

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2561501

АНТИРЕТРОВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ
ПРОИЗВОДНЫХ АЗИДОТИМИДИНА

Патентообладатель(ли): *федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет" (ФГАОУ ВПО КФУ) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014132372

Приоритет изобретения **05 августа 2014 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **03 августа 2015 г.**

Срок действия патента истекает **05 августа 2034 г.**

Заместитель руководителя Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий



Автор(ы): **Штырлин Юрий Григорьевич (RU), Павельев Роман Сергеевич (RU), Хайруллина Регина Ришатовна (RU), Ризванов Альберт Анатольевич (RU), Мартынова Екатерина Владимировна (RU)**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10



(51) МПК
C07D 321/00 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21)(22) Заявка: 2014132372/04, 05.08.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.08.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.08.2014

(45) Опубликовано: 27.08.2015 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: UA 41296 C2, 17.09.2001. EA 7060 B1, 30.06.2006. US 5077280 A1, 31.12.1991

Адрес для переписки:

420008, г.Казань, Кремлевская ул., 18, ФГАОУ ВПО КФУ ПЛО УНИД, И.А. Назмиеву

(72) Автор(ы):

Штырлин Юрий Григорьевич (RU),
 Павельев Роман Сергеевич (RU),
 Хайруллина Регина Ришатовна (RU),
 Ризванов Альберт Анатольевич (RU),
 Мартынова Екатерина Владимировна (RU)

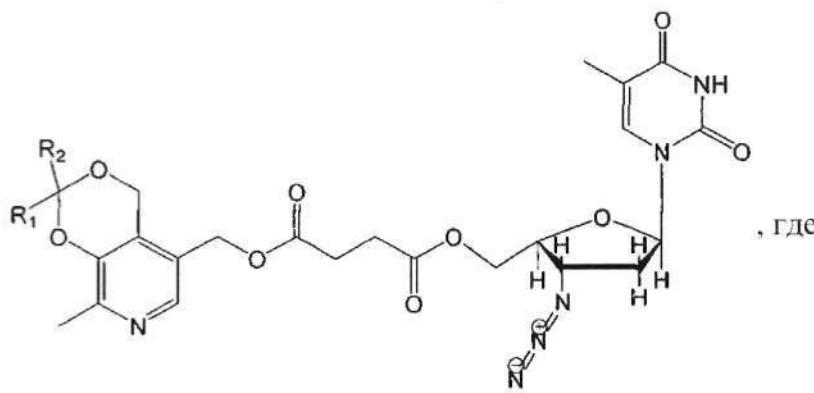
(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет" (ФГАОУ ВПО КФУ) (RU)

(54) АНТИРЕТРОВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ АЗИДОТИМИДИНА

(57) Формула изобретения

Антиретровирусные препараты на основе производных азидотимидина общей формулы 1:



$R_1+R_2=-CH_2(CH_2)_2CH_2-$

$R_1+R_2=-CH_2(CH_2)_3CH_2-$

$R_1=H, R_2=CH_3$

$R_1=H, R_2=CH_2CH_2CH_3$

$R_1=H, R_2=C(CH_3)_3$

$R_1=H, R_2=CH_2(CH_2)_6CH_3$

Р
У

2
5
6
1
5
0

С
1



(51) МПК
C07D 321/00 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014132372/04, 05.08.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.08.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.08.2014

(45) Опубликовано: 27.08.2015 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: UA 41296 C2, 17.09.2001. EA 7060 B1, 30.06.2006. US 5077280 A1, 31.12.1991

Адрес для переписки:
420008, г.Казань, Кремлевская ул., 18, ФГАОУ ВПО КФУ ПЛО УНИД, И.А. Назмиеву

(72) Автор(ы):

Штырлин Юрий Григорьевич (RU),
 Павельев Роман Сергеевич (RU),
 Хайруллина Регина Ришатовна (RU),
 Ризванов Альберт Анатольевич (RU),
 Мартынова Екатерина Владимировна (RU)

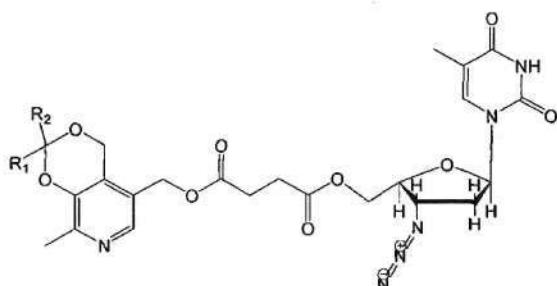
(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет" (ФГАОУ ВПО КФУ) (RU)

(54) АНТИРЕТРОВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ АЗИДОТИМИДИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к антиретровирусным производным азидотимицина формулы 1 и может быть использовано в качестве лекарственного средства.



1

где:

$R_1+R_2=-CH_2(CH_2)_2CH_2-$

$R_1+R_2=-CH_2(CH_2)_3CH_2-$

$R_1=H, R_2=CH_3$

$R_1=H, R_2=CH_2CH_2CH_3$

$R_1=H, R_2=C(CH_3)_3$

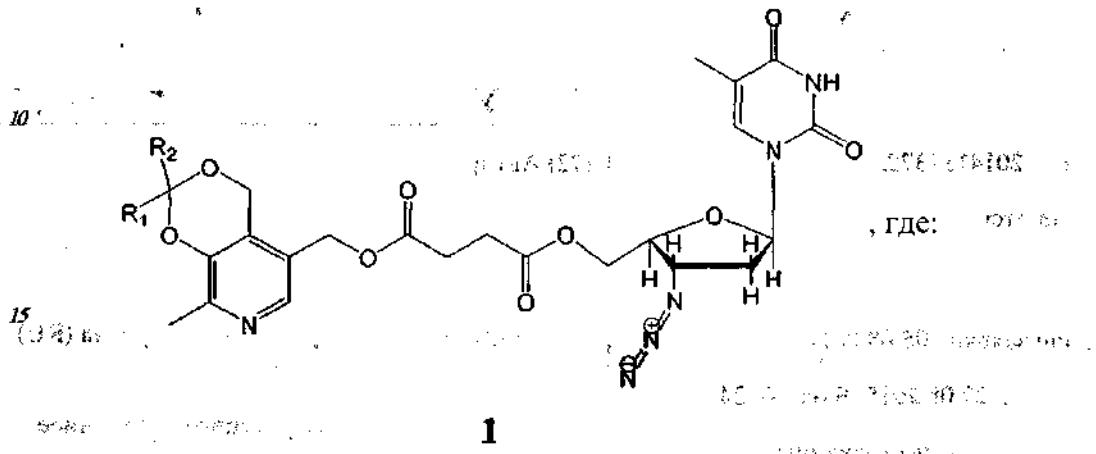
$R_1=H, R_2=CH_2(CH_2)_6CH_3$

Предложены новые эффективные средства с низкой токсичностью против ретровирусных инфекций. 16 пр., 2 табл.

RU 2 561 501 C 1

R U 2 5 6 1 5 0 1 C 1

Изобретение относится к области удовлетворения жизненных потребностей человека и может быть использовано в медицине и биологии в качестве лекарственных средств. Препараты являются синтетическими биологически активными веществами гетероциклического ряда, обладают высокой антиретровирусной активностью, и представляют собой сложные эфиры янтарной кислоты, содержащие фрагменты пиридоксина и азидотимидина общей формулы 1:



15 $R_1+R_2=-CH_2(CH_2)_2CH_2-$

20 $R_1+R_2=-CH_2(CH_2)_3CH_2-$

$R_1=H, R_2=CH_3$

$R_1=H, R_2=CH_2CH_2CH_3$

$R_1=H, R_2=C(CH_3)_3$

25 $R_1=H, R_2=CH_2(CH_2)_6CH_3$

Соединения формулы 1 обладают высокой антиретровирусной активностью на фоне низкой токсичности и могут найти применение в медицине.

Лечение больных, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) - одна из самых актуальных проблем современной фармакологии и медицины.

Антиретровирусные препараты, существующие на сегодняшний день, обладают высокой терапевтической активностью в отношении ВИЧ, но при этом имеют целый ряд побочных эффектов, таких как анемия, нейтропения, расстройства желудочно-кишечного тракта и др. Кроме того, пролонгированные положительные эффекты комбинированной антиретровирусной терапии часто осложняются возникновением лекарственной устойчивости. В связи с этим крайне актуальной является разработка новых высокоэффективных и безопасных лекарственных препаратов.

Известно пять классов препаратов, которые применяются в лечении ВИЧ-инфекции: ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы интегразы, ингибиторы протеазы, ингибиторы рецепторов, ингибиторы слияния. Стандарт лечения ВИЧ инфекции предполагает использование комбинации препаратов, по меньшей мере, трех антиретровирусных препаратов, относящихся к разным классам. (Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents (2013) Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents, 12 February 2013. Washington DC: Department of Health and Human Services; Available at <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/1/adult-and-adolescent-treatment-guidelines/0>(accessed 24 January 2014).

Зидовудин (азидотимидин) [US 5,077,280 Treatment of viral infections/Brown University Research Foundation - Опубл. - 31.12.1991] применяется для лечения ВИЧ-инфекции у

взрослых и детей как в виде монотерапии, так и в комбинации с другими антиретровирусными препаратами. Кроме того, его применяют для профилактики заражения плода от ВИЧ-инфицированной матери и постэкспозиционной профилактики у медицинских работников. С 1987 г., когда зидовудин впервые стали применять для лечения ВИЧ-инфекции, его эффективность была доказана многочисленными клиническими испытаниями. Показано, что лечение зидовудином в течение года снижает развитие инфекции, но выживаемость при этом не увеличивается [Margaret A. Fischl, MD; Douglas D. Richman, MD; Nellie Hansen, MPH; Ann C. Collier, MD; John T. Carey, MD; Michael F. Para, MD; W. David Hardy, MD; Raphael Dolin, MD; William G. Powderly, MD; J. Davis Allan, MD; Brian Wong, MD; Thomas C. Merigan, MD; Vincent J. McAuliffe, MD; Newton E. Hyslop, MD; Frank S. Rhame, MD; Henry H. Balfour Jr., MD; Stephen A. Spector, MD; Paul Volberding, MD; Carla Pettinelli, MD, PhD; James Anderson, PhD, AIDS Clinical Trials Group The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection a double-blind, placebo-controlled trial// Annals of Internal Medicine - 1990. - V 112, №10 - P. 727-737].

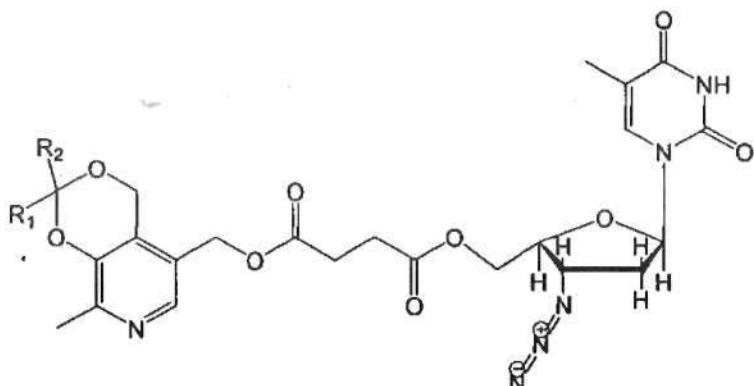
Сущность предполагаемого изобретения состоит в том, что применение заявляемых веществ общей формулы 1, относящихся к аналогам ингибиторов обратной транскриптазы, применяемых при терапии ВИЧ-инфекции, может значительно увеличить терапевтическую эффективность ввиду наличия в своем составе веществ с более низкой 20 токсичностью, что способствует снижению побочных эффектов в процессе лечения пациентов. Эти положительные эффекты связаны с наличием в составе заявленной формулы 1 элемента группы витаминов В, а именно пиридоксина, который выделяется вследствие гидролиза сложноэфирных связей в организме.

В настоящее время в литературе известны различные способы получения производных азидотимидина в качестве противовирусных агентов. В работе [L. Ait Mohamed, M. Taourirte, A. Rochdi, H.B. Lazrek, J.J. Vasseur, J.W. Engels, C. Pannecouque, and E. De Clercq Synthesis of New Homo and Heterodimers of 2',3'-Dideoxyinosine (ddI) Using Ester Linkage // NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS - 2003. - V. 22, N. 5-8. - P. 829-831] было получено производное азидотимидина, состоящее из фрагментов ряда 25 противовирусных агентов, в том числе азидотимидина, и сшивающего агента. В работе [Patrick Vlieghe, Frederic Bihel, Thierry Clerc, Christophe Pannecouque, Myriam Witvrouw, Erik De Clercq, Jean-Pierre Salles, Jean-Claude Chermann, § and Jean-Louis Kraus New 3'-Azido-3'-deoxythymidin-5'-yl O-(ω -Hydroxyalkyl) Carbonate Prodrugs: Synthesis and Anti-HIVEvaluation // J. Med. Chem. - 2001. - V. 44. - P. 777-786] также были исследованы на 30 противовирусную активность сложные эфиры азидотимидина и различных карбоновых кислот. Установлено, что для некоторых соединений наблюдается увеличение 35 противовирусной активности, но при этом возрастает их токсичность.

Следует отметить, что описанные в литературе соединения, по мнению заявителя, не могут рассматриваться в качестве аналогов к заявленному техническому решению 40 вследствие того, что они не совпадают с заявляемыми соединениями по химической структуре. При этом указанные соединения являются аналогами по достигаемому(ым) техническому (им) результату(ам), т.к. характеризуются (обладают) указанными выше недостатками. Заявителем не выявлены источники, содержащие информацию о технических решениях, идентичных настоящему изобретению, что позволяет сделать 45 вывод о его соответствии критерию «новизна».

Целью заявленного технического решения является создание низкотоксичных биологически активных соединений с высокой антиретровирусной активностью в отношении вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

Поставленная задача решается путем синтеза антиретровирусных веществ общей формулы 1:



где:

1

R₁+R₂=-CH₂(CH₂)₂CH₂-

R₁+R₂=-CH₂(CH₂)₃CH₂-

R₁=H, R₂=CH₃

R₁=H, R₂=CH₂CH₂CH₃

R₁=H, R₂=C(CH₃)₃

R₁=H, R₂=CH₂(CH₂)₆CH₃

Заявляемые вещества на фоне низкой токсичности проявили высокую антиретровирусную активность в отношении ВИЧ и могут найти применение в медицине.

В результате проведенного заявителем анализа уровня техники в области современной медицины не выявлено использование антиретровирусных препаратов аналогичной структуры.

Заявителем не выявлены источники, в которых содержались бы сведения о влиянии отличительных признаков изобретения на достигаемый технический результат.

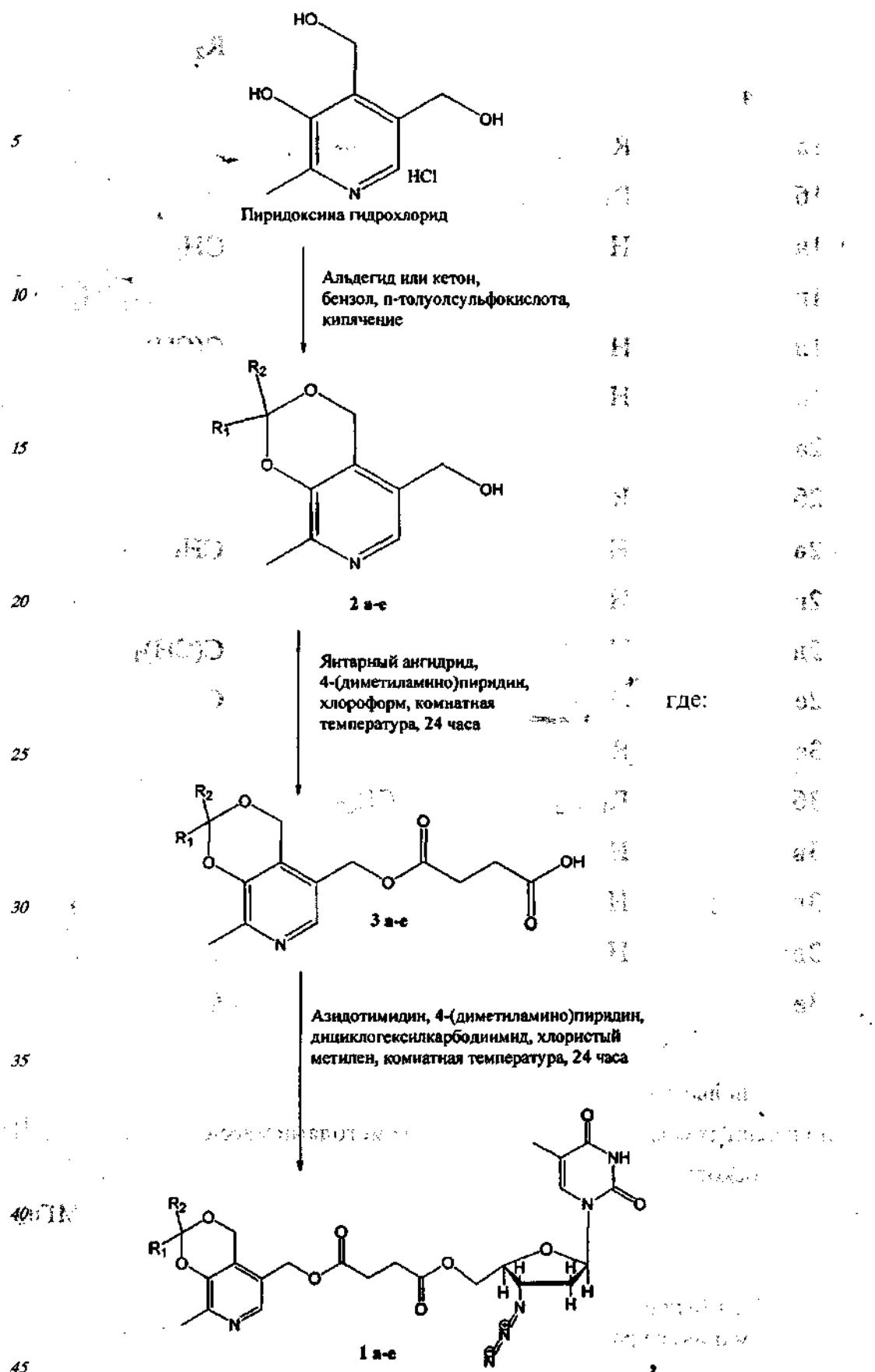
Указанное новое свойство объекта обусловливает, по мнению заявителя, соответствие изобретения критерию «изобретательский уровень».

Предлагаемые в данном изобретении соединения формулы 1 получали согласно нижеприведенной схеме:

35

40

45



Номер соединения	R ₁	R ₂
5 1а	R ₁ +R ₂ =-CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ -	
10 1б	R ₁ +R ₂ =-CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂ -	CH ₃
1г	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃
1д	H	C(CH) ₃
1е	H	CH ₂ (CH ₂) ₆ CH ₃
15 2а	R ₁ +R ₂ =-CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ -	
2б	R ₁ +R ₂ =-CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂ -	
2в	H	CH ₃
20 2г	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃
2д	H	C(CH) ₃
2е	H	CH ₂ (CH ₂) ₆ CH ₃
25 3а	R ₁ +R ₂ =-CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂ -	
3б	R ₁ +R ₂ =-CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂ -	
3в	H	CH ₃
30 3г	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃
3д	H	C(CH) ₃
3е	H	CH ₂ (CH ₂) ₆ CH ₃

Характеристики новых соединений приведены в примерах конкретного выполнения. Структуры полученных соединений подтверждены методами масс-спектрометрии, ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии.

Спектры ЯМР ¹H зарегистрированы на приборе «Bruker» AVANCE 400 (400 МГц). Химический сдвиг определялся относительно сигналов остаточных протонов дейтерированного растворителя.

HRMS-эксперимент был проведен с использованием масс-спектрометра TripleTOF 5600, AB Sciex (Германия) из раствора в метаноле методом ионизации - турбоионный спрей (TIS) - при энергии столкновения с молекулами азота 10 еВ.

Температура плавления веществ определялась на приборе OptiMelt MPA100 (Stanford Research Systems). Угол оптического вращения определяли с помощью поляриметра автоматического ADP440+ (B&S), Англия. Контроль за ходом реакций проводили

методом ТСХ на пластинах Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ. Препаративную хроматографию соединений проводили на силикагеле КСКГ фр. 0.10-0.16 (Экофарм).

Примеры конкретного выполнения заявленного технического решения

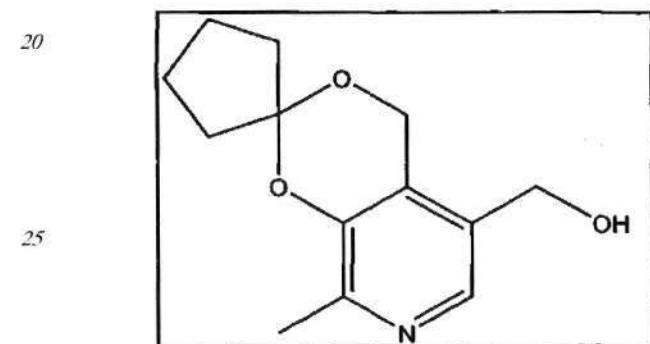
Общая методика получения ацеталей и кеталей пиридоксина 2 (а-е)

- 5 В круглодонной колбе, снабженной насадкой Дина-Старка, готовили суспензию гидрохлорида пиридоксина эквивалент далее (экв) 1 экв, моногидрата и-толуолсульфокислоты (2.1 экв) и карбонил содержащего соединения (альдегид или кетон) (2.1 экв) в 100 мл бензола. Реакционную массу кипятили 8 ч, затем растворитель отгоняли в вакууме. Остаток нейтрализовали до pH=7 водным раствором 10 гидрокарбоната натрия. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали петролейным эфиром.

Соединение 2б было описано в патенте [1,030,400. Sulfur-Containing Derivatives of Vitamin B₆ and process for their preparation / Merck. Actiengesellschaft. - Опубл. - 20.01.1965].

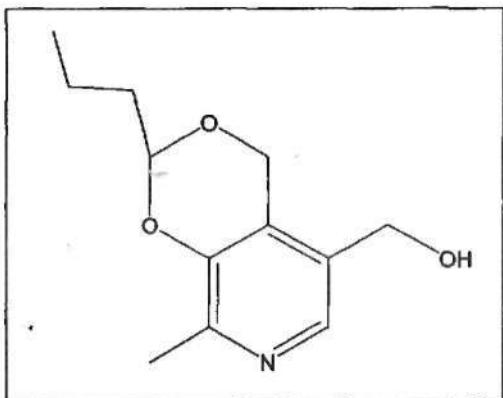
- 15 Соединение 2в было описано в статье [Arustamova, I.S.; Kul'nevich, V.G. Some transformations of 5-hydroxymethyl-8-methyl-1,3-dioxinopyridines // Journal of Organic Chemistry USSR (English Translation) - 1985. - Т. 21, №11 - p. 2225-2230.]

Пример 1. Синтез (8'-метил-4'H-спиро[циклогексан-1,2'-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин]-5'-ил)метанола (2а)



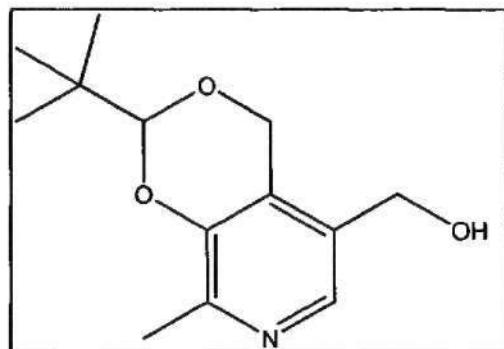
Продукт получали по вышеописанной методике, использовали пиридоксина гидрохлорид (7 г, 34.4 ммоль), циклогексанон (72.1 ммоль) и моногидрат п-толуолсульфокислоты (72.1 ммоль). Выход 60%; Белые кристаллы, т.пл. 108-109°C. ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-d₆), δ м.д.: 1.68-1.96 м (8Н, 4CH₂), 2.28 с (3Н, CH₃), 4.40 д (2Н, ³J=4.2 Гц, CH₂), 4.91 с (2Н, CH₂), 5.15 уш т (1Н, OH), 7.92 с (1Н, CH); ЯМР ¹³C (100 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д.: 18.16, 23.05, 35.60, 58.20, 59.24, 110.48, 125.84, 130.68, 138.63, 145.52, 145.60; HRMS (TIS): найдено [M+H]⁺: 236.1287, рассчитано для C₁₃H₁₈NO₃ [M+H]⁺: 236.1287.

Пример 2. Синтез (8-метил-2-пропил-4H-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин-5-ил)метанола (2г)



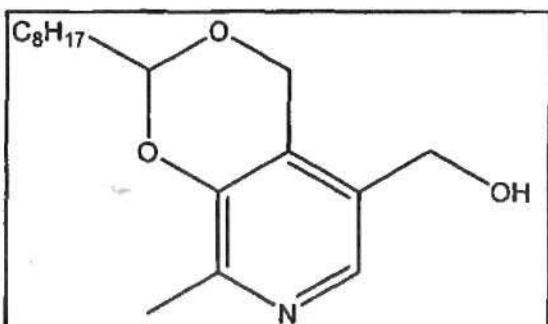
Продукт получали по вышеописанной методике, использовали пиридоксина гидрохлорид (34.4 ммоль), масляный альдегид (72.1 ммоль) и моногидрат *n*-толуолсульфокислоты (72.1 ммоль). Выход 73%; Белые кристаллы, т.пл. 101°C. ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3), δ м.д.: 0.99 т (3Н, $^3\text{J}=7.4$ Гц, CH_3), 1.52-1.58 м (2Н, CH_2), 1.80-1.87 м (2Н, CH_2), 2.34 с (3Н, CH_3), 4.25 уш с (1Н, OH), 4.48 с (2Н, CH_2), 4.96 с (2Н, CH_2), 4.97 т (1Н, $^2\text{J}=4.8$ Гц, CH), 7.75 с (1Н, CH); ЯМР ^{13}C (100 МГц, CDCl_3) δ м.д.: 14.01, 17.08, 18.17, 36.41, 60.04, 64.27, 99.97, 127.76, 130.11, 139.17, 147.31, 147.99; HRMS (TIS): найдено [M+H] $^+$: 224.1287, рассчитано для $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_3$ [M+H] $^+$: 224.1287.

20 Пример 3. Синтез (2-(трет-бутил)-8-метил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин-5-ил) метанола (2д)



35 Продукт получали по вышеописанной методике, использовали пиридоксина гидрохлорид (34.4 ммоль), пивальдегид (72.1 ммоль) и моногидрат *n*-толуолсульфокислоты (72.1 ммоль). Выход 65%; Белые кристаллы, т.пл. 158-159°C. ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3), 1.01 с (9Н, CH_3), 2.30 с (3Н, CH_3), 4.76 с (1Н, CH), 4.38 д (2Н, $^3\text{J}=3.6$ Гц, CH_2), 4.74 с (1Н, CH), 4.94 и 4.98 (2Н, AB, $^2\text{J}=-16.0$ Гц, CH_2), 5.16 уш т (1Н, OH), 7.92 с (1Н, CH); ЯМР ^{13}C (100 МГц, CDCl_3) δ м.д.: 17.90, 24.09, 34.58, 58.17, 63.84, 103.98, 126.67, 130.85, 138.77, 145.07, 147.07; HRMS (TIS): найдено [M+H] $^+$: 238.1443, рассчитано для $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}_3$ [M+H] $^+$: 238.1443.

40 45 Пример 4. Синтез (8-метил-2-октил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин-5-ил)метанола (2е)

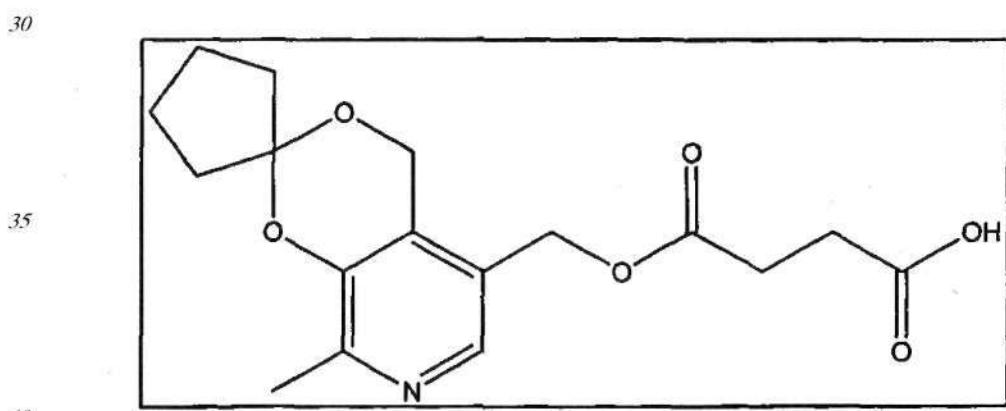


10 Продукт получали по вышеописанной методике, использовали пиридоксина гидрохлорид (34.4 ммоль), нониловый альдегид (34.4 ммоль) и моногидрат п-толуолсульфокислоты (72.1 ммоль). Выход 82%; Белые кристаллы, т.пл. 175°C. ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃), δ м.д.: 0.88 т (3H, ³J=6.6 Гц, CH₃), 1.28-1.38 м (10H, 5CH₂), 1.49-1.57 м (2H, CH₂), 1.80-1.94 м (2H, CH₂), 2.39 с (3H, CH₃), 3.30 уш с (1H, OH), 4.53 с (2H, CH₂), 4.99 с (2H, CH₂), 5.00 к (1H, ²J=5.2 Гц, CH); ЯМР ¹³C (100 МГц, CDCl₃) δ м.д.: 14.25, 18.33, 22.80, 23.71, 29.35, 29.51, 29.60, 31.99, 34.42, 60.38, 64.32, 100.21, 127.79, 129.81, 139.31, 147.59, 148.05; HRMS (TIS): найдено [M+H]⁺: 294.2069, рассчитано для C₁₇H₂₈NO₃ [M+H]⁺: 294.2069.

Общая методика полученияmonoэфиров янтарной кислоты 3 (а-е):

25 Ацеталь или кеталь пиридоксина 1 (а-е) (1 экв), янтарный ангидрид (1 экв) и 4-диметиламинопиридин (1 экв) растворяли в 15 мл хлороформа. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 24 часа. После завершения реакции растворитель отгоняли при пониженном давлении, и продукт очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле [элюент - смесь этилацетат - ацетон (1:1)].

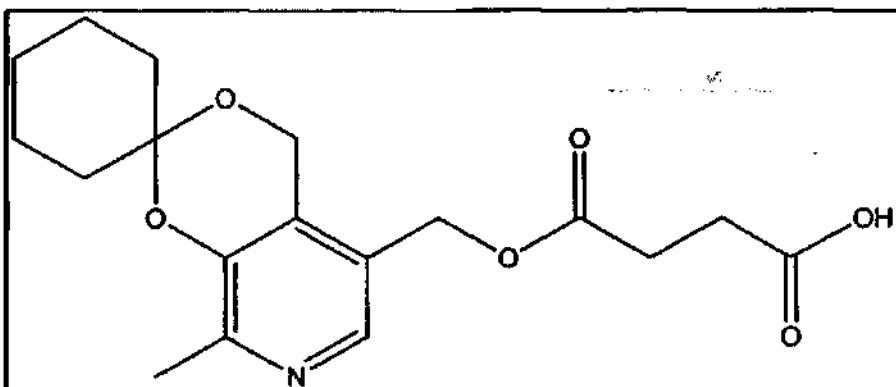
Пример 5. Синтез 4-((8'-метил-4,Н-спиро[цикlopентан-1,2'-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин]-5'-ил)метокси)-4-оксобутановой кислоты (За)



45 Продукт получали по вышеописанной методике, использовали соединение 2а (2.70 ммоль), янтарный ангидрид (2.70 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (2.70 ммоль). Выход 64%; Маслообразное вещество коричневого цвета; ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃), δ м. д.: 1.73-2.05 м (8H, 4CH₂), 2.40 с (3H, CH₃), 2.66 м (4H, 2CH₂), 4.89 с (2H, CH₂), 5.02 с (2H, CH₂), 8.06 с (1H, CH), 10.16-10.75 уш с (1H, COOH); ЯМР ¹³C (100 МГц, CDCl₃), δ м. д.: 17.52, 23.65, 29.33, 29.41, 36.26, 59.87, 61.04, 111.59, 125.16, 127.60, 139.34, 146.87, 148.13,

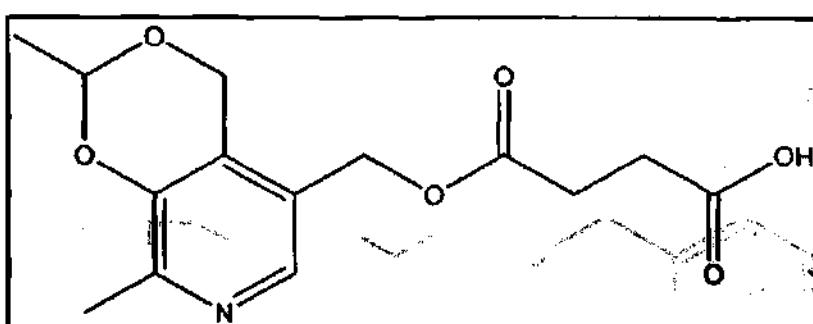
172.10, 175.38; HRMS (TIS): найдено $[M+H]^+$: 336.1447, рассчитано для $C_{17}H_{22}NO_6 [M+H]^+$: 336.1447.

Пример 6. Синтез 4-((8'-метил-4Н-спиро[циклогексан-1,2'-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин]-5'-ил)метокси)-4-оксобутановой кислоты (3б)



Продукт получали по вышеописанной методике, использовали соединение 2б (4.25 ммоль), янтарный ангидрид (4.25 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (4.25 ммоль). Выход 96%; Маслообразное вещество коричневого цвета; ЯМР 1H (400 МГц, ацетон- d_6), δ м. д.: 1.39-1.57 м (2H, CH_2), 1.58-1.68 м (4H, 2 CH_2), 1.70-1.92 м (4H, 2 CH_2), 2.36 с (3H, CH_3), 2.63 м (4H, 2 CH_2), 4.95 с (2H, CH_2), 5.07 с (2H, CH_2), 8.02 с (1H, CH); ЯМР ^{13}C (100 МГц, ацетон- d_6), δ м. д.: 18.40, 23.20, 25.86, 29.14, 29.53, 36.06, 58.22, 61.70, 100.86, 126.10, 127.75, 140.87, 146.37, 148.38, 172.60, 173.74, 206.21; HRMS (TIS): найдено $[M+H]^+$: 350.1604, рассчитано для $C_{18}H_{24}NO_6 [M+H]^+$: 350.1604.

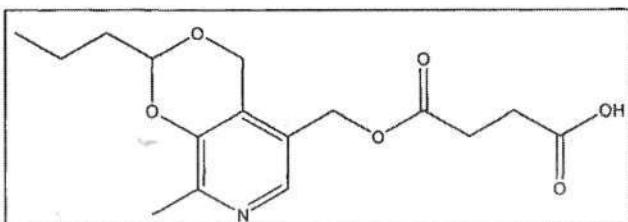
Пример 7. Синтез 4-((2,8-диметил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин-5-ил)метокси)-4-оксобутановой кислоты (3в)



Продукт получали по вышеописанной методике, использовали соединение 2в (2.67 ммоль), янтарный ангидрид (2.67 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (2.67 ммоль). Выход 89%; Маслообразное вещество коричневого цвета; ЯМР 1H (400 МГц, метанол- d_4), δ м. д.: 1.55 д (3H, $^3J=5.1$ Гц, CH_3), 2.38 с (3H, CH_3), 2.56-2.64 м (4H, 2 CH_2), 4.99-5.08 м (4H, CH_2), 5.27 кв (1H, CH), 7.96 с (1H, CH); ЯМР ^{13}C (100 МГц, $CDCl_3$), δ м. д.: 16.05, 19.36, 29.53, 29.88, 63.25, 64.12, 102.45, 130.64, 135.64, 140.68, 143.34, 151.54, 172.98, 177.15; HRMS (TIS): найдено $[M+H]^+$: 296.1134, рассчитано для $C_{14}H_{18}NO_6 [M+H]^+$: 296.1134.

Пример 8. Синтез 4-((8-метил-2-пропил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин-5-ил)метокси)

-4-оксобутановой кислоты (3г)

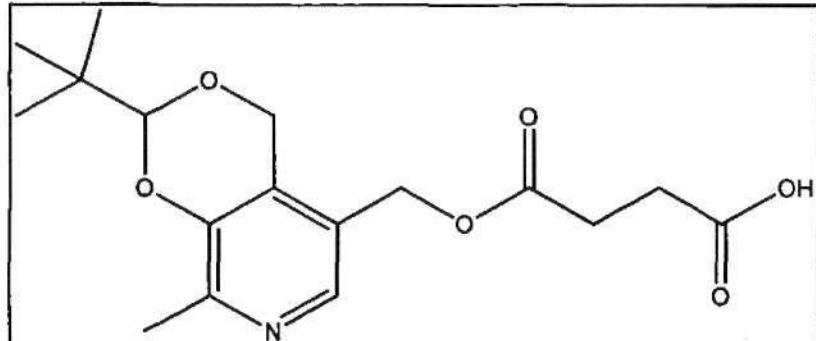


10

Продукт получали по вышеописанной методике, использовали соединение 2 г (2.24 ммоль), янтарный ангидрид (2.24 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (2.24 ммоль). Выход 57%; Бесцветные кристаллы, т.пл. 164°C; ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6), δ м. д.: 0.96 т (3H, $^3\text{J}=7.4$ Гц, CH₃), 1.44 - 1.58 м (2H, CH₂), 1.71 - 1.84 м (2H, CH₂), 2.31 с (3H, CH₃), 2.45 - 2.58 м (4H, 2CH₂), 4.96 с (2H, CH₂), 5.01 с (2H, CH₂), 5.15 т (1H, $^3\text{J}=5.1$ Гц, CH), 7.99 с (1H, CH), 12.27 уш с (1H, COOH); ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d_6), δ м. д.: 13.74, 16.53, 18.19, 28.61, 28.65, 35.73, 60.86, 63.23, 99.27, 125.24, 127.78, 140.45, 146.59, 147.04, 171.87, 173.40; HRMS (TIS): найдено [M+H]⁺: 324.1447, рассчитано для C₁₆H₂₂NO₆ [M+H]⁺: 324.1447.

20 Пример 9. Синтез 4-((2-(трет-бутил)-8-метил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин-5-ил)метокси)-4-оксобутановой кислоты (3д)

25

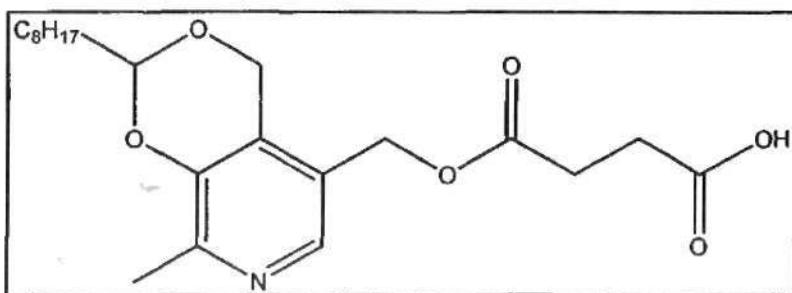


35

Продукт получали по вышеописанной методике, использовали соединение 2д (1.06 ммоль), янтарный ангидрид (1.06 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (1.06 ммоль). Выход 63%; Бесцветные кристаллы, т.пл. 151°C; ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6), δ м. д.: 1.00 с (9H, CH₃), 2.30 с (3H, CH₃), 2.42-2.56 м (4H, 2CH₂), 4.76 с (1H, CH), 4.96 кв (1H, $^2\text{J}=-16.0$ Гц, CH₂), 4.99 с (2H, CH₂), 7.97 с (1H, CH), 12.25 уш с (1H, COOH); ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d_6), δ м. д.: 18.02, 24.09, 28.59, 28.66, 34.60, 60.90, 63.70, 104.11, 125.20, 127.64, 146.64, 147.21, 171.89, 173.41; HRMS (TIS): найдено [M+H]⁺: 338.1604, рассчитано для C₁₇H₂₄NO₆ [M+H]⁺: 338.1604.

40

45 Пример 10. Синтез 4-((8-Метил-2-октил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин-5-ил)метокси)-4-оксобутановой кислоты (3е)

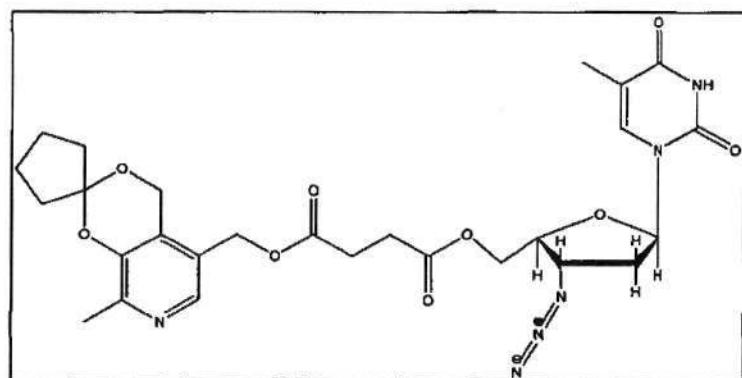


Продукт получали по вышеописанной методике, использовали соединение 2e (1.70
10 ммоль), янтарный ангидрид (1.70 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (1.70 ммоль). Выход
52%; Бесцветные кристаллы, т.пл. 146°C; ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6), δ м. д.: 0.86 уш
т (3Н, $^3\text{J}=6.0$ Гц, CH₃), 1.13-1.40 м (9Н, CH₂), 1.47 м (2Н, CH₂), 1.78 м (2Н, CH₂), 2.31 с (3Н,
15 CH₃), 2.47-2.54 м (4Н, 2CH₂), 4.95 с (2Н, CH₂), 5.00 с (2Н, CH₂), 5.13 уш т (1Н, $^3\text{J}=4.5$ Гц,
CH), 7.99 с (1Н, CH), 12.26 уш с (1Н, COOH); ЯМР ^{13}C (100 МГц, ДМСО- d_6), δ м. д.:
13.94, 18.17, 22.11, 23.07, 28.61, 28.73, 28.90, 31.26, 33.68, 60.85, 63.23, 99.43, 125.22, 127.76,
140.44, 146.55, 147.02, 171.85, 173.38; HRMS (TIS): найдено [M+H]⁺: 394.2230, рассчитано
20 для C₂₁H₃₂NO₆ [M+H]⁺: 394.2230.

Общая методика получения бис-эфиров янтарной кислоты 1 (а-е):

25 Моноэфир янтарной кислоты 3 (а-е) (1 экв), азидотимидин (АЗТ) (1 экв) и 4-
диметиламинопиридин (1 экв) растворяли в 15 мл хлористого метилена. В раствор
добавляли дициклогексилкарбодиимид (1 экв). Реакционную смесь перемешивали при
комнатной температуре на протяжении 24 часов. После завершения реакции
растворитель отгоняли при пониженном давлении, и продукт очищали с помощью
колоночной хроматографии на силикагеле [элюент - этилацетат].

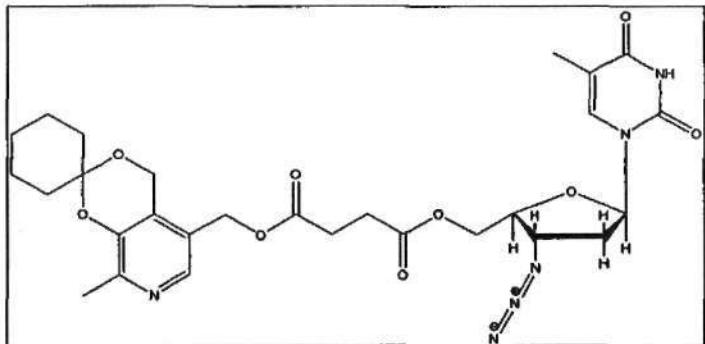
30 Пример 11. Синтез (3-азидо-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2Н)-ил)
тетрагидрофуран-2-ил)метил((8'-метил-4'Н-спиро[цикlopентан-1,2'-[1,3]диоксино[4,5-
с]пиридин]-5'-ил)метил)сукцината (1а)



40 Продукт получали по вышеописанной методике, использовали соединение 3а (1.49
ммоль), АЗТ (1.49 ммоль), 4-диметиламинопиридин (1.49 ммоль) и
дициклогексилкарбодиимид (1.49 ммоль). Выход 60%; бесцветные кристаллы, т.пл. 81-
82°C; $[\alpha]_D^{20}$ (CH₂Cl₂) = +14.7, c=4.7; ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl₃), δ м. д.: 1.67-1.82 м (4Н,
2CH₂), 1.86 с (3Н, CH₃), 1.99-1.83 м (4Н, 2CH₂), 2.30-2.48 м (2Н, CH₂), 2.38 с (3Н, CH₃),
2.54-2.74 м (4Н, 2CH₂), 3.94-4.01 м (1Н, CH), 4.14-4.22 м (1Н, CH), 4.24 (1Н, ΔВХ, $^2\text{J}_{\text{AB}}=$

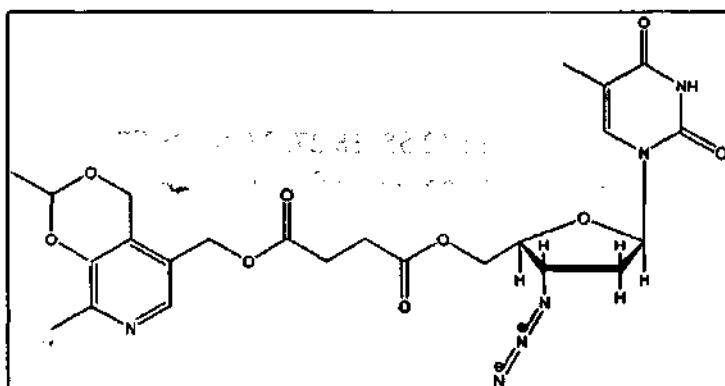
12.2 Гц, $^3J_{AX}=3.7$ Гц, CH₂), 4.41 (1H, ABX, $^3J_{BX}=4.3$ Гц, CH₂), 4.83 с (2H, CH₂), 4.96 с (2H, CH₂), 6.08 т (1H, J=6.3 Гц, CH), 7.21 уш кв (1H, $^4J=-1.2$ Гц, CH), 8.00 с (1H, CH), 10.32 уш с (1H, NH); ЯМР ^{13}C (100 МГц, CDCl₃), δ м. д.: 12.55, 18.27, 23.48, 28.77, 36.06, 37.35, 59.63, 60.25, 61.43, 63.30, 77.36, 81.65, 85.35, 111.23, 111.25, 124.11, 126.55, 135.43, 140.30, 146.42, 148.88, 150.43, 164.09, 171.82; HRMS (TIS): найдено [M+H]⁺: 585.2309, рассчитано для C₂₇H₃₃N₆O₉ [M+H]⁺: 585.2309.

Пример 12. Синтез (3-азидо-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиrimидин-1(2Н)-ил)тетрагидрофуран-2-ил)метил((8'-метил-4'Н-спиро[циклогексан-1,2,-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин]-5'-ил)метил)сукцинаты (1б)



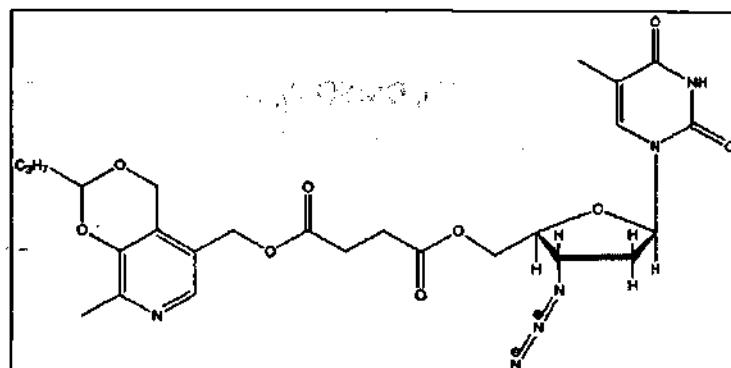
Продукт получали по вышеописанной методике, использовали соединение 3б (1.56 ммоль), АЗТ (1.56 ммоль), 4-диметиламинопиридин (1.56 ммоль) и дициклогексилкарбодиимид (1.56 ммоль). Выход 36%; бесцветные кристаллы, т.пл. 78-79°C; $[\alpha]_D^{20}$ (CH₂Cl₂) = +13.8, с=3.2; ЯМР 1H (400 МГц, DMSO-d₆), δ м. д.: 1.41-2.11 м (10H, 5CH₂), 1.77 с (3H, CH₃), 2.27-2.48 м (2H, CH₂), 2.30 с (3H, CH₃), 2.57-2.69 м (4H, 2CH₂), 3.94 кв (1H, $^3J=9.7$ Гц, $^3J=4.8$ Гц, CH), 4.23 (1H, ABX, $^2J_{AB}=-12.4$ Гц, $^3J_{AX}=4.1$ Гц, CH₂), 4.26 (1H, ABX, $^3J_{BX}=5.2$ Гц, CH₂), 4.43 кв (1H, $^3J=13.2$ Гц, $^3J=6.0$ Гц, CH), 4.83-4.94 м (2H, CH₂), 4.97-5.06 м (2H, CH₂), 6.12 т (1H, J=6.5 Гц, CH), 7.45 с (1H, CH), 7.93-8.00 м (1H, CH), 11.37 уш с (1H, NH); ЯМР ^{13}C (100 МГц, DMSO-d₆): δ 12.10, 18.28, 22.14, 23.04, 24.65, 28.47, 28.50, 32.89, 35.59, 56.99, 59.04, 59.98, 60.91, 63.45, 80.55, 83.54, 99.74, 109.96, 110.75, 114.70, 124.93, 126.65, 135.98, 139.93, 140.14, 144.89, 145.66, 147.01, 147.19, 150.38, 163.67, 171.69, 171.83; HRMS (TIS): найдено [M+H]⁺: 599.2466, рассчитано для C₂₈H₃₅N₆O₉ [M+H]⁺: 599.2466.

Пример 13. Синтез (3-азидо-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиrimидин-1(2Н)-ил)тетрагидрофуран-2-ил)метил((2,8-диметил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин-5-ил)метил)сукцинаты (1в)



Продукт получали по вышеописанной методике, использовали соединение 3в (1.50 ммоль), АЗТ (1.50 ммоль), 4-диметиламинопиридин (1.50 ммоль) и дициклогексилкарбодиимид (1.50 ммоль). Выход 48%; Маслообразное вещество коричневого цвета; ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3), δ м. д.: 1.57 д (3H, $^3\text{J}=5.1$ Гц, CH_3), 1.89 д (3H, $^3\text{J}=3.4$ Гц, CH_3), 2.42 с (3H, CH_3), 2.34-2.48 м (2H, CH_2), 2.57-2.75 м (4H, 2 CH_2), 3.99 кв (1H, $^3\text{J}=9.2$ Гц, $^3\text{J}=4.1$ Гц, CH), 4.27 м (1H, $\text{J}=12.2$ Гц, $\text{J}=3.6$ Гц, CH_2), 4.45 м (1H, $\text{J}=4.2$ Гц, CH_2), 4.88 и 4.92 (2H, AB, $^2\text{J}_{\text{AB}}=-16.0$ Гц, CH_2), 4.97 с (2H, CH_2), 5.15 кв (1H, CH), 6.09 т (1H, $\text{J}=6.3$ Гц, CH), 7.22 с (1H, CH), 8.03 с (1H, $\text{CH}_{(\text{Pyr})}$), 9.82 уш с (1H, NH); ЯМР ^{13}C (100 МГц, CDCl_3), δ м. д.: 12.67, 18.48, 20.63, 28.84, 28.87, 37.50, 60.31, 61.60, 63.34, 63.85, 81.79, 85.55, 97.27, 111.38, 124.34, 127.28, 135.28, 140.98, 141.01, 147.76, 148.63, 150.37, 163.97, 171.90; HRMS (TIS): найдено [M+H] $^+$: 545.1996, рассчитано для $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_9$ [M+H] $^+$: 545.1996.

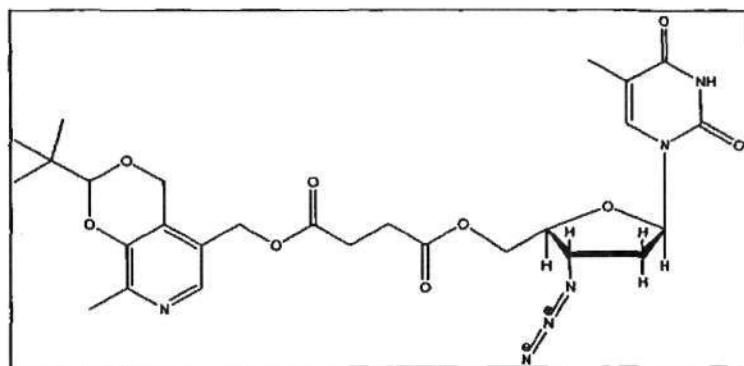
Пример 14. Синтез (3-азидо-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропirimидин-1(2H)-ил)тетрагидрофуран-2-ил)метил((8-метил-2-пропил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин-5-ил)метил)сукцината (1г)



Продукт получали по вышеописанной методике, использовали соединение 3г (1.12 ммоль), АЗТ (1.12 ммоль), 4-диметиламинопиридин (1.12 ммоль) и дициклогексилкарбодиимид (1.12 ммоль). Выход 21%; Маслообразное вещество коричневого цвета; ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3), δ м. д.: 0.97 т (3H, $^3\text{J}=7.5$ Гц, CH_3), 1.46-1.60 м (2H, CH_2), 1.75-1.90 м (2H, CH_2), 1.90 д (3H, $^3\text{J}=2.9$ Гц, CH_3), 2.32-2.48 м (2H, CH_2), 2.41 с (3H, CH_3), 2.55-2.77 м (4H, 2 CH_2), 3.98 кв (1H, $\text{J}=8.9$ Гц, $\text{J}=4.1$ Гц, CH), 4.14-4.23 м (1H, CH_2), 4.26 м (1H, $\text{J}=12.2$ Гц, $\text{J}=3.7$ Гц, CH_2), 4.44 м (1H, $\text{J}=3.9$ Гц, CH), 4.88 и 4.90 (2H,

AB, $^2J_{AB}=-16.0$ Гц, CH₂), 4.96 с (2H, CH₂), 4.99 т (1H, J=5.2 Гц, CH), 6.08 т (1H, J=6.3 Гц, CH), 7.22 уш с (1H, CH), 8.02 с (1H, CH), 10.05 уш с (1H, NH); ЯМР ^{13}C (100 МГц, CDCl₃), δ м. д.: 12.63, 13.93, 16.97, 18.31, 28.79, 28.83, 36.25, 37.45, 60.28, 61.56, 63.33, 63.89, 81.75, 85.46, 85.49, 99.94, 111.33, 124.39, 127.58, 135.55, 136.54, 140.78, 147.83, 148.57, 150.42, 164.09, 171.87, 171.89; HRMS (TIS): найдено [M+H]⁺: 573.2309, рассчитано для C₂₆H₃₃N₆O₉ [M+H]⁺: 573.2309.

Пример 15. Синтез (3-азидо-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофuran-2-ил)метил((8-метил-2-(трет-бутил)-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин-5-ил)метил)сукцинаты (1д)

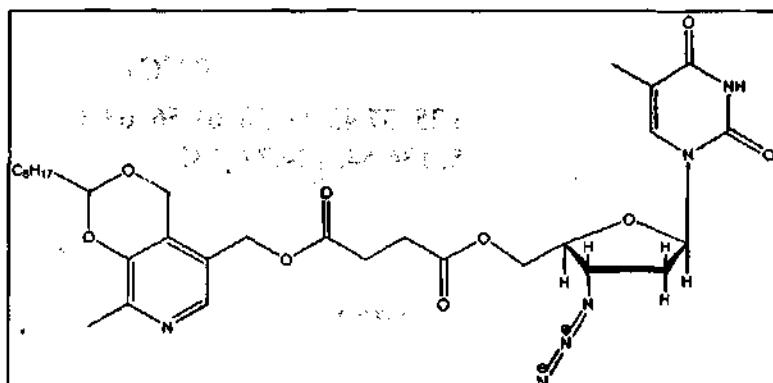


Продукт получали по вышеописанной методике, использовали соединение 3д (0.56 ммоль), А3Т (0.56 ммоль), 4-диметиламинопиридин (0.56 ммоль) и дициклогексилкарбодиимид (0.56 ммоль). Выход 54%; Маслообразное вещество коричневого цвета; ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl₃), δ м. д.: 0.98 с (9H, 3CH₃), 1.83 д (3H, J=2.2 Гц, CH₃), 2.28-2.46 м (2H, CH₂), 2.37 с (3H, CH₃), 2.52-2.73 м (4H, 2CH₂), 3.95 уш кв (1H, J=4.4 Гц, CH), 4.10-4.28 м (2H, CH, CH₂), 4.35-4.46 уш м (1H, CH₂), 4.55 с (1H, CH), 4.86 с (2H, CH₂), 4.92 с (2H, CH₂), 6.06 т (1H, J=6.0 Гц, CH), 7.20 с (1H, CH), 7.97 с (1H, CH), 10.48 с (1H, NH); ЯМР ^{13}C (100 МГц, CDCl₃), δ м. д.: 12.49, 18.07, 24.14, 28.66, 28.69, 33.76, 34.85, 37.26, 60.17, 61.48, 63.23, 64.14, 81.58, 85.22, 85.25, 104.91, 111.16, 124.23, 127.43, 135.41, 140.48, 147.92, 148.45, 150.44, 164.14, 171.76, 171.80; HRMS (TIS): найдено [M+H]⁺: 587.2466, рассчитано для C₂₇H₃₅N₆O₉ [M+H]⁺: 587.2466.

Пример 16. Синтез (3-азидо-5-(5-метил-2,4-диоксо-3,4-дигидропиримидин-1(2H)-ил)тетрагидрофuran-2-ил)метил((8-метил-2-октил-4Н-[1,3]диоксино[4,5-с]пиридин-5-ил)метил)сукцинаты (1е)

40

45



Продукт получали по вышеописанной методике, использовали соединение Зе (0.63 ммоль), АЗТ (0.63 ммоль), 4-диметиламинопиридин (0.63 ммоль) и дициклогексилкарбодиимид (0.63 ммоль). Выход 56%; Маслообразное вещество коричневого цвета; ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3), δ м. д.: 0.83 т (3Н, $J=6.7$ Гц, CH_3), 1.17-1.38 м (10Н, 5 CH_2), 1.43-1.53 м (2Н, CH_2), 1.75-1.90 м (5Н, CH_2 , CH_3), 2.30-2.48 м (5Н, CH_3 , CH_2), 2.54-2.74 м (4Н, 2 CH_2), 3.97 кв (1Н, $J=8.2$ Гц, $J=3.7$ Гц, CH), 4.12-4.29 м (2Н, $J=3.5$ Гц, CH , CH_2), 4.42 м (1Н, $J=12.0$ Гц, $J=3.8$ Гц, CH_2), 4.86 и 4.88 (2Н, AB, $^{2}\text{J}_{\text{AB}}=-16.4$ Гц, CH_2), 4.95 с (2Н, CH_2), 4.96 кв (1Н, $J=5.1$ Гц, CH), 6.08 т (1Н, $J=6.2$ Гц, CH), 7.21 с (1Н, CH), 8.00 с (1Н, CH), 10.25 уш с (1Н, NH); ЯМР ^{13}C (100 МГц, CDCl_3), δ м. д.: 12.58, 14.09, 18.29, 22.63, 23.51, 28.74, 28.77, 29.16, 29.31, 29.42, 31.81, 34.18, 37.37, 60.24, 61.53, 63.29, 63.84, 81.68, 85.34, 85.37, 100.07, 111.26, 124.31, 127.48, 135.47, 140.76, 147.75, 148.53, 150.43, 164.09, 171.82, 171.84; HRMS (TIS): найдено [M+H] $^{+}$: 643.3092, рассчитано для $\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_9$ [M+H] $^{+}$: 643.3092.

Методика изучения антиретровирусной активности

Первый этап. Культивирование клеток HeLa.

Все работы с культурой клеток проводили в стерильном ламинарном боксе согласно общепринятым правилам работы в лаборатории 2-го класса биобезопасности.

Клетки из раковой опухоли шейки матки человека HeLa (ATCC) культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки FBS и пенстрепа (фирма-производитель - Sigma, Великобритания). Клетки инкубировали при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% углекислого газа (CO_2). Пересев клеток проводили при плотности клеточного монослоя 90% с применением 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (фирма-производитель - БиоЛот, Санкт Петербург).

Таким путем завершали получение клеточной культуры HeLa и приступали ко второму этапу.

Второй этап. Определение цитотоксичности потенциальных антиретровирусных веществ.

Точные навески исследуемых веществ растворяли в рассчитанном объеме стерильного раствора диметилсульфоксида (фирма-производитель - БиоЛот, Санкт Петербург) или стерильном растворе DPBS (фирма-производитель - БиоЛот, Санкт Петербург) в 1,5-миллилитровой стерильной пробирке, до полного растворения вещества. Препарат разводили в различных концентрациях от 1 кратного до 1000 кратного раствора.

Таким образом, после получения необходимых растворов, вещество наносили на клетки HeLa в 96 луночном планшете и инкубировали во влажной атмосфере, при

содержании 5% CO₂, 24 часа. По истечении 24 часов, после воздействия препаратов, в каждую лунку планшета добавляли по 10 мкл смеси растворов MTS/PMS (Promega, Sigma, США), в соотношении 1:20). Через 1 час выполняли измерение оптической плотности раствора на планшетном фотометре Tecan (Thermo Scientific, США) при 5 длине волны 490 нм в соответствии с инструкциями фирмы производителя (Promega, США).

Результаты получали в единицах оптической плотности с помощью программного обеспечения SkanIt Software 3.0 for Multiskan FC (Thermo Scientific, США). Статистический анализ результатов проводили в программном обеспечении Excel 2010 (Microsoft, США). 10 После определения оптимальной нетоксичной концентрации по сравнению с исходным препаратом азидотимидином приступали к третьему этапу.

Третий этап. Определение антиретровирусной активности веществ.

Определение антиретровирусной активности вещества проводили в соответствии с ранее описанным методом (Биобезопасная модель ВИЧ-инфекции для оценки 15 антиретровирусной активности лекарственных препаратов / Е.В. Головин, И.Г. Мустафин, Е.В. Мартынова, О.Р. Галеев, В.А. Анохин, А.А. Ризванов // Современные технологии в медицине. - 2012. - Т. 1. - С. 55-60). Рекомбинантный лентивирус, экспрессирующий белок GFP, получали с помощью котрансфекции культуры клеток HEK293 плазмидами, кодирующими разные компоненты рекомбинантного вируса, 20 например, плазмидами, полученными из некоммерческой организации AddGene (www.addgene.org): pCMV-VSV-G (плазмида №8454), psPAX2 (плазмида №12260) и pWPT-GFP (плазмида №12255). Сбор вирусного супернатанта проводили 3 раза, через каждые 12 часов. Супернатанты объединяли и хранили при 4°C. По завершению сбора 25 супернатанты центрифугировали в течение 5 минут, при 1500 об/мин и фильтровали через фильтр 0,22 мкм. Очищенные супернатанты хранили в аликвотах при -80°C. Полученный лентивирус добавляли в культуру клеток, предварительно проинкубированные с исследуемыми веществами. Культивирование и инфицирование клеток проводили в 24-луночном культуральном планшете. В планшете с клетками HeLa после двух дней культивирования наблюдали нормальный рост клеток, примерно 30 30000 клеток в каждой лунке.

Далее культуральную среду удаляли и добавляли свежую среду в объеме 250 мкл в каждую лунку. В лунки добавляли исходные растворы исследуемых веществ до конечных нетоксичных концентраций в культуральной среде для каждого препарата. Клетки инкубировали в течении 30 минут при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% 35 CO₂. Среду удаляли, в лунки добавляли по 250 мкл раствора лентивируса в питательной среде, содержащей соответствующее исследуемое вещество в конечной концентрации. Клетки инкубировали в течении 3 часов при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Среду удаляли и добавляли по 500 мкл свежей среды. Инфицированные клетки 40 инкубировали в течении двух суток при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Инфицирование клеток определяли по экспрессии GFP с помощью метода проточной цитометрии.

Эффективность антиретровирусной активности исследуемого вещества определяли 45 по экспрессии репотерного гена, например, GFP. Ген GFP входит в состав генома рекомбинантного лентивируса и, таким образом, ведет себя как типичный вирусный ген. Для экспрессии лентивирусных генов необходимо, чтобы вирус встроился (интегрировался) в геном клетки хозяина. После встраивания в геном клетки хозяина

начинается экспрессия вирусных генов - транскрипция мРНК и трансляция белка. Если исследуемое вещество подавляет вирусную инфекцию на стадии проникновения вируса в клетку, обратной транскрипции, транспорта в ядро и/или интеграции, то не происходит экспрессии вирусных генов. Следовательно, не происходит экспрессии репотерного гена. В описываемом нами примере, специфическая активность репотерного белка - зеленая флуоресценция при облучении светом с длиной волны 450 нанометров. Таким образом, наличие зеленой флуоресценции клеток свидетельствует об успешной интеграции вируса в геном клетки хозяина и, следовательно, низкой антиретровирусной активности исследуемого вещества.

10 Из представленных в таблице 1 данных следует, что заявленные вещества обладают антиретровирусным действием, при этом соединения 1 (г-е) ингибируют инфекцию на уровне азидотимида - одного из наиболее эффективных и часто используемых антиретровирусных препаратов.

15 Из представленных в таблице 2 данных следует, что исследуемые вещества менее токсичны азидотимида (в 1,5-2,5 раза). Таким образом, синтезированные соединения представляют интерес при разработке новых антиретровирусных веществ, используемых для борьбы с ретровирусами, например, с ВИЧ-инфекцией.

Антиретровирусные препараты на 20 основе производных азидотимида

(Таблица 1. Результаты исследования
25 антиретровирусной активности
заявляемых соединений 1(а-е) на
культуре клеток HeLa (подавление
30 инфекции, %))

Соединение	Подавление инфекции, %
1а	69.0±0.5
1б	75.0±0.3
1в	75.0±0.2
1г	77.0±0.5
1д	88.0±1.0
1е	81.0±0.9
A3T	90.0±1.0

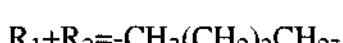
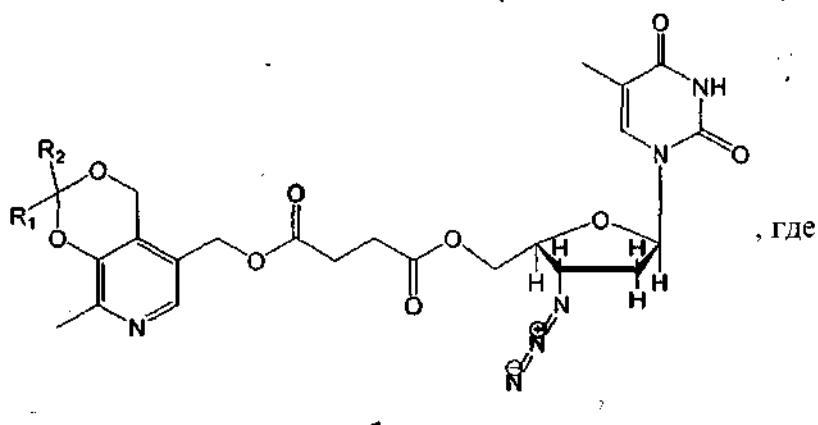
**Антиретровирусные препараты на
основе производных азидотимидина**

(Таблица 2. Результаты исследования
цитотоксичности заявляемых
соединений 1(а-е) на культуре клеток
HeLa (IC50, мкг/мл))

Соединение	IC50, мкг/мл
1а	172.0±1,0
1б	165.0±1.0
1в	191.0±0.4
1г	156.0±0.5
1д	313.0±0.3
1е	313.0±0.2
АЗТ	121.0±0.9

Формула изобретения

Антиретровирусные препараты на основе производных азидотимидина общей
формулы 1:



R₁+R₂=-CH₂(CH₂)₃CH₂-

R₁=H, R₂=CH₃

R₁=H, R₂=CH₂CH₂CH₃

R₁=H, R₂=C(CH₃)₃

R₁=H, R₂=CH₂(CH₂)₆CH₃

10

15

20

25

30

35

40

45