, кислорода, серы или фосфора.

2. Соединение по п.1, выбранное из следующего:



3. Соединение по п.2, имеющее следующую формулу:



4. Соединение по п.1, где арил представляет собой фенил, 1-нафтил, 2-нафтил или 4-замещенный фенил.

5. Соединение по п.1, где арил представляет собой 4-хлорфенил или 4-бромфенил.

6. Соединение по п.1, где R^3 представляет собой фторметил, дифторметил, трифторметил или гидроксиметил.

7. Соединение по п.1, где R^4 представляет собой метил, этил, изопропил, циклопентил, циклогексил, неопентил или бензил.

8. Соединение по п.1, где R⁴ представляет собой метил, этил, изопропил, циклопентил, циклогексил или неопентил.

9. Соединение по п.1, где R⁶ представляет собой метил, этил или трет-бутил.

10. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики вирусной инфекции, содержащая терапевтически эффективное количество соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

11. Фармацевтическая композиция по п.10, отличающаяся тем, что вирусная инфекция вызвана инфекционным агентом, содержащим ДНК-вирус.

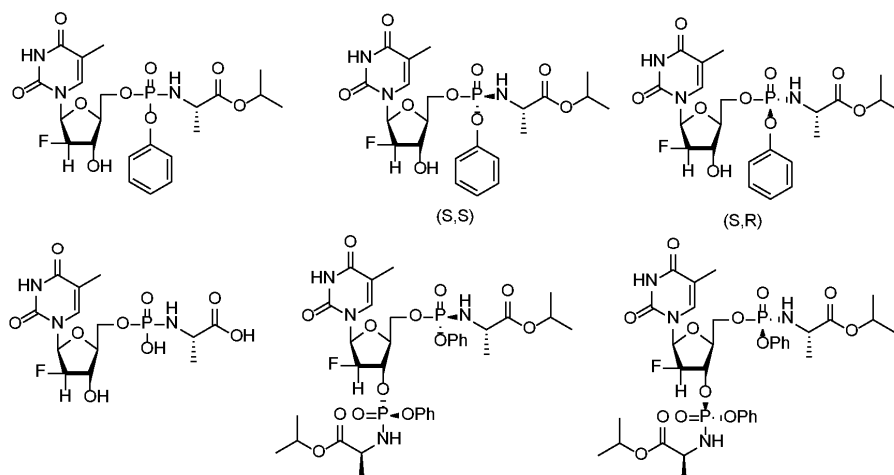
12. Фармацевтическая композиция по п.10, отличающаяся тем, что ДНК-вирус содержит гепадна-
вирусы.

13. Липосомальная композиция для лечения или профилактики вирусной инфекции, содержащая терапевтически эффективное количество соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Способ лечения или профилактики инфекций, вызываемых ДНК-вирусами, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли.

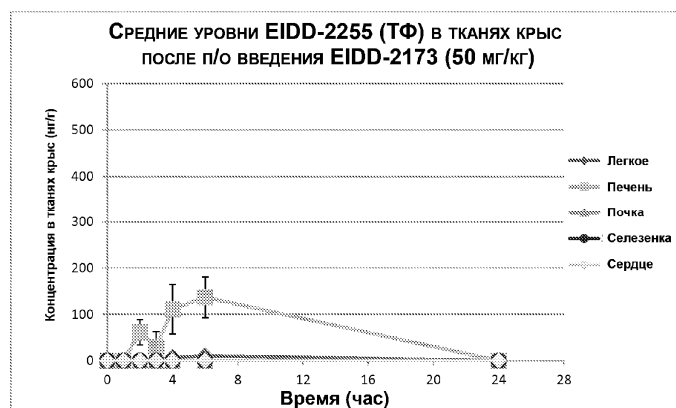
15. Способ по п.14, отличающийся тем, что ДНК-вирус содержит гепаднавирусы.

16. Способ лечения или предупреждения инфекций, вызванных ДНК-вирусами, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения, имеющего структуру, как это определено в п.2



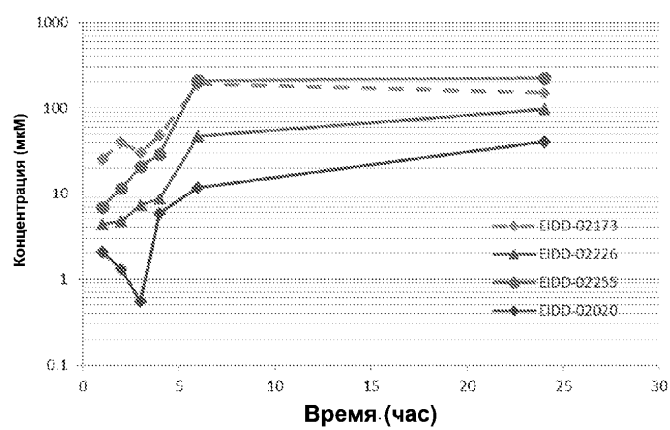
или его фармацевтически приемлемой соли и дополнительное введение противовирусного агента, выбранного из абакавира, ацикловира, адефовира, амантадина, ампренавира, амплигена, арбидола, атазанавира, атрипла, боцепревира, цидофовира, комбивира, дарунавира, делавирдина, диданозина, докозанола, эдоксудина, эфавиренза, эмтрицитабина, энфувиртида, энтекавира, фамцикловира, фомивирсена, фозампренавира, фоскарнета, фосфонета, ганцикловира, ибацитабина, имуновира, идоксуридина, имихимода, индинавира, инозина, интерферона типа III, интерферона типа II, интерферона типа I, ламивудина, лопинавира, ловирида, маравирока, мороксидина, метисазона, нелфинавира, невирапина, нексавира, осельтамивира, пегинтерферона α -2a, пенцикловира, перамивира, плеконарила, подофиллотоксина, ралтегравира, рибавирина, ремантадина, ритонавира, пирамидина, саквинавира, софосбувира, ставудина, телапревира, телбивудина, тенофовира, тенофовира дизопроксила, типранавира, трифлуридина, тризиви-ра, тромантадина, тривада, валацикловира, валганцикловира, викривирока, видарабина, вирамицина, зальцитабина, занамивира, зидовудина и их комбинаций.

17. Способ лечения или профилактики инфекций, вызванных ДНК-вирусами, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения по п.2 или его фармацевтически приемлемой соли.



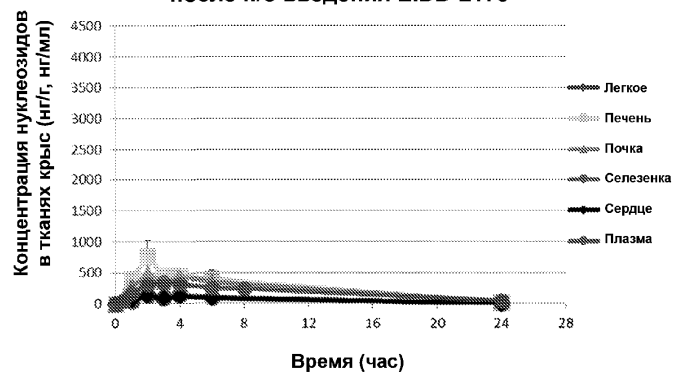
Фиг. 1

Инкубация EIDD-02173 (20 мкМ) с клетками Huh7



Фиг. 2

Уровни клевудина в тканях крыс после п/о введения EIDD-2173



Фиг. 3

