

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к 3'-пролекарствам 2'-дезоксид-β-L-нуклеозидов для лечения вирусного гепатита В.

В данной заявке заявляется приоритет согласно предварительной заявке № 60/212100, поданной 15 июня 2000 г.

Предпосылки изобретения

Вирус гепатита В («HBV») является вторым по отношению к табакковирусам, вызывающим рак у человека. Механизм, с помощью которого HBV индуцирует рак, неизвестен, хотя постулируется, что он может непосредственно запускать развитие опухолей или опосредованно запускать развитие опухолей через хроническое воспаление, цирроз и регенерацию клеток, связанную с инфекцией.

Распространение вируса гепатита В во всем мире достигло уровня эпидемий. Через 2-6 месяцев инкубационного периода, во время которого хозяин не знает об инфицировании, заражение HBV может привести к острому гепатиту и повреждению печени, что вызывает боль в брюшной области, желтуху и повышение уровня некоторых ферментов в крови. HBV может вызвать скоротечный гепатит, быстро прогрессирующую, часто приводящую к смерти форму заболевания, при которой повреждаются большие участки печени. Пациенты обычно выздоравливают от острого вирусного гепатита. Однако у некоторых пациентов высокие уровни вирусного антигена находятся в крови в течение длительного или неопределенного периода времени, вызывая хроническую инфекцию. Хронические инфекции могут привести к хроническому персистирующему гепатиту. Пациенты, зараженные хроническим персистирующим HBV, наиболее часто встречаются в развивающихся странах. Хронический персистирующий гепатит может приводить к утомлению, вызывать цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному, первичный рак печени. В западных промышленных странах группы высокого риска заражения HBV включают таковых, которые контактируют с носителями HBV и пробами их крови. Эпидемиология HBV фактически очень сходна с таковой для синдрома приобретенного иммунодефицита, что является причиной того, что инфекция, вызываемая HBV, распространена среди пациентов со СПИДом или связанными с вирусом иммунодефицита человека инфекциями. Однако HBV является более контагиозным, чем HIV.

Было показано, что обещающими при лечении являются ежедневные введения α-интерферона, генетически сконструированного белка. Разработана вакцина из человеческой сыворотки для иммунизации пациентов против HBV. Вакцины получали путем генной инженерии. Несмотря на то, что было установлено, что вакцина является эффективной, производство вакцины представляет серьезную проблему, поскольку поставка человеческой сыворотки от хронических носителей ограничена, и процедура очистки является длительной и дорогостоящей. Кроме того, каждую партию вакцины, полученной из различных сывороток, необходимо тестировать на шимпанзе для гарантии безопасности. Кроме того, вакцина не помогает уже зараженным вирусом пациентам.

Важной стадией в механизме действия пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов при вирусных заболеваниях и, в частности, HBV и HIV, является их метаболическая активация под воздействием клеточных и вирусных киназ с образованием моно-, ди- и трифосфатных производных. Биологически активным видом многих нуклеозидов является трифосфатная форма, которая ингибирует ДНК-полимеразу или обратную транскриптазу, или вызывает обрыв цепи.

Был установлен ряд синтетических нуклеозидов, которые проявляют активность в отношении HBV. Заявленный в патенте США 5539116, Liotta et al., (-)-энантиомер BCH-189 (2',3'-дидезокси-3'-тиациитидин), известный как ЗТС, в настоящее время проходит клинические испытания при лечении гепатита В. См. также заявку на выдачу европейского патента 04 94119 A1, поданную BioChem Pharma, Inc.

β-2-Гидроксиметил-5-(5-фторцитозин-1-ил)-1,3-оксатиолан («FTC»), заявленный в патентах США № 5814639 и 5914331, Liotta et al., проявляет активность против HBV. См. Furman et al., «The Anti-Hepatitis B Virus Activities, Cytotoxicities, and Anabolic Profiles of the (-) and (+) Enantiomers of cis-5-Fluoro-1-{2-(Hydroxymethyl)-1,3-oxathiolane-5-yl}-Cytosine» Antimicrobial Agents and Chemotherapy/ December 1992, page 2686-2692; and Cheng, et al., Journal of Biological Chemistry, Volume 267(20), 13938-13942 (1992).

В патентах США № 5565438, 5567688 и 5587362 (Chu, et al.) раскрывается применение 2'-фтор-5-метил-β-L-арабинофуранолилуридина (L-FMAU) для лечения гепатита В и инфекции, вызываемой вирусом Эпштейна-Барра.

Установлена эффективность пенцикловира (PCV; 2-амино-1,9-дигидро-9-{4-гидрокси-3-(гидрокси-метил)бутил}-6Н-пуриин-6-она) при гепатите В. См. патенты США № 5075445 и 5684153.

Также была установлена активность адефовира 9-{2-(фосфонометокси)этил}аденина, также называемого как РМЕА или {{2-(6-амино-9Н-пуриин-9-ил)этокси}метилфосфорная кислота} против гепатита В. См., например, патент США № 5641763 и 5142051.

Yale University и The University of Georgia Research Foundation, Inc. раскрывают применение L-FDDC (5-фтор-3'-тиа-2',3'-дидезоксицитидина) для лечения гепатита В в WO 92/18517.

Другие лекарства, исследованные для лечения HBV, включают арабинозид аденозина, тимозин, ацикловир, фосфоноформат, зидовудин, (+)-цианиданол, хинакрин и 2'-фторарабинозил-5-иодурацил.

В патентах США № 5444063 и 5684010, Университет Эмори, раскрывается применение энантиомерно чистых β -D-1,3-диоксолановых пуриновых нуклеозидов для лечения гепатита В.

В заявке WO 96/40164, поданной Университетом Эмори, UAB Research Foundation and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), раскрывается ряд β -L-2',3'-дидезоксинуклеозидов для лечения гепатита В.

В заявке WO 95/07287, также поданной Университетом Эмори и the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), раскрываются 2'- или 3'-дезоксидеозокси- β -L-пентофуранозилнуклеозиды для лечения инфекции, вызываемой HIV.

В заявке WO 96/13512, поданной Genencor International, Inc. и Lipitek, Inc., раскрывается получение L-рибофуранозилнуклеозидов в качестве противоопухолевых агентов и противовирусных агентов.

В заявке WO 95/32984 раскрываются липидные эфиры монофосфатов нуклеозидов в качестве иммуносупрессоров.

В DE 4224737 раскрываются нуклеозиды цитозина и их фармацевтические применения.

Tsai et al. в Biochem. Pharmacol. 1994, 48(7), 1477-81, раскрывают действие аналогов агента против HIV 2'- β -D-F-2',3'-дидезоксинуклеозида на содержание в клетках митохондриальной ДНК и продуцирование лактата.

Galvez, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 1994, 35(5), 1198-203, описывает молекулярный расчет β -D-3'-азидо-2',3'-дидезокси-5-фторцитидина.

Mahmoudian, Pharm. Research 1991, 8(1), 43-6, раскрывает анализ количественной взаимосвязи структура-активности агентов против HIV, таких как β -D-3'-азидо-2',3'-дидезокси-5-фторцитидин.

В патенте США № 5703058 раскрываются (5-карбоксимидо или 5-фтор)-(2',3'-ненасыщенные или 3'-модифицированные) пиримидиновые нуклеозиды для лечения HIV или HBV.

Lin et al. раскрывают синтез и противовирусную активность различных 3'-азидо-аналогов β -D-нуклеозидов в J. Med. Chem. 31(2), 336-340 (1988).

В заявке WO 00/3998, поданной Novirio Pharmaceuticals, Ltd., раскрываются способы получения замещенных 6-бензил-4-оксопиримидинов и применение таких пиримидинов для лечения HIV.

Novirio Pharmaceuticals, Ltd. также были первыми в раскрытии 2'-дезоксидеозокси- β -L-эритропентофуранонуклеозидов и их применении для лечения HBV в заявке WO 00/09531. Раскрывается способ лечения гепатита В у людей и у животных-хозяев, который включает введение эффективного количества биологически активного 2'-дезоксидеозокси- β -L-эритропентофуранонуклеозида (альтернативно называемого β -L-dN или β -L-2'-dN) или его фармацевтически приемлемой соли или пролекарства, включая β -L-дезоксидеозоксириботимидин (β -L-dT), β -L-дезоксидеозоксирибоцитидин (β -L-dC), β -L-дезоксидеозоксирибоуридин (β -L-dU), β -L-дезоксидеозоксирибогуанозин (β -L-dG), β -L-дезоксидеозоксирибоаденозин (β -L-dA) и β -L-дезоксидеозоксирибоинозин (β -L-dI), вводимые по отдельности или в комбинации, необязательно в фармацевтически приемлемом носителе. Также раскрыты 5'- и N⁴(цитидин) или N⁶(аденозин)ацилированные или алкилированные производные активного соединения, или 5'-фосфолипиды или 5'-эфирные липиды.

Имелись попытки создать различные пролекарства противовирусных препаратов. Наиболее примечательно в патенте США № 4957924, Beauchamp, раскрываются различные лечебные сложные эфиры ацикловира.

В свете того, что распространение вирусного гепатита В во всем мире достигло уровня эпидемий, и он имеет тяжелые и часто трагические воздействия на зараженного пациента, остается настоятельная потребность в обеспечении новых эффективных фармацевтических агентов для лечения людей, зараженных вирусом, которые обладают низкой токсичностью для хозяина.

Следовательно, целью настоящего изобретения является обеспечение соединений, композиций и способов лечения людей или других хозяев, зараженных HBV.

Краткое описание изобретения

3'-Пролекарства 2'-дезоксидеозокси- β -L-нуклеозидов или их фармацевтически приемлемые соли, или фармацевтически приемлемые композиции, содержащие данные соединения, пригодны для профилактики и лечения гепатита В и других связанных состояний, таких как состояния, при которых имеется положительная реакция на наличие анти-HBV-антител и положительная на HBV, хроническое воспаление печени, вызванное HBV, цирроз, острый гепатит, фульминантный гепатит, хронический персистирующий гепатит и желтуха. Данные соединения или композиции также можно использовать в профилактических целях для предупреждения или замедления прогрессирования клинического течения заболевания у индивидуумов, которые дают положительную реакцию на анти-HBV-антитела или HBV-антиген или которые подвергались воздействию HBV.

Также раскрывается способ лечения вирусного гепатита В у хозяина, включая человека, включающий введение эффективного количества 3'-пролекарства биологически активного 2'-дезоксидеозокси- β -L-нуклеозида или его фармацевтически приемлемой соли, назначаемого отдельно или в комбинации или чередовании с другим агентом против вируса гепатита В, необязательно в фармацевтически приемлемом

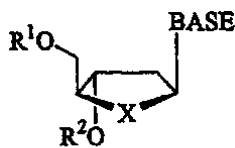
носителе. Термин 2'-дезоксид, в том смысле, в котором он используется в данном описании, относится к нуклеозиду, который не имеет заместителя в 2'-положении. Термин 3'-пролекарство, в том смысле, в котором он здесь используется, относится к 2'-дезоксид-β-L-нуклеозиду, который включает биологически отщепляемую группу в 3'-положении, включая, но не ограничиваясь им, ацил, и в одном воплощении L-аминокислоту.

В одном воплощении 3'-пролекарство 2'-дезоксид-β-L-нуклеозида включает биологически отщепляемые группы в 3'- и/или 5'-положениях. Предпочтительными группами являются сложные эфиры аминокислот, включая валил, и сложные алкиловые эфиры, включая ацетил. Следовательно, данное изобретение, в частности, включает эфир 3'-L-аминокислоты и эфир 3',5'-L-диаминокислоты 2'-дезоксид-β-L-нуклеозидов с любым желаемым пуриновым или пиримидиновым основанием, где исходное лекарство имеет EC₅₀ ниже 15 мкмоль и предпочтительно ниже 10 мкмоль в клетках 2.2.15; 3'-(алкиловый или ариловый эфир)- или 3',5'-L-ди(алкиловый или ариловый эфир)-2'-дезоксид-β-L-нуклеозиды с любым желаемым пуриновым или пиримидиновым основанием, где исходное лекарство имеет EC₅₀ ниже 10 или 15 мкмоль в клетках 2.2.15; и пролекарства 3',5'-диэфиров 2'-дезоксид-β-L-нуклеозидов, в которых: (i) 3'-эфир представляет эфир аминокислоты и 5'-эфир представляет алкиловый или ариловый эфир; (ii) оба эфира представляют эфиры аминокислоты; (iii) оба эфира независимо представляют алкиловые или ариловые эфиры; и (iv) 3'-эфир независимо представляет алкиловый или ариловый эфир, и 5'-эфир представляет эфир аминокислоты, где исходное лекарство имеет EC₅₀ ниже 10 или 15 мкмоль в клетках 2.2.15.

Примерами пролекарств, попадающих в объем изобретения, являются 3'-L-валиновый эфир 2'-дезоксид-β-L-цитидина; 3'-L-валиновый эфир 2'-дезоксид-β-L-тимина; 3'-L-валиновый эфир 2'-дезоксид-β-L-аденозина; 3'-L-валиновый эфир 2'-дезоксид-β-L-гуанозина; 3'-L-валиновый эфир 2'-дезоксид-β-L-5-фторцитидина; 3'-L-валиновый эфир 2'-дезоксид-β-L-уридина; 3'-ацетиловый эфир 2'-дезоксид-β-L-цитидина; 3'-ацетиловый эфир 2'-дезоксид-β-L-тимина; 3'-ацетиловый эфир 2'-дезоксид-β-L-аденозина; 3'-ацетиловый эфир 2'-дезоксид-β-L-гуанозина; 3'-ацетиловый эфир 2'-дезоксид-β-L-5-фторцитидина и 3'-эфиры 2'-дезоксид-β-L-(цитидина, 5-фторцитидина, гуанозина, уридина, аденозина или тимина), в которых (i) 3'-эфир представляет эфир аминокислоты или (ii) 3'-эфир представляет алкиловый или ариловый эфир.

Дополнительные примеры пролекарств, попадающих в объем изобретения, представляют 3',5'-L-дивалиновый эфир 2'-дезоксид-β-L-цитидина (дивал-L-dC); 3',5'-L-дивалиновый эфир 2'-дезоксид-β-L-тимина; 3',5'-L-дивалиновый эфир 2'-дезоксид-β-L-аденозина; 3',5'-L-дивалиновый эфир 2'-дезоксид-β-L-гуанозина; 3',5'-L-дивалиновый эфир 2'-дезоксид-β-L-5-фторцитидина; 3',5'-L-дивалиновый эфир 2'-дезоксид-β-L-уридина; 3',5'-диацетиловый эфир 2'-дезоксид-β-L-цитидина; 3',5'-диацетиловый эфир 2'-дезоксид-β-L-тимина; 3',5'-диацетиловый эфир 2'-дезоксид-β-L-аденозина; 3',5'-диацетиловый эфир 2'-дезоксид-β-L-гуанозина; 3',5'-диацетиловый эфир 2'-дезоксид-β-L-5-фторцитидина и 3',5'-диэфиры 2'-дезоксид-β-L-(цитидина, 5-фторцитидина, гуанозина, уридина, аденозина или тимина), в которых (i) 3'-эфир представляет эфир аминокислоты и 5'-эфир представляет алкиловый или ариловый эфир; (ii) оба эфира представляют эфиры аминокислоты; (iii) оба эфира независимо представляют алкиловые или ариловые эфиры; или (iv) 3'-эфир представляет алкиловый или ариловый эфир и 5'-эфир представляет эфир аминокислоты.

Во втором воплощении изобретение обеспечивает 3'-пролекарство β-L-нуклеозида, определенное формулой (I)



(I)

или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R¹ представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R² выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонила, арилсульфонила, аралкилсульфонила, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата;

X представляет О, S, SO₂ или CH₂; и

BASE представляет пуриновое или пиримидиновое основание, которое необязательно может быть замещенным.

В предпочтительном воплощении X представляет О.

В одном воплощении R^1 и/или R^2 представляют остаток аминокислоты.

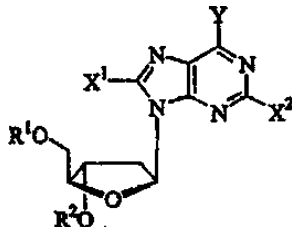
В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

В другом воплощении настоящего изобретения 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-2'-дезоксипурин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонила, арилсульфонила, аралкилсульфонила, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата;

Y представляет OR^3 , NR^3R^4 или SR^3 ; и

X^1 и X^2 независимо выбраны из группы, состоящей из H, нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, галогена, OR^5 , NR^5R^6 или SR^5 ; и

R^3 , R^4 , R^5 и R^6 независимо представляют H, нормальный, разветвленный или циклический алкил (особенно циклопропил), диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинометил), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

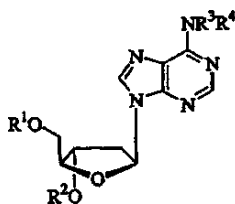
В другом воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное-, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

В конкретном воплощении 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-2'-дезоксиаденозин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонила, арилсульфонила, аралкилсульфонила, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата; и

R^3 и R^4 независимо представляют H, нормальный, разветвленный или циклический алкил (особенно циклопропил), диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинометил), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

В предпочтительном воплощении R^1 представляет H.

В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

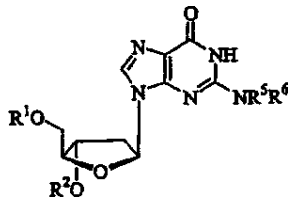
В другом предпочтительном воплощении R^2 представляет остаток аминокислоты, и в частности, L-валинил.

В одном воплощении R^3 представляет водород и R^4 представляет диметиламинотетил.

В другом воплощении R^3 представляет водород и R^4 представляет ацетил.

В другом воплощении R^3 представляет водород и R^4 представляет L-валинил.

В другом конкретном воплощении 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-2'-дезоксигуанозин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонила, арилсульфонила, аралкилсульфонила, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата.

R^5 и R^6 независимо представляют H, нормальный, разветвленный или циклический алкил (особенно циклопропил), диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинотетил), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

В предпочтительном воплощении R^1 представляет H.

В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

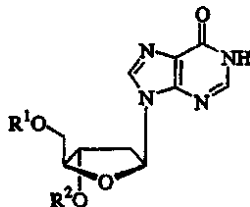
В предпочтительном воплощении R^2 представляет остаток аминокислоты, и в частности, L-валинил.

В одном воплощении R^5 представляет водород и R^6 представляет диметиламинотетил.

В другом воплощении R^5 представляет водород и R^6 представляет ацетил.

В другом воплощении R^5 представляет водород и R^6 представляет L-валинил.

В другом конкретном воплощении 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-2'-дезоксигуанозин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонила, арилсульфонила, аралкилсульфонила, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата.

В предпочтительном воплощении R^1 представляет H.

В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

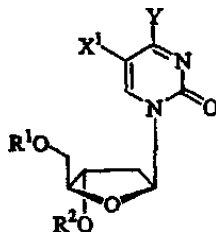
R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

В другом предпочтительном воплощении R^2 представляет остаток аминокислоты, и в частности, L-валинил.

В другом воплощении настоящего изобретения 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-2'-дезоксипиримидин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата;

Y представляет OR^3 , NR^3R^4 или SR^3 ;

X^1 выбран из группы, состоящей из H, нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, галогена, OR^5 , NR^5R^6 или SR^5 ; и

R^3 , R^4 , R^5 и R^6 независимо представляют H, нормальный, разветвленный или циклический алкил (особенно циклопропил), диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинометилен), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

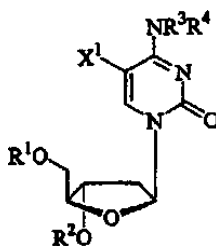
В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

В одном конкретном воплощении 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-2'-дезоксипиримидин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата.

X^1 выбран из группы, состоящей из H, нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, галогена, OR^5 , NR^5R^6 или SR^5 ; и

R^3 , R^4 , R^5 и R^6 независимо представляют H, нормальный, разветвленный или циклический алкил (особенно циклопропил), диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинометилен), СО-алкил, СО-

арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

В одном воплощении X^1 представляет водород.

В другом воплощении X^1 представляет галоген, а именно фтор, хлор, бром или иод.

В предпочтительном воплощении R^1 представляет Н.

В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

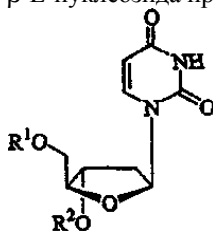
В другом предпочтительном воплощении R^2 представляет остаток аминокислоты, и в частности, L-валинил.

В одном воплощении R^3 представляет водород и R^4 представляет диметиламинометил.

В другом воплощении R^3 представляет водород и R^4 представляет ацетил.

В другом воплощении R^3 представляет водород и R^4 представляет L-валинил.

В другом воплощении 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-2'-дезоксинуридин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата; и

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата.

В предпочтительном воплощении R^1 представляет Н.

В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

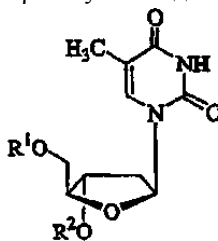
R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

В другом предпочтительном воплощении R^2 представляет остаток аминокислоты, и в частности, L-валинил.

В другом воплощении 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-тимидин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата; и

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата.

В предпочтительном воплощении R^1 представляет Н.

В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

В другом предпочтительном воплощении R^2 представляет остаток аминокислоты, и в частности, L-валинил.

Изобретение также обеспечивает комбинации по меньшей мере двух описанных здесь пролекарств.

Изобретение дополнительно обеспечивает по меньшей мере одно из описанных 3'-пролекарств в комбинации или при чередовании со вторым нуклеозидом, который проявляет активность против гепатита В, включая, но не ограничиваясь им, исходное лекарство любого из определенных здесь пролекарств, т.е. 2'-дезоксид-β-L-нуклеозидов, включая 2'-дезоксид-β-L-цитидин; 2'-дезоксид-β-L-тимин; 2'-дезоксид-β-L-аденозин; 2'-дезоксид-β-L-гуанин; 2'-дезоксид-β-L-5-фторцитидин. Альтернативно, 3'-пролекарства можно вводить в комбинации или при чередовании с другими агентами против вируса гепатита В, такими как (-)-цис-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин; цис-2',3'-дидезокси-3'-тиа-5-фторцитидин; L-FMAU; адефовир; фамцикловир и энтецивир, или любым другим соединением, имеющим значение EC_{50} ниже 10 или 15 мкмоль в клетках 2.2.15; или их пролекарствами или фармацевтически приемлемыми солями.

Изобретение дополнительно включает введение пролекарства в комбинации или при чередовании с иммуномодулятором или другим фармацевтически активным модификатором репликации вируса, включая биологическое вещество, такое как белок, пептид, олигонуклеотид или гамма-глобулин, включая, но не ограничиваясь ими, интерферон, интерлейкин или антисмысловые олигонуклеотиды для генов, которые экспрессируют или регулируют репликацию вируса гепатита В.

Эффективность исходных соединений против HBV можно определить по концентрации соединения, необходимой для уменьшения скорости репликации вируса в условиях *in vitro*, в соответствии со способами, приведенными подробнее ниже, на 50% (т.е. EC_{50} соединения). В предпочтительных воплощениях исходное соединение пролекарства показывает значение EC_{50} ниже 15 или предпочтительно ниже 10 мкмоль в условиях *in vitro* при тестировании на клетках 2.2.15, трансфектированных вирионом гепатита.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1a и 1b представляют неограничивающие иллюстративные примеры по настоящему изобретению синтеза соответственно 3'- и 5'-валиниловых эфиров 2'-дезоксид-β-L-цитидина (β-L-dC) из 2'-дезоксид-β-L-цитидина;

фиг. 2 - неограничивающий иллюстративный пример по настоящему изобретению синтеза N^4 -ацетил-2'-дезоксид-β-L-цитидина из 2'-дезоксид-β-L-цитидина;

фиг. 3 - неограничивающий иллюстративный пример по настоящему изобретению синтеза N^4 -(диметиламино)метил-2'-дезоксид-β-L-цитидина из 2'-дезоксид-β-L-цитидина;

фиг. 4 - неограничивающий иллюстративный пример по настоящему изобретению синтеза 3',5'-ди-O-ацетил-2'-дезоксид-β-L-цитидина из 2'-дезоксид-β-L-цитидина;

фиг. 5 - неограничивающий иллюстративный пример по настоящему изобретению синтеза 3',5'-ди-O-валинилового эфира 2'-дезоксид-β-L-цитидина из 2'-дезоксид-β-L-цитидина;

фиг. 6 - неограничивающий иллюстративный пример по настоящему изобретению синтеза N^4 -(Вос-валинилового) эфира 2'-дезоксид-β-L-цитидина из 2'-дезоксид-β-L-цитидина;

фиг. 7 - неограничивающий иллюстративный пример по настоящему изобретению синтеза 3',5', N^4 -три-(L-валинил)-2'-дезоксид-β-L-цитидина из 3',5', N^4 -три-(Вос-N-валинил)-2'-дезоксид-β-L-цитидина;

фиг. 8 - линейный график, отражающий стандартную калибровочную кривую, пригодную для определения растворимости различных нуклеозидов;

фиг. 8a - калибровочную кривую, полученную для природного β-D-дезоксидрибоцитозина;

фиг. 8b - калибровочную кривую, полученную для 3',5'-дивалинилового эфира β-L-дезоксидрибоцитозина;

фиг. 9a - неограничивающий пример хроматограммы, полученной при проведении ВЭЖХ, используемой для оценки стабильности 3',5'-дивалинилового эфира β-L-дезоксидрибоцитозина при pH 7,42. ВЭЖХ-хроматограмма указывает на присутствие 3',5'-дивалинилового эфира β-L-дезоксидрибоцитозина наряду с 3 активными метаболитами, 3'-валиниловым эфиром β-L-дезоксидрибоцитозина, 5'-валиниловым эфиром β-L-дезоксидрибоцитозина и L-dC;

фиг. 9b - линейный график, отражающий относительные концентрации 3',5'-дивалинилового эфира β-L-дезоксидрибоцитозина и его метаболитов по отношению ко времени;

аналогично, фиг. 10a и 11a представляют неограничивающие примеры хроматограмм, полученных при проведении ВЭЖХ, используемой для оценки стабильности 3',5'-дивалинилового эфира β-L-

дезоксирибоцитозина, соответственно, при pH 7,20 и 4,51. При данных значениях pH ВЭЖХ-хроматограммы указывают на присутствие 3',5'-дивалинилового эфира β -L-дезоксирибоцитозина наряду с 3 активными метаболитами, 3'-валиниловым эфиром β -L-дезоксирибоцитозина, 5'-валиниловым эфиром β -L-дезоксирибоцитозина и L-dC;

фиг. 10b и 11b - линейные графики, отражающие относительные концентрации 3',5'-дивалинилового эфира β -L-дезоксирибоцитозина и его метаболитов по отношению ко времени;

фиг. 12 - неограничивающий пример хроматограммы, полученной при проведении ВЭЖХ, используемой для оценки стабильности 3',5'-дивалинилового эфира β -L-дезоксирибоцитозина при pH 1,23. При данном значении pH ВЭЖХ-хроматограмма указывает только на присутствие 3',5'-дивалинилового эфира β -L-дезоксирибоцитозина без какого-либо превращения в любой из его 3 активных метаболитов;

фиг. 13 - линейный график, отражающий метаболизм 3',5'-дивалинилового эфира β -L-дезоксирибоцитозина в условиях *in vitro* в плазме человека;

фиг. 14 - линейный график, отражающий внутриклеточный метаболизм β -L-дезоксирибоцитозина (L-dC) в клетках HepG2;

фиг. 15 - линейный график, отражающий внутриклеточное накопление L-dC в первичных гепатоцитах человека;

фиг. 16 - столбчатый график, отражающий ответную противовирусную реакцию в зависимости от дозы L-dC при лечении хронического вирусного гепатита В в течение 28 суток на модели хронического вирусного гепатита В на лесных сурках;

фиг. 17 - линейный график, отражающий противовирусную активность L-dC на модели хронического вирусного гепатита В на лесных сурках;

фиг. 18 линейные графики, показывающие массу тела отдельных лесных сурков, обработанных в течение 28 суток L-dC (0,01-10 мг/кг/день) перорально;

фиг. 19 - линейные графики, показывающие массу тела отдельных лесных сурков, обработанных в течение 12 недель L-dC (1 мг/кг/день) перорально.

Подробное описание изобретения

Раскрываемое изобретение представляет соединение, способ и композицию для лечения вирусного гепатита В у людей и других хозяев-животных. Способ включает введение эффективного для лечения HBV количества описываемого в данном описании 3'-пролекарства β -L-нуклеозида или его фармацевтически приемлемой соли, необязательно в фармацевтически приемлемом носителе. Соединение по данному изобретению обладает либо противовирусной (т.е. анти-HBV) активностью, либо метаболизируется в соединение, которое проявляет данную активность.

Суммируя кратко, настоящее изобретение включает следующие признаки:

(a) 3'-пролекарства β -L-2'-дезоксинуклеозида, как описано, и их фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры и композиции;

(b) 3'-пролекарства β -L-2'-дезоксинуклеозида, как описано, и их фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры и композиции для применения при лечении или профилактике гепатита В, особенно у индивидуумов с установленным диагнозом гепатита В или при риске заражения вирусом гепатита В;

(c) применение данных 3'-пролекарств β -L-2'-дезоксинуклеозида, как описано, и их фармацевтически приемлемых солей, сложных эфиров и композиций при производстве лекарственного средства для лечения гепатита В;

(d) фармацевтические композиции, содержащие 3'-пролекарства β -L-2'-дезоксинуклеозида или их фармацевтически приемлемые соли, вместе с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем;

(e) 3'-пролекарства β -L-2'-дезоксинуклеозида или их фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры и композиции, как описано, по существу, в отсутствие противоположных энантиомеров описанного нуклеозида или, по существу, отделенные от других химических соединений;

(f) способы получения 3'-пролекарств β -L-2'-дезоксинуклеозида, как описано подробнее ниже;

(g) способы получения 3'-пролекарств β -L-2'-дезоксинуклеозида, по существу, в отсутствие энантиомеров описанного нуклеозида или, по существу, отделенного от других химических соединений;

(h) лечение хозяина, зараженного гепатитом В, которое включает введение эффективного количества 3'-пролекарства β -L-2'-дезоксинуклеозида, его фармацевтически приемлемой соли, сложного эфира или композиции со вторым агентом против гепатита В;

(i) лечение хозяина, зараженного гепатитом В, которое включает введение эффективного количества 3'-пролекарства β -L-2'-дезоксинуклеозида, его фармацевтически приемлемой соли, сложного эфира или композиции с исходным соединением другого β -L-2'-дезоксинуклеозида;

(j) лечение хозяина, зараженного гепатитом В, которое включает введение эффективного количества 3'-пролекарства β -L-2'-дезоксидитидина, его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира с исходным соединением второго агента против гепатита В;

(к) лечение хозяина, зараженного гепатитом В, которое включает введение эффективного количества 3',5'-дивалилового или диацетилового эфира β -L-2'-дезокситидина или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира со вторым агентом против гепатита В; и

(л) лечение хозяина, зараженного гепатитом В, которое включает введение эффективного количества 3',5'-дивалилового или диацетилового эфира β -L-2'-дезокситидина или его фармацевтически приемлемой соли или сложного эфира с β -L-2'-дезокситимидином или его фармацевтически приемлемой солью.

Особенно предпочтительной комбинацией является 3',5'-пролекарство β -L-dC (также называется как L-dC) с исходным β -L-dT (также называется как L-dT) и, в частности, 3',5'-дивалиловый или 3',5'-диацетиловый эфир β -L-dC в комбинации с β -L-dT. Биодоступность L-dC при пероральном введении в виде нейтрального основания и гидрохлорида является низкой у грызунов и приматов, не относящихся к человеку. Было установлено, что имеется существенная конкуренция L-dC с другими нуклеозидами или аналогами нуклеозидов по всасыванию или транспорту из желудочно-кишечного тракта и конкуренция других нуклеозидов или аналогов нуклеозидов с L-dC по всасыванию. Для того чтобы повысить биодоступность при пероральном введении и снизить возможность взаимодействия лекарство-лекарство, был проведен фармакокинетический скрининг на обезьянах. В результате этого скрининга было обнаружено, что 3'-пролекарства L-dC обладают более высокой биодоступностью по сравнению с исходной молекулой и уменьшенным воздействием на биодоступность других нуклеозидов и аналогов нуклеозидов, используемых в комбинации. Примерами таких нуклеозидов или аналогов нуклеозидов, используемых в комбинации с пролекарствами L-dC, являются L-dT, L-dA, ламивудин или FTC.

С использованием данного подхода было установлено, что 3',5'-дивалиновый эфир L-dC обладает более высокой биодоступностью при пероральном введении, чем исходный L-dC, и уменьшенным взаимодействием с другими нуклеозидами и аналогами нуклеозидов, когда применяются в комбинации, по сравнению с L-dC. Фармакокинетические исследования также показали, что 3',5'-дивалиновый эфир L-dC превращается в исходный L-dC путем деэтерификации в слизистой желудочно-кишечного тракта, крови или печени.

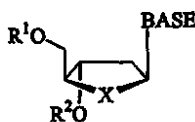
Вероятно, 3',5'-дивалиновый эфир L-dC активно переносится из желудочно-кишечного тракта после перорального введения в кровяное русло транспортером аминокислот, находящимся в слизистой желудочно-кишечного тракта. Это является причиной повышения биодоступности при пероральном введении по сравнению с исходным L-dC, который переносится в основном транспортером нуклеозидов. Это также объясняет уменьшенную конкуренцию 3',5'-дивалилового эфира L-dC в отношении поглощения с другими нуклеозидами или аналогами нуклеозидов, которые переносятся транспортером нуклеозидов, а не транспортером аминокислот. Поскольку частичная деэтерификация дивалилового эфира L-dC происходит раньше полного всасывания, моновалиновый эфир продолжает всасываться с использованием транспортера аминокислот. Следовательно, сохраняется желаемый выход лучшего всасывания или биодоступности и уменьшенная конкуренция с другими нуклеозидами или аналогами нуклеозидов по проникновению в кровяное русло.

I. Соединения, определенные данными изобретениями

В первом воплощении 3'-пролекарство 2'-дезоксид- β -L-нуклеозида включает биологически отщепляемые группы в 3'- и 5'-положениях. Предпочтительными группами являются эфиры L-аминокислот, такие как L-валил, и алкиловые эфиры, такие как ацетил. Данное изобретение, в частности, включает 3',5'-L-аминокислота- β -L-2'-дезоксинуклеозиды с любым желаемым пуриновым или пиримидиновым основанием, где исходное лекарство имеет EC₅₀ ниже 15 мкмоль и предпочтительно ниже 10 мкмоль в клетках 2.2.15; 3',5'-(алкил или арил)- β -L-2'-дезоксинуклеозиды с любым желаемым пуриновым или пиримидиновым основанием, где исходное лекарство имеет EC₅₀ ниже 15 и предпочтительно ниже 10 мкмоль в клетках 2.2.15; и пролекарства 3',5'-диэфиров 2'-дезоксид- β -L-нуклеозидов, в которых (i) 3'-эфир представляет эфир аминокислоты и 5'-эфир представляет алкиловый или ариловый эфир; (ii) оба эфира представляют эфиры аминокислоты; (iii) оба эфира независимо представляют алкиловые или ариловые эфиры; и (iv) 3'-эфир независимо представляет алкиловый или ариловый эфир, и 5'-эфир представляет эфир аминокислоты, где исходное лекарство имеет EC₅₀ ниже 15 мкмоль в клетках 2.2.15.

Примерами 3'-пролекарств, попадающих в объем изобретения, являются 3',5'-L-валиновый эфир 2'-дезоксид- β -L-цитидина; 3',5'-L-валиновый эфир 2'-дезоксид- β -L-тимина; 3',5'-L-валиновый эфир 2'-дезоксид- β -L-аденозина; 3',5'-L-валиновый эфир 2'-дезоксид- β -L-гуанозина; 3',5'-L-валиновый эфир 2'-дезоксид- β -L-5-фторцитидина; 3',5'-L-валиновый эфир 2'-дезоксид- β -L-уридина; 3',5'-ацетиловый эфир 2'-дезоксид- β -L-цитидина; 3',5'-ацетиловый эфир 2'-дезоксид- β -L-тимина; 3',5'-ацетиловый эфир 2'-дезоксид- β -L-аденозина; 3',5'-ацетиловый эфир 2'-дезоксид- β -L-гуанозина; 3',5'-ацетиловый эфир 2'-дезоксид- β -L-5-фторцитидина и 3',5'-диэфиры 2'-дезоксид- β -L-(цитидина, 5-фторцитидина, гуанозина, уридина, аденозина или тимина), в которых (i) 3'-эфир представляет эфир аминокислоты и 5'-эфир представляет алкиловый или ариловый эфир; (ii) оба эфира представляют эфиры аминокислоты; (iii) оба эфира независимо представляют алкиловые или ариловые эфиры; или (iv) 3'-эфир представляет алкиловый или ариловый эфир и 5'-эфир представляет эфир аминокислоты.

В одном воплощении изобретение обеспечивает 3'-пролекарство β -L-нуклеозида, определенное формулой (I)



(I)

или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонила, арилсульфонила, аралкилсульфонила, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата;

X представляет O, S, SO_2 или CH_2 ; и

BASE представляет пуриновое или пиримидиновое основание, которое необязательно может быть замещенным.

В предпочтительном воплощении X представляет O.

В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

В первом варианте воплощения R^2 представляет С(О)-алкил (включая низший алкил) или арил и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

Во втором варианте воплощения R^2 представляет С(О)-низший алкил и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

В третьем варианте воплощения R^2 представляет С(О)-метил и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

В четвертом варианте воплощения R^2 представляет $C(O)C(R^8)(H)(NR^{10}R^{11})$ и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

В пятом варианте воплощения R^2 представляет $C(O)C(R^8)(H)(NR^{10}R^{11})$, R^8 является изопропилом, по меньшей мере один из R^{10} и R^{11} представляет водород и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

В шестом варианте воплощения R^2 представляет $C(O)C(R^8)(H)(NR^{10}R^{11})$, R^8 является боковой аминокислотной цепью и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

В седьмом варианте воплощения R^2 представляет $C(O)C(R^8)(H)(NR^{10}R^{11})$, R^8 является неполярной аминокислотной боковой цепью и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

Неограничивающие примеры вариантов воплощений можно определить формулой (I), в которой

(1) R^2 представляет С(О)-метил и BASE представляет аденин.

(2) R^2 представляет С(О)-метил и BASE представляет защищенный аденин.

(3) R^2 представляет С(О)-метил и BASE представляет цитозин.

(4) R^2 представляет С(О)-метил и BASE представляет защищенный цитозин.

(5) R^2 представляет С(О)-метил и BASE представляет тимин.

(6) R^2 представляет $C(O)C(R^8)(H)(NH_2)$; R^8 представляет изопропил и BASE представляет аденин.

(7) R^2 представляет $C(O)C(R^8)(H)(NH_2)$; R^8 представляет изопропил и BASE представляет защищенный аденин.

(8) R^2 представляет $C(O)C(R^8)(H)(NH_2)$; R^8 представляет изопропил и BASE представляет цитозин.

(9) R^2 представляет $C(O)C(R^8)(H)(NH_2)$; R^8 представляет изопропил и BASE представляет защищенный цитозин.

(10) R^2 представляет $C(O)C(R^8)(H)(NH_2)$; R^8 представляет изопропил и BASE представляет тимин.

В восьмом варианте воплощения X представляет O, R^2 представляет С(О)-алкил (включая низший алкил) или арил и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

В девятом варианте воплощения X представляет O, R^2 представляет С(О)-низший алкил и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

(6) X представляет O, R¹ представляет водород, R² представляет C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ представляет изопропил и BASE представляет аденин.

(7) X представляет O, R¹ представляет водород, R² представляет C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ представляет изопропил и BASE представляет защищенный аденин.

(8) X представляет O, R¹ представляет водород, R² представляет C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ представляет изопропил и BASE представляет цитозин.

(9) X представляет O, R¹ представляет водород, R² представляет C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ представляет изопропил и BASE представляет защищенный цитозин.

(10) X представляет O, R¹ представляет водород, R² представляет C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ представляет изопропил и BASE представляет тимин.

В двадцать втором варианте воплощения X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)-алкил (включая низший алкил) или арил и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

В двадцать третьем варианте воплощения X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)-низший алкил и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

В двадцать четвертом варианте воплощения X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)-метил и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

В двадцать пятом варианте воплощения X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹) и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

В двадцать шестом варианте воплощения X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ представляет изопропил, по меньшей мере один из R¹⁰ и R¹¹ представляет водород и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

В двадцать седьмом варианте воплощения X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ представляет аминокислотную боковую цепь и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

В двадцать восьмом варианте воплощения X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)C(R⁸)(H)(NR¹⁰R¹¹), R⁸ представляет неполярную аминокислотную боковую цепь, по меньшей мере один из R⁵ и R⁶ представляет водород и BASE представляет аденин, защищенный аденин, цитозин, защищенный цитозин или тимин.

Неограничивающие примеры вариантов воплощений можно определить формулой (I), в которой

(1) X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)-метил и BASE представляет аденин.

(2) X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)-метил и BASE представляет защищенный аденин.

(3) X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)-метил и BASE представляет цитозин.

(4) X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)-метил и BASE представляет защищенный цитозин.

(5) X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)-метил и BASE представляет тимин.

(6) X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ представляет изопропил и BASE представляет аденин.

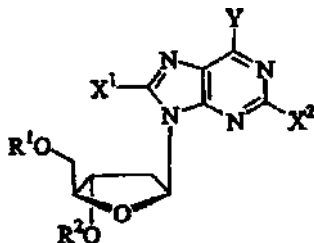
(7) X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ представляет изопропил и BASE представляет защищенный аденин.

(8) X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ представляет изопропил и BASE представляет цитозин.

(9) X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ представляют изопропил и BASE представляет защищенный цитозин.

(10) X представляет O, R¹ и R² независимо представляют C(O)C(R⁸)(H)(NH₂); R⁸ представляет изопропил и BASE представляет тимин.

В другом воплощении настоящего изобретения 3'-пролекарство β-L-нуклеозида представляет β-L-2'-дезоксипурин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонила, арилсульфонила, аралкилсульфонила, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата;

Y представляет OR^3 , NR^3R^4 или SR^3 ; и

X^1 и X^2 независимо выбраны из группы, состоящей из H, нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, галогена, OR^5 , NR^5R^6 или SR^5 ; и

R^3 , R^4 , R^5 и R^6 независимо представляют H, нормальный, разветвленный или циклический алкил (особенно циклопропил), диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинометил), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

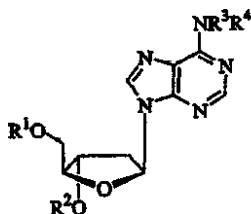
В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

В конкретном воплощении 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-2'-дезоксаденозин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонила, арилсульфонила, аралкилсульфонила, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата; и

R^3 и R^4 независимо представляют H, нормальный, разветвленный или циклический алкил (особенно циклопропил), диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинометил), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

В предпочтительном воплощении R^1 представляет H.

В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

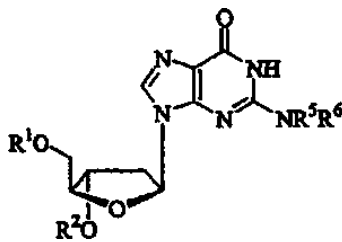
В другом предпочтительном воплощении R^2 представляет остаток аминокислоты, и в частности, L-валинил.

В одном воплощении R^3 представляет водород и R^4 представляет диметиламинометил.

В другом воплощении R^3 представляет водород и R^4 представляет ацетил.

В другом воплощении R^3 представляет водород и R^4 представляет L-валинил.

В другом конкретном воплощении 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-2'-дезоксигуанозин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата; и

R^5 и R^6 независимо представляют Н, нормальный, разветвленный или циклический алкил (особенно циклопропил), диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинометил), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

В предпочтительном воплощении R^1 представляет Н.

В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет, водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

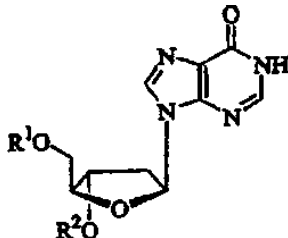
В другом предпочтительном воплощении R^2 представляет остаток аминокислоты, и в частности, L-валинил.

В одном воплощении R^5 представляет водород и R^6 представляет диметиламинометил.

В другом воплощении R^5 представляет водород и R^6 представляет ацетил.

В другом воплощении R^5 представляет водород и R^6 представляет L-валинил.

В другом конкретном воплощении 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-2'-дезоксинозин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата; и

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата.

В предпочтительном воплощении R^1 представляет Н.

В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

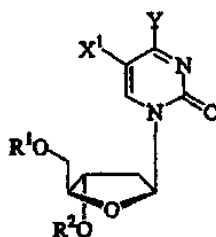
R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

В другом предпочтительном воплощении R^2 представляет остаток аминокислоты, и в частности, L-валинил.

В другом воплощении настоящего изобретения 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-2'-дезоксипримидин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонила, арилсульфонила, аралкилсульфонила, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата;

Y представляет OR^3 , NR^3R^4 или SR^3 ;

X^1 выбран из группы, состоящей из H, нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, галогена, OR^5 , NR^5R^6 или SR^5 ; и

R^3 , R^4 , R^5 и R^6 независимо представляют H, нормальный, разветвленный или циклический алкил (особенно циклопропил), диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинометил), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

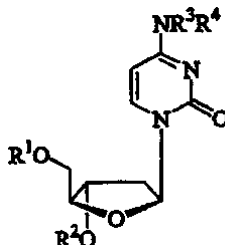
В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

В одном конкретном воплощении 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-2'-дезоксцитидин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонила, арилсульфонила, аралкилсульфонила, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата; и

R^3 и R^4 независимо представляют H, нормальный, разветвленный или циклический алкил (особенно циклопропил), диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинометил), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

В предпочтительном воплощении R^1 представляет H.

В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

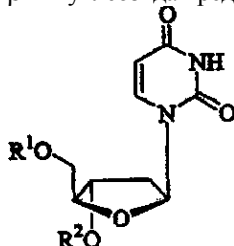
В другом предпочтительном воплощении R^2 представляет остаток аминокислоты, и в частности, L-валинил.

В одном воплощении R^3 представляет водород и R^4 представляет диметиламинометил.

В другом воплощении R^3 представляет водород и R^4 представляет ацетил.

В другом воплощении R^3 представляет водород и R^4 представляет L-валинил.

В другом воплощении 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-2'-дезоксуридин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата; и

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонила, арилсульфонила, аралкилсульфонила, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата.

В предпочтительном воплощении R^1 представляет H.

В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

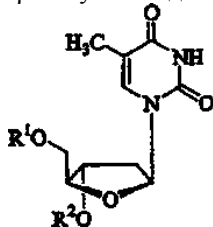
R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

В другом предпочтительном воплощении R^2 представляет остаток аминокислоты, и в частности, L-валинил.

В другом воплощении 3'-пролекарство β -L-нуклеозида представляет β -L-тимидин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль, в которой

R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата; и

R^2 выбран из группы, состоящей из нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонила, арилсульфонила, аралкилсульфонила, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата.

В предпочтительном воплощении R^1 представляет H.

В одном воплощении остаток аминокислоты имеет формулу $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры; или альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая низший алкил) или арил; и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

В другом предпочтительном воплощении R^2 представляет остаток аминокислоты, и в частности, L-валинил.

II. Определения и использование терминов

Термин «алкил», в том смысле, в котором он используется в данном описании, если не указано иначе, относится к насыщенному, нормальному, разветвленному или циклическому, первичному, вторично-

му или третичному углеводороду C_1-C_{10} и, в частности, включает метил, трифторметил, этил, пропил, изопропил, циклопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, пентил, циклопентил, изопентил, неопентил, гексил, изогексил, циклогексил, циклогексилметил, 3-метилпентил, 2,2-диметилбутил и 2,3-диметилбутил. Термин включает как замещенные, так и незамещенные алкильные группы. Группы, которыми алкил может быть замещен, выбраны из группы, состоящей из гидроксила, амина, алкиламина, ариламина, алкокси, арилокси, нитро, циано, сульфоновой кислоты, сульфата, фосфорной кислоты, фосфата или фосфоната, либо незащищенных, либо защищенных при необходимости, что, очевидно, понятно специалистам в данной области как, например, представлено у Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991, включенного в данное описание посредством ссылки.

Термин «низший алкил», в том смысле, в котором он используется, и если не указано иначе, относится к C_1-C_4 насыщенной нормальной, разветвленной или, если подходит, циклической (например, циклопропил) алкильной группе, включая как замещенные, так и незамещенные формы. Если не указано иначе в данной заявке, когда алкил представляет подходящую группу, низший алкил является предпочтительным. Аналогично, когда алкил или низший алкил представляет подходящую группу, незамещенный алкил или низший алкил является предпочтительным.

Термин «защитная», в том смысле, в котором он используется, и если не указано иначе, относится к группе, которая добавляется к атому кислорода, азота или фосфора для предупреждения его дальнейшего взаимодействия или для других целей. Специалистам в области органического синтеза известен широкий ряд защитных групп для кислорода и азота. Неограничивающие примеры защитных групп приведены у Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991.

Термин «арил», в том смысле, в котором он используется, и если не указано иначе, относится к фенилу, бифенилу или нафтилу и предпочтительно к фенилу. Термин включает как замещенные, так и незамещенные группы. Арильная группа может быть замещена одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из гидроксила, амина, алкиламина, ариламина, алкокси, арилокси, нитро, циано, сульфоновой кислоты, сульфата, фосфорной кислоты, фосфата или фосфоната, либо незащищенных, либо защищенных при необходимости, что, очевидно, понятно специалистам в данной области как, например, представлено у Greene, et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991.

Термин пуриновое или пиримидиновое основание включает, но не ограничивается ими, аденин, N^6 -алкилпурины, N^6 -ацилпурины (где ацил представляет $C(O)$ (алкил, арил, алкиларил или ариларил), N^6 -бензилпурин, N^6 -галогенпурин, N^6 -винилпурин, N^6 -ацетиленпурин, N^6 -ацилпурины, N^6 -гидроксиалкилпурины, N^6 -тиоалкилпурин, N^2 -алкилпурин, N^2 -алкил-6-тиопурин, тимин, цитозин, 5-фторцитозин, 5-метилцитозин, 6-азапиримидин, включая 6-азацитозин, 2- и/или 4-меркаптопиримидин, урацил, 5-галогенурацил, включая 5-фторурацил, C^5 -алкилпиримидины, C^5 -бензилпиримидины, C^5 -галогенпиримидины, C^5 -винилпиримидин, C^5 -ацетиленпиримидин, C^5 -ацилпиримидин, C^5 -гидроксиалкилпурин, C^5 -амидопиримидин, C^5 -цианопиримидин, C^5 -нитропиримидин, C^5 -аминопиримидин, N^2 -алкилпурины, N^2 -алкил-6-тиопурины, 5-азацитидинил, 5-азаурацилил, триазолопиримидинил, имидазолопиримидинил, пиролопиримидинил и пиразолопиримидинил. Пуриновые основания включают, но не ограничиваются ими, гуанин, аденин, гипоксантин, 2,6-диаминопурин и 6-хлорпурин.

Функциональные кислородные и азотные группы в основании могут быть защищены при необходимости или желании. Подходящие защитные группы хорошо известны специалистам в данной области, и они включают триметилсилил, диметилгексилсилил, трет-бутилдиметилсилил и трет-бутилдифенилсилил, тритил, алкильные группы и ацильные группы, такие как ацетил и пропионил, метансульфонил и *p*-толуолсульфонил.

Термин ацил относится к эфиру карбоновой кислоты, в котором некарбонильная группа эфира выбрана из нормального, разветвленного или циклического алкила, или низшего алкила, алкоксиалкила, включая метоксиметил, аралкила, включая бензил, арилоксиалкила, такого как феноксиметил, арила, включая фенил, необязательно замещенный галогеном, C_1-C_4 алкила или C_1-C_4 алкокси, сульфонатных эфиров, таких как алкил- или аралкилсульфонил, включая метансульфонил, моно-, ди- или трифосфатного эфира, тритила или монометокситритила, замещенного бензила, триалкилсилила (например, диметил-трет-бутилсилила) или дифенилметилсилила. Арильные группы в эфирах оптимально включают фенильную группу. Термин «низший ацил» относится к ацильной группе, в которой некарбонильная группа представляет низший алкил.

Термин аминокислота включает природные и синтетические α , β , γ или δ аминокислоты и включает, но не ограничивается ими, аминокислоты, имеющиеся в белках, например глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспарат, глутамат, лизин, аргинин и гистидин. В предпочтительном воплощении аминокислота находится в L-конфигурации. Альтернативно, аминокислота может быть производным аланила, валинила, лейцинила, изолейцинила, пролинила, фенилаланинила, триптофанила, метионила, глицинила, серинила, треонинила, цистеинила, тирозинила, аспарагинила, глутаминила, аспартоила, глутароила, лизинила, аргининила, гистидинила, β -аланина, β -валинила, β -лейцинила, β -изолейцинила, β -

пролинала, β -фенилаланинила, β -триптофанила, β -метионинила, β -глицинила, β -серинила, β -треонинила, β -цистеинила, β -тирозинила, β -аспарагинила, β -глутаминила, β -аспартоила, β -глутароила, β -лизинила, β -аргининила или β -гистидинила.

Термин гетероарил или гетероароматический, в том смысле, в котором он используется, относится к ароматической группе, которая включает по меньшей мере один атом серы, азота или фосфора в ароматическом кольце. Термин гетероциклический относится к неароматической циклической группе, в которой имеется по меньшей мере один гетероатом, такой как кислород, сера, азот или фосфор, в кольце. Неограничивающие примеры гетероарильных и гетероциклических групп включают фурил, фуранил, пиридил, пиримидил, тиенил, изотиазолил, имидазолил, тетразолил, пиразинил, бензофуранил, бензотиофенил, хинолил, изохинолил, бензотиенил, изобензофурил, пиразолил, индолил, изоиндолил, бензимидазолил, пуринил, карбазолил, оксазолил, тиазолил, изотиазолил, 1,2,4-тиадиазолил, изоксазолил, пирролил, хиназолинил, циннолинил, фталазинил, ксантинил, гипоксантинил, тиофен, фуран, пиррол, изопиррол, пиразол, имидазол, 1,2,3-триазол, 1,2,4-триазол, оксазол, изоксазол, тиазол, изотиазол, пиримидин или пиридазин и птеридинил, азиридины, тиазол, изотиазол, 1,2,3-оксадиазол, тиазин, пиридин, пиразин, пиперизин, пирролидин, оксазираны, феназин, фенотиазин, морфолинил, пиразолил, пиридазинил, пиразинил, хиноксалинил, ксантинил, гипоксантинил, птеридинил, 5-азацитидинил, 5-азаурацилил, триазолопиримидинил, имидазолопиримидинил, пирролопиримидинил, пиразолопиримидинил, аденин, N⁶-алкилпурины, N⁶-бензилпурин, N⁶-галогенпурин, N⁶-винипурин, N⁶-ацетиленпурин, N⁶-ацилпурин, N⁶-гидроксикалпурин, N⁶-тиоалкилпурин, тимин, цитозин, 6-азапиримидин, 2-меркаптопиримидин, урацил, N⁵-алкилпиримидины, N⁵-бензилпиримидины, N⁵-галогенпиримидины, N⁵-винилпиримидин, N⁵-ацетиленпиримидин, N⁵-ацилпиримидин, N⁵-гидроксикалпурин и N⁶-тиоалкилпурин и изоксазолил. Гетероароматические и гетероциклические группы могут быть необязательно замещены, как описано выше для арила, включая замещенные одним или более заместителями, выбранными из галогена, галогеналкила, алкила, алкокси, гидрокси, карбоксильных производных, амидо, amino, алкиламино, диалкиламино. Гетероароматическая группа по желанию может быть частично или полностью гидрирована. В качестве неограничивающего примера можно использовать дигидропиримидин вместо пиридина. Функциональные кислородные и азотные группы в гетероарильной группе могут быть защищены при необходимости и желании. Подходящие защитные группы хорошо известны специалистам в данной области и включают триметилсилил, диметилгексилсилил, трет-бутилдиметилсилил и трет-бутилдифенилсилил, тритил или замещенный тритил, алкильные группы, ацильные группы, такие как ацетил и пропионил, метансульфонил и п-толуолсульфонил.

В том смысле, в котором он используется, термин «по существу свободный от энантиомера» или «по существу в отсутствие энантиомера» относится к нуклеозиду, который включает по меньшей мере от 95 до 98 мас.% и еще более предпочтительно от 99 до 100 мас.% определенного энантиомера такого нуклеозида. В предпочтительном воплощении в способах и соединениях по данному изобретению соединения, по существу, свободны от энантиомеров.

Аналогично термин «отделенный» относится к нуклеозиду, который включает по меньшей мере 85 или 90 мас.%, предпочтительно от 95 до 98 мас.% и еще более предпочтительно от 99 до 100 мас.% нуклеозида, причем остаток выключает другие химические соединения или энантиомеры.

Термин «независимо» используется в данном описании для обозначения того, что переменная, которая независимо используется, варьирует независимо от применения к применению. Так, в соединении, таком как R"XYR", в котором R" представляет «независимо углерод или азот», оба R" могут быть углеродом, оба R" могут быть азотом, или один R" может быть углеродом, а другой R" азотом.

Термин хозяин в том смысле, в котором он здесь используется, относится к одноклеточному или многоклеточному организму, в котором вирус может реплицироваться, включая клеточные линии и животных, и предпочтительно человека. Альтернативно, хозяин может включать часть генома вируса гепатита В, чья репликация или функция может изменяться под воздействием соединений по настоящему изобретению. Термин хозяин, в частности, относится к зараженным клеткам, клеткам, трансфектированным всем или частью генома HBV, и животным, в частности, приматам (включая шимпанзе) и человеку. В большинстве применений на животных по настоящему изобретению хозяином является человек. Однако по некоторым показаниям четко предвидятся применения в ветеринарии по настоящему изобретению.

Термины «фармацевтически приемлемые соли» и «фармацевтически приемлемые комплексы» используются в описании для обозначения любой фармацевтически приемлемой формы нуклеозида, которая при введении пациенту обеспечивает нуклеозид и проявляет минимальное, если проявляет какое-либо, нежелательное токсикологическое действие. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, полученные из фармацевтически приемлемых неорганических или органических оснований и кислот. Неограничивающими примерами таких солей являются (а) аддитивные соли кислоты, образованные неорганическими кислотами (например, хлористо-водородной кислотой, бромисто-водородной кислотой, серной кислотой, фосфорной кислотой, азотной кислотой и тому подобное) и соли, образованные органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, винная кислота, янтарная ки-

слота, яблочная кислота, аскорбиновая кислота, бензойная кислота, дубильная кислота, памовая кислота, альгиновая кислота, полиглутаминовая кислота, нафталинсульфоновые кислоты, нафталиндисульфоно-вые кислоты и полигалактурононовая кислота; (b) аддитивные соли основания, образованные катионами, такие как полученные из щелочных металлов, такие как полученные из щелочно-земельных металлов, натрия, калия, цинка, кальция, висмута, бария, магния, алюминия, меди, кобальта, никеля, кадмия и тому подобное, или с органическим катионом, полученные из N,N-дибензилэтилендиамин, аммония или этилендиамин; или (c) комбинации (a) и (b); например, таннат цинка или тому подобное.

Фармацевтически приемлемые пролекарства относятся к соединению, которое метаболизирует, например, гидролизует или окисляется, у хозяина с образованием соединения по настоящему изобретению. Типичные примеры пролекарств включают соединения, которые обладают биологически лабильными защитными группами в функциональной группе активного соединения. Пролекарства включают соединения, которые могут быть окислены, восстановлены, аминированы, деаминированы, гидроксильированы, дегидроксильированы, гидролизованы, дегидролизированы, алкилированы, деалкилированы, ацилированы, деацилированы, фосфорилированы, дефосфорилированы с образованием активного соединения. Соединения по данному изобретению обладают противовирусной активностью в отношении HBV или метаболизируются в соединении, которое проявляет такую активность.

III. Соль нуклеотидов или композиции с пролекарствами

В случаях, когда соединения являются достаточно основными или кислыми для получения стабильных нетоксичных кислых или основных солей, может быть подходящим введение соединения в виде фармацевтически приемлемой соли. Примерами фармацевтически приемлемых солей являются аддитивные соли органической кислоты, полученные с кислотами, которые образуют физиологически приемлемый анион, например тозилат, метансульфонат, ацетат, цитрат, малонат, тартрат, сукцинат, бензоат, аскорбат, α -кетоглутарат и α -глицерофосфат. Могут также быть получены подходящие неорганические соли, включая сульфат, нитрат, бикарбонат и карбонат.

Фармацевтически приемлемые соли можно получить с использованием обычных способов, хорошо известных в данной области, например, взаимодействием достаточно основного соединения, такого как амин, с подходящей кислотой с получением физиологически приемлемого аниона. Также можно получить соли щелочного металла (например, натрия, калия или лития) или щелочно-земельного металла (например, кальция) карбоновых кислот.

Любой из описываемых нуклеозидов можно вводить в виде пролекарства нуклеотида для повышения активности, биодоступности, стабильности или прочего, что изменяет свойства нуклеозида. Известен ряд лигандов пролекарств нуклеотидов. Как правило, алкилирование, ацилирование или другая липофильная модификация моно-, ди- или трифосфата нуклеозида будет повышать стабильность нуклеотида. Примерами заместителей, которые могут замещать один или более водородов в фосфатной группе, являются алкил, арил, стероиды, углеводы, включая сахара, 1,2-диацилглицерин и спирты. Многие описаны у R.Jones and N.Bischofberger, *Antiviral Research*, 27 (1995) 1-17. Любой из них можно использовать в сочетании с описанными нуклеозидами для достижения желаемого эффекта.

Активное 3'-пролекарство β -L-нуклеозида можно также обеспечить в виде простого 5'-фосфоэфирного липида или простого 5'-эфирного липида, как раскрыто в последующих источниках, которые включены в данное описание для сведения: Kucera, L.S., N. Iyer, E.Leake, A.Raben, Modest E.K., D.L.W., and C. Piantadosi. 1990. «Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectious HIV-1 production and induce defective virus formation». *AIDS Res. Hum. Retro Viruses*. 6:491-501; Piantadosi, C, J.Marasco C.J., S.L.Morris-Natschke, K.L. Meyer, F. Gumus, J.R. Surles, K.S. Ishaq, L.S. Kucera, N.Iyer, C.A. Wallen, S. Piantadosi, and E.J. Modest. 1991. «Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV activity». *J. Med. Chem.* 34:1408-1414; Hosteller K.Y., D.D. Richman, D.A. Carson, L.M. Stuhmiller, G.M.T. van Wijk, and H. van den Bosch. 1992. «Greatly enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in CEM and HT4-6C cells by 3'-deoxythymidine diphosphate dimyristoylglycerol, a lipid prodrug of 3'-deoxythymidine». *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2025-2029; Hosetler K.Y., L.M. Stuhmiller, H.B. Lenting, H. van den Bosch, and D.D. Richman, 1990. «Synthesis and antiretroviral activity of phospholipids analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides». *J. Biol. Chem.* 265:61127.

Неограничивающие примеры патентов США, в которых раскрываются подходящие липофильные заместители, которые могут быть ковалентно присоединены к нуклеозиду, предпочтительно в 5-положении нуклеозида, или липофильные препараты включают патенты США № 5149794 (22 сентября 1992 г., Yatvin et al.); 5194654 (16 марта 1993 г., Hostetler et al.); 5223263 (29 июня 1993 г., Hostetler et al.); 5256641 (26 октября 1993 г., Yatvin et al.); 5411947 (2 мая 1995 г., Hostetler et al.); 5463092 (31 октября 1995 г., Hostetler et al.); 5543389 (6 августа 1996 г., Yatvin et al.); 5543390 (6 августа 1996 г., Yatvin et al.), 5543391 (6 августа 1996 г., Yatvin et al.) и 5554728 (10 сентября 1996 г., Basava et al.), все они включены в данное описание посредством ссылки. Зарубежные заявки на выдачу патента, в которых раскрываются липофильные заместители, которые могут быть присоединены к нуклеозидам по настоящему изобретению, или липофильные препараты включают заявки WO 89/02733, WO 90/00555, WO 91/16920, WO

91/18914, WO 93/00910, WO 94/26273, WO 96/15132, европейский патент 0350287, европейский патент 93917054.4 и WO 91/19721.

3'-Пролекарство можно вводить как какое-либо производное, которое при введении реципиенту способно обеспечить прямо или опосредованно исходное соединение 3'-пролекарства, или которое проявляет активность само по себе. Неограничивающими примерами являются фармацевтически приемлемые соли (альтернативно называемые как «физиологически приемлемые соли») и N⁴-пиримидиновые или N²- и/или N⁶-пуриновые алкилированные (в частности, диметиламинометилом) или ацилированные (в частности, ацетилом или аминоацетилом) производные активного соединения. В одном неограничивающем воплощении ацильная группа представляет эфир карбоновой кислоты, в котором некарбонильная группа сложноэфирной группы выбрана из нормального, разветвленного или циклического алкила или низшего алкила, алкоксиалкила, включая метоксиметил, аралкила, включая бензил, арилоксиалкила, такого как феноксиметил, арила, включая фенил, необязательно замещенный галогеном, C₁-C₄алкилом или C₁-C₄алкокси, сульфонатных эфиров, таких как алкил- или аралкилсульфонил, включая метансульфонил, фосфата, включая, но не ограничиваясь ими, моно-, ди- или трифосфатный эфир, тритила или монометокситритила, замещенного бензила, триалкилсилила (например, диметил-5-бутилсилила) или дифенилметилсилила. Арильные группы в сложных эфирах необязательно включают фенильную группу.

Модификации 3'-пролекарства или исходного соединения и особенно по N⁴-положению пиримидинила или по N²- и/или N⁶-положению пурина могут оказывать влияние на биодоступность и скорость метаболизма активных соединений, обеспечивая, таким образом, регуляцию доставки активных соединений. Кроме того, модификации могут оказывать влияние на противовирусную активность соединения, в некоторых случаях повышая активность по сравнению с исходным соединением. Это можно легко оценить при получении производного и тестировании его противовирусной активности методами, описанными ниже, или другим методом, известным специалистам в данной области.

IV. Стереохимия

Поскольку 1' и 4' углероды сахара (называемые в общем как группа сахара) в нуклеозидах являются хиральными, их неводородные заместители (CH₂OR и соответственно пиримидиновое или пуриновое основание) могут находиться либо в цис- (с одной стороны) или транс- (с противоположных сторон) положениях по отношению к кольцевой системе сахара. Следовательно, четыре оптических изомера представлены следующими конфигурациями (при ориентации группы сахара в горизонтальной плоскости так, что «первичный» кислород, который между C1' и C4' атомами находится сзади): «β» или «цис» (с обеими группами «вверх», что соответствует конфигурации природных нуклеозидов, т.е. D-конфигурации), «β» или «цис» (с обеими группами «вниз», что является неприродной конфигурацией, т.е. L-конфигурацией), «α» или «транс» (с заместителем в C2 «вверх» и заместителем в C5 «вниз») и «α» или «транс» (с заместителем в C2 «вниз» и заместителем в C5 «вверх»).

Нуклеозиды по настоящему изобретению имеют β-L-конфигурацию. В предпочтительном воплощении 2'-дезоксид-β-L-нуклеозид вводят по существу в виде одного изомера, т.е. по меньшей мере примерно 95% его находится в определенной стереоконфигурации.

V. Комбинированная и чередующаяся терапия

При комбинированной терапии эффективные дозы двух или более агентов вводят вместе, в то время как при чередующейся терапии эффективную дозу каждого агента вводят периодически. Дозы будут зависеть от скорости всасывания, инактивации и выведения лекарственного препарата, а также других факторов, известных специалистам в данной области. Следует отметить, что дозы будут также варьировать в зависимости от тяжести состояния у пациента, который подвергается лечению. Кроме того, следует понимать, что для любого определенного субъекта, конкретные дозировки и схемы должны корректироваться в течение времени по необходимости для индивидуума и согласно мнению профессионала, назначающего или наблюдающего за введением композиций.

Например, в любом из воплощений, описанных в данном описании, если 3'-пролекарство β-L-2'-дезоксинуклеозида по настоящему изобретению вводят в комбинации или при чередовании со вторым нуклеозидным или нуклеозидным ингибитором обратной транскриптазы, который фосфорилируется в активную форму, то в одном воплощении, второе соединение представляет соединение, которое может быть фосфорилировано под действием фермента, который отличается от фермента, который фосфорилирует выбранный β-L-2'-нуклеозид по настоящему изобретению *in vivo*. Примерами киназ являются тимидинкиназа, цитозинкиназа, гуанозинкиназа, аденозинкиназа, дезоксицитидинкиназа, 5'-нуклеотидаза и дезоксигуанозинкиназа.

Таким образом, в одном воплощении изобретение обеспечивает комбинацию двух или более пролекарств нуклеозидов настоящего изобретения, предпочтительно нуклеозидов, которые фосфорилируются под воздействием различных ферментов, или действие которых опосредуется через различные биологические пути. В другом воплощении изобретение обеспечивает по меньшей мере одно пролекарство в комбинации или при чередовании с нуклеозидом, который проявляет активность против гепатита В, включая, но не ограничиваясь им, исходное лекарство любого из пролекарств, определенных в данном

описании, т.е. 2'-дезоксид-β-L-нуклеозидов, включая 2'-дезоксид-β-L-цитидин, 2'-дезоксид-β-L-тимин, 2'-дезоксид-β-L-аденозин, 2'-дезоксид-β-L-гуанин, 2'-дезоксид-β-L-5-фторцитидин, 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин, 2',3'-дидезокси-3'-тиа-5-фторцитидин. Альтернативно, соединения по настоящему изобретению также можно вводить в комбинации или при чередовании с любым другим известным агентом против вируса гепатита В, таким как энтецивир, цис-2-гидроксиметил-5-(5-фторцитозин-1-ил)-1,3-оксатиолан, предпочтительно, по существу, в виде (-)-оптического изомера («FTC» см. WO 92/14743); (-)-энантиомер цис-2-гидроксиметил-5-(цитозин-1-ил)-1,3-оксатиолана (ЗТС); β-D-1,3-диоксалановые пуриновые нуклеозиды, описанные в патентах США № 5444063 и 5684010; β-D-диоксалановые нуклеозиды, такие как β-D-диоксаланилгуанин (DXG), β-D-диоксаланил-2,6-диаминопурин (DAPD) и β-D-диоксаланил-6-хлорпурин (АССР), L-FDDC (5-фтор-3'-тиа-2',3'-дидезоксицитидин), L-энантиомеры 3'-фтормодифицированных β-2'-деоксирибонуклеотид-5'-трифосфатов, карбовир, интерферон, пенцикловир и фамцикловир, L-FMAU, фамцикловир, пенцикловир, BMS-200475, бис-пом-РМЕА (адефовир, дипивоксил); лобукавир, ганцикловир или рибаварин; или с любым другим соединением, которое показывает ЕС₅₀ ниже 15 мкмоль в клетках 2.2.15; или их пролекарствами или фармацевтически приемлемыми солями.

Комбинируемую или чередующуюся терапию можно также проводить для преодоления резистентности к лекарственным препаратам. Было установлено, что резистентные к лекарствам варианты вирусов могут появляться вновь после продолжительного лечения противовирусным агентом. Резистентность к лекарственным препаратам обычно появляется в результате мутации гена, который кодирует фермент, используемый при репликации вируса. Эффективность лекарства против гепатита В можно пролонгировать, усилить или восстановить назначением соединения в комбинации или при чередовании со вторым и, возможно, третьим противовирусным соединением, которое индуцирует другую мутацию, чем та, которая была вызвана основным лекарством. Альтернативно, подобной комбинируемой или чередующейся терапией могут быть изменены фармакокинетические параметры, биораспределение или другой параметр лекарства. Как правило, комбинируемая терапия обычно является предпочтительной по сравнению с чередующейся терапией, поскольку она вызывает множественные одновременные стрессы на вирус.

В другом воплощении пролекарство вводят в комбинации или при чередовании с иммуномодулятором или другим фармацевтически активным модификатором репликации вируса, включая биологическое вещество, такое как белок, пептид, олигонуклеотид или гамма-глобулин, включая, но не ограничиваясь ими, интерферон, интерлейкин или антисмысловые олигонуклеотиды для генов, которые экспрессируют или регулируют репликацию вируса гепатита В.

Можно применять любой способ чередования, который обеспечивает лечение пациента. Неограничивающие примеры чередования включают 1-6-недельное введение эффективного количества одного агента с последующим введением в течение 1-6 недель эффективного количества второго агента против HBV. Схема чередования может включать периоды без лечения. Обычно комбинируемая терапия включает одновременное введение эффективного соотношения доз двух или более агентов против HBV.

Ввиду того факта, что HBV часто обнаруживают у пациентов, которые также дают положительную реакцию на анти-HIV-антитела или HIV-антиген, или которые подвергались воздействию HIV, соединения, активные против HBV, раскрытые в данном описании, или их производные или пролекарства можно вводить в соответствующих обстоятельствах в комбинации или при чередовании с препаратами против HIV.

Вторым противовирусным агентом для лечения HIV в одном воплощении может быть ингибитор обратной транскриптазы («RTI»), который может быть или синтетическим нуклеозидом («NRTI»), или нуклеозидным соединением («NNRTI»). В альтернативном воплощении, в случае HIV, второй (или третий) противовирусный агент может быть ингибитором протеазы. В других, воплощениях второе (или третье) соединение может быть аналогом пиррофосфата или слитым ингибитором связывания. Перечень данных по резистентности, собранных в условиях *in vitro* и *in vivo*, для ряда противовирусных соединений имеется в International Antiviral News, Volume 1(4), International Medical Press 1996.

Активные агенты против HBV также можно вводить в комбинации с антибиотиками, другими противовирусными соединениями, противогрибковыми агентами или другими фармацевтическими агентами, назначаемыми для лечения вторичных инфекций.

VI. Фармацевтические композиции

Людей, страдающих любым из описываемых заболеваний, включая гепатит В, можно лечить введением пациенту эффективного количества 3'-пролекарства β-L-2'-дезоксинуклеозида по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли в присутствии фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя. Активные вещества можно вводить соответствующим путем, например, перорально, парентерально, внутривенно, внутривожно, подкожно или местно в жидкой или твердой форме.

Активное соединение включают в фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в количестве, достаточном для доставки пациенту терапевтически эффективного количества соединения для подавления репликации вируса *in vivo*, не вызывая серьезного токсического действия у пациента, который подвергается лечению. «Ингибирующее количество» означает количество активного ингредиента,

достаточное для проявления ингибирующего действия, что определяется, например, методом, таким как описано в данном описании.

Предпочтительная доза соединения для всех указанных выше состояний будет находиться в пределах примерно от 1 до 50 мг/кг, предпочтительно от 1 до 20 мг/кг массы тела в день, обычно от 0,1 до примерно 100 мг на кг массы тела реципиента в день. Диапазон эффективных доз фармацевтически приемлемого пролекарства можно высчитать, основываясь на массе исходного нуклеозида, который вводится. Если пролекарство проявляет активность само по себе, эффективную дозу можно установить, как указано выше, с использованием массы пролекарства или другими способами, известными специалистам в данной области.

Обычно соединение вводят в любой разовой подходящей дозированной форме, включая, но не ограничиваясь таковой, содержащей от 7 до 3000 мг, предпочтительно от 70 до 1400 мг активного ингредиента на разовую дозированную форму. Подходящей является дозированная форма для перорального введения, содержащая 50-1000 мг активного ингредиента.

В идеале активный ингредиент следует вводить для достижения максимальных концентраций активного соединения примерно от 0,2 до 70 мкМ, предпочтительно примерно от 1,0 до 10 мкМ. Этого можно достичь, например, при внутривенной инъекции 0,1-5% раствора активного ингредиента, необязательно в физиологическом растворе, или при введении в виде болуса активного ингредиента.

Концентрация активного соединения в лекарственной композиции будет зависеть от скорости всасывания, инактивации и выведения лекарства, а также других факторов, известных специалистам в данной области. Следует отметить, что дозы будут также варьировать в зависимости от тяжести состояния у пациента, который подвергается лечению. Кроме того, следует понимать, что для любого определенного субъекта конкретные дозировки и схемы должны корректироваться в течение времени по необходимости для индивидуума и согласно мнению профессионала, назначающего или наблюдающего за введением композиций, и приведенные в данном описании пределы концентраций являются только примерными и не предназначены для ограничения объема или применения заявляемой композиции. Активный ингредиент можно вводить один раз или можно разделить на ряд меньших доз, которые следует вводить с различными интервалами времени.

Предпочтительным путем введения активного соединения является пероральный. Композиции для перорального введения, как правило, будут включать инертный разбавитель или пищевой носитель. Они могут быть включены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. Для перорального лечебного введения активное соединение может быть включено с эксципиентами и использовано в виде таблеток, пастилок или капсул. В качестве части композиции могут быть включены фармацевтически совместимые связывающие вещества и/или адьюванты.

Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и тому подобное могут включать любой из следующих ингредиентов или соединения подобной природы: связывающее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиент, такой как крахмал или лактоза, дезинтегратор, такой как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или стеротес; глидант, такой как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор. Когда единичная дозированная форма представляет капсулу, она может содержать в дополнение к веществам указанного выше типа жидкий носитель, такой как жирное масло. Кроме того, единичные дозированные формы могут включать различные другие вещества, которые модифицируют физическую форму дозированной формы, например, оболочки из сахара, шеллака и других агентов для кишечных оболочек.

Соединение можно вводить в виде компонента эликсира, суспензии, сиропа, воды, жвачки и тому подобное. Сироп может включать в дополнение к активным соединениям сахарозу в качестве подсластителя и некоторые консерванты, красители и окрашивающие вещества и ароматизаторы.

Соединение или его фармацевтически приемлемое производное или соли можно также смешать с другими активными веществами, которые не оказывают отрицательного влияния на желаемое действие, или с веществами, которые дополняют желаемое действие, такими как антибиотики, противогрибковые препараты, противовоспалительные препараты, ингибиторы протеазы или другие нуклеозидные и нуклеозидные противовирусные агенты. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутривенного, подкожного или местного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; образующие комплексы агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для поддержания тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Препарат для парентерального введения может быть помещен в ампулы, одноразовые шприцы или емкости с множественными дозами, изготовленные из стекла или пластмассы.

При внутривенном введении предпочтительными носителями являются физиологический раствор или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS).

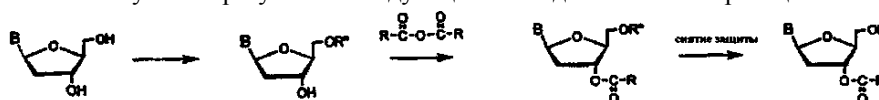
В предпочтительном воплощении активные соединения готовят с носителями, которые будут защищать соединения от быстрого выделения из организма, такими как композиция для контролируемого высвобождения, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно использовать биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэферы и полуксусная кислота. Способы получения таких композиций, очевидно, понятны специалистам в данной области. Вещества можно также получить от Alza Corporation.

Также в качестве фармацевтически приемлемых носителей предпочтительными являются липосомные суспензии (включая липосомы, направленные к зараженным клеткам с моноклональными антителами к антигенам вируса). Их можно приготовить способами, известными специалистам в данной области, например, описанными в патенте США № 4522811. Например, липосомные композиции можно получить растворением соответствующего липида(ов) (таких как стеароилфосфатидилэтаноламин, стеароилфосфатидилхолин, арахидоилфосфатидилхолин и холестерин) в неорганическом растворителе, который затем выпаривают, оставляя тонкую пленку сухого липида на поверхности емкости. Затем в емкость вносят водный раствор активного соединения или его монофосфат, дифосфат и/или трифосфат. Затем емкость вращают вручную для отделения липида от стенок емкости и диспергирования липидных агрегатов, получая тем самым липосомальную суспензию.

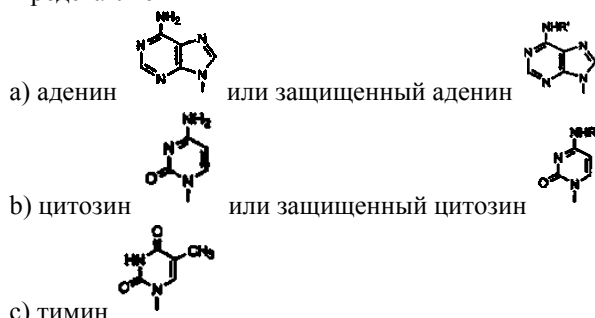
VII. Способы получения активных соединений

A. Способ получения β -L-3'-производных β -L-нуклеозидов.

β -L-3'-Производные 2'-дезоксинуклеозида можно получить любыми способами, известными в данной области, в частности, известными способами защиты вторичных спиртов ацильными группами, т.е. с помощью ангидрида или с помощью агента сочетания. В качестве неограничивающего примера 3'-производные можно получить в результате следующей последовательности реакций:



где В представляет



R представляет алкильную или арильную группу,

R' и R'' представляют обычно используемые защитные группы.

Альтернативно, 3'-производное получают из аминокислотной группы. Ключевым исходным соединением для данного способа является подходящий замещенный β -L-нуклеозид. β -L-Нуклеозид можно купить или можно получить известными способами, включая обычные реакции сочетания с группой L-сахара.

Данные аминокислотные производные можно получить, сначала защищая 5'-гидроксил подходящей кислородзащитной группой, такой как ацильная или силильная защитная группа, и необязательно защищая любой свободный амин в гетероциклическом или гетероароматическом основании. Затем свободный 3'-гидроксил можно сочетать с N-защищенной α - или β -аминокислотой.

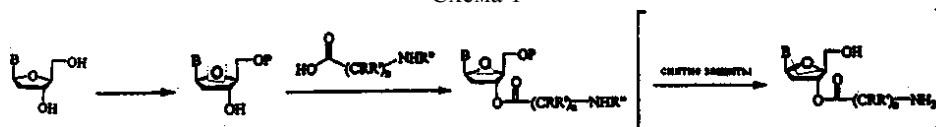
Затем β -L-нуклеозид сочетают с аминокислотой, используя обычные реагенты сочетания, которые способствуют сочетанию. Некоторыми неограничивающими примерами реагентов сочетания являются реагенты типа Митсунобу (например, диалкилазодикарбоксилаты, такие как диизопропилазодикарбоксилат и диэтилазодикарбоксилат) с трифенилфосфином или различные типы карбодиимидов.

Реакцию сочетания можно проводить при любой температуре, когда достигаются желаемые результаты, т.е. подходящей для протекания реакции с приемлемой скоростью без разложения или избыточного образования побочных продуктов.

Можно выбрать любой растворитель для реакции, при котором можно достичь необходимой температуры и который может сольбуилизовать компоненты реакции. Неограничивающими примерами являются любые апротонные растворители, включая, но не ограничиваясь ими, алкильные или галогеналкильные растворители, такие как гексан, циклогексан, дихлорметан или дихлорэтан, толуол, ацетон, этилацетат, дитианы, ТГФ, диоксан, ацетонитрил, диэтиловый эфир, пиридин, диметилформамид (DMF), диметилсульфоксид (DMSO), диметилацетамид или любая их комбинация.

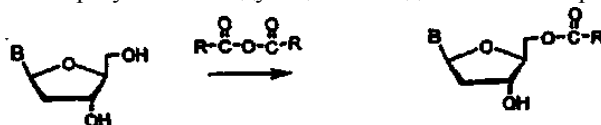
Схема 1 представляет неограничивающий пример получения β -L-3'-аминоацилнуклеозида из L-дезоксирибонуклеозида.

Схема 1

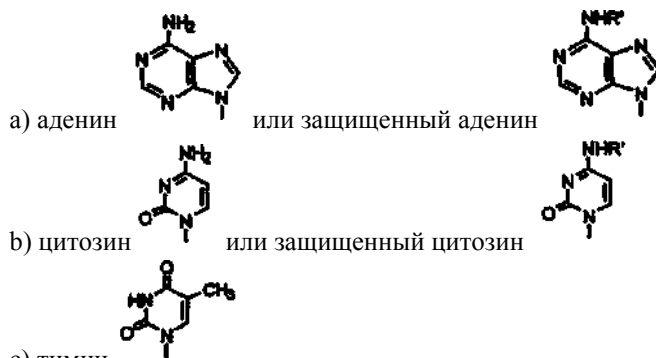


В. Способ получения β -L-5'-производных β -L-нуклеозидов.

β -L-5'-Производные β -L-нуклеозида можно получить любыми способами, известными в данной области, в частности, известными способами защиты "первичных спиртов ацильными группами, т.е. с помощью ангидрида или с помощью агента сочетания. В качестве неограничивающего примера β -L-5'-производные можно получить в результате следующей последовательности реакций:



где В представляет



R представляет алкильную или арильную группу,

R' представляет обычно используемую защитную группу.

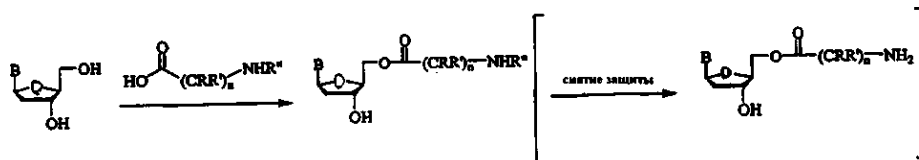
В предпочтительном воплощении 5'-производное получают из аминоацильной группы. Ключевым исходным соединением для данного способа является подходящий замещенный β -L-нуклеозид. β -L-Нуклеозид можно купить или можно получить известными способами, включая обычные реакции сочетания с группой L-сахара, такого как дезоксирибоза. Аминоацильные производные можно получить избирательным сочетанием аминокислоты с β -L-нуклеозидом, предпочтительно без какой-либо дополнительной защиты нуклеозида. Реакцию сочетания можно проводить с использованием подходящих реагентов сочетания, которые способствуют сочетанию. Некоторыми неограничивающими примерами реагентов сочетания являются реагенты типа Митсунобу (например, диалкилазодикарбоксилаты, такие как диизопропилазодикарбоксилат и диэтилазодикарбоксилат) с трифенилфосфином или различные типы карбодиимидов.

Реакцию сочетания можно проводить при любой температуре, когда достигаются желаемые результаты, т.е. подходящей для протекания реакции с приемлемой скоростью без разложения или избыточного образования побочных продуктов.

Можно выбрать любой растворитель для реакции, при котором можно достичь необходимой температуры и который может солюбилизовать компоненты реакции. Неограничивающими примерами являются любые апротонные растворители, включая, но не ограничиваясь ими, алкильные или галогеналкильные растворители, такие как гексан, циклогексан, дихлорметан или дихлорэтан, толуол, ацетон, этилацетат, дитианы, ТГФ, диоксан, ацетонитрил, диэтиловый эфир, пиридин, диметилформамид (ДМФ), диметилсульфоксид (ДМСО), диметилацетамид или любая их комбинация.

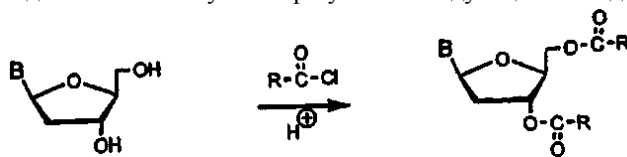
Схема 2 представляет неограничивающий пример получения β -L-5'-аминоацилнуклеозида из L-дезоксирибонуклеозида.

Схема 2

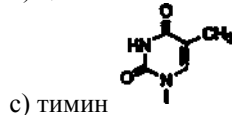
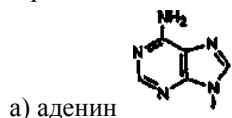


С. Способ получения β -L-3', 5'-бис-О-производных β -L-нуклеозидов.

β -L-3',5'-бис-О-Производные β -L-нуклеозида можно получить любыми способами, известными в данной области, в частности, известными способами защиты первичных и вторичных спиртов ацильными группами, т.е. с помощью ангидрида или с помощью агента сочетания. В качестве неограничивающего примера 3',5'-бис-О-производные можно получить в результате следующей последовательности реакций:



где В представляет



R представляет алкильную или арильную группу.

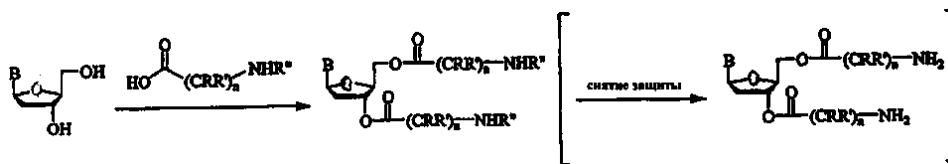
В предпочтительном воплощении 3',5'-бис-О-производное получают из аминокислотной группы. Ключевым исходным соединением для данного способа является подходящий замещенный β -L-нуклеозид. 3',5'-бис-О-Производные β -L-нуклеозидов можно купить или можно получить известными способами, включая обычные реакции сочетания с группой L-сахара, такого как дезоксирибоза. Затем свободные 3'- и 5'-гидроксильные группы можно сочетать с N-защищенной α -или β -аминокислотой. Реакцию сочетания можно проводить с использованием подходящих реагентов сочетания, которые способствуют сочетанию. Некоторыми неограничивающими примерами реагентов сочетания являются реагенты типа Митсунобу (например, диалкилазодикарбоксилаты, такие как диизопропилазодикарбоксилат и диэтилазодикарбоксилат) с трифенилфосфином или различные типы карбодиимидов.

Реакцию сочетания можно проводить при любой температуре, когда достигаются желаемые результаты, т.е. подходящей для протекания реакции с приемлемой скоростью без разложения или избыточного образования побочных продуктов.

Можно выбрать любой растворитель для реакции, при котором можно достичь необходимой температуры и который может солюбилизовать компоненты реакции. Неограничивающими примерами являются любые апротонные растворители, включая, но не ограничиваясь ими, алкильные или галогеналкильные растворители, такие как гексан, циклогексан, дихлорметан или дихлорэтан, толуол, ацетон, этилацетат, дитианы, ТГФ, диоксан, ацетонитрил, диэтиловый эфир, пиридин, диметилформамид (ДМФ), диметилсульфоксид (ДМСО), диметилацетамид или любая их комбинация.

Схема 3 представляет неограничивающий пример получения β -L-3',5'-диаминоацилнуклеозида из L-дезоксирибонуклеозида.

Схема 3



D. Необязательный способ удлинения аминокислотной группы.

Указанные в заголовке соединения можно получить взаимодействием 3'- и 5'-гидроксильных групп с подходящим производным, таким как ацил, и, в частности, аминокислотной группой. Если нуклеозид превращают в его производное с помощью аминокислотной группы, желательно затем сочетать свободный амин с N-защищенной α - или β -аминокислотой. Реакцию сочетания можно проводить с использованием подходящих реагентов сочетания, которые способствуют сочетанию. Некоторыми неограничивающими примерами реагентов сочетания являются реагенты типа Митсунобу (например, диалкилазодикарбоксилаты, такие как диизопропилазодикарбоксилат и диэтилазодикарбоксилат) с трифенилфосфином или различные типы карбодиимидов.

Реакцию сочетания можно проводить при любой температуре, когда достигаются желаемые результаты, т.е. подходящей для протекания реакции с приемлемой скоростью без разложения или избыточного образования побочных продуктов.

Можно выбрать любой растворитель для реакции, при котором можно достичь необходимой температуры и который может солубилизовать компоненты реакции. Неограничивающими примерами являются любые апротонные растворители, включая, но не ограничиваясь ими, алкильные или галогеналкильные растворители, такие как гексан, циклогексан, дихлорметан или дихлорэтан, толуол, ацетон, этилацетат, дитианы, ТГФ, диоксан, ацетонитрил, диэтиловый эфир, пиридин, диметилформамид (ДМФ), диметилсульфоксид (ДМСО), диметилацетамид или любая их комбинация.

Е. Необязательный способ получения производных гетероароматического или гетероциклического основания.

Указанные в заголовке соединения можно получить необязательной защитой свободной аминогруппы в гетероциклическом или гетероароматическом основании, например, N⁴-цитозине, N⁶-аденине или N²-гуанине. Например, амин можно защитить ацильной группой или диалкиламинометиленовой группой по следующей общей схеме:



Защиту можно проводить при любой температуре, когда достигаются желаемые результаты, т.е. подходящей для протекания реакции с приемлемой скоростью без разложения или избыточного образования побочных продуктов.

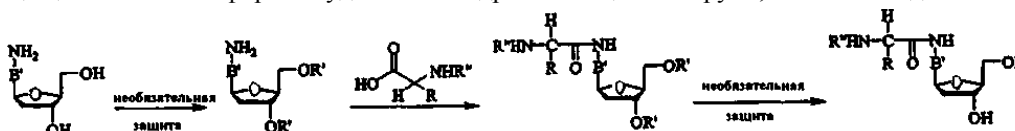
Можно выбрать любой растворитель для реакции, при котором можно достичь необходимой температуры и который может солубилизовать компоненты реакции. Неограничивающими примерами являются любые апротонные растворители, включая, но не ограничиваясь ими, алкильные или галогеналкильные растворители, такие как гексан, циклогексан, дихлорметан или дихлорэтан, толуол, ацетон, этилацетат, дитианы, ТГФ, диоксан, ацетонитрил, диэтиловый эфир, пиридин, диметилформамид (ДМФ), диметилсульфоксид (ДМСО), диметилацетамид или любая их комбинация.

Затем свободную 3'-гидроксильную группу можно сочетать с N-защищенной α- или β-аминокислотой. Реакцию сочетания можно проводить с использованием соответствующих реагентов сочетания, которые способствуют сочетанию. Некоторыми неограничивающими примерами реагентов сочетания являются реагенты типа Митсунобу (например, диалкилазодикарбоксилаты, такие как диизопропилазодикарбоксилат и диэтилазодикарбоксилат) с трифенилфосфином или различные типы карбодимидов.

Реакцию сочетания можно проводить при любой температуре, когда достигаются желаемые результаты, т.е. подходящей для протекания реакции с приемлемой скоростью без разложения или избыточного образования побочных продуктов.

Можно выбрать любой растворитель для реакции, при котором можно достичь необходимой температуры и который может солубилизовать компоненты реакции. Неограничивающими примерами являются любые апротонные растворители, включая, но не ограничиваясь ими, алкильные или галогеналкильные растворители, такие как гексан, циклогексан, дихлорметан или дихлорэтан, толуол, ацетон, этилацетат, дитианы, ТГФ, диоксан, ацетонитрил, диэтиловый эфир, пиридин, диметилформамид (ДМФ), диметилсульфоксид (ДМСО), диметилацетамид или любая их комбинация.

В альтернативном воплощении N⁴- или N⁶-ацильное производное получают из аминоацильной группы, и его можно получить в результате следующей последовательности реакций при необязательной защите свободных гидроксильных групп, с последующей реакцией конденсации с соответствующим образом защищенным аминоэфиром и удалением гидроксилзащитных групп, если необходимо.



Примеры

Пример 1. ⁴N-mMTr-2'-дезоксид-β-L-цитидин (1, фиг. 1).

β-L-dC (1 г, 4,40 ммоль) растворяли в сухом пиридине (44 мл). После временной защиты триметилсилильной группой (TMSCl, 3,34 мл, 26,4 ммоль), с последующим добавлением mMTrCl (3,38 мг, 11 ммоль) и 4-диметиламинопиридина (DMAP, 540 мг, 4,40 ммоль), реакционную смесь перемешивали в течение 3 суток при комнатной температуре {A. Nyilas; C. Glemarec; J. Chattopadhyaya; Tetrahedron Lett.

1990, 46, 2149-2164}. После экстракции бикарбонатом натрия органический слой промывали водой, упаривали и растворяли в диоксане (40 мл). Добавляли по каплям водный аммиак (8,5 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение ночи. После отгонки летучих веществ твердый остаток очищали на колонке с силикагелем {элюент: ступенчатый градиент MeOH (0-10%) в CH₂Cl₂} с получением желаемого соединения 1 (1,02 г, 46,5%) в виде пены.

¹H-ЯМР (DMCO-d₆) δ м.д. 8,39 (шир.с, 1H, NH, D₂O обмениваемый), 7,70 (д, 1H, H-6, J=7,3 Гц), 7,4-6,8 (м, 14H, (C₆H₅)₂C(C₆H₄)OCH₃), 6,23 (д, 1H, H-5, J=7,3 Гц), 6,02 (т, 1H, H-1', J=6,5 Гц), 5,16 (д, 1H, OH-3', J=3,8 Гц, D₂O заменяемый), 4,9 (шир.с, 1H, OH-5', D₂O заменяемый), 4,1 (м, 1H, H-3'), 3,7 (м, 4H, H-4', OCH₃), 3,5 (м, 2H, H-5', H-5''), 2,1-1,8 (2м, 2H, H-2', H-2'');

FAB (бомбардировка быстрыми атомами) <0, (GT) m/e 498 (M-H)⁻, 382 (B)⁻; 226 (M-mMTr)⁻; FAB>0 (GT) 500 (M+H)⁺, 273 (mMTr)⁺; УФ (EtOH95) λ_{max} = 279 нм; λ_{min} = 250 нм.

Пример 2. 5'-L-N-(трет-Бутоксикарбонил)валиновый эфир ⁴N-mMTr-2'-дезоксид-β-L-цитидина (2, фиг. 1).

К раствору соединения 1 (1 г, 2,00 ммоль) в сухом ДМФ (34 мл) последовательно добавляли 4-диметиламинопиридин (DMAP, 37 мг, 0,3 ммоль), N-(трет-бутоксикарбонил)-L-валин (Voc-Val-OH, 587 мг, 2,7 ммоль) и N,N'-дициклогексилкарбодимид (DCC, 660 мг, 3,2 ммоль) {L.M. Beauchamp; G.F. Orr; P.De Miranda; T. Burnette; T.A. Krenitsky; Antiviral Chem. Chemother. 1992, 3, 157-164}. Раствор перемешивали при комнатной температуре. Через 40 ч в реакционную смесь вносили еще DMAP (37 мг, 0,3 ммоль), Voc-Val-OH (587 мг, 2,7 ммоль) и DCC (660 мг, 3,2 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 40 ч. Смесь фильтровали и ДМФ удаляли из фильтрата при пониженном давлении и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем {элюент: ступенчатый градиент MeOH (0-10%) в CH₂Cl₂} с получением желаемого соединения 2 (515 мг, 37%) в виде пены.

¹H-ЯМР (DMCO-d₆) δ м.д. 8,44 (шир.с, 1H, NH, D₂O заменяемый), 7,7-6,8 (м, 15H, H-6 и (C₆H₅)₂C(C₆H₄)OCH₃), 6,26 (д, 1H, H-5, J=7,3 Гц), 6,06 (т, 1H, H-1', J=6,6 Гц), 5,7 (шир.с, 1H, OH-3, D₂O заменяемый), 4,2-4,0 (м, 3H, H-3', H-4' и CH), 3,8-3,9 (м, 2H, H-5', H-5''), 3,7 (с, 3H, OCH₃), 2,0-1,9 (м, 3H, H-2', H-2'', CH), 1,36 (с, 9H, (CH₃)₃C), 0,86 (м, 6H, (CH₃)₂CH);

FAB<0, (GT) m/e 1395 (2M-H)⁻, 697 (M-H)⁻, 425 (M-mMTr)⁻; 382 (B)⁻; 216 (Voc-Val-H)⁻; FAB>0 (GT) 384 (B+2H)⁺, 273 (mMTr)⁺; 57 (CH₃)₃C⁺; УФ (EtOH95) λ_{max} = 279 нм; λ_{max} = 249 нм.

Пример 3. Гидрохлорид 5'-L-валинового эфира 2'-дезоксид-β-L-цитидина (3, фиг. 1).

Соединение 2 (500 мг, 0,715 ммоль) растворяли в 20% растворе трифторуксусной кислоты в CH₂Cl₂ (25 мл) и добавляли триизопропилсилан (1,47 мл, 71,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и валиновый эфир осаждали в Et₂O в виде трифторацетата. После нескольких совместных выпариваний с водой осадок растворяли в воде (2 мл), обрабатывали насыщенным раствором HCl в диоксане (20 мл) и выпаривали при пониженном давлении. Данную обработку повторяли три раза и в конце желаемое вещество 3 осаждали в эфире (207 мг, 73%) в виде гидрохлорида.

¹H-ЯМР (DMCO-d₆) δ м.д. 9,7 (шир.с, 1H, 1/2NH₂, D₂O заменяемый), 8,6 (шир.с, 4H, 1/2NH₂, NH₃, D₂O заменяемый), 7,98 (д, 1H, H-6, J=7,8 Гц), 6,17 (д, 1H, H-5, J=7,8 Гц), 6,11 (пт, 1H, H-2'), 5,5 (шир.с, <1H, OH-3', D₂O заменяемый), 4,4 (м, 2H, H-5', H-5''), 4,3 (м, 1H, H-3'), 4,2-4,0 (м, 2H, H-4', CH), 3,8-3,9, 3,7 (с, 3H, OCH₃), 2,3-2,1 (м, 3H, H-2', H-2'', CH), 0,94 (дд, 6H, (CH₃)₂CH, J=3,7 и 6, 6 Гц);

FAB<0, (GT) m/e 361 (M+Cl)⁻; 325 (M-H)⁻, 116 (Val-H)⁻, 110 (B)⁻; 216 (Voc-Val-H)⁻; FAB>0 (GT) 653 (2M+H)⁺, 327 (M+H)⁺; 112 (B+2H)⁺; {α}_D²⁰ -28,57 (с=0,49 в ДМСО); УФ (EtOH95) λ_{max} = 272 нм (ε 8700); λ_{max} = 255 нм (ε 7600); ВЭЖХ_{время удерживания} = 8,37 мин (градиент от 0 до 50% CH₃N в 20 mM триэтиламиниевом ацетатном буфере в течение 30 мин со скоростью потока 1 мл/мин).

Пример 4. N⁴-ацетил-2'-дезоксид-β-L-цитидин (4, фиг. 2).

К суспензии нуклеозида, β-L-dC (415 мг, 1,83 ммоль) в N,N-диметилформамиде (9,2 мл) добавляли уксусный ангидрид (207 мкл, 2,20 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч [V.Bhat; B.G. Ugarkar; V.A. Sayeed, K. Grimm; N. Kosora; P.A. Domenico; E. Stocker, Nucleosides & Nucleotides, 1989, 8(2), 179-183]. После удаления ДМФ при пониженном давлении полученный остаток очищали колоночной хроматографией [элюент: 15% MeOH в CH₂Cl₂] с получением желаемого соединения (310 мг, 63%), которое кристаллизовали из этанола; т.пл. 128-170°C;

¹H-ЯМР (DMCO-d₆) δ м.д. 10,86 (с, 1H, NH, D₂O заменяемый), 8,31 (д, 1H, H-6, J=7,5 Гц), 7,18 (д, 1H, H-5, J=7,5 Гц), 6,09 (т, 1H, H-1', J=6,3 Гц), 5,25 (д, 1H, OH-3', D₂O заменяемый, J=4,2 Гц), 5,03 (т, 1H, OH-5', D₂O заменяемый, J=5,0 Гц), 4,1-4,2 (м, 1H, H-3'), 3,8 (м, 1H, H-4'), 3,4-3,6 (м, 2H, 2H, H-5', H-5''), 2,2-2,3 (м, 1H, H-2'), 2,08 (с, 3H, CH₃), 2,0-1,9 (м, 1H, H-2'');

FAB<0, (GT) m/e 806 (3M-H)⁻, 537 (2M-H)⁻, 360 (M+G-H)⁻, 268 (M-H)⁻, 152 (B)⁻; FAB>0 (GT) 808 (3M+H)⁺, 539 (2M+H)⁺, 362 (M+G+H)⁺, 270 (M+H)⁺, 154 (B+2H)⁺, 117 (S)⁺; УФ (H₂O) λ_{max} = 297 нм (ε 8300); λ_{min} = 270 нм (ε 3500); λ_{max} = 245 нм (ε 14400); λ_{min} = 226 нм (ε 5800); [α]_D²⁰ -81,31 (с=1,07 в ДМСО).

Пример 5. N⁴[(Диметиламино)метилен]-2'-дезоксид-β-L-цитидин (5, фиг. 3).

Указанное в заголовке соединение получали опубликованным способом, разработанным для получения соответствующего D-энантиомера [S.G. Kerr and T.I. Kalman, J. Pharm. Sci. 1994, 83, 582-585]. Рас-

твор L-dC (500 мг, 2,20 ммоль) в ДМФ (4,8 мл) обрабатывали диметилацетатом диметилформаида (2,8 мл, 21,08 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор упаривали при пониженном давлении и совместно выпаривали с этанолом. Кристаллизация из смеси этанол/эфир давала указанное в заголовке соединение (501,2 мг, 81%) в виде светло-желтых кристаллов. Т.пл. 174-176°C (по литературным данным: 188-190°C для D-энантиомера);

¹H-ЯМР (ДМСО-d₆) δ м.д. 8,60 (с, 1H, N=CH), 8,00 (д, 1H, H-6), 6,15 (т, J=6,6 Гц, 1H, H-1'), 5,96 (д, J=7,2 Гц, 1H, H-5), 5,22 (д, J=4,2 Гц, 1H, OH-3'), 5,01 (т, J=5,2 Гц, 1H, OH-5'), 4,20 (м, 1H, H-4'), 3,80 (м, 1H, H-3'), 3,56 (м, 2H, H-5' и H-5''), 3,15 и 3,02 (2с, 3H и 3H, N(CH₃)₂), 2,22-1,90 (2м, 1H и 1H, H-2' и H-2''); FAB>0, (GT) 847 (3M+H)⁺, 565 (2M+H)⁺, 283 (M+H); FAB<0, (GT) m/z 599 (2M+Cl)⁻, 317 (M+Cl)⁻, 165 (B)⁻.

Пример 6. 3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксид-β-L-цитидин (6, фиг. 4).

Указанное в заголовке соединение синтезировали в одну стадию, исходя из L-dC и следуя способу, разработанному Breiner et al. [R.G. Breiner; W. Rose; J.A. Dunn; J.E. Mae Diarmid and J. Bardos; J. Med. Chem. 1990, 33, 2596-2603] для получения D-энантиомера. Раствор L-dC (765 мг, 3,37 ммоль) и ацетилхлорид (960 мкл, 13,48 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (4,8 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем добавляли сухой хлороформ (3,5 мл) и перемешивание продолжали в течение 24 ч. Раствор упаривали при пониженном давлении и совместно выпаривали с этанолом. Кристаллизация из этанола давала 78% желаемого соединения, т.пл. 192-193°C (по литературным данным: 187-189°C для D-энантиомера [Breiner et al. J. Med. Chem. 1990, 33, 2596-2603]);

¹H-ЯМР (ДМСО-d₆) δ м.д. 9,8 и 8,7 (2 шир.с, <3H, NH₃⁺, D₂O заменяемый), 8,0 (д, 1H, H-6 J=7,8 Гц), 6,18 (д, 1H, H-5, J=7,8 Гц), 6,08 (т, 1H, H-1', J=6,7 Гц), 5,2 (м, 1H, H-3'), 4,3-4,1 (м, 3H, H-4', H-5', H-5''), 2,4-2,5 (м, 2H, H-2', H-2''), 2,06 и 2,03 (2с, 6H, 2 CH₃);

FAB<0, (GT) m/e 968 (3M+Cl)⁻, 657 (2M+Cl)⁻, 438 (M+G+Cl)⁻, 346 (M+Cl)⁻, 310 (M-H)⁻, 110 (B)⁻; 59 (CH₃COO)⁻; FAB>0 (GT) 623 (2M+H)⁺, 312 (M+H)⁺, 201 (S)⁺, 112 (B+2H)⁺, 43 (CH₃CO)⁺; [α]_D²⁰ 36,27 (с=1,02 в ДМСО); УФ (MeOH)λ_{max} = 277 нм (ε 9900); λ_{min} = 246 нм (ε 5000).

Пример 7. 3',5'-L-N-(трет-бутоксикарбонил)валиновый диэфир 2'-дезоксид-β-L-цитидина (9, фиг. 5).

Раствор N⁴-[(диметиламино)метил]-2'-дезоксид-β-L-цитидина (7,500 мг, 1,77 ммоль) в ДМФ (35 мл) обрабатывали Вос-Val-OH (1,31 г, 6,03 ммоль), DMAP (86,5 мг, 0,71 ммоль), гидрохлоридом 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида (EDC) (1,36 г, 7,09 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 40 мин. Добавляли дополнительные количества Вос-Val-OH (655 мг, 3,01 ммоль), DMAP (43,2 мг, 0,35 ммоль), EDC (680 мг, 3,55 ммоль) и раствор перемешивали еще в течение 20 ч. После упаривания при пониженном давлении остаток растворяли в CH₂Cl₂ и экстрагировали несколько раз водой. Органический слой промывали насыщенным раствором соли (100 мл), сушили (Na₂SO₄) и упаривали при пониженном давлении с получением 8 в виде сырого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Остаток растворяли в диоксане (18 мл), обрабатывали 26% водным раствором NH₄OH и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Раствор упаривали при пониженном давлении и остаток очищали хроматографией на силикагеле с использованием ступенчатого градиента MeOH (0-5%) в CH₂Cl₂ с получением указанного в заголовке соединения (698,7 мг, 58% из 9).

¹H-ЯМР (ДМСО-d₆) δ м.д. 7,58 (д, 1H, H-6), 7,29-7,18 (м, 4H, NH-Вос и NH₂), 6,20 (т, J=6,6 Гц, 1H, H-1'), 5,75 (д, J=7,3 Гц, 1H, H-5), 5,20 (шир.с, 1H, H-3'), 4,29 (м, 2H, H-5' и H-5''), 4,14 (шир.с, 1H, H-4'), 3,86 (м, 2H, CH-NH-Вос), 2,31-2,21 (м, 2H, H-2' и H-2''), 2,13-1,98 (м, 2H, CH(iPr)), 1,38 и 1,36 (2с, 18H, tBu), 0,88 и 0,85 (2д, J=6, 8 Гц, 12H, CH(CH₃)₂);

¹³C-ЯМР (ДМСО-d₆) δ м.д. 172,67 и 172,46, 166,41, 156,64 и 155,70, 141,39, 95,43, 85,78, 82,03, 79,14, 75,57, 64,90, 60,37 и 60,11, 37,40, 30,33, 29,00, 19,83-19,12;

FAB>0 (GT) 626 (M+H)⁺, 112 (B+2H)⁺, 255 (M-Вос)⁺; FAB<0, (GT) m/z 1249 (2M-H)⁻, 624 (M-H)⁻.

Пример 8. Гидрохлорид 3,5'-L-валинового эфира 2'-дезоксид-β-L-цитидина (10, фиг. 5).

Раствор 9 (675 мг, 1,08 ммоль) в диоксане (30 мл) обрабатывали раствором 26% HCl в диоксане (30 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч 55 мин. Полученную белую суспензию упаривали при пониженном давлении. Белый твердый остаток растворяли в минимальном количестве MeOH и осадили в эфире с получением указанного в заголовке соединения (10) в виде белого твердого вещества. Т.пл. 187°C (с разложением);

¹H-ЯМР (ДМСО-d₆) δ м.д. 9,79 (шир.с, 1H, 1/2NH₂), 8,72 (шир.с, 7H, 1/2NH₂ и NH₃⁺), 8,04 (д, 1H, H-6), 6,21 (д, J=7,8 Гц, 1H, H-5), 6,16 (т, J=6,9 Гц, 1H, H-1'), 5,39 (м, 1H, H-3'), 4,50-4,40 (м, 3H, H-4', H-5' и H-5''), 3,90 (2 шир.д, 2H, CH-NH₃⁺), 2,63-2,50 (2м, 2H, H-2' и H-2''), 2,21 (м, 2H, CH(iPr)), 1,02-0,94 (м, 12H, CH(CH₃)₂);

¹³C-ЯМР (ДМСО-d₆) δ м.д. 169,50 и 168,94, 161,02, 148,50, 145,26, 95,18, 87,19, 82,15, 76,14, 65,77 и 65,59, 58,12 и 58,07, 37,00, 30,16, 19,26-18,51;

FAB>0 (GT) 426 (M+H)⁺, 112 (B+2H)⁺; FAB<0, (GT) m/z 885 (2M+Cl)⁻, 460 (M+Cl)⁻; УФ (H₂O)λ_{max} = 270 нм (ε 7600).

Пример 9. N⁴-Вос-валиниловый эфир 2'-дезоксид-β-L-цитидина (13, фиг. 6).

Смесь L-dC (1,80 г, 7,92 ммоль) и триэтиламина (8,8 мл, 63,14 ммоль) в безводном ТГФ (80 мл) обрабатывали хлортриметилсианом (6 мл, 47,28 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию гасили добавлением водного насыщенного раствора NH_4Cl (26 мл) и воды (10 мл). Водный слой экстрагировали три раза EtOAc . Органические слои объединяли, промывали насыщенным раствором соли, сушили (Na_2SO_4) и упаривали при пониженном давлении с получением сырой светло-желтой маслянистой пены, содержащей 11, которую использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Данный остаток растворяли в CH_2Cl_2 (104 мл), обрабатывали N-(трет-бутоксикарбонил)-L-валином (Woc-Val-OH, 1,72 г, 7,90 ммоль), гексафторфосфатом бензотриазол-1-илокси-трис(диметиламино)фосфония (BOP, 4,20 г, 9,50 ммоль), триэтиламино (2,2 мл, 15,78 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 суток. Раствор разбавляли EtOAc и дважды экстрагировали насыщенным раствором NaHCO_3 . Органический слой сушили (Na_2SO_4) и упаривали при пониженном давлении с получением 12 в виде сырого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Данный остаток растворяли в диоксане (80 мл), обрабатывали 26% водным раствором NH_4OH и перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч 45 мин. Раствор упаривали при пониженном давлении, совместно выпаривали с абсолютным EtOH и остаток очищали хроматографией на силикагеле с использованием ступенчатого градиента MeOH (5-10%) в CH_2Cl_2 , получая указанное в заголовке соединение 13 в виде пены (1,64 г, выход в целом 48,5%).

^1H -ЯМР (ДМСО- d_6) δ м.д. 10,88 (с, 1H, NH-4), 8,40 (д, 1H, H-6), 7,26 (д, J=7,4 Гц, 1H, H-5), 7,06 (д, J=8,2 Гц, 1H, CH-NH-Woc), 6,15 (т, J=6,3 Гц, 1H, H-1'), 5,32 (д, J=4,2 Гц, 1H, OH-3'), 5,09 (т, J=5,2 Гц, 1H, OH-5'), 4,27 (м, 1H, H-3'), 4,06 (пт, J=7,5 Гц, 1H, CH-NH-Woc), 3,91 (м, 1H, H-4'), 3,63 (м, 2H, H-5' и H-5''), 2,35 (м, 1H, H-2''), 2,06 (м, 2H, H-2' и $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,43 (с, 9H, tBu), 0,92 (пт, J=6, 6 Гц, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$);

^{13}C -ЯМР (ДМСО- d_6) δ м.д. 174,41, 162,94, 156,47, 155,24, 146,10, 96,06, 88,79, 87,10, 79,09, 70,75, 61,78, 61,55, 41,74, 30,63, 29,02, 19,91 и 19,10;

FAB >0 (GT) 853 (2M+H)⁺, 427 (M+H)⁺, 311 (B+2H)⁺, 255 (M-Woc)⁺; FAB <0, (GT) m/z 851 (2M-H)⁻, 425 (M-H)⁻, 309 (B)⁻.

Пример 10. 3',5'-N⁴-Тривалил-2'-дезокситидин (14, фиг. 7).

Исходное соединение, 3',5'-N⁴-три(Woc-валил)-2'-дезокситидин растворяли в CH_2Cl_2 , но поскольку имелось нерастворимое вещество, пробу профильтровывали через перлит. Это приводило к увеличению объема используемого CH_2Cl_2 . При перемешивании добавляли реагент HCl/диоксан. В течение нескольких секунд можно было наблюдать некоторое выделение пузырьков в растворе, и затем смесь становилась мутной. Смесь перемешивали при комнатной температуре примерно в течение 1 ч. В течение этого времени осадок становился более кристаллическим. Смесь быстро фильтровали, остаток на фильтре промывали CH_2Cl_2 и затем его сушили с использованием насоса, получая 0,16 мг (69%) кремне-белых кристаллов. Реагенты и условия более детально описаны ниже в табл. 1.

Таблица 1

Реагент	мол. единица	масс/об. рассч.	Моль/части	масс/об. использ.	моль/части	экв.
3',5',N ⁴ -триWoc-Val-2'-dC (CyVal2a-2a)	825,0 FW	0,30 г	0,00036	0,3 г	0,00036	1,00
CH_2Cl_2	5,0 част.	1,5 мл	5	3,0 мл	10	10,0
HCl, 3,9 M в диоксане	256,0 мл/моль	0,47 г	0,00182	0,5 г	0,00195	5,37
3',5',N ⁴ -триWoc-2'-dC, неочищенный	634,0 FW	0,23 г	выч.-получ.	0,16 г	69,4%	

Пример 11. Метод анализа ВЭЖХ для ди-Woc-валил-2'-dC и ди-Woc-валил-2'-dU.

Готовили пробу с концентрацией 1,0 мг/мл растворением желаемого соединения в абсолютном этаноле. Затем раствор разбавляли раствором, который содержал 50% метанола и 50% KH_2PO_4 (0,015 M, pH=3,30-3,50), пока не получали концентрацию 0,16 мг/мл. (Примечание: все используемые растворители дегазировали перед применением.) 20 мкл раствора сразу же наносили на колонку ВЭЖХ производства WATERS (NOVAPAK C18 - 4 мкм - 3,9x150 мм). Скорость потока устанавливали на 1 мл/мин при температуре колонки 35°C. Для детектирования соединений длину волны устанавливали на 275 нм для ди-Woc2'dC, 260 нм для ди-Woc2'dU и 204 нм для примесей через 15 мин. Колонку элюировали KH_2PO_4 (0,015 M, pH 3,30-3,50, доведенным 10% H_3PO_4 об./об.) в насосе А и чистым ацетонитрилом для ВЭЖХ в насосе В. Градиент представлен в табл. 2.

№	Время	Объемный % из насоса В (мл)
1	0,01	1
2	0,01	45
3	12,00	45
4	20,00	70
5	28,00	70
6	28,00	45
7	32,00	45
8	32,01	0

VIII. Эффективность активных соединений против HBV

В условиях *in vitro* L-dC не оказывал влияния на человеческие ДНК-полимеразы и функцию митохондрий. L-dC не был цитотоксичным для одноядерных клеток периферической крови человека (РВМС), клеток-предшественников костного мозга и многочисленных клеточных линий человека и других клеток млекопитающих, не относящихся к клеткам человека.

Противовирусную активность и безопасность L-dC исследовали в двух опытах с использованием модели хронического гепатита В на лесных сурках. В первоначальном исследовании лесных сурков с хронической инфекцией WHV ($>10^{11}$ геномных эквивалентов/мл сыворотки) обрабатывали жидкой композицией L-dC перорально один раз в сутки в течение 28 суток. Контрольные животные получали ламивудин или жидкую композицию без препарата. В группах, обработанных L-dC, вирусная нагрузка снижалась в зависимости от дозы. При наиболее высокой протестированной дозе (10 мг/кг/день) вирусная нагрузка снижалась на 6 log по сравнению с контролем в количественном анализе полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Восстановление вируса после лечения обнаруживали через 2 недели. Все животные прибавляли в массе, и не наблюдалось связанной с препаратом токсичности в течение 4-недельного периода лечения или 8-недельного периода после лечения.

В условиях *in vitro* 50% эффективная концентрация (EC_{50}) в отношении снижения содержания внеклеточной вирусной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для L-dC составляла 0,24 мкМ против HBV и 0,87 мкМ против DHBV. Кроме того, L-dC снижал уровень внутриклеточных промежуточных соединений, имеющих место при репликации ДНК (RI), при EG_{50} , равной 0,51 мкМ. 90% эффективная концентрация (EC_{90}) L-dC в отношении репликации HBV составляла 1,07 мкМ. Анализ взаимосвязи структура-активность (САК) показывает, что замещение гидроксильной группы в 3'-положении (3'-ОН) расширяет спектр противовирусной активности от гепаднавирусов до других вирусов, включая вирус иммунодефицита человека (HIV) и некоторые герпес-вирусы. Замена основания снижает противовирусную эффективность и избирательность.

Во втором опыте с использованием модели хронического вирусного гепатита В на лесных сурках тестировали противовирусную эффективность и безопасность L-dC в комбинации с другим исследуемым нуклеозидом [β -L-2'-дезокситимидином (L-dT)]. В данный опыт входила группа животных, на которых применяли L-dC в качестве одного агента (1 мг/кг/день). Не наблюдали связанной с препаратом токсичности для одного L-dC или в комбинации с L-dT во время 12-недельного периода лечения или 12-недельного периода после лечения. Отсутствовали изменения массы тела или биохимических показателей сыворотки крови и гематологических параметров по сравнению с контрольными животными. При проведении в конце лечения исследования биопсийного материала печени не было установлено наличия гистоморфологических признаков жировых изменений (микровезикулярный стеатоз). Комбинация L-dC (1 мг/кг/день) плюс L-dT (1 мг/кг/день) была синергетической и снижала вирусную нагрузку на 8 log по сравнению с контролем.

Противовирусные нуклеозиды и аналоги нуклеозидов оказывают их противовирусное действие в виде внутриклеточных трифосфатных производных на уровне вирусной полимеразы во время репликации вируса. Как и природные нуклеозиды (D-дезоксцитидин и D-тимидин) и противовирусные аналоги нуклеозидов (например, ламивудин и зидовудин), L-dC активируется внутриклеточно фосфорилированием. В гепатоцитах человека дезоксицитидинкиназа (dCK) ответственна за зависимое от дозы превращение L-dC в производные 5'-монофосфата (MP). Затем L-dC-MP превращается в 5'-дифосфат (DP), который затем превращается в преобладающий 5'-трифосфатный метаболит (TP). Концентрация L-dC-TP достигала 72,4 мкМ в клетках HepG2, подвергнутых воздействию 10 мкМ L-dC (90,1 мкМ в первичных гепатоцитах человека) за 24 ч, и он имел период полураспада внутри клеток, равный 15,5 ч. В тестах на эндогенную полимеразу L-dC-TP ингибировал связанную с вирионом ДНК-полимеразу WHV при 50% ингибирующей концентрации (IC_{50}), равной 1,82 мкМ. Детальный механизм ингибирования ДНК-полимеразы HBV под воздействием L-dC изучается. Воздействие на клетки HepG2 или человеческие гепатоциты в первичной культуре L-dC также приводило к образованию второго TP-производного, β -L-2'-деоксиуридин-5'-трифосфата (L-dU-TP). Уровень L-dU-TP достигал 18,2 мкМ в клетках HepG2, подвергнутых воздействию 10 мкМ L-dC (43,5 мкМ в первичных гепатоцитах человека) за 24 ч. В тестах на

эндогенную полимеразу L-dU-TP ингибировал связанные с вирионом ДНК-полимеразы WHV при значении IC_{50} , равном 5,26 мкМ.

В первичной культуре гепатоцитов человека и в клеточной линии гепатомы человека (HepG2) основным метаболитом L-dC был L-dU-TP. Воздействие на данные клетки L-dC приводило к образованию L-dU-TP. В фармакологических тестах *in vitro* было показано, что L-dU-TP ингибировал синтез ДНК в гепаднавирусах при значении IC_{50} , равном 1,82 мкМ, по сравнению со связанной с вирионами ДНК-полимеразой. L-dU-TP ингибировал синтез ДНК гепаднавирусов при значении IC_{50} , равном 5,26 мкМ. L-dC-TP и L-dU-TP не ингибировали ДНК-полимеразы человека α , β и γ вплоть до концентрации 100 мкМ, наиболее высокой испытанной концентрации.

Способность активных соединений ингибировать рост вируса в культуре клеток 2.2.15 (клетки HepG2, трансформированные вирионом гепатита) можно оценить, как подробно описано ниже.

Дано краткое заключение и описание анализа противовирусного действия в данной культуральной системе и анализ ДНК HBV (Korba and Milman, 1991, Antiviral Res., 15:217). Оценку противовирусной эффективности проводили на двух отдельных пассажах клеток. Посев во всех лунках во всех планшетах проводили с одинаковой плотностью и в одно и то же время.

В результате собственных различий в концентрации внутриклеточной и внеклеточной ДНК HBV, статистически достоверными ($p < 0,05$) считались снижения только более чем в 3,5 раза (для ДНК вириона HBV) или в 3,0 раза (для промежуточных соединений репликации ДНК HBV) по сравнению со средними концентрациями для данных форм ДНК HBV в необработанных клетках. Использовали концентрации интегрированной ДНК в каждом клеточном препарате ДНК (который оставался постоянным по клеточной основе в данных опытах) для расчета концентраций внутриклеточной ДНК HBV, тем самым с гарантией того, что равные количества клеточной ДНК сравнивались между отдельными пробами.

Обычные значения внеклеточной ДНК вирионов HBV в необработанных клетках находились в пределах от 50 до 150 пг/мл культуральной среды (в среднем, примерно 76 пг/мл). Внутриклеточные промежуточные соединения репликации ДНК HBV в необработанных клетках колебались на уровне от 50 до 100 мкг/пг клеточной ДНК (в среднем, примерно 74 пг/мкг клеточной ДНК). В основном, снижение концентрации внутриклеточной ДНК HBV в результате обработки противовирусными соединениями было менее выраженным и проявлялось медленнее, чем падение концентраций ДНК вирионов HBV (Korba and Milman, 1991, Antiviral Res., 15:217).

Характер анализов гибридизации привел к эквивалентности примерно 1,0 пг внутриклеточной ДНК HBV 2-3 геномным копиям на клетку и эквивалентности 1,0 пг/мл внеклеточной ДНК HBV 3×10^5 вирусным частицам/мл.

Примеры

Пример 12. Изучение растворимости.

Сравнивали растворимость природного дезоксирибозитозина (D-dC), 3'-валинилового эфира L-dC и 3',5'-дивалинилового эфира L-dC в воде. Вначале растворимость L-dC оценивали по данным ВЭЖХ (т.е. площади под кривой) при последовательном введении различных хорошо известных концентраций β -L-dC, как представлено в табл. 3. ВЭЖХ проводили на колонке Nova-Pack C18 (3,9×150 мм) в градиенте 0-25% CH_3CN в 20 мМ триэтиламмонию ацетатном буфере (TEAAc) в течение 15 мин со скоростью потока 1 мл в минуту. Зависимость концентрации раствора от площади под кривой имела линейный характер как $y = 4150049477 \times -4334,46845$ (фиг. 8а).

Таблица 3

Концентрация (моль/л)	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	10^{-5}
Площадь	4175916	2031950	440122	55264

Исходя из этих данных, готовили насыщенный раствор с природным дезоксирибозитозином (D-dC); отбирали 3 пробы и вводили в хроматограф для ВЭЖХ. Определенная концентрация данного насыщенного раствора равнялась 1,07, 1,08 и 0,96 моль/л; следовательно, насыщенный раствор имел среднюю насыщенную концентрацию, равную 1,03 моль/л или 272 г/л. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты	Площадь	Концентрация (моль/л)
1-ая проба	4420674000	1,07
2-ая проба	4475191000	1,08
3-я проба	3983845000	0,96

Аналогично оценивали растворимость гидрохлорида 3'-валинилового эфира β -L-dC в воде. Калибровочную кривую строили при последовательных введениях различных концентраций гидрохлорида 3'-валинилового эфира β -L-dC в хроматограф для ВЭЖХ и определяли площадь под кривой, как представлено в табл. 5. ВЭЖХ также проводили на колонке Nova-Pack C18 (3,9×150 мм) в градиенте 0-25% CH_3CN в 20 мМ триэтиламмонию ацетатном буфере (TEAAc) в течение 15 мин со скоростью потока 1

мл в мин. Зависимость концентрации раствора от площади под кривой имела линейный характер как $y = 3176423963 \times -33051,63$.

Таблица 5

Концентрация (моль/л)	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
Площадь	3166842	1514479	254296	119668	19269

Исходя из этих результатов, была предпринята попытка приготовить насыщенный раствор гидрохлорида 3'-валинилового эфира β -L-dC; однако, она не была достигнута. Следовательно, растворяли в воде имеющееся в лаборатории максимальное количество гидрохлорида 3'-валинилового эфира β -L-dC. Отбирали 3 пробы и определяли концентрацию, исходя из площади под кривой по ВЭЖХ, они имели среднюю концентрацию 1,013, 0,996 и 1,059 моль/л. Результаты приведены в табл. 6.

Таблица 6

Результаты	Площадь	Концентрация (моль/л)
1-ая проба	3218013000	1,013
2-ая проба	3162471000	0,996
3-я проба	3362725000	1,059

Все три результата попадали в предполагаемые пределы, рассчитанные по калибровочной кривой, что указывает на полную растворимость соединения при данных высоких концентрациях, показывая, что насыщенный раствор данного образца имеет более высокую концентрацию, чем среднее из трех проб, т.е. выше, чем 1,023 моль/л или 408 г/л.

Определяли растворимость гидрохлорида 3',5'-дивалинилового эфира β -L-dC в воде. Калибровочную кривую строили при последовательных введениях различных концентраций гидрохлорида 3',5'-дивалинилового эфира β -L-dC в хроматограф для ВЭЖХ и определении площади под кривой, как представлено в табл. 7. ВЭЖХ проводили на колонке Nova-Pack C18 (3,9×150 мм) в градиенте 0-25% CH_3CN в 20 мМ триэтиламмониюм ацетатном буфере (TEAAC) в течение 15 мин со скоростью потока 1 мл в минуту. Зависимость концентрации раствора от площади под кривой носила линейный характер как $y = 3176423963 \times -33051,63$ (фиг. 8b).

Таблица 7

Концентрация (моль/л)	10^{-3}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}
Площадь	2863372	1466574	211046	115678	14435

Исходя из этих результатов, была предпринята попытка приготовить насыщенный раствор гидрохлорида 3',5'-дивалинилового эфира β -L-dC; однако, она не была достигнута. Следовательно, растворяли в воде имеющееся в лаборатории максимальное количество гидрохлорида 3',5'-дивалинилового эфира β -L-dC. Отбирали 3 пробы и определяли концентрацию, исходя из площади под кривой по ВЭЖХ, они имели среднюю концентрацию 2,8, 2,4 и 2,4 моль/л. Результаты приведены в табл. 8.

Таблица 8

Результаты	Площадь	Концентрация (моль/л)
1-ая проба	8336188000	2,8
2-ая проба	7054012000	2,4
3-я проба	6970838000	2,4

Все три результата попадали в предполагаемые пределы, рассчитанные по калибровочной кривой, что указывает на полную растворимость соединения при данных высоких концентрациях, показывая, что насыщенный раствор данного образца имеет более высокую концентрацию, чем среднее из трех проб, т.е. выше чем 2,5 моль/л или 1337 г/л.

Аналогичные исследования проводили по растворимости гидрохлорида 5'-валинилового эфира β -L-dC (выше чем 5,1 моль/л или 1664 г/л) и гидрохлорида 3',5'-диацетилового эфира β -L-dC (3,3 моль/л или 1148 г/л). Обобщенные данные приведены в табл. 9.

Таблица 9

Соединение	Растворимость (моль/л)	Растворимость (г/л)
D-dC	1,03	272
5'-Val-L-dC	>5,1	>1664
3'-Val-L-dC	>1,023	>408
3',5'-диацетил-L-dC	3,3	1148
3',5'-диVal-L-dC	>2,5	>1337

Пример 13. Log P исследование - фосфатный буфер.

Примерно 1,5 мг D-dC растворяли в 2,2 мл 0,02 М раствора фосфатного буфера (А, 100 мл, pH 7,2), приготовленного из смеси раствора моноосновного фосфата калия (28,5 мл) и раствора двухосновного

фосфата калия (71,5 мл), насыщенного октанолом-1 (В). К 1 мл данного раствора добавляли 1 мл октанола-1 (В), насыщенного 0,02 М раствором фосфатного буфера (А). Полученную смесь встряхивали и центрифугировали; отбирали три пробы из каждой фазы и анализировали ВЭЖХ, как представлено в табл. 10. ВЭЖХ проводили на колонке Nova-Pack C18 (3,9×150 мм) в градиенте 0-25% CH₃CN в 20 мМ триэтиламмониюм ацетатном буфере (ТЕААс) в течение 15 мин со скоростью потока 1 мл в минуту. Было установлено, что log P D-dC равен 1,41, следовательно, для D-dC предпочтительна вода октанолу.

Таблица 10

	Опыт 1						Опыт 2					
	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³
Площадь	1948481	2130720	2197377	79838	82172	80159	2380141	2326654	2339059	93123	90275	89651
В среднем	2092193			80723			2348618			91016		
P (B/A)	0,039						0,039					
logP	-1,41						-1,41					

Аналогично, примерно 1,5 мг гидрохлорида L-dC-3'-валинового эфира растворяли в 2,5 мл 0,02 М раствора фосфатного буфера (А, 100 мл, pH 7,2), приготовленного из смеси раствора моноосновного фосфата калия (28,5 мл) и раствора двухосновного фосфата калия (71,5 мл). Затем раствор насыщали октанолом-1 (В). К 1 мл данного раствора добавляли 1 мл октанола-1 (В), насыщенного 0,02 М раствором фосфатного буфера (А). Полученную смесь встряхивали и центрифугировали; отбирали три пробы из каждой фазы и анализировали ВЭЖХ, как представлено в табл. 11. ВЭЖХ проводили на колонке Nova-Pack C18 (3,9×150 мм) в градиенте 0-25% CH₃CN в 20 мМ триэтиламмониюм ацетатном буфере (ТЕААс) в течение 15 мин со скоростью потока 1 мл в минуту.

Таблица 11

	Опыт 1						Опыт 2					
	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³	A ¹	A ²	A ³	B ¹	B ²	B ³
Площадь	3352735	/	3417723	100544	96843	103466	3458180	3448062	3412971	100179	/	101731
В среднем	3385227			100284			3439738			100955		
P (B/A)	0,0296						0,0293					
logP	-1,53						-1,53					

Было установлено, что log P для гидрохлорида L-dC-3'-валинового эфира равняется -1,53; следовательно, для L-dC-3'-валинового эфира в большей степени, чем для D-dC, предпочтительна вода октанолу.

Определяли значения log P для гидрохлорида L-dC-5'-валинового эфира и гидрохлорида L-dC-3',5'-дивалинового эфира. Результаты представлены в табл. 12. Однако следует отметить, что значение log P для гидрохлорида L-dC-3',5'-дивалинового эфира возможно ниже, чем определенное (-0,86). Во время опыта наблюдали значительное превращение дивалинового эфира в 3'- или 5'-моновалиниловый эфир или даже L-dC. Отмечали 50% превращение гидрохлорида L-dC-3',5'-дивалинового эфира в водной фазе и 14% в органической фазе. Данное превращение шло за счет нестабильности эфиров в фосфатном буфере при pH 7 (см. примеры 15 и 16).

Таблица 12

Соединение	log P (октанол/вода)
D-dC	-1,41
гидрохлорид L-dC-3'-валинового эфира	-1,53
гидрохлорид L-dC-5'-валинового эфира	-1,42
гидрохлорид L-dC-3',5'-дивалинового эфира	-0,86
гидрохлорид L-dC-3',5'-диацетилового эфира	-0,74

Пример 14. Log P'-исследование - вода MilliQ.

Для того чтобы избежать превращения дивалинового эфира в моноэфиры и L-dC, провели альтернативный опыт по определению log P с использованием воды MilliQ (A') вместо фосфатного буфера (pH 6,5 вместо 7,2). Важно отметить, что в воде можно растворить только гидрохлорид дивалинилового эфира. Примерно 1,5 мг гидрохлорида L-dC-3',5'-дивалинилового эфира растворяли в 2,2 мл воды MilliQ (A', pH 6,5), насыщенной октанолом-1 (В). К 1 мл данного раствора добавляли 1 мл октанола-1 (В), насыщенной водой MilliQ (A'). Полученную смесь встряхивали и центрифугировали; отбирали три пробы из каждой фазы и анализировали ВЭЖХ, как представлено в табл. 13. ВЭЖХ проводили на колонке Nova-Pack C18 (3,9×150 мм) в градиенте 0-25% CH₃CN в 20 мМ триэтиламмониюм ацетатном буфере (ТЕААс) в течение 15 мин со скоростью потока 1 мл в минуту. Было установлено, что log P' для 3',5'-дивалина в данных условиях равнялся -2,72, что указывает на сильное воздействие противоионов в фос-

фатном буфере. Не обнаруживали превращения дивалина в моноэфиры или L-dC ни в водной, ни в органической фазах.

Таблица 13

	Опыт 1						Опыт 2					
	A ^{1'}	A ^{2'}	A ^{3'}	B ¹	B ²	B ³	A ^{1'}	A ^{2'}	A ^{3'}	B ¹	B ²	B ³
Площадь	3278293	3292150	3282281	5484	5776	6496	3282927	3327123	3297983	5829	5615	6139
В среднем	3284241			5919			3302678			5861		
P' (B/A')	1,80 x 10 ⁻³						1,77 x 10 ⁻³					
log P'	-2,7						-2,75					

Аналогично, примерно 1,5 мг гидрохлорида L-dC-5'-валинилового эфира растворяли в 2,2 мл воды MilliQ (A', pH 6,5), насыщенной октанолом-1 (B). К 1 мл данного раствора добавляли 1 мл октанола-1 (B), насыщенного водой MilliQ (A'). Полученную смесь встряхивали и центрифугировали; отбирали три пробы из каждой фазы и анализировали ВЭЖХ, как представлено в табл. 14. ВЭЖХ проводили на колонке Nova-Pack C18 (3,9x150 мм) в градиенте 0-25% CH₃CN в 20 mM триэтиламмониевом ацетатном буфере (TEAAc) в течение 15 мин со скоростью потока 1 мл в минуту. Было установлено, что log P для 5'-валина в данных условиях равнялся -2,75, значение вновь было ниже, чем установленное в опыте при определении log P с использованием фосфатного буфера.

Таблица 14

	Опыт 1						Опыт 2					
	A ^{1'}	A ^{2'}	A ^{3'}	B ¹	B ²	B ³	A ^{1'}	A ^{2'}	A ^{3'}	B ¹	B ²	B ³
Площадь	3722494	3771963	3788317	6545	5082	/	3619900	3975353	4062284	8484	9454	5877
В среднем	3760924			5813			3885845			7938		
P' (B/A')	1,54 x 10 ⁻³						2,04 x 10 ⁻³					
log P'	-2,81						-2,69					

В данных условиях значения log P' для гидрохлорида L-dC-5'-валинилового эфира и гидрохлорида L-dC-3',5'-дивалинилового эфира были очень сходными (табл. 15).

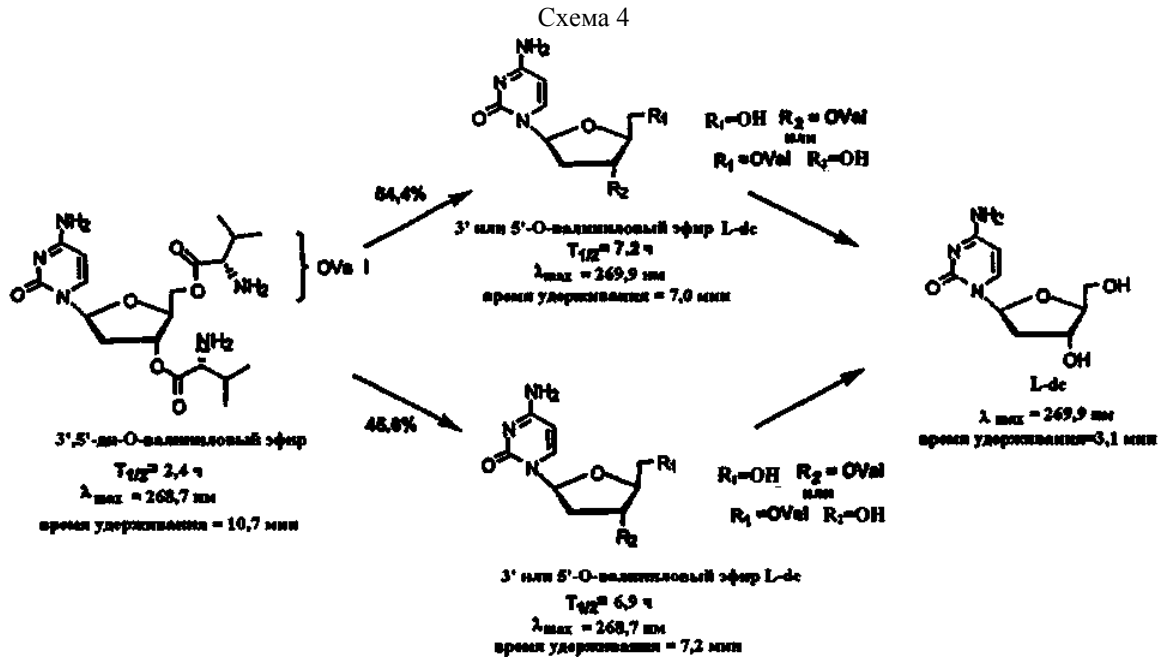
Таблица 15

Соединение	log P (октанол/вода)	log P' (октанол/вода)
гидрохлорид L-dC-5'-валинилового эфира	-1,42	-2,75
гидрохлорид L-dC-3',5'-дивалинилового эфира	-0,86	-2,72

Пример 15. Изучение стабильности при pH 7,4.

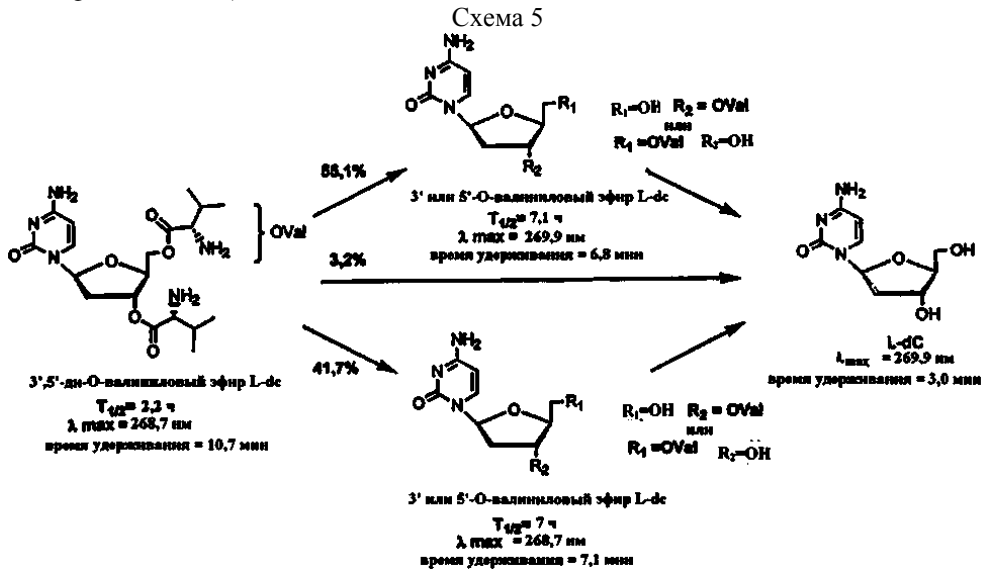
Определяли скорость разложения каждого метаболита гидрохлорида L-dC-3'-валинилового эфира. Было установлено, что период полураспада гидрохлорида L-dC-3'-валинилового эфира при pH 7,40 составлял 7 ч в 0,2 М Трис-НСl растворе при 37°C. В данных условиях гидрохлорид L-dC-3'-валинилового эфира просто превращался в L-dC. Не было обнаружено цитозина, таким образом, отсутствовало детектируемое расщепление гликозидной связи.

Аналогично определяли скорость разложения каждого метаболита гидрохлорида L-dC-3',5'-дивалинилового эфира. Было установлено, что период полураспада гидрохлорида L-dC-3',5'-дивалинилового эфира при pH 7,42 составлял 24 ч в 0,2 М Трис-НСl растворе при 37°C. В данных условиях гидрохлорид L-dC-3',5'-дивалинилового эфира частично гидролизывался в 3'- и 5'-валинил-L-dC, которые затем превращались в L-dC. Цитозин не обнаруживали, что, таким образом, указывает на отсутствие детектируемого расщепления гликозидной связи (схема 4, фиг. 9а и 9б).



Пример 16. Изучение стабильности при pH 7,20.

Было установлено, что период полураспада гидрохлорида L-dC-3',5'-дивалинового эфира при pH 7,20 равнялся 2,2 ч в 20 мМ фосфатном буфере. В данных условиях гидрохлорид L-dC-3',5'-дивалинового эфира частично гидролизывался в 3'- и 5'-валинил-L-dC, которые затем превращались в L-dC. Цитозин не обнаруживали, что, таким образом, указывает на отсутствие детектируемого расщепления гликозидной связи (схема 5, фиг. 10а и 10b).



Пример 17. Изучение стабильности при pH 4,75.

Было установлено, что период полураспада гидрохлорида L-dC-3'-валинового эфира при pH 4,5 равнялся 8,6 суткам в 20 мМ ацетатном буфере. Вновь, гидрохлорид L-dC-3'-валинового эфира гидрохлорид просто превращался в L-dC. Цитозин не обнаруживали, что, таким образом, указывает на отсутствие детектируемого расщепления гликозидной связи.

Аналогично установили, что период полураспада гидрохлорида L-dC-3',5'-дивалинового эфира при pH 4,51 равняется 44 ч в 20 мМ ацетатом буфере. В данных условиях гидрохлорид L-dC-3',5'-дивалинового эфира частично гидролизывался в 3'- и 5'-валинил-L-dC, которые затем превращались в L-dC. Цитозин не был обнаружен, что, таким образом, указывает на отсутствие расщепления гликозидной связи (фиг. 11а и 11b).

Пример 18. Изучение стабильности при pH 1,2.

Было установлено, что период полураспада гидрохлорида L-dC-3'-валинового эфира при pH 1,2 выше 48 ч в 135 мМ буферном растворе KCl-HCl. Цитозин не был обнаружен, что, таким образом, указывает на отсутствие расщепления гликозидной связи.

Аналогично проводили изучение стабильности гидрохлорида L-dC-5'-валинового эфира. Данное соединение полностью стабильно при pH 1,2 при отсутствии других метаболитов или продуктов разложения вплоть до 23 ч. В течение 2 суток в растворе не обнаруживали расщепления гликозидной связи.

Было установлено, что 3',5'-диацетиловый эфир L-dC имеет период полураспада при pH 1,2, равный 11,2 ч. В данных условиях соединение частично гидролизовалось в 3'- или 5'-производные, которые затем превращались в L-dC. В течение 2 суток в растворе не обнаруживали расщепления гликозидной связи.

Было установлено, что 3',5'-дивалиниловый эфир L-dC полностью стабилен при pH 1,23, поскольку не было обнаружено других соединений в течение 48 ч в данных условиях. В течение 2 суток в растворе не обнаруживали расщепления гликозидной связи (фиг. 12).

Альтернативно, когда N⁴-положение L-dC маскировалось диметиламинометилом или ацетиллом, период полураспада соединения при pH 1,2 составлял, соответственно, только 26 или 50 мин.

Пример 19. Биодоступность однократной дозы L-dC у синомологических обезьян.

Изучали фармакокинетику L-dC после внутривенного и перорального введения L-dC синомологичным обезьянам. В данном опыте 10 мг/кг меченного тритием ([³H])-L-dC вводили трем синомологичным обезьянам в виде однократной внутривенной дозы. Через 6 недель периода выделения тем же трем обезьянам вводили такую же дозу L-dC перорально. Пробы крови для фармакокинетических анализов отбирали перед введением и через 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 6, 8 и 24 ч после введения. Пробы мочи для фармакокинетических анализов отбирали с помощью мочеприемника перед введением и в течение следующих периодов времени после введения: 0-2, 2-4, 4-8 и 8-12 ч и затем на протяжении 12-часовых интервалов времени в течение 336 ч после введения. Определяли лекарство и концентрацию с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой. Концентрации лекарства в крови и моче анализировали немоделирующим математическим методом, и значения AUC получали линейной аппроксимацией методом трапеций.

Внутривенное введение L-dC. Среднее значение C_{max} L-dC после внутривенного введения составляло 95,7 мкМ, и у всех животных оно обнаруживалось при самом раннем времени отбора проб (15 мин после введения). Концентрация L-dC в плазме крови снижалась в течение времени после внутривенного введения в виде болуса со средним значением t_{1/2}, равным 1,59 ч. Общий клиренс (Cl) и почечный клиренс (CLR) L-dC после внутривенного введения в среднем составляли, соответственно, 0,53 л/ч/кг и 0,46 л/ч/кг. Среднее значение кажущегося объема распределения (V_d) 1,22 л/кг указывало на то, что L-dC имел значительное внесосудистое распределение в тканях.

Выделение с мочой было быстрым, при выделении 71% от введенной дозы в течение 2 ч. Основная часть (94%) дозы, извлеченной из мочи, приходилась на L-dC. Почечный клиренс (0,46 л/ч/кг) был ответственным за 87% от общего клиренса L-dC, на основании чего можно было предположить, что выделение с почками является основным путем выделения.

L-dU обнаруживали в плазме и моче, что указывает на то, что после внутривенного введения L-dC также имеет место метаболическое элиминирование L-dC. L-dU в низких концентрациях обнаруживали в плазме крови на уровне следовых количеств (нижний предел определения (LLOD) = 0,1 мкМ). За исключением L-dU, других метаболитов в плазме и крови не обнаруживали.

Пероральное введение L-dC. C_{max} составляла 3,38 мкМ, и время установления максимальной концентрации T_{max} равнялось 2,33 ч. Концентрация L-dC в плазме снижалась бифазным характером со средним конечным значением t_{1/2}, равным 2,95 ч, и она была ниже предела определения к 24 ч у всех обезьян. L-dC всасывался из желудочно-кишечного тракта со средней пероральной биодоступностью (F), равной 16,4%.

L-dU обнаруживали в плазме и моче, на основании чего можно предположить, что после перорального введения имело место метаболическое элиминирование L-dC. Были установлены низкие концентрации L-dU в плазме на уровне LLOD. За исключением L-dU, других метаболитов в плазме и крови не обнаруживали.

Примерно 8,5% введенной перорально дозы выделялось с мочой, собранной в течение 12 ч. Через 72 ч выделялось 15,5±8%. Основная часть (~69%) выделяемого с мочой лекарства приходилась на L-dC. Выделение L-dU с почками составляло 29% от общей выделенной дозы. Фекалии не собирали.

В табл. 16 представлено краткое заключение по результатам фармакокинетических исследований при внутривенном и пероральном введении L-dC синомологичным обезьянам.

Анализ фармакокинетических данных после внутривенного и перорального введения

Путь введения	L-dC (10 мг/кг) у синомологичных обезьян							
	AUC _{last}	t _{1/2}	C _{max}	T _{max}	CL	CL _R	V _d	F
(n)	(мМ·ч)	(ч)	(мМ)	(ч)	(л/ч/кг)	(л/ч/кг)	(л/кг)	(%)
в/в	81,1	1,59	95,7	0	0,53	0,46	1,22	-
(3)	(±5,7)	(±0,09)	(±13)		(±0,04)		(±0,11)	
перорально	13,7	2,95	3,38	2,33	-	-	-	16,4
(3)	(±4,3)	(±1,3)	(±1,3)	(±1,5)				(±5,0)
Среднее значение (± стандартное отклонение)								

Пример 20. Биодоступность однократной дозы L-dC у макак резус.

Изучали фармакокинетику L-dC после перорального введения L-dC макакам резус. В данном опыте 10 мг/кг меченного тритием ([3H]) L-dC вводили трем макакам резус в виде однократной пероральной дозы. Пробы крови для фармакокинетических анализов отбирали перед введением и через 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 6, 8 и 24 ч после введения. Пробы мочи для фармакокинетических анализов отбирали с помощью мочеприемника перед введением и в течение следующих периодов времени после введения: 0-2, 2-4, 4-8 и 8-12 ч и затем в течение 12-часовых интервалов времени в течение 336 ч после введения. Определяли лекарство и концентрацию с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой. Концентрации лекарства в крови и моче анализировали немоделирующим математическим методом и значения AUC получали линейной аппроксимацией методом трапеций.

Средние значения AUC_{0,25→8} и C_{max} составляли, соответственно, 12,2 мкМ·ч и 3,23 мкМ. C_{max} установлена при T_{max} 0,83 ч. Среднее значение t_{1/2} равнялось 3,34 ч, и концентрация L-dC была ниже предела определения через 24 ч у всех обезьян. Средний почечный клиренс L-dC был равен 0,273 л/ч/кг. В плазме крови обезьян, получивших L-dC, метаболиты не были обнаружены.

Примерно 8,5% от введенной перорально дозы (биодоступность при пероральном введении L-dC ~16%) было обнаружено в моче в течение 8 ч. Через 48 ч выделялось 15%. Основная часть (~77%) лекарства, выделенного с мочой, приходилась на L-dC. Выделение L-dU с мочой составляло 23% от общей извлеченной дозы. За исключением L-dU, другие метаболиты не были обнаружены.

Значения AUC и C_{max} для L-dC после введения макакам резус были аналогичны установленным у синомологичных обезьян.

Пример 21. Биодоступность однократной дозы L-dC у крыс.

Изучали фармакокинетику и биодоступность L-dC у крыс. В данном опыте 10 мг/кг [3H]-радиомеченного L-dC вводили трем крысам самкам Спрегью-Даули в виде одной внутривенной дозы. Вторая группа из трех животных получала такую же дозу L-dC перорально. Пробы крови для фармакокинетических исследований отбирали через 0,17; 0,33; 0,5; 1, 2, 3, 4, 6, 8 и 24 ч после введения. Мочу собирали в течение 8 и 24 ч после введения. Определяли лекарство и определяли концентрацию в плазме крови и моче с использованием ВЭЖХ с обращенной фазой. Данные анализировали немоделирующим математическим методом и значения AUC получали линейной аппроксимацией методом трапеций.

Внутривенное введение L-dC. Среднее значение AUC_{0,25→8} равнялось 30,1 мМ·ч. C_{max} составляла 91,1 мкМ и достигалась в самое раннее время отбора проб (10 мин после введения) у всех животных. Концентрация L-dC в плазме крови снижалась бифазным характером после внутривенного введения в виде болюса со средним значением t_{1/2}, равным 1,21 ч. Среднее значение CL L-dC составляло 1,44 л/ч/кг. Среднее значение V_d, равное 2,53 л/кг, указывало на то, что L-dC имел значительное внесосудистое распределение в тканях. В моче крыс, получивших L-dC, метаболиты не были обнаружены.

Большая часть радиоактивности, определенная в моче, приходилась на L-dC. В моче обнаруживали L-dU, на основании чего можно предположить, что после внутривенного введения происходит метаболическое элиминирование L-dC.

Пероральное введение L-dC. Среднее значение AUC_{0,25→8} равнялось 4,77 мМ·ч. Среднее значение C_{max} составляло 1,50 мкМ и достигалось при T_{max}, равном 1,0 ч. Концентрации L-dC в плазме крови снижались при t_{1/2}, равном 2,52 ч. Для L-dC было характерно ограниченное всасывание из желудочно-кишечного тракта со средней биодоступностью при пероральном введении (F), равной 15,4%. В плазме крови крыс после перорального введения L-dC метаболитов не обнаруживали.

Большая часть радиоактивности, определенная в моче, приходилась на L-dC. L-dU обнаруживали в плазме и моче, на основании чего можно предположить, что после перорального введения происходит метаболическое элиминирование L-dC.

В табл. 17 представлено краткое заключение по результатам фармакокинетических исследований при внутривенном и пероральном введении L-dC.

Таблица 17

Анализ фармакокинетических данных после внутривенного и перорального введения L-dC (10 мг/кг) у крыс

Путь введения (n)	AUC ₀₋₂₅₋₂₈ (мкМ-ч)	t _{1/2} (ч)	C _{max} (мкМ)	T _{max} (ч)	CL (л/ч/кг)	V _d (л/кг)	F (%)
в/в (3)	30,1 (±4,7)	1,21 (±0,06)	91,1 (±6,6)	0	1,44 (±0,29)	2,53 (±0,60)	-
пер-орально (3)	4,77 (±2,1)	2,52 (±1,3)	1,50 (±0,68)	1,0	-	-	15,4 (±4,6)

Среднее значение (±стандартное отклонение)

Пример 22. Биодоступность однократной дозы L-dC у лесных сурков.

Изучали фармакокинетику и биодоступность L-dC у лесных сурков. В данном опыте 10 мг/кг [3H]-меченного L-dC вводили трем лесным суркам в виде одной внутривенной дозы. Пробы крови для фармакокинетических исследований отбирали через 2, 5, 15 и 30 мин и 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0 и 24 ч после введения. После 7-дневного периода выведения тем же животным вводили 10 мг/кг L-dC в виде однократной пероральной дозы. Пробы крови для фармакокинетических исследований отбирали через 15 и 30 мин и 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 8,0 и 24 ч после введения. Мочу собирали в течение 24 ч. Определяли концентрации в плазме крови, CL, t_{1/2} и F. Уровни лекарства определяли с использованием ВЭЖХ при детекции по радиоактивности и при сцинтиляционном подсчете.

Внутривенное введение L-dC. Среднее значение C_{max} L-dC составляло 112 мкМ и достигалось в самое раннее время, отбора проб (2 мин после введения) у всех животных. Концентрации L-dC в плазме крови снижались бифазным характером после внутривенного введения в виде болуса при среднем значении t_{1/2}, равном 2,85 ч. Среднее значение CL L-dC составляло 0,39 л/ч/кг. Среднее значение V_d равнялось 1,17 л/кг. Большая часть радиоактивности, определенной в моче, приходилась на L-dC. L-dU обнаруживали в плазме крови и моче, что указывало на то, что после внутривенного введения происходит метаболическое элиминирование L-dC. Концентрации L-dU, обнаруживаемые периодически в плазме крови, были на уровне или ниже предела количественного определения со средним значением C_{max}, равным 0,75 мкМ.

Пероральное введение L-dC. Значение C_{max} составляло 1,37 мкМ и достигалось при T_{max}, равном 3 ч. Концентрации L-dC снижались со средним значением t_{1/2}, равным 5,22 ч. L-dC всасывался из желудочно-кишечного тракта с биодоступностью при пероральном введении в пределах от 5,60 до 16,9% при среднем значении 9,57%. Большая часть радиоактивности, определенная в моче, приходилась на L-dC. L-dU обнаруживали в плазме крови и моче, что указывало на то, что после внутривенного введения происходит метаболическое элиминирование L-dC. Концентрации L-dU, обнаруживаемые периодически в плазме крови, были на уровне или ниже предела количественного определения со средним значением C_{max}, равным 0,19 мкМ.

В табл. 18 представлено краткое заключение по результатам фармакокинетических исследований при внутривенном и пероральном введении L-dC.

Таблица 18

Анализ фармакокинетических данных по L-dC (10 мг/кг) после внутривенного и перорального введения лесным суркам

Путь введения (n)	AUC _{t→24^a} (мкМ-ч)	t _{1/2} (ч)	C _{max} (мкМ)	T _{max} (ч)	CL (л/ч/кг)	V _d (л/кг)	F (%)
в/в (3)	174 (±120) ^b	2,85 (±130)	112 (±33)	0	0,39 (±0,3)	1,17 (±0,36)	-
пер-орально (3)	11,3 (±4,7)	5,22 (±2,7)	1,37 (±0,22)	3,0 (±1)	-	-	9,57 (±6,4)

a t=0,033 ч при внутривенном и 0,25 ч при пероральном введении
b среднее значение (±стандартное отклонение)

Пример 23. Биодоступность пролекарств L-dC.

Оценивали биодоступность L-dC, 5'-моноэфира L-dC, дивалинового эфира L-dC и диацетилового эфира L-dC на синомологичных обезьянах с и без L-dT. Когда дивалиновый эфир L-dC вводили перорально обезьянам, всасывалось примерно 73% дозы. Более 99% всосавшегося дивалинового эфира L-dC быстро превращалось в L-dC с получением высокой концентрации L-dC в плазме, и не обнаруживали на детектируемом уровне дивалинового эфира L-dC. Низкую концентрацию моновалинового эфира L-dC в

плазме обнаруживали вскоре после перорального введения дивалинового эфира L-dC. Низкую концентрацию β -L-2'-дезоксигуанидина (L-dU) обнаруживали периодически. Других метаболитов не обнаруживали. Результаты приведены в табл. 19. Как уже указывалось, комбинация 3',5'-дивалинового эфира L-dC с L-dT обеспечивала наиболее высокую биодоступность L-dC.

Таблица 19

	L-dC исходный (ММ=227,22)	L-dC ³ 5'-валин (ММ=399,27)	L-dC 3'-валин (ММ=399,27)	L-dC дивалин (ММ=534,87)	L-dC диацетил (ММ=347,75)
Биодоступность ¹ , %	16,4±5,0	39,0±11,4	85,1±24,5	72,7±22,0	23,0±6,5
Биодоступность, % м/L-dT ²	11,9±1,7	ND	ND	74,6±9,9	24,9±4,0

¹ установлено по отношению к AUC L-dC (пероральное введение)

² совместное введение с L-dT в дозе 10 мг/кг

³ удельная активность 5'-моновалина, основываясь на общей радиоактивной дозе

ND, не определяли

Чистота = 87% L-dC-моновалина, 12% L-dC

Пример 24. Биодоступность однократной дозы дивалил-L-dC у синомологичных обезьян.

Трем незараженным синомологичным обезьянам (тасаса fascicularis) вводили 10 мг/кг диVal-L-dC внутривенно со следовым количеством меченого тритием ($[^3H]$) препарата (250 мкКюри) в стерильном 0,9% физиологическом растворе. После 6-недельного периода выделения тем же трем животным вводили диVal-L-dC в той же дозе перорально. Пробы крови отбирали в пробирки с гепарином перед введением (~18 ч) и через 0,25, 0,50, 1, 2, 3, 4, 6, 8 и 24 ч после введения. Мочу собирали в периоды 0-2, 2-4, 4-8, 8-12 и затем с 12-часовыми интервалами в течение 336 ч после введения. Лекарство количественно определяли в плазме и моче методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS). После введения диVal-L-dC анализировали концентрацию L-dC во времени немоделирующим математическим методом и площадь под кривыми время-концентрация (AUC) получали линейной аппроксимацией методом трапеций. Биодоступность (F) для L-dC после внутривенного или перорального введения диVal-L-dC рассчитывали по AUC для L-dC, где $F = AUC_{\text{перорально}}/AUC_{\text{внутривенно}} \times \text{доза}_{\text{внутривенно}}/\text{доза}_{\text{перорально}}$.

Введенный внутривенно диVal-L-dC быстро превращался в L-dC после внутривенного введения. ДиVal-L-dC обнаруживали в плазме крови через 15 мин (1,39 мкМ) и 30 мин (0,36 мкМ, у 1 из 3 животных) [нижний предел количественного определения (LLOQ) = 0,23 мкМ или 100 нг/мл]. ДиVal-L-dC не обнаруживали в плазме крови через 30 мин после введения. В плазме крови была обнаружена частично дезэтерифицированная форма диVal-L-dC, β -L-2'-дезоксигуанидин-5'-валиновый эфир, через 15 мин (3,23 мкМ), и в течение 2 ч ее концентрация снижалась до 0,08 мкМ (LLOQ = 0,031 мкМ или 10 нг/мл). L-dC представлял основную часть лекарства, находящегося в плазме крови после внутривенного введения. Среднее значение $AUC_{0,25-8}$ для L-dC составляло 19,8 мкМ·ч. Средняя максимальная концентрация в плазме крови (C_{max}) L-dC равнялась 24,6 мкМ (LLOQ = 0,088 мкМ или 20 нг/мл) и достигалась в самое раннее время отбора проб (15 мин после введения) у всех животных. Концентрация в плазме крови L-dC снижалась бифазным характером со средним значением $t_{1/2}$, равным 1,73 ч. Общий клиренс (CL) и кажущийся объем распределения (V_d) для L-dC в среднем, соответственно, равнялись 1,01 л/ч/кг и 2,46 л/кг, что указывает на значительное внесосудистое распределение в тканях. Связывание диVal-L-dC и L-dC с белками плазмы человека *ex vivo* составляло, соответственно, 13,3%±2,6% и 19,7±5,9%. Влияние связывания белками плазмы человека на концентрации диVal-L-dC и свободного L-dC было минимальным, на основании чего можно предположить, что не предполагаются взаимодействия лекарства с участием замещенных мест связывания.

Выделение с мочой было быстрым при выделении 58±3% от введенной дозы диVal-L-dC в течение 2 ч после внутривенного введения. Большая часть (~93%) лекарства, выделенного с мочой, приходилась на L-dC. L-dU также обнаруживали в плазме и моче. На основании этого можно предположить, что после введения диVal-L-dC также имеет место метаболическое элиминирование L-dC. Низкие уровни L-dU обнаруживали периодически в плазме крови у двух из трех животных при концентрациях в пределах от 0,22 до 0,88 мкМ (LLOQ = 0,22 мкМ или 50 нг/мл). У третьей обезьяны детектируемые концентрации L-dU отсутствовали в любые временные точки. Выделение через почки L-dU и частично дезэтерифицированной формы диVal-L-dC, β -L-2'-дезоксигуанидин-5'-валинового эфира было минимальным, составляя примерно, соответственно, 2,5% и 3,7% от общей выделенной дозы. ДиVal-L-dC обнаруживали в моче у одного из трех животных через 2 ч после внутривенного введения, на который приходилось примерно 0,15% от выделенной дозы.

Вследствие периодически появляющихся низких концентраций как моновалиновых эфиров, так и L-dU в плазме и моче, было нецелесообразно проводить фармакокинетический анализ данных метаболитов. Появление моновалинового эфира диVal-L-dC не было неожиданным, поскольку он представляет промежуточный продукт при превращении диVal-L-dC в L-dC. Кроме того, при исследовании клеточно-

го метаболизма в условиях *in vitro* в обезьяньих, крысиных и первичных гепатоцитах человека и в экстрактах клеток HepG2 было показано, что L-dC непосредственно не деаминируется в L-dU, но L-dC монофосфат (-MP) превращается в L-dU-MP, который либо активируется в L-dU-дифосфат (-DP) и трифосфат (-TP), или метаболизируется в L-dU, который затем обнаруживают во внеклеточном пространстве (плазме). L-dU не был цитотоксичным ($CC_{50} > 200$ мкМ), и L-dU-TP имел значение IC_{50} в условиях *in vitro* в отношении дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) полимеразы вируса гепатита В, равное 5,26 мкМ (см. «Микробиологию и вирусологию», раздел 10).

При введении перорально диVal-L-dC также быстро превращался в L-dC после введения через рот, и его не обнаруживали в пробах плазмы крови в любой временной точке (LLOQ диVal-L-dC в растворе = 0,23 мкМ или 100 нг/мл). Частично деэтерифицированный метаболит диVal-L-dC, β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валиновый эфир, обнаруживали в плазме крови через 30 мин и 1 ч при концентрации в пределах от 0,034 мкМ до 0,107 мкМ (LLOQ моноэфира в растворе = 0,031 мкМ или 10 нг/мл). ДиVal-L-dC не обнаруживали в плазме крови.

L-dC представлял основную часть (>99% при C_{max}) концентрации лекарства в плазме крови после введения диVal-L-dC перорально. Среднее значение $AUC_{0,25 \rightarrow 8}$ для L-dC составляло 14,0 мкМ·ч. Значение C_{max} для L-dC равнялось 8,26 мкМ (LLOQ L-dC в растворе = 0,088 мкМ или 20 нг/мл), и оно достигалось через 0,67 ч после введения диVal-L-dC. Концентрация L-dC в плазме крови снижалась бифазным характером со средним значением $t_{1/2}$, равным 2,28 ч. Среднее значение пероральной биодоступности L-dC после введения диVal-L-dC равнялось $72,7\% \pm 22\%$.

L-dU также обнаруживали в плазме крови, что указывает на то, что после перорального введения диVal-L-dC происходит метаболическое элиминирование L-dC. Низкие концентрации L-dU детектировали в плазме крови в течение периода времени от 30 мин до 4 ч у двух из трех животных при концентрациях в пределах от 0,24 мкМ до 0,66 мкМ (LLOQ L-dU в растворе = 0,22 мкМ или 50 нг/мл) и у одного животного только через 8 ч при концентрации 0,39 мкМ.

После перорального введения диVal-L-dC быстро всасывался из желудочно-кишечного тракта и превращался в L-dC в результате первичного кишечного и/или печеночного метаболизма. Метаболизм ни диVal-L-dC, ни L-dC не связан с фракцией микросомальных ферментов печени. После введения диVal-L-dC в высоких дозах временно обнаруживали моновалиновый эфир L-dC перед превращением в L-dC. ДиVal-L-dC не обнаруживали после введения через рот. Периодические низкие концентрации L-dU обнаруживали в плазме крови на уровне или ниже предела количественного определения. L-dU образовывался в результате деаминирования L-dC после поглощения клетками L-dC.

Примерно $31 \pm 8\%$ от введенной перорально дозы было выделено с мочой в течение 4 ч. Через 72 ч было выделено $39 \pm 8\%$. Большая часть (~95%) лекарства, выделенного с мочой, приходилась на L-dC. Выделение L-dU и частично деэтерифицированной формы диVal-L-dC, β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира, почками было минимальным, составляя примерно, соответственно, 2,5 и 0,2% от общей выделенной дозы. ДиVal-L-dC в моче не обнаруживали.

В табл. 20 представлено краткое заключение по результатам фармакокинетических исследований для L-dC после внутривенного и перорального введения диVal-L-dC.

Таблица 20

Анализ фармакокинетических данных после внутривенного и перорального введения диVal-L-dC (10 мг/кг) у синомологичных обезьян
Фармакокинетический параметр²

Путь введения (n)	$AUC_{0,25 \rightarrow 8}$ (мкМ ч)	$t_{1/2}$ (ч)	C_{max} (мкМ)	T_{max} (ч)	CL (л/ч/кг)	V_d (л/кг)	F (%)
в/в (3)	19,8 ($\pm 5,2$)	1,73 ($\pm 0,33$)	24,6 ($\pm 2,6$)	0	1,01 ($\pm 0,32$)	2,46 ($\pm 0,47$)	
пер- орально (3)	14,0 ($\pm 2,4$)	2,28 ($\pm 1,4$)	8,26 ($\pm 0,71$)	0,67 ($\pm 0,3$)	-	-	72,7 (± 22)

(3) среднее значение (\pm стандартное отклонение)

В табл. 21 представлена схема образования метаболита диVal-L-dC, моновалинового производного L-dC, L-dC и L-dU после внутривенного и перорального введения диVal-L-dC. Также указана C_{max} каждого метаболита.

Образование метаболитов при внутривенном и пероральном введении диVal-L-dC

внутривенно (10 мг/кг диVal-L-dC)				
	диVal-L-dC→	моноVal-L-dC→	L-dC→→	L-dU
C_{max}	1,39 мкМ	3,23 мкМ	24,6 мкМ	0,88 мкМ
перорально (10 мг/кг диVal-L-dC)				
	Val-L-dC→	моноVal-L-dC→	L-dC→→	L-dU
C_{max}	не обнаружено	0,11 мкМ	8,26 мкМ	0,66 мкМ

Пример 25. Биодоступность L-dC при пероральном введении диVal-L-dC у синомологических обезьян.

Трем незараженным синомологическим обезьянам самцам (*macaca fascicularis*) вводили 10 мг/кг диVal-L-dC перорально со следовым количеством [3H]-меченого лекарства (250 мкКюри), растворенного в стерильном 0,9% физиологическом растворе. Пробы крови отбирали в пробирки с гепарином перед введением (~18 ч) и через 0,25, 0,50, 1, 2, 3, 4, 6, 8 и 24 ч после введения. Мочу собирали в периоды 0-2, 2-4, 4-8, 8-12 и затем через 12-часовые интервалы в течение 336 ч после введения. Лекарство количественно определяли в плазме крови и моче с использованием ВЭЖХ. После введения диVal-L-dC определяли концентрацию L-dC в плазме крови немоделирующим математическим методом, и площадь под кривыми время-концентрация (AUC) получали линейной аппроксимацией методом трапеций. ДиVal-L-dC быстро всасывался и превращался в L-dC после перорального введения. Анализ проб плазмы крови радиохроматографической высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) подтвердил, что большая часть выделенной радиоактивности представляла L-dC. ДиVal-L-dC определяли только у одного животного через 15 мин после введения при концентрации 0,35 мкМ. Частично дезэтерифицированную форму диVal-L-dC, β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валиновый эфир, не обнаруживали в плазме крови или моче. Примерно 26% от введенной пероральной дозы было обнаружено в моче в течение 8 ч. Через 72 ч было выделено 31%. Большая часть (~89%) лекарства, выделенного с мочой, приходилась на L-dC. Выделение L-dU через почки было минимальным, составляя примерно 10% от выделенной дозы. В моче не обнаруживали ни диVal-L-dC, ни его частично дезэтерифицированную форму.

Фармакокинетический профиль в целом был сравним с таковым, определенным в фармакокинетическом исследовании, что было показано аналогичными соотношениями C_{max} к AUC. Низкие концентрации L-dU детектировали в плазме крови у двух из трех животных при среднем значении C_{max} , равном 0,33 мкМ. В плазме крови третьего животного не было обнаружено L-dU. Концентрация L-dU была на уровне или ниже предела количественного определения, препятствуя проведению фармакокинетического анализа.

Пример 26. Метаболизм диVal-L-dC в условиях *in vitro*.

Были проведены исследования с целью определения стабильности и связывания с белками диVal-L-dC и его дезэтерифицированных метаболитов в плазме человека. ДиVal-L-dC инкубировали в человеческой плазме при 37°C и пробы анализировали в различные временные точки до 24 ч (фиг. 13). ДиVal-L-dC не обнаруживали через 24 ч при полном его превращении в L-dC. Также было отмечено наличие двух дополнительных метаболитов (β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира и β -L-2'-дезоксцитидин-валинового эфира). Непостоянное присутствие метаболитов указывало на то, что они являются промежуточными продуктами при превращении диVal-L-dC в L-dC. В условиях *in vitro* было установлено, что период полураспада диVal-L-dC в плазме человека при 37°C равнялся примерно 39 мин.

Также исследовали влияние связывания с белками плазмы крови человека на свободный уровень диVal-L-dC и L-dC с использованием метода ультрафильтрации. Связывание диVal-L-dC с белками плазмы равнялось 13,3%±2,6%. Связывание L-dC с белками плазмы составляло 19,7±5,9%. В данном опыте было показано, что влияние связывания с белками плазмы крови человека на диVal-L-dC и L-dC было минимальным, и на основании этого можно предположить, что не ожидаются взаимодействия лекарства с участием замены мест связывания.

Пример 27. Метаболическая активация и внутриклеточный профиль L-dC.

Изучали метаболизм L-dC в клетках с использованием клеток HepG2 и первичных гепатоцитов человека. Результаты высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) показывали, что L-dC интенсивно фосфорилировался в гепатоцитах. Основным метаболитом в клетках HepG2, подвергнутых воздействию 10 мкМ L-dC в течение 24 ч, был L-dC-TP, концентрация которого достигала 72,4±1,8 мкМ (см. табл. 23). В первичных гепатоцитах человека концентрация L-dC-TP за 24 ч была равна 90,1±37 мкМ, на уровне, близком к таковому, для фосфорилирования в клетках HepG2. Воздействие на гепатоциты L-dC приводило к активации второго 5'-трифосфатного производного, L-dU-TP. В клетках HepG2, подвергнутых воздействию 10 мкМ L-dC, уровень L-dU-TP достигал 18,2 мкМ (43,5 пМ в первичных гепатоцитах человека) за 24 ч. В первичных крысиных и обезьяньих гепатоцитах степень фосфорилирования L-dC была несколько ниже.

Клетки ^a	n	Активация L-dC (10 мкМ) в гепатоцитах						
		L-dC-MP	L-dU-MP	L-dC-DP	Метаболит (10 мкМ) L-dC-DP- ХОЛИН	L-dU-DP	L-dC-TP	L-dU-TP
HepG2	3	23,3±0,86	6,73±0,41	10,2±1,9	25,6±0,08	2,69±0,45	72,4±1,8	18,2±1,0
первичные гепатоциты человека	3	27,6±1,5	5,74±2,4	7,19±2,3	15,8±1,8	3,93±1,6	90,1±3,7	43,5±2,7
первичные гепатоциты обезьяны	1	11,2	2,54	7,66	10,4	3,11	39,3	21,9
первичные гепатоциты крысы	3	5,09±2,1	3,53±0,97	1,52±0,38	8,82±3,1	7,90±1,4	14,2±3,1	46,9±5,2

(а) Клетки инкубировали в течение 24 ч с [³H]-L-dC, удельная активность: в тесте с HepG2 = 0,5 Кюри/ммоль; в тесте гепатоцитами человека, обезьяны и крысы = 1,0 Кюри/ммоль.

В дополнение к фосфорилированным производным L-dC и L-dU отмечали образование метаболита [β -L-2'-дезоксипонуклеотида]. В культурах клеток HepG2 и первичных гепатоцитах, подвергнутых воздействию 10 мкМ L-dC в течение 24 ч, обнаруживали [3-L-2'-дезокситидин-5'-дифосфохолин] (L-dC-DP-холин), при концентрации 25,6 мкМ (в пределах 25,6-25,7 мкМ) и 12,3 мкМ (в пределах 8,82-15,8 мкМ), соответственно.

Метаболический профиль, полученный через 24 ч воздействия на клетки HepG2 10 мкМ [3H]-L-dC, представлен на фиг. 14. Кажущийся внутриклеточный период полураспада L-dC-TP составлял 15,5±0,34 ч, что коррелировало с пролонгированной противовирусной активностью после отмены лекарства в опытах с восстановлением вируса. Характер фосфорилирования, установленный в первичных гепатоцитах человека в качественном и количественном отношении, был аналогичен таковому, полученному с использованием клеток HepG2 (фиг. 15).

Пример 28. Клеточные киназы, связанные с метаболической активацией.

D-Дезоксицитидин (dCyd) представляет природный субстрат цитозольной dCydкиназы (dCK) и митохондриальной тимидинкиназы (TK2) для превращения в dCyd-5'-монофосфат (dCMP). Цитозольная тимидинкиназа (TK1) и TK2 используют D-тимидин (Thd) в качестве природного субстрата для превращения в Thd-5'-монофосфат (TMP). Клеточная киназа, участвующая в первоначальном фосфорилировании L-dC, была идентифицирована в конкурентных опытах с использованием L-dC и природных эндогенных Thd и dCyd. Внутриклеточное фосфорилирование L-dC снижалось в зависимости от дозы под воздействием dCyd, но не Thd. Таким образом, dCyd действовал в качестве ингибитора фосфорилирования L-dC. Изменение внутриклеточного фосфорилирования L-dC было аналогичным, когда клетки HepG2 подвергались воздействию обоих Thd и dCyd или одного dCyd. На основании ингибирования фосфорилирования L-dC только под воздействием природного дезоксипиримидина, dCyd, было высказано предположение, что dCK участвует в фосфорилировании L-dC.

Роль данных киназ пиримидиновых нуклеозидов в фосфорилировании L-dC дополнительно исследовалась на клеточных линиях с дефицитом киназ. Имело место значительное снижение количества фосфорилированных метаболитов L-dC в клетках с дефицитом dCK. Однако не наблюдали значительного различия в фосфорилировании L-dC в клетках с дефицитом TK1. Эти данные совпадают с результатами исследований по конкуренции, описанных выше, и указывают на то, что dCK играет ключевую роль в фосфорилировании L-dC при его превращении в L-dC-MP.

С использованием цитозольных экстрактов клеток HepG2 в качестве источника ферментов стационарные параметры кинетики фосфорилирования для L-dC, Thd и dCyd были аналогичными, на что указывают значения кажущейся константы Михаэлиса-Ментена (K_m) и максимальной первоначальной скорости (V_{max}) (L-dC: K_m равно 5,75 мМ и V_{max} равно 1,12 ммоль/мин/мг белка; Thd: K_m равно 4,06 мМ и V_{max} равно 1,26 ммоль/мин/мг белка; dCyd: K_m равно 4,85 мМ и V_{max} равно 2,15 ммоль/мин/мг белка). Кроме того, эффективность фосфорилирования L-dC, Thd и dCyd была аналогичной, что определялось их соответствующими значениями V_{max}/K_m (соответственно, 0,19, 0,31 и 0,44).

Кроме того, степень внутриклеточного фосфорилирования L-dC была сравнима с природными эндогенными субстратами, Thd и dCyd, в экстрактах печени лесных сурков. Это было сделано для обоснования тестирования противовирусной активности на модели хронического гепатита на лесных сурках. Фосфорилирование L-dC было аналогичным таковому для эндогенных субстратов. Кроме того, уровень фосфорилирования L-dC был сравним с таковым для L-dC и эндогенных субстратов в экстрактах печени человека.

Пример 29. Противовирусная активность L-dC в отношении гепаднавируса.

Противовирусную активность L-dC в отношении вируса гепатита В человека оценивали по снижению внеклеточной ДНК HBV и репликационных промежуточных соединений по сравнению с необработанными контрольными клетками в клеточной линии гепатомы, экспрессирующей HBV, 2.2.15 (см. табл. 24). Подтверждающее тестирование противовирусной активности L-dC с использованием ряда РНК- и ДНК-содержащих вирусов проводили по программе противовирусных исследований и антимикробной химии НИИ.

L-dC не ингибировал репликацию какого-либо вируса, кроме гепаднавирусов (HBV, DHBV). L-dC обладал высокой противовирусной активностью в отношении репликации HBV в условиях *in vitro*, снижая продуцирование внеклеточной ДНК HBV при EC₅₀, равной 0,24 мкМ (EC₉₀ 1,06 мкМ). Также L-dC уменьшал количество внутриклеточных промежуточных соединений, образующихся при репликации ДНК HBV (RI), при EC₅₀, равной 0,5 мкМ. Кроме того, L-dC приводил к зависимому от дозы ингибированию синтеза ДНК вируса гепатита В утки (DHBV) в культуре первичных утиных гепатоцитов (PDM) при EC₅₀, равной 0,87 мкМ.

Таблица 24

Противовирусная активность, избирательность и цитотоксичность L-dC <i>in vitro</i>		
Вирус (клеточная линия)	EC ₅₀ ^b (мкМ)	CC ₅₀ ^c (мкМ)
HBV (2.2.15)	0,24±0,08	>2000
DHBV (PDH)	0,87	nd ^d
HIV-1 (PBMC)	>200	>200
HSV-1 (HFF) ^e	>100	>100
HSV-2 (HFF) ^e	>100	>100
VZV (HFF) ^e	18,6	>100
EBV (Daudi) ^e	>50	>50
HCMV (HFF) ^e	>100	>100
Грипп А/Н1N1 (MDCK)	>100	>100
Грипп А/Н3N2 (MDCK)	>100	>100
Грипп В (MDCK)	>100	>100
Корь (CV-1)	>100	>100
Парагрипп тип 3 (МА-104)	>100	>100
Риновирус тип 5 (KB)	>100	>100
RSV тип А (МА-104)	>100	>100

а. PDH, первичные утиные гепатоциты; PBMC, периферические моноядерные клетки крови; HFF, фибробласты человека; В-клеточная лимфома Дауди, Буркитта; MDCK, собачьи почечные эпителиальные клетки; CV-1, почечные фибробласты африканской зеленой маргаритки; KB, носоглоточная карцинома человека; МА-104, почечные эпителиальные клетки макаки резус.

б. EC₅₀ = 50% эффективная концентрация.

с. CC₅₀ = 50% цитотоксическая концентрация.

д. nd = не определяли.

е. Данные выражены в большей степени в мкг/мл, чем в мкМ.

Не обнаруживали цитотоксичности при максимальных концентрациях L-dC, тестируемого на любой из клеточных линий или первичных клеточных типах, используемых для поддержания репликации различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Токсичность отсутствовала для PBMC человека, HFF или других типов клеток млекопитающих.

Пример 30. Противовирусная активность L-dC на лесных сурках при введении в течение 28 суток.

Лесные сурки, хронически зараженные WHV, широко применяются в качестве модели HBV-инфекции, и они доказали свою пригодность для оценки эффективности противовирусных агентов в отношении HBV. Выло доказано, что эта модель дает положительный прогноз противовирусной активности для лечения хронической HBV-инфекции и служит в качестве чувствительной системы для оценки безопасности нуклеозидов и их аналогов.

L-dC вводили лесным суркам перорально один раз в день в дозах от 0,01 до 10 мг/кг/день в течение 28 суток. В сыворотке крови определяли уровни ДНК WHV в течение 28 суток лечения лекарством и 56 суток после лечения посредством ДНК-гибридизации с использованием дот-блоттинга (пределы определения примерно 100 геномных эквивалентов (гэв.)/мл сыворотки) и количественной ПЦР (пределы определения 300 гэв./мл сыворотки) (1). Репликация ДНК WHV была значительно подавлена в первые несколько дней лечения, и ингибирование сохранялось во время периода лечения. Сразу же в день перорального введения L-dC вызывал высокий противовирусный эффект, который зависел от дозы, что было установлено ДНК-гибридизацией с использованием дот-блоттинга (фиг. 16).

На фиг. 17 представлена противовирусная активность L-dC для отдельных животных, обработанных 10 мг/кг/день в течение 28 суток, на модели хронического гепатита В на лесных сурках. Заметно, что в группе, обработанной 10 мг/кг/день L-dC, к 14-28 суткам вирусная нагрузка снижалась на 2-6 log по

сравнению с контролем, что определяли с помощью количественной ПЦР. После отмены лекарства вирусная нагрузка достигала уровня, предшествующего лечению, между 1 и 2 недель.

В группе, обработанной ламивудином (10 мг/кг/день, перорально), вирусная нагрузка HBV снижалась примерно на 0,5-1,0 log (гэкв./мл, данные не представлены), что совпадает с ранее проведенными исследованиями при использовании аналогичных концентраций ламивудина, который представляет аналог цитидиннуклеозида (30).

Пример 31. Восстановление вируса в клетках, обработанных L-dC.

Восстановление вируса в клетках 2.2.15, обработанных L-dC, имело место после отмены лекарства. Репликация HBV восстанавливалась до 50% от уровня перед обработкой к 18 суткам после обработки. На основании кинетики восстановления вируса после обработки L-dC можно предположить, что значительное противовирусное действие продолжалось после отмены лекарства, что совпадало с внутриклеточным периодом полураспада L-dC-TP (15,5 ч в клетках HepG2).

Пример 32. Противовирусная активность L-dC в отношении резистентного к лекарствам HBV.

При контролируемых клинических испытаниях ламивудина (100 мг один раз в день), введенного пациентам, зараженным HBV, распространение YMDD-мутантного HBV составляло 14-32% после одного года лечения и 58% после 2-3 лет лечения (18-20). Доказательство наличия мутантного вируса было связано со сниженной ответной реакцией в сравнении с пациентами, подвергнутыми лечению ламивудином, без наличия YMDD-мутаций.

На основании генотипического анализа вирусных изолятов, полученных от пациентов с признаками вновь возникшей репликации HBV во время приема ламивудина, можно предположить, что снижение чувствительности HBV к ламивудину связано с мутациями, приводящими к замене метионина на валин или изолейцин в YMDD-мотиве каталитического домена полимеразы HBV (положение 552) и замене лейцина на метионин в положении 528.

HBV-рекомбинанты, включающие YMDD-мутации, представляют резистентные к ламивудину и несколько менее компетентные в отношении репликации по сравнению с HBV дикого типа в условиях *in vitro* (21). Трифосфатное производное L-dC будет протестировано против ДНК-полимеразы HBV дикого типа и мутантного для сравнения значений IC₅₀. Кроме того, будет проведено тестирование противовирусной активности L-dC в отношении резистентных к ламивудину изолятов HBV и рекомбинантных вирусов с мутациями в положениях 552 и 528.

Кроме того, также предусматривается отбор резистентных к L-dC мутантов HBV в условиях *in vivo* во время продолжительного лечения WHV-зараженных лесных сурков. Уместность отбора резистентных к лекарству мутантов на лесных сурках является неопределенной, поскольку спектр резистентных к ламивудину мутантов на лесных сурках не соответствует таковым, идентифицированным у пациентов, зараженных HBV (20-22). Постановка такого длительного опыта (12-24 месяца) может обеспечить информацией, относящейся к связанному с лечением элиминированию ковалентно замкнутой кольцевой (ccc) ДНК HBV из зараженных гепатоцитов. В настоящее время невозможно использовать ДНВВ в качестве модели *in vitro* для отбора мутаций, приводящих к резистентности к лекарствам, поскольку первичные утиные гепатоциты, использованные в данной модели, не могут поддерживаться в течение продолжительного периода времени, необходимого для отбора резистентного к лекарству вируса.

Пример 33. Комбинированная противовирусная активность и цитотоксичность L-dT+L-dC.

Противовирусную активность в отношении HBV и цитотоксичность комбинации L-dT и L-dC, находящихся примерно в эквимоллярных соотношениях, тестировали на клетках 2.2.15, и было установлено, что они оказывали синергетический эффект в соотношениях 1:1, 1:3 и 3:1 (см. табл. 25).

Комбинированная противовирусная активность L-dT+L-dC на зараженных HBV клетках 2.2.15

Обработка	CC ₅₀ ^a (мкМ)	EC ₅₀ ^b (мкМ)	S. I. ^c (CC ₅₀ /EC ₅₀)	Анализ ^d синергизма (при EC ₅₀)
ЗТС	>1000	0,180±0,007	>5,000	
L-dT	3022	1,2±0,1	2,518	-
L-dC	3000±96	1,1±0,1	2,727	-
L-dT+L-dC (1:1)	>1500	0,297±0,016	>5,051	синергетический
L-dT+L-dC (1:3)	1331±67	0,333±0,023	3,997	синергетический
L-dT+L-dC (3:1)	2957±88	0,409±0,079	7,230	синергетический
L-dT+ЗТС (1:1)	>1000	0,089±0,004	>11,000	синергетический
L-dT+ЗТС (3:1)	1000	0,068±0,004	14,706	синергетический
L-dT+ЗТС (10:1)	>1000	0,191±0,017	>5,000	синергетический
L-dC+ЗТС (1:1)	>1000	0,200±0,013	>5,000	синергетический (аддитивный при высоких концентрациях)
L-dC+ЗТС (3:1)	>1000	0,216±0,013	>5,000	синергетический
L-dC+ЗТС (10:1)	>1000	0,084±0,006	>11,000	синергетический

a CC₅₀ = концентрация лекарства, при которой наблюдается 50% ингибирование поглощения нейтральной красной краски (по сравнению с необработанными культурами).

b EC₅₀ = концентрация лекарства, при которой наблюдается 10-кратное уменьшение содержания ДНК HBV-вириона (по сравнению с необработанными культурами).

c Значения EC₅₀ использовали для расчета показателя избирательности (S.I.), поскольку снижение содержания ДНК HBV менее, чем в три раза, обычно статистически недостоверно в данном тесте.

d Анализ эффективности комбинированных обработок лекарством проводили комбинированной программой для оценки CalcuSyn (Biosoft, Inc.).

Пример 34. Оценка токсичности L-dC в отношении клеток-предшественников костного мозга человека.

Наличие миелосупрессорного действия некоторых аналогов нуклеозидов привело к необходимости тестирования на потенциальное действие в отношении роста клеток-предшественников костного мозга в клоногенных тестах. В частности, анемия и нейтропения являются наиболее частыми, вызываемыми лекарством клиническими токсическими проявлениями, относящимися к лекарству зидовудину (ZDV), эффективному против HIV. Данную токсичность смоделировали в тесте *in vitro*, в котором используются клетки костного мозга, полученные от здоровых добровольцев (Sommadossi J-P, Carlisle R. «Toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine for normal human hemotopoietic progenitor cells *in vitro*» Antimicrob Agents Chemother 1987, 31 (3), 452-454). Было показано, что ZDV непосредственно ингибирует гранулоцитарно-макрофагальную колониобразующую (КОЕ-ГМ) и эритроидную бурстобразующую активность (БОЕ-Е) при применении в клинике при концентрациях 1-2 мкМ. С использованием клоногенных тестов на костном мозге человека с ZDV в качестве положительного контроля и ламивудином в качестве отрицательного контроля, L-dC имел IC₅₀ в КОЕ-ГМ и БОЕ-Е при концентрации >10 мкМ (см. табл. 26).

Таблица 26

Токсичность L-dC для костного мозга на клетках-предшественниках гранулоцитов и макрофагов и клетках-предшественниках эритроцитов

Соединение	КОЕ-ГМ ^a	БОЕ-Е ^a
	IC ₅₀ (мкМ)	IC ₅₀ (мкМ)
L-dC	>10	>10
Ламивудин	>10	>10
ZDV	1,8	0,7

a Значения представляют результаты трех независимых опытов в трех повторностях

Пример 35. Тест на митохондриальную токсичность для L-dC.

Аналоги противовирусных нуклеозидов, разрешенные для лечения HIV, такие как ZDV, ставудин (d4T), диданозин (ddI) и залцитабин (ddC), также связаны с ограничивающей их применение в клинике замедленной токсичностью, такой как периферическая невропатия, миопатия и панкреатит (8-11). Дан-

ные клинические побочные эффекты возникают в результате подавления функции митохондрий за счет уменьшения содержания митохондриальной ДНК (мтДНК) и включения аналогов нуклеозидов в мтДНК. Кроме того, конкретный аналог нуклеозидов, фиалуридин (FIAU) вызывает печеночную недостаточность, панкреатит, невропатию, миопатию и молочный ацидоз за счет непосредственной митохондриальной токсичности. Связанное с лекарством увеличение продуцирования молочной кислоты может рассматриваться в качестве маркера нарушенной функции митохондрий или окислительного фосфорилирования.

Для оценки потенциальной возможности L-dC вызывать митохондриальную токсичность проводили несколько опытов в условиях *in vitro* с использованием клеточной линии гепатомы человека HepG2. Данные исследования включали анализ продуцирования молочной кислоты, содержания мтДНК и определение изменений в морфологии (например, исчезновение крист, растворение и набухание матрикса и образование жировых капель) ультраструктуры митохондрий. Данные по воздействию L-dC на митохондрии представлены в табл. 27.

Не наблюдали различий в концентрации молочной кислоты, образованной в клетках при продолжительной обработке L-dC и в необработанных клетках. Продуцирование молочной кислоты в клетках, обработанных ZDV и FIAU, увеличивалось на 100% по сравнению с контролем на растворитель. Воздействие L-dC на клетки HepG2 в течение 14 суток при концентрации до 10 мкМ не оказывало влияния на содержание митохондриальной ДНК по сравнению с 87% снижением в ddC-обработанных клетках. Через 14 суток воздействия 10 мкМ L-dC исследовали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии ультраструктуру клеток HepG2 и, в частности, митохондрий. Не было обнаружено серьезных изменений в структуре клеток и морфологии митохондрий. Размеры и организация митохондриальных крист была в норме. В обработанных ZDV клетках наблюдали типичные набухшие митохондрии с потерей крист. Морфология митохондрий была также аномальной в клетках, обработанных ddC и FIAU.

Таблица 27

Влияние L-dC на пролиферацию гепатоцитов, функцию и морфологию митохондрий в клетках HepG2

Соединение	CC ₅₀ ^a (мкМ)	Конц. (мкМ)	% от контроля		Образование жировых капель	Морфология мито- хондрий
			L-лактат	мтДНК		
Контроль	-	-	100	100	отрицат.	нормальн.
L-dC	>2000	10	101±2	107±8	отрицат.	нормальн.
FIAU	4	10	203	86	положит.	аномальн.
ZDV	14	50	239±34	119	отрицат.	аномальн.
ddC	20	1	95±4,4	13	отрицат.	аномальн.

a CC₅₀ после 14 суток обработки

Пример 36. Тест на токсичность L-dC в отношении ДНК-полимераз человека α , β и γ .

Нуклеозиды и аналоги нуклеозидов обычно метаболизируются внутри клеток с превращением в их TP-производные. Обычно клеточные ДНК-полимеразы ответственны за нормальный ядерный и митохондриальный синтез и репарацию ДНК. Поскольку TP-метаболиты являются потенциальными субстратами для ДНК-полимераз, были проведены исследования с целью определить, насколько ингибируются ДНК-полимеразы человека под воздействием L-dC-TP.

Аналог нуклеозидов, 3'-амино-3'-дезокситимидин (АМТ) TP, ингибировал ДНК-полимеразу человека α на 30% при концентрации 10 мкМ. ДНК-полимеразы человека β и γ ингибировались под действием ddC-TP, соответственно, на 50% (5 мкМ) и 35% (2,5 мкМ). L-dC-TP и L-dU-TP не оказывали ингибирующего действия на ДНК-полимеразы человека α , β и γ до концентрации 100 мкМ (табл. 28). На основании данных результатов можно предположить, что TP L-dC и L-dU обладают низкой аффинностью в отношении данных ядерных и митохондриальных ДНК-полимераз человека, что совпадает с благоприятным профилем безопасности L-dC, наблюдаемым в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Таблица 28

Влияние L-dC-TP на ДНК-полимеразу вируса гепатита В и ДНК-полимеразы человека α , β и γ

Субстрат ^a	IC ₅₀ (мкМ)			
	Вирусная ДНК- полимераза ^b	ДНК- полимераза человека α ^c	ДНК- полимераза человека β ^c	ДНК- полимераза человека γ ^c
L-dC-TP	1,82±0,23	>100	>100	>100
L-dU-TP	5,26±2,4	>100	>100	>100
Ламивудин-TP ^d	0,50±0,1	>5	1,2	0,01
L-FMAU-TP ^d	0,15±0,05	>50	>50	>50
L-ddA-TP	2,0±0,3	>100	>100	>100

a Каждый ряд данных представляет среднее арифметическое и, где приводится, стандартное отклонение трех независимых опытов.

b ДНК-полимеразы WHV.

c 3'-Амино-3'-дезокситимидин TP ингибировал полимеразу α на 30% при концентрации 10 мкМ; ddC-TP ингибировал полимеразу β на 50% при концентрации 5 мМ и полимеразу γ на 35% при концентрации 3,5 мкМ.

d Данные по воздействию ламивудина-TP и L-FMAU-TP на ДНК-полимеразу человека приведены из Chang et al. (13) и Yao et al. (14), соответственно.

Пример 37. Токсичность диVal-L-dC в отношении крыс.

Определяли токсичность диVal-L-dC при однократном пероральном введении крысам. В опыте в целом участвовало 40 животных (крысы Спрегью-Даули, в возрасте от 6 до 8 недель); десять животных в каждом случае в отдельности (пять самцов и пять самок) произвольно разделяли на получивших однократно перорально диVal-L-dC в одной из трех доз, выбранных из ряда доз в данном исследовании (500, 1000 или 2000 мг/кг) или контрольных животных. За животными наблюдали в течение 15 суток. Наблюдения за животными в клетках на состояние, близкое к гибели, или падеж регистрировали дважды в день. Клинические наблюдения и определение массы тела проводили один раз в день на 1, 8, 14 и 15 сутки. Также на 15 сутки отбирали пробы крови для определения гематологических и биохимических показателей. После завершения обследования на 15 сутки животных усыпляли и подвергали полному патологоанатомическому исследованию, которое включало макроскопическое обследование внешней поверхности тела, всех отверстий и черепной, грудной и брюшной полостей и их содержимого. Также определяли массу тела и отдельных органов и соотношения массы органа-к-массе тела и массы органа-к-массе мозга.

Очевидных признаков токсичности не наблюдали в данном опыте, и не было установлено связанных с лекарством эффектов на массу тела, массу органов, и не обнаруживали клинических патологических признаков. Отсутствовали связанные с лекарством нарушения гематологических или биохимических показателей. Кроме того, отсутствовали в результате воздействия лекарства макроскопические участки поражения при вскрытии. Основываясь на результатах данного опыта, NOAEL (недействующая доза) для диVal-L-dC после однократного перорального введения крысам была установлена на уровне 2000 мг/кг.

Пример 38. Токсичность диVal-L-dC в отношении обезьян.

Оценивали потенциальную токсичность диVal-L-dC в пяти возрастающих дозах в отношении синологических обезьян. Каждое из четырех животных (два самца и две самки) получали в целом пять доз диVal-L-dC перорально, один раз каждую дозу (20, 100, 500, 1000 и 2000 мг/кг) на 1, 4, 7, 10 и 14 сутки, соответственно. Наблюдения за животными в клетках на состояние, близкое к гибели, или падеж регистрировали дважды в день. Клинические наблюдения проводили ежедневно. Отбирали пробы крови для определения гематологических и биохимических показателей и массы тела перед обработкой на 1, 4, 7, 10 и 14 сутки и перед вскрытием на 17 сутки. После завершения обследования на 17 сутки всех животных усыпляли и проводили полное патологоанатомическое вскрытие, включая макроскопическое обследование и отбор большинства тканей.

Не было обнаружено связанных с обработкой лекарством аномалий. После введения первой дозы на 1 сутки у каждого животного была установлена потеря массы тела примерно на 0,6 кг. Начиная с 4 суток и в последующие сутки опыта, все животные сохраняли массу тела.

Были отмечены следующие наблюдения по отдельным гематологическим показателям. На 17 сутки снизилось число эритроцитов (RBC), гемоглобин (HGB) и гематокрит (HCT) (примерно на 15-27%), суммарно у всех четырех животных по сравнению со значениями на 1 сутки. Исключение составляло животное № 1001 (самец), на каждой временной точке изменения данных параметров составляли <10% от ранее установленного значения. У животного № 1001 на 4 сутки значения RBC, HGB и HCT снизились примерно на 18% по сравнению со значениями на 1 сутки; следовательно, в целом изменения для данного животного составляли < $\pm 9\%$. Причина данного первоначального изменения неизвестна, и токсикологическое значение является неопределенным. На 1 сутки число лейкоцитов (WBC) было заметно выше у животного № 1101 (самка, $36,3 \times 10^3$ клеток/мл), но к 4 суткам оно снижалось примерно на 55%. Абсолютное количество полиморфоядерных лейкоцитов (APLY) и процент полиморфоядерных лейкоцитов (PLY) также снижались (соответственно, на 73 и 40%) к 4 суткам по сравнению с повышенными уровнями на 1 сутки. Изменения колебались в остальные дни опыта. Токсикологическое значение является неопределенным.

Были отмечены следующие наблюдения для отдельных биохимических показателей сыворотки крови. На 17 сутки уровень азота мочевины (BUN) снижался (в целом на ~43%) у всех обезьян по сравнению со значениями на 1 сутки. Данные суммарные изменения находятся в пределах от -39 до +46%. Данные изменения были у всех обезьян в опыте, однако, их токсикологическое значение не ясно.

Основываясь на результатах данного опыта, NOAEL для диVal-L-dC после однократного перорального введения обезьянам через желудочный зонд была установлена на уровне 2000 мг/кг.

Пример 39. Токсичность L-dC на лесных сурках при введении в течение 28 суток.

Модель хронического гепатита В на лесных сурках является ценной для доклинической токсикологической оценки аналогов нуклеозидов. На данной модели была установлена замедленная тяжелая гепатоцеллюлярная токсичность, индуцированная FLAU, у людей, которую не обнаруживали при проведе-

нии доклинических исследований на грызунах или приматах. Индуцированная FLAU токсичность, наблюдаемая на лесных сурках, включающая значительную потерю массы, отказ от корма и гепатоцеллюлярное повреждение, установленное при исследовании биопсийного материала печени, была установлена, начиная с 6-8 недель от начала лечения, и она была аналогичной наблюдаемой у пациентов, зараженных HBV, при лечении FLAU.

Определяли противовирусную активность и безопасность L-dC, а также восстановление вируса после лечения на зараженных вирусом гепатита (WHV) лесных сурков. Новорожденных лесных сурков самцов и самок заражали подкожным введением разбавленной сыворотки носителей WHV, и они все были хроническими носителями WHV. Произвольно животных (в возрасте 16-18 месяцев) разделяли на сравнимые группы на основе массы тела, активности γ -глутамилтрансферазы (GGT), пола и концентрации ДНК WHV ($>10^{11}$ геномных эквивалентов/мл сыворотки), что определяли дот-блоттингом.

Трем животным, в каждом случае в отдельности, вводили перорально L-dC в дозах 0,01, 0,1, 1,0 или 10,0 мг/кг/день в течение 28 суток. Кроме того, три животных получали ламивудин в дозе 10 мг/кг/день перорально в течение 28 суток. Четверем животным вводили растворитель в качестве контроля по аналогичной схеме. У всех животных прослеживали восстановление WHV еще в течение 56 суток после лечения. Пробы крови на содержание ДНК WHV отбирали на -7, 0, 3, 7, 14, 21 и 28 сутки, концентрацию ДНК WHV также определяли на 1, 3, 7, 14, 28 и 56 сутки после лечения. Концентрацию ДНК WHV определяли полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Одновременно фиксировали массу тела и соответственно доводили дозу лекарства. В случае, когда наблюдали признаки токсичности, проводили определение клинических биохимических и гематологических показателей. Проводили патологоанатомическое обследование, включая гистологическое исследование тканей, у одного животного, которое пало во время опыта.

В течение 4-недельного периода лечения или 8-недельного периода после лечения признаков токсичности не наблюдали. Кроме того, не было потери массы тела ни в одной группе, обработанной L-dC по сравнению с контрольными животными (фиг. 18). Все животные прибавляли в массу тела аналогично контрольным животным в течение 84-дневного периода опыта. Одно животное (#98051), получавшее препарат в дозе 0,1 мг/кг/день, пало на 8 сутки после окончания лечения. В результате патологоанатомического обследования была обнаружена большая гепатокарцинома (8×5×2 см) в левой латеральной доле печени, и падеж был отнесен за счет опухоли печени. Гепатоцеллюлярные неоплазмы на данной модели обнаруживаются в возрасте 9 месяцев и становятся причиной падежа в возрасте 15 месяцев. Падеж данного животного был отнесен за счет гепатоцеллюлярной карциномы, которая является ожидаемым компонентом естественного протекания WHV-инфекции, и он не рассматривался, как связанный с лечением L-dC, поскольку отсутствовали признаки, указывающие на то, что токсичность препарата является причиной падежа животного.

Пример 40. Токсичность L-dC на лесных сурках при введении в течение 12 недель.

Определяли противовирусную активность и безопасность L-dC на лесных сурках. В данном опыте четверем животным, в каждом случае в отдельности, вводили L-dC в дозе 1,0 мг/кг/день или растворитель в качестве контроля в течение 12 недель. Еще четыре животных получали L-dC вместе с другим аналогом нуклеозидов, L-dT. Произвольно животных разделяли на сравнимые группы по полу, массе и уровням ДНК WHV и активности GGT в сыворотке крови до лечения.

Концентрацию ДНК WHV и массу тела определяли на 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 42, 56 и 84 дни, а также на 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 и 84 дни после лечения. Уровень ДНК WHV определяли количественной ПЦР. Соответствующие пробы для определения гематологических, биохимических показателей сыворотки, серологии на WHV и биопсийный материал печени отбирали перед лечением и на 84 сутки. Концентрацию лекарства в плазме крови определяли в пробах, отобранных через 2,5 ч после введения на 0; 14 и 84 сутки.

L-dC (1 мг/кг/день, перорально) хорошо переносился, и токсичность, связанная с лекарством, не проявлялась в течение 12 недель или в течение 12 недель после лечения. Виремия WHV у лесных сурков с хронической инфекцией, подвергнутых лечению L-dC в течение 12 недель (1 мг/кг/день, перорально), снижалась на 0,5-1 \log_{10} к концу 12 недель лечения, аналогично ответной реакции в 28-дневном опыте в этой же дозе. В данное исследование входили дополнительные группы, обработанные L-dT в дозе 1 мг/кг/день, и L-dC (1 мг/кг/день) плюс L-dT (1 мг/кг/день), введенные в комбинации. Данная комбинация L-dC и L-dT снижала вирусную нагрузку до пределов определения аналогично тому, что наблюдали во время лечения L-dC или L-dT в дозе 10 мг/кг/день в 28-дневном опыте. Отсутствовало различие в массе тела между животными в группах, обработанных L-dC, и контрольной группой (см. фиг. 19). Одно животное в контрольной группе пало на 8 неделе; при вскрытии выявленной причиной смерти стала дегенерация и разрыв аорты. Хотя это и необычно, спонтанный разрыв восходящей части аорты наблюдался у незараженных и зараженных WHV лесных сурков. Масса у всех животных несколько снижалась в течение 24-недельного периода опыта. В предшествующем опыте было установлено, что данное незначительное снижение массы имело место за счет впадения в зимнюю спячку (B. Tennant, DVM; Marmothech, Inc.). Биохимические показатели сыворотки крови и гематологические параметры у всех животных были

в нормальных пределах перед и через 12 недель опыта. Во всех группах гистоморфология ткани печени, что оценивали микроскопией, была в норме. Отсутствовали признаки жирового изменения (микровезикулярный стеатоз).

Пример 41. Токсикокинетика многократных доз диVal-L-dC на синомологичных обезьянах.

Определяли потенциальную токсичность и фармакокинетику диVal-L-dC после перорального введения в течение 25 суток синомологичным обезьянам. Восемь животных (четыре самца и четыре самки) произвольно разделяли для введения диVal-L-dC перорально в одной из трех доз (500, 1000 и 2000 мг/кг) или растворителя в качестве контроля один раз в день в течение 25 суток (общее N = 32). Наблюдения за животными в клетках на состояние, близкое к гибели, и падеж регистрировали дважды в день, и клинические наблюдения проводили один раз в день. Массу тела определяли перед обработкой, на 1, 8, 15 и 25 сутки и перед умерщвлением на 26 сутки. Потребление корма фиксировали ежедневно и выражали в среднем за неделю. Физические и офтальмологические обследования и анализ мочи проводили перед обработкой и при вскрытии. По завершении обследований на 26 сутки всех животных подвергали эвтаназии и полностью патологоанатомическому обследованию, которое включало макроскопическое исследование внешней поверхности тела, всех отверстий и черепной, грудной и брюшной полостей и их содержимого. Также определяли массу тела и отдельных органов и соотношение массы органов к массе тела и массу органов к массе мозга. Полученные при полном патологоанатомическом вскрытии ткани оценивал гистоморфологически дипломированный ветеринарный патологоанатом.

А. Масса тела.

Все животные либо сохраняли, либо прибавляли в массу тела во время опыта, за исключением животных № 2002 (группа с дозой 500 мг/кг) и 4001 и 4003 (группа с дозой 2000 мг/кг), у которых наблюдали потерю массы тела на 0,1 кг на 25 сутки (по сравнению с 1 сутками). Статистически значимые различия между самцами в контрольной группе и самцами в обработанных диVal-L-dC группах не были отнесены за счет проявления токсичности, поскольку средняя масса тела у контрольных животных перед началом опыта была выше по сравнению со средней массой в группах, подвергнутых обработке, на 0,13-0,25 кг.

В. Потребление корма.

В течение опыта у всех животных сохранялось адекватное потребление корма с ожидаемой вариабельностью. Среднее потребление печени было меньше, чем у контрольных самцов, в группе самцов, получавших лекарство в дозе 500 мг/кг на 8/9; 15/16 и 16/17 сутки; в группе самцов с дозой 1000 мг/кг на 24/25 сутки и в группе самцов с дозой 2000 мг/кг на 8/9, 15/16, 16/17, 20/21 и 23/24 сутки. Небольшим отличием, отмеченным у самок, было снижение потребления корма в группе самок, получавших лекарство в дозе 2000 мг/кг на 7/8 сутки. Данные различия не рассматриваются, как проявление токсичности.

С. Клиническая патология.

Гематология. На 1 сутки перед началом обработки отсутствовали различия между контрольными и опытными группами по всем гематологическим параметрам. На 26 сутки был отмечен ряд статистически достоверных различий по показателям, касающимся эритроцитов, включая пониженное число эритроцитов (RBC) (у всех обработанных самок), пониженный гемоглобин (HGB) (у всех обработанных самцов) и сниженный гематокрит (HCT) (у животных опытных групп обоего пола). У самцов также отмечали пониженное RBC, но различия не носили статистически значимый характер. Концентрация гемоглобина была также ниже у обработанных самок, но это не было статистически достоверным. По сравнению с 1 сутками RBC, HGB и HCT снижались на 26 сутки у контрольных и обработанных диVal-L-dC самцов и самок. Однако относительные снижения, наблюдаемые у контрольных животных, были меньше, чем отмеченные у животных, получавших диVal-L-dC. Данные результаты указывают на наличие клинической негемолитической анемии, однако, зависимость ответной реакции от дозы была минимальной и на основании гистопатологической оценки было высказано предположение, что за этот эффект был ответственен костный мозг. Следовательно, маловероятны какие-либо прогрессирующие или долговременные эффекты.

Для лейкоцитов имело место снижение абсолютного числа полиморфоядерных лейкоцитов (APLY) (в группах самок, получавших лекарство в дозах 500 мг/кг и 1000 мг/кг, и в группах самцов и самок с дозой 2000 мг/кг), пониженный процент полиморфоядерных лейкоцитов (PLY) (в группах самок, получавших лекарство в дозах 1000 мг/кг и 2000 мг/кг) и повышенный процент лимфоцитов (LYM) (в группе самцов с дозой 2000 мг/кг и группах самок с дозами 1000 мг/кг и 2000 мг/кг).

Биохимические показатели сыворотки крови. Средние значения активности щелочной фосфатазы (ALK) для всех обработанных самцов были значимо ниже по сравнению со средним значением ALK в контрольной группе на 26 сутки. Также были повышены средние значения концентрации глобулина (GLOB) и кальция (CAL) в группе самцов с введением лекарства в дозе 2000 мг/кг на 26 сутки. Данные изменения не рассматривались, как клинически значимые. Средние показатели уровня калия (K) были выше у самцов, получавших лекарства в дозах 1000 и 2000 мг/кг, по сравнению с контрольной группой, и это можно отнести за счет негемолитической анемии, имеющей место в данных опытных группах. У самок на 26 сутки изменения каких-либо биохимических показателей сыворотки крови отсутствовали.

Анализ мочи. Среднее значение рН мочи было несколько ниже в группе самцов, получавших лекарство в дозе 2000 мг/кг, и в группе самок с дозами 1000 и 2000 мг/кг, но различия не носили статистически значимый характер. Заслуживает внимания и совпадает с подкислением мочи отсутствие кристаллов в моче в группах самцов и самок с самой высокой дозой лекарства.

D. Массы органов.

Статистически значимое падение массы органов отмечали для легких (абсолютная) в группах самцов при дозах 1000 и 2000 мг/кг и относительной массы тимуса (тимус: мозг) в группе самцов при дозе 2000 мг/кг. Однако данные различия не рассматривались, как проявление токсичности.

E. Патологоанатомические исследования.

Макроскопические. Макроскопические данные, которые можно было бы интерпретировать, как относящиеся к введению диVal-L-dC, отсутствовали. Результаты макроскопических исследований были типичными, как обычно присутствующие в качестве случайных у приматов, не относящихся к человеку.

Микроскопические. Атрофия тимуса была единственным микроскопическим признаком, который можно было бы интерпретировать в качестве относящегося к воздействию лекарства. Частота и выраженность атрофии тимуса возрастала в группах самцов и самок, которым лекарство вводили в дозах 1000 и 2000 мг/кг, но это отсутствовало в группе животных с дозой 500 мг/кг. Однако клиническую значимость атрофии тимуса сочли сомнительной. Зависимость реакции от дозы была низкой, это воздействие отмечали не у всех самцов в группах с дозой 1000 мг/кг и 2000 мг/кг, и обычно атрофия тимуса проявляется у приматов с возрастом. Другими микроскопическими признаками, отмеченными в данном опыте, были незначительные воспалительные или дегенеративные изменения обычного типа и частоты, наблюдаемые у приматов в этом возрасте.

Токсикокинетика. Пробы крови для определения гематологических и биохимических показателей сыворотки отбирали на 1 сутки перед обработкой и перед убоем на 26 сутки. Пробы крови отбирали для фармакокинетических исследований на 25 сутки от каждого животного в следующие периоды времени после введения: 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 и 24 ч. Из крови готовили плазму и анализировали на содержание диVal-L-dC и трех метаболитов: L-dC, L-dU и частично дезэтерифицированной формы диVal-L-dC, β -2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира. Количественно можно было определить только L-dC и β -2'-дезоксцитидин-5'-валиновый эфир. Средние данные по показателю концентрация-время для групп с дозами 1000 и 2000 мг/кг подвергали некомпонентному фармакокинетическому анализу с использованием WinNonlin 1,5 (модель 200). Анализ по группе с дозой 500 мг/кг находится в работе.

Концентрация β -2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира в плазме крови на 25 сутки достигала максимальных значений (C_{max}) через 1 ч (среднее значение T_{max}) после перорального введения диVal-L-dC по сравнению со средним значением T_{max} , равным 2-4 ч для L-dC. Однако значения C_{max} для β -2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира были примерно на 2 порядка ниже, чем для L-dC. После достижения C_{max} концентрация L-dC снижалась выраженным биэкспоненциальным образом для каждой группы. Установленные средние значения периода полураспада в терминальной фазе составляли примерно 4-5 ч для самцов и самок в группах с обеими дозами. Однако данные значения периода полураспада следует рассматривать в качестве минимальных значений, поскольку большая часть индивидуальных значений основывалась на данных от 6 до 12 ч после введения, в периоде времени, при котором терминальные фазы не могут быть полностью охарактеризованы. Средние значения концентрации β -2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира также снижались после достижения C_{max} , но терминальные фазы не были адекватно определены для установления периода полураспада.

Средние значения C_{max} для L-dC и β -2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира были аналогичны для самцов и самок в группах с каждой дозой, за исключением самцов, получавших лекарство в дозе 1000 мг/кг, у которых они были ниже наполовину по сравнению с самцами с дозой 2000 мг/кг. Следовательно, оказалось, что C_{max} возрастала с дозой только у самцов, получавших лекарство в дозе 1000 мг/кг.

Сравнение AUC_{last} для L-dD у самцов и самок было аналогичным таковым, отмеченным для C_{max} у самцов в группе с дозой 1000 мг/кг, у которых значения были ниже примерно наполовину, чем AUC_{last} у самцов с дозой 2000 мг/кг. Сравнение значений AUC_{last} β -2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира показало отсутствие половых различий и оказалось, что AUC_{last} возрастала прямо пропорционально увеличению доз.

На основании данных можно предположить, что при пероральном введении диVal-L-dC быстро превращается в дезэтерифицированную форму диVal-L-dC, β -2'-дезоксцитидин-5'-валиновый эфир и затем L-dC, но в целом воздействие в 100 раз выше для L-dC, чем для β -2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира. Воздействие в целом метаболита β -2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира, по-видимому, возрастает примерно в линейной зависимости с увеличением дозы.

Обобщенные данные токсикокинетических исследований представлены в табл. 29.

Фармакокинетический анализ многократных доз диVal-L-dC при пероральном введении в дозах 1000 и 2000 мг/кг на обезьянах

Доза (мг/кг/день)	Пол	(n)	Фармакокинетический параметр ¹					
			C _{max} (мг/мл)	T _{max} (ч)	T _{last} (ч)	AUC _{last} (мг·ч/мл)	AUC (мг·ч/мл)	t _{1/2} (ч)
L-dC								
1000	самцы	(4)	66,7 (±29,1)	2	12	273 (±107)	295 (±110)	4,1 (±1,8)
1000	самки	(4)	106 (±39)	2	12	429 (±19)	468 (NA)	3,7 (NA)
2000	самцы	(4)	116 (±13)	4	12	668 (±127)	726 (±114)	3,8 (±1,3)
2000	самки	(4)	103 (±12)	2	24	567 (±208)	598 (±220)	5,1 (±1,7)
Фармакокинетический параметр ¹								
Доза (мг/кг/день)	Пол	(n)	C _{max} (мг/мл)	T _{max} (ч)	T _{last} (ч)	AUC _{last} (мг·ч/мл)	AUC (мг·ч/мл)	t _{1/2} (ч)
β-L-2'-дезокситидин-5'-валиновый эфир								
1000	самцы	(4)	0,624 (±0,273)	1	5	1,46 (±0,45)	ID	ID
1000	самки	(4)	1,23 (±0,25)	1	4	1,90 (±0,41)	ID	ID
2000	самцы	(4)	1,64 (±0,42)	1	10	3,66 (±0,88)	ID	ID
2000	самки	(4)	1,29 (±0,28)	1	8	3,67 (±0,42)	ID	ID

¹ Средние значения (± стандартное отклонение) на 25 сутки

² n=4 для всех параметров как для L-dC, так и β-L-2'-дезокситидин-5'-валинового эфира, за исключением группы самок, которым вводили дозу 2000 мг/кг, для которых n=3, и для AUC и t_{1/2} для группы самок с дозой 1000 мг/кг, где n=2 за счет неадекватной характеристики терминальной фазы

³ Срединные (в большей мере, чем средние) значения представлены для T_{max} и T_{last}

NA = не применимо

ID = недостаточно данных для определения терминальной фазы для всех животных

Пример 42. Токсикокинетика диVal-L-dC при многократном введении на крысах.

Определяли потенциальную токсичность и фармакокинетику диVal-L-dC после перорального введения в течение 28 суток крысам. Двадцать животных (10 самцов и 10 самок) произвольно разделили для введения диVal-L-dC перорально одной из трех доз (500, 1000 и 2000 мг/кг) или растворителя в качестве контроля один раз в день в течение 28 суток. Наблюдения за животными в клетках на состояние, близкое к гибели, и падеж регистрировали дважды в день, и клинические наблюдения проводили один раз в день. Массу тела определяли перед обработкой на 1, 8, 15, 22 и 28 сутки и перед умерщвлением на 29 сутки. Потребление корма фиксировали ежедневно и выражали в среднем за неделю. Физические и офтальмологические обследования и анализ мочи проводили перед обработкой и при вскрытии. По завершении обследований на 29 сутки всех животных подвергали эвтаназии и полному патологоанатомическому обследованию, которое включало макроскопическое исследование внешней поверхности тела, всех отверстий и черепной, грудной и брюшной полостей и их содержимого. Также определяли массу тела и отдельных органов и соотношение массы органов к массе тела и массы органов к массе мозга. Полученные при полном патологоанатомическом вскрытии ткани оценивал гистоморфологически дипломированный ветеринарный патологоанатом.

А. Масса тела.

Средние значения массы тела в группе самцов, получавших лекарство в дозе 2000 мг/кг, были достоверно ниже на 22 и 28 сутки по сравнению со средним значением в контрольной группе самцов. Среднее значение массы тела в группе самок с дозой 2000 мг/кг на 28 сутки было также достоверно ниже, чем среднее значение у самок контрольной группы.

В. Потребление корма.

Потребление корма было снижено в группе самцов с дозой 2000 мг/кг в течение всего опыта. Также потребление корма в группе самцов, получавших лекарство в дозе 1000 мг/кг, в течение третьей недели опыта было достоверно ниже по сравнению с контрольной группой самцов. Потребление корма было достоверно ниже у самок, которым лекарство вводили в дозах 1000 и 2000 мг/кг в течение второй, третьей и четвертой недель опыта.

С. Клиническая патология.

Гематология. На 29 сутки был отмечен ряд статистически достоверных различий по показателям, касающимся эритроцитов. Число эритроцитов (RBC) было достоверно ниже у самцов и самок при всех трех дозах (500, 1000 и 2000 мг/кг). Уровень гемоглобина (HGB) снижался в группе самцов, получавших лекарство в дозе 2000 мг/кг, и в группе самок с дозой 1000 мг/кг и в группе самок с дозой 2000 мг/кг. Было отмечено снижение гематокрита (HCT) в группах самцов и самок, которым лекарство вводили в дозе 1000 и 2000 мг/кг. Средний объем клеток (MCV) был достоверно выше в группах самцов с дозами 500, 1000 и 2000 мг/кг и в группах самок с дозами 500 и 1000 мг/кг. Среднее содержание гемоглобина (MCH) в клетках было достоверно выше в группах самцов и самок, получавших лекарство в дозах 500, 1000 и 2000 мг/кг. Средняя концентрация гемоглобина в клетках (MCHC) была повышена у самок при дозе 1000 мг/кг. Число эритроцитов с ядрами (NRC; абсолютное и относительное) снижалось у самцов при дозах 1000 и 2000 мг/кг и повышалось у самок при дозе 2000 мг/кг. Данные изменения указывали на умеренную ответную анемию, связанную с обработкой лекарством.

Число лейкоцитов (WBC) снижалось у самцов, получавших лекарство в дозе 2000 мг/кг. Имело место снижение числа моноцитов (MNO; абсолютного и процентного) в группе самцов с дозой 2000 мг/кг. Повышалось число тромбоцитов у самцов при дозе 2000 мг/кг. Однако данные изменения в количественном отношении были незначительными, и их токсикологическое значение является неопределенным.

Биохимические показатели сыворотки крови. Средняя концентрация глобулина (GLOB) снижалась в группе самцов, получавших лекарство в дозе 2000 мг/кг, и в группе самок с дозой 1000 мг/кг на 29 сутки. Соотношение альбумин/глобулин было выше в группах самцов, которым лекарство вводили в дозах 1000 и 2000 мг/кг, и в группе самок при дозе 1000 мг/кг. Активность щелочной фосфатазы (ALK) была выше в группе самок с дозой 500 мг/кг. Уровень холестерина (CHOL) повышался у самок при дозе 1000 мг/кг. Данные незначительные изменения не носили зависимые от дозы характер или тенденции, на основании чего можно предположить, что они не являются проявлением токсичности лекарства.

D. Массы органов.

Достоверное снижение абсолютных значений массы органов было отмечено для легких (группы самцов и самок с дозой 2000 мг/кг) и тимуса (группа самцов с дозой 2000 мг/кг, группа самок с дозой 1000 мг/кг и группа самок с дозой 2000 мг/кг). Также статистически достоверным было снижение средней абсолютной массы простаты и семенных пузырьков в группе самцов, получавших лекарство в дозе 2000 мг/кг. Среднее абсолютное значение массы сердца было снижено в группах самок при дозе 1000 мг/кг и 2000 мг/кг. Средняя масса слюнных желез снижалась в группе самок при дозе 2000 мг/кг. Средняя масса селезенки была повышена в группе самок, которым лекарство вводили в дозе 2000 мг/кг.

Относительные (к массе тела) изменения массы органов включали повышенную массу мозга в группах самцов и самок при дозе 2000 мг/кг. Также было отмечено увеличение средней массы семенников в группах самцов, получавших лекарство в дозах 1000 и 2000 мг/кг. Относительная масса тимуса была понижена в группе самцов с дозой 2000 мг/кг и в группе самок с дозой 1000 и 2000 мг/кг. Средняя относительная масса селезенки повышалась в группе самок с дозой 2000 мг/кг.

Также относительные (к массе мозга) изменения массы органов включали пониженную относительную массу легких в группе самцов, которым лекарство вводили в дозе 2000 мг/кг. Относительная масса тимуса снижалась в группах самцов и самок с дозой 1000 и 2000 мг/кг. Относительная средняя масса простаты и семенных пузырьков была также ниже в группе самцов с дозой 2000 мг/кг. Средняя относительная масса сердца уменьшалась в группе самок, получавших лекарство в дозе 2000 мг/кг, как и средняя относительная масса слюнных желез. Относительная средняя масса селезенки увеличивалась в группе самок при дозе 2000 мг/кг.

Снижение массы органов (тимуса, легких, сердца, слюнных желез, простаты, семенных пузырьков и мозга) рассматривались, как вторичные по отношению к общей потере массы тела, имеющей место в группах животных, которым лекарство вводили в дозах 1000 и 2000 мг/кг. Атрофия тимуса, которую наблюдали при микроскопических исследованиях в группах животных с дозой 1000 и 2000 мг/кг, совпадала с пониженной массой тимуса. Для других тканей с пониженной массой совпадения с результатами микроскопии отсутствовали. Повышенную массу селезенки можно рассматривать, как следствие эритропоэтической активности, наблюдаемой при микроскопии.

E. Патологоанатомические исследования.

Микроскопические. Частота атрофии тимуса и некроза лимфоидной ткани была выше в группах животных, которым лекарство вводили в дозах 1000 и 2000 мг/кг, но данные изменения отсутствовали при дозе 500 мг/кг. Однако клиническую значимость атрофии тимуса и некроза лимфоидной ткани можно рассматривать, как сомнительную, поскольку зависимость ответной реакции от дозы была незначительной. Также подобные изменения тимуса часто присутствуют в качестве неспецифических изменений у животных, подвергнутых стрессу различными факторами, и в данном опыте наблюдали достоверное снижение массы тела в группах животных, получавших лекарство в дозах 1000 и 2000 мг/кг.

В группах самцов и самок, которым лекарство вводили в дозах 1000 и 2000 мг/кг, был повышен эритропоэз в достаточной степени по сравнению с контролем, но селезенка в группе животных с дозой 500 мг/кг не отличалась от контроля. Гематопоз в печени повышался в группе самцов и самок с дозой

2000 мг/кг в достаточной степени по сравнению с контролем, но состояние печени в группах животных, которым лекарство вводили в дозах 500 и 1000 мг/кг, было аналогичным таковому у контрольных животных. В группах самцов и самок с дозой 2000 мг/кг наблюдали гиперплазию в грудном костном мозге. Эритропоз в селезенке, повышенный гематопоз в печени и гиперплазия в костном мозге, все рассматривались, как ожидаемые и соответствующие ответные реакции на умеренную анемию, наблюдаемую по результатам гематологических исследований. Данные результаты подтверждают ответный характер анемии во время продолжительного введения лекарства.

В данном опыте имело место несколько других микроскопических изменений. Наиболее часто отмечали незначительные воспалительные и дегенеративные изменения обычного типа и частоты, наблюдаемые у грызунов в опытах с пероральным введением.

Токсикокинетика. У 54 дополнительных животных (27 самцов и 27 самок) отбирали пробы крови для фармакокинетических исследований на 1 и 28 сутки. В оба дня пробы отбирали в шестую из шести временных точек (у двух животных на каждую временную точку): 0,5, 1, 2, 4, 8 и 24 ч после введения. Из крови готовили плазму и анализировали на содержание диVal-L-dC и трех метаболитов: L-dC, L-dU и частично дезэтерифицированной формы диVal-L-dC, β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира.

Количественно можно было определять только L-dC и β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валиновый эфир. Средние данные по показателю концентрация-время для групп с дозами 1000 и 2000 мг/кг подвергали некомпонентному фармакокинетическому анализу с использованием WinNonlin 1,5 (модель 200). Анализ по группе с дозой 500 мг/кг находится в работе.

Средняя концентрация метаболита, L-dC в плазме достигала максимальных значений (C_{max}) через 2 ч после введения (T_{max}) в группе с дозой 1000 мг/кг и через 1-4 ч после введения в группе с дозой 2000 мг/кг. Средние значения C_{max} у самцов и самок были сравнимыми в каждой из групп с введением лекарства в дозах 1000 и 2000 мг/кг и были аналогичными на 28 сутки по сравнению с 1 сутками в обеих группах. В большинстве случаев значение C_{max} увеличивалось с дозой, но степень увеличения была различной. После достижения C_{max} концентрация L-dC снижалась выраженным биэкспоненциальным образом для каждой группы. Установленные средние значения периода полураспада в терминальной фазе в группе с введением дозы 1000 мг/кг (9-17 ч) были выше по сравнению с группой 2000 мг/кг (6-8 ч), но значения периода полураспада следует интерпретировать с осторожностью. Для установления периода полураспада необходимо использование только трех точек данных, и данные колебались. Также одна из трех использованных точек данных составляла точку 4 ч, в данное время терминальную фазу установить невозможно. T_{last} для концентраций L-dC имело место через 24 ч. Значения AUC_{last} были сравнимы для самцов и самок в каждой группе и значительно не различались на 28 сутки по сравнению с 1 сутками. Несмотря на то, что C_{max} для L-dC постоянно не возрастала с увеличением дозы диVal-L-dC, как указывалось выше, AUC_{last} для L-dC увеличивалась с диVal-L-dC, как оказалось, почти пропорционально дозе.

Средние концентрации β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира в плазме достигали максимальных значений (C_{max}) через 1-2 ч после введения (T_{max}). Средние значения C_{max} для самцов и самок были одинаковыми в группе с каждой дозой с тенденцией к более высоким величинам у самок. Значения C_{max} были примерно на 14-50% выше для самок на 1 сутки и 28 суток, за исключением самок в группе с дозой 2000 мг/кг, где значения C_{max} β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира были примерно на 164% выше по сравнению с самцами на 28 суток. При сравнении значений по полу C_{max} на 28 суток была аналогичной 1 суткам, за исключением самок в группе с введением лекарства в дозе 2000 мг/кг, у которых значения C_{max} были на 130% выше на 28 суток по сравнению с 1 сутками. В каждом случае C_{max} возрастало с дозой, но при коэффициенте, который, как правило, был ниже, чем это имело бы место при прямо пропорциональной зависимости от дозы.

Кажущаяся терминальная фаза элиминирования β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира не была хорошо охарактеризована и, следовательно, периоды полураспада не приводятся. T_{last} для концентраций β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира имел место через 4-8 ч после введения в группе с дозой 1000 мг/кг и через 8-24 ч для группы с дозой 2000 мг/кг. Как уже отмечалось для C_{max} , AUC_{last} было выше на 25-50% для самок по сравнению с самцами. Значение AUC_{last} было несколько выше на 28 суток по сравнению с 1 сутками как для самцов, так и для самок (на 30-62%). AUC_{last} возрастало с дозой в зависимости, которая оказалась примерно прямо пропорциональной дозе.

На основании этих данных можно предположить, что как L-dC, так и β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валиновый эфир, попадали в кровяное русло довольно быстро. Воздействие в целом, при оценке по C_{max} , было в 10-40 раз выше для L-dC по сравнению с β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валиновым эфиром, и в 35-80 раз выше при оценке по AUC_{last} . Воздействие увеличивалось пропорционально дозе в пределах доз 1000-2000 мг/кг/день. В целом воздействие на 29 сутки L-dC было сравнимо с наблюдаемым на 1 сутки, в то время как воздействие β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валинового эфира, в основном, было выше на 28 суток, на основании чего можно предположить, что β -L-2'-дезоксцитидин-5'-валиновый эфир может накапливаться во время многократного введения.

Обобщенные данные токсикокинетических исследований представлены в табл. 30.

Фармакокинетический анализ однократной и многократных доз диVal-L-dC при пероральном введении в дозах 1000 мг/кг и 2000 мг/кг на крысах

Доза (мг/кг/день)	Сутки	Пол	Фармакокинетический параметр ¹					
			C _{max} (мг/мл)	T _{max} (ч)	T _{last} (ч)	AUC _{last} (мг·ч/мл)	AUC (мг·ч/мл)	t _{1/2} (ч)
L-dC								
1000	1	самцы	33,6	2	24	255	363	17,3
1000	1	самки	48,5	2	24	239	279	9,4
1000	28	самцы	52,9	2	24	254	334	12,9
1000	28	самки	46,6	2	24	239	277	8,8
2000	1	самцы	70,9	2	24	700	478	5,8
2000	28	самки	59,4	2	24	461	487	5,6
2000	28	самцы	51,1	4	24	500	550	NA
2000	28	самки	77,7	1	24	578	561	8,5
β-L-2'-дезокситидин-5'-валиновый эфир								
1000	1	самцы	1,31	1	4	2,81	ID	ID
1000	1	самки	1,70	2	4	4,07	ID	ID
1000	28	самцы	1,32	2	8	3,96	ID	ID
1000	28	самки	1,97	2	4	5,36	ID	ID
2000	1	самцы	2,38	2	8	8,09	ID	ID
2000	1	самки	2,71	2	8	10,2	ID	ID
2000	28	самцы	2,36	1	8	11,0	ID	ID
2000	28	самки	6,24	2	24	16,5	ID	ID

NA = не применимо; терминальная фаза не была адекватно охарактеризована

ID = недостаточно данных для определения терминальной фазы для всех животных

Пример 43. Оценка на мутагенную активность на *S. typhimurium* и *E. coli* (генотоксичность).

При пероральном введении диVal-L-dC животным он быстро превращается в L-dC с появлением высоких концентраций L-dC в плазме крови и не детектируемых для диVal-L-dC. Следовательно, исследования по оценке на мутагенную активность *in vitro* проводили с использованием L-dC. Данное исследование проводили в соответствии с указаниями FDA GLP. L-dC тестировали на его потенциальную способность вызывать мутации в гистидиновом опероне штаммов *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 и TA1537 и в триптофановом опероне штамма *Escherichia coli* WP2uvrA. Тестировали L-dC при концентрациях 50, 100, 500, 1000 и 5000 мг/чашка плюс положительный и отрицательный контроли. Тест-штамм подвергали воздействию L-dC или контролей в отсутствие экзогенной активации и в присутствии индуцированного экстракта печени крысы S-9 плюс экзофакторы. После инкубации примерно в течение 68 ч L-dC и контроли оценивали на число ревертантов на чашку и целостность фонового газона микроколоний.

Как отрицательный, так и положительный контроли соответствовали требованиям теста. Результаты как основного, так и подтверждающего тестов указывали на то, что L-dC не индуцировал статистически значимое увеличение числа ревертантных колоний у какого-либо тест-штамма в присутствии и в отсутствие индуцированного экстракта печени крысы S-9. Основываясь на результатах этого опыта, было сделано заключение, что отсутствовали доказательства мутагенного действия L-dC в тестах на *S. typhimurium* или *E. coli* при концентрациях до 5000 мг/чашка.

Пример 44. Тест хромосомных aberrаций.

При пероральном введении диVal-L-dC животным он быстро превращается в L-dC с появлением высоких концентраций L-dC в плазме крови и не детектируемых для диVal-L-dC. Следовательно, исследования по оценке на мутагенную активность *in vitro* проводили с использованием L-dC. Данное исследование проводили в соответствии с указаниями FDA GLP. L-dC тестировали на его потенциальную способность вызывать хромосомные aberrации в культивируемых клетках CHO. В основном тесте L-dC при концентрациях 100, 500, 1000 и 5000 мг/мл и положительные, и отрицательные контроли тестировали с и без метаболической активации. После непрерывной обработки в течение 18 ч определяли токсичность по снижению относительного роста клеток (RCG) и относительному митотическому индексу (RMI). Основываясь на значениях RCG и RMI, хромосомные aberrации оценивали в баллах при трех наиболее высоких концентрациях (500, 1000 и 5000 мг/мл). Из каждой параллельной культуры при каждой концентрации (включая положительный и отрицательный контроли) просматривали сто метафаз.

Подтверждающий тест проводили без активации только с L-dC при концентрациях 1,0, 10, 100, 500, 1000 и 5000 мг/мл. После непрерывной обработки в течение 18 ч определяли снижение RCG и RMI. Основываясь на значениях RCG и RMI, хромосомные aberrации оценивали в баллах при трех наиболее высоких концентрациях (500, 1000 и 5000 мг/мл). Из каждой параллельной культуры при каждой концентрации (включая положительный и отрицательный контроли) просматривали сто метафаз.

Результаты как основного, так и подтверждающего тестов указывали на то, что L-dC не индуцировал статистически значимое увеличение (определяли как p-значение ≤ 0,05 по тесту Chi-square) процента

клеток с абберациями при любой из тестируемых концентраций как с, так и без метаболической активации по сравнению с растворителем в качестве контроля. Основываясь на результатах данного опыта, было сделано заключение, что отсутствовали доказательства наличия хромосомных аббераций в тесте на СНО после воздействия L-dC при концентрациях до 5000 мг/мл, и L-dC не рассматривается в качестве кластогенного агента.

Пример 45. Микроядерный тест на мышах.

При пероральном введении диVal-L-dC животным он быстро превращается в L-dC с появлением высоких концентраций L-dC в плазме крови и не детектируемых для диVal-L-dC. Следовательно, исследования по оценке на мутагенную активность *in vitro* проводили с использованием L-dC. Данное исследование проводили в соответствии с указаниями FDA GLP. С учетом того, что биодоступность при пероральном введении у грызунов составляет 10-20% (см. Pharmacology and Toxicology, Section 8.1.7.3), воздействие L-dC (в дозе 2000 мг/кг) будет достигать или превышать 400 мг/кг. Данный уровень воздействия будет превышать предполагаемый уровень воздействия у людей в 20-50 раз.

L-dC тестировали на его потенциальную способность вызывать появление полихромных эритроцитов с микроядрами (MPCE) в клетках костного мозга мышей самцов и самок. Тестировали L-dC при концентрациях 500, 1000 и 2000 мг/кг и положительный и отрицательный контроли. Изучаемые лекарства вводили перорально в однократной дозе. Проводили два сбора клеток примерно через 24 и 48 ч после введения L-dC или отрицательного контроля, и один сбор клеток примерно через 24 ч после введения положительного контроля. Использовали по пять самцов и пять самок мышей на каждую дозу на время сбора клеток. В каждой временной точке определяли процент полихромных эритроцитов (PCE) и частоту появления MPCE.

Результаты данного теста указывали на отсутствие статистически значимого увеличения (определяли как р-значение $\leq 0,025$ в тесте Стьюдента) числа MPCE в любую временную точку при любой дозе L-dC по сравнению с отрицательным контролем. Снижение более чем на 20%, по сравнению с растворителем в качестве контроля, процента PCE как показателя токсичности наблюдали в каждой тестируемой дозе при экспозиции 24 ч у мышей обоего пола (от -30,5% до -43,1% для самцов и от -26,1% до -32,2% для самок). Снижение также указывает на соответствующее воздействие тестируемого лекарства на ткань-мишень. Однако данное снижение более чем на 20% не наблюдали ни в одной дозе через 48 ч экспозиции у мышей обоего пола.

Результаты данного опыта указывают, что в условиях теста и соответственно критериям, установленным для оценки результатов теста, L-dC давал отрицательный ответ в микроядерном тесте на самцах и самках в дозах до 2000 мг/кг.

Пример 46. Суммарное заключение по результатам токсикологических исследований.

Для оценки цитотоксичности L-dC и любых клеточных метаболитов использовали общепринятые тесты на клетках. L-dC не был цитотоксичным (50% цитотоксическая концентрация, CC_{50} , >2000 мкМ) на линии клеток гепатомы человека 2.2.15, которая обычно используется для определения активности против I-IBV потенциальных противовирусных агентов. L-dC не был токсичным для моноядерных клеток периферической крови человека (PBMC; CC_{50} >100 мкМ) и клеток-предшественников костного мозга человека (50% ингибирующая концентрация, IC_{50} , >10 мкМ в гранулоцитарно-макрофагальных колониеобразующих единицах (КОЕ-ГМ) и эритроидных бурстобразующих единицах (БОЕ-Е)).

Таблица 31

Цитотоксичность L-dC <i>in vitro</i>	
Клеточная линия ^a	CC_{50} ^b (мМ)
2.2.15 ^c	>2000
PBMC ^d	>200
HFF ^{c, e}	>100
Daudi ^{c, e}	>50
MDCK ^b	>100
CV-1 ^c	>100
MA-104 ^c	>100

^a PBMC, моноядерные клетки периферической крови; HFF, фибробласты человека; В-клеточная лимфома Дауди, Буркитта; MDCK, собачьи почечные эпителиальные клетки; CV-1, почечные фибробласты африканской зеленой маргитышки; MA-104, почечные эпителиальные клетки макаки резус

^b CC_{50} = 50% цитотоксическая концентрация; '>' указывает, что CC_{50} не была достигнута при наиболее высокой тестируемой концентрации лекарства

^c NIH, исследовательская программа по противовирусным и антимикробным препаратам

^d R. Schinazi, Emory University, Veterans Affairs Medical Center

^e Результаты представлены в мкг/мл в большей степени, чем в мкМ

Кроме того, L-dC не был цитотоксичным для других многочисленных клеточных линий человека и других млекопитающих. Не было отмечено существенных изменений функции, морфологии и содержания ДНК в митохондриях, и отсутствовало накопление молочной кислоты в обработанных L-dC гепато-

цитах ($IC_{50} > 10$ мкМ). Трифосфатная форма L-dC не оказывала ингибирующего действия на ДНК-полимеразы человека α , β и γ до концентраций 100 мкМ.

В исследованиях острой токсичности в однократной дозе (включая 500, 1000 и 2000 мг/кг однократно перорально) на крысах и обезьянах (при увеличении дозы в течение 1, 4, 7, 10 и 14 суток до 2000 мг/кг) отсутствовали явные признаки токсичности и воздействия диVal-L-dC на массу тела, потребление корма или клинические патологические параметры (гематологические и биохимические показатели сыворотки крови). Кроме того, отсутствовали макроскопические участки поражения при вскрытии, как и микроскопические изменения при гистоморфологическом исследовании, относящиеся к воздействию диVal-L-dC. Основываясь на результатах данных исследований, уровень отсутствия эффекта поражения (NOAEL) для диVal-L-dC после однократного перорального введения крысам Спрегью-Даули и синомологичным обезьянам составлял 2000 мг/кг.

В субхронических (25 суток) токсикологических исследованиях на обезьянах NOAEL диVal-L-dC был меньше 500 мг/кг. Атрофия тимуса была единственным микроскопическим признаком, который, возможно, был связан с воздействием диVal-L-dC, но ее клиническая значимость рассматривалась как сомнительная. При дозе 500 мг/кг отмечали умеренную негемолитическую анемию (пониженное число эритроцитов, пониженный уровень гемоглобина и гематокрит) и снижение абсолютного и процентного числа полиморфоядерных лейкоцитов без явных последствий. В группах со всеми дозами других проявлений токсичности, чем нежели гематологические изменения, не наблюдали.

В субхронических (28 суток) токсикологических исследованиях на крысах NOAEL диVal-L-dC был ниже 500 мг/кг. Пероральное введение диVal-L-dC в течение 28 суток крысам в дозе 2000 мг/кг приводило к связанным с обработкой изменениям, которые включали умеренную макроцитарную анемию, сниженную массу тимуса, повышенную массу селезенки (только у самок), пониженную массу тела и гематопоз в селезенке, печени и грудном костном мозге. Пероральное введение диVal-L-dC в течение 28 суток крысам в дозе 1000 мг/кг приводило к связанным с обработкой изменениям, которые включали умеренную макроцитарную анемию, атрофию тимуса (только у самок) и гематопоз в селезенке. Гистоморфологические изменения, обнаруженные в печени, селезенке и костном мозге, отражают гематологический ответ на умеренную анемию. Пероральное введение диVal-L-dC в течение 28 суток крысам в дозе 500 мг/кг приводило к умеренной макроцитарной анемии. Другие токсические ответные реакции, чем гематологические изменения и гематопозитические проявления, не были отмечены в группах с любой дозой.

У нормальных здоровых лесных сурков или лесных сурков с хроническим гепатитом В (модель для оценки эффективности лечения HBV-инфекции) не наблюдали проявлений токсичности у животных, получавших L-dC во время исследования острой (в дозе 10 мг/кг однократно внутривенно или перорально) или субхронической токсичности (в дозе 10 мг/кг/день в течение 12 недель).

Отсутствовала потеря массы в группах, которым вводили L-dC, по сравнению с контрольными животными, клинические патологические признаки (гематологические и биохимические показатели сыворотки крови) находились в нормальных пределах и в биопсийном материале печени, взятом в конце обработки в 12-недельном опыте, не было признаков жирового изменения (микровезикулярный стеатоз).

L-dC не проявлял мутагенной активности в тесте на *S. typhimurium* или *E. coli* при концентрациях до 5000 мкг/чашка. Отсутствовали признаки хромосомных aberrаций в тесте на яичниках китайских хомяков (СНО) после воздействия L-dC при концентрациях до 5000 мкг/мл (или 22,0 мМ). В микроядерном тесте на мышцах L-dC не был кластогенным для самцов или самок при дозах до 2000 мг/кг.

Умеренная анемия, обнаруженная у обезьян, не была связана с какими-либо клиническими признаками даже при самой высокой дозе (2000 мг/кг) и у крыс при дозе 500 мг/кг. Кроме того, число ретикулоцитов оставалось без изменений. Несмотря на то, что в данных исследованиях отсутствовала соответствующая обратимость, является очевидным, что может иметь место восстановление гематологических показателей, на что указывал экстрамедуллярный гематопоз, установленный в селезенке и печени, при более высоких дозах у крыс.

Таблица 32

Межвидовое сравнение доз по массе и площади поверхности тела

Виды	Масса тела (кг)	Доза (мг/кг)	Доза (мг/животное)	Доза фактор превращения	Доза, эквивалентная человеку	Кратная разница
					(НED) (мг/кг)	
Крыса	0,2	500	100	6	16,6	23
Обезьяна	4,0	500	2000	3	666	938
Лесной сурок	3,0	10	30	3	10	14
Человек	70	0,71	50	1	0,71	-
(предполагаемое)						

Аналогичные гематологические изменения при сравнимых или более низких дозах наблюдали в доклинических исследованиях токсичности ламивудина (EpiVir-HBVT™) и валацикловира (Valtrex™). Оба этих разрешенных к применению лекарства являются представителями такой же хорошо охарактер-

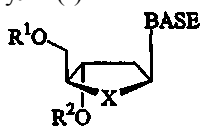
ризованной группы (нуклеозиды или аналоги нуклеозидов), как и диVal-L-dC. Выбор ламивудина для сравнения основан на том факте, что он представляет производное цитозина, как и диVal-L-dC, а также он разрешен для лечения хронического гепатита В. Выбор валацикловира для сравнения основан на том факте, что он представляет пролекарство валинового эфира нуклеозида ацикловира.

Данное изобретение описано при обращении к его предпочтительным воплощениям. Вариации и модификации изобретения, очевидно, понятны специалистам в данной области из предшествующего подробного описания изобретения.

Подразумевается, что все такие вариации и модификации включены в объем данного изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. 3'-Замещенный-β-L-нуклеозид формулы (I)



(I)

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой

R¹ представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R² представляет остаток аминокислоты;

X представляет O, S, SO₂ или CH₂ и

BASE представляет пуриновое или пиримидиновое основание, которое необязательно может быть замещенным;

где термин «алкил» сам по себе или как часть других терминов, относится к насыщенному, нормальному, разветвленному или циклическому, первичному, вторичному или третичному углеводороду C₁-C₁₀, который может быть замещен по одному или нескольким атомам углерода одной или несколькими группами, выбранными из группы, состоящей из гидроксила, amino, алкиламино, ариламино, алкокси, арилокси, нитро, циано, сульфоновой кислоты, сульфата, фосфорной кислоты, фосфата или фосфоната; любой из которых может быть защищен группой, выбранной из бутоксикарбонила, п-толуоида и бензоила; термин «арил», сам по себе или как часть других терминов, относится к фенилу, бифенилу или нафтилу, которые могут быть замещены одной или более группами, выбранными из группы, состоящей из гидроксила, amino, алкиламино, ариламино, алкокси, арилокси, нитро, циано, сульфоновой кислоты, сульфата, фосфорной кислоты, фосфата или фосфоната, любой из которых может быть защищен группой, выбранной из бутоксикарбонила, п-толуоида и бензоила; термин «BASE, которое необязательно может быть замещенным» включает цитозин, 5-фторцитозин, 5-бромцитозин, 5-иодцитозин, урацил, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-иод урацил, 5-хлорурацил, 5-метилурацил, 5-метилцитозин, тимин, аденин, гуанин, инозин, ксантин, гипоксантин, 2,6-диаминогуанин, 2,6-диаминоаденин, 2,6-диаминоксантин, 2,6-диаминогипоксантин, 6-аминогуанин, 6-аминоаденин, 6-аминоксантин, 6-аминогипоксантин, 6-хлоргуанин, 6-хлораденин, 6-хлорксантин, 6-хлоргипоксантин, 2,6-дихлоргуанин, 2,6-дихлораденин, 2,6-дихлорксантин, 2,6-дихлоргипоксантин, 6-бромгуанин, 6-бромаденин, 6-бромксантин, 6-бромгипоксантин, 2,6-дибромгуанин, 2,6-дибромаденин, 2,6-дибромксантин, 6-иодгуанин, 6-иодаденин, 6-иодксантин, 6-иодгипоксантин, 2,6-дииодгуанин, 2,6-дииодаденин, 2,6-дииодксантин, 2,6-дииодгипоксантин, 5-бромвинилцитозин, 5-бромвинилурацил, 5-бромэтилилцитозин, 5-бромэтилилурацил, 5-трифторметилцитозин, 5-трифторметилурацил, N⁶-алкиладенин, N⁶-алкилгуанин, N⁶-алкилксантин, N⁶-алкилгипоксантин, N⁶-C(=O)-алкиладенин, N⁶-C(=O)-алкилксантин, N⁶-C(=O)-алкилгипоксантин, N⁶-C(=O)-фениладенин, N⁶-C(=O)-фенилксантин, N⁶-C(=O)-фенилгипоксантин, N⁶-C(=O)-бифениладенин, N⁶-C(=O)-бифенилксантин, N⁶-C(=O)-бифенилгипоксантин, N⁶-C(=O)-нафтил-аденин, N⁶-C(=O)-нафтилксантин, N⁶-C(=O)-нафтилгипоксантин, N⁶-C(=O)-алкилгуанин, N⁶-C(=O)-фенилгуанин, N⁶-C(=O)-бифенилгуанин, N⁶-C(=O)-нафтилгуанин, N⁶-C(=O)-алкилариладенин и N⁶-C(=O)-арилалкиладенин, N⁶-C(=O)-алкилксантин, N⁶-C(=O)-фенилксантин, N⁶-C(=O)-бифенилксантин, N⁶-C(=O)-нафтилксантин, N⁶-C(=O)-алкилгипоксантин, N⁶-C(=O)-фенилгипоксантин, N⁶-C(=O)-бифенилгипоксантин, N⁶-C(=O)-нафтилгипоксантин, N⁶-C(=O)-алкиларилгуанин и N⁶-C(=O)-арилалкилгуанин, N⁶-C(=O)-бензиладенин, N⁶-C(=O)-бензилгуанин, N⁶-C(=O)-бензилксантин, N⁶-C(=O)-бензилгипоксантин, N⁶-C(=O)-хлораденин, N⁶-C(=O)-хлоргуанин, N⁶-C(=O)-хлорксантин, N⁶-C(=O)-хлоргипоксантин, N⁶-C(=O)-бромаденин, N⁶-C(=O)-бромгуанин, N⁶-C(=O)-бромксантин, N⁶-C(=O)-бромгипоксантин, N⁶-C(=O)-фтораденин, N⁶-C(=O)-фторгуанин, N⁶-C(=O)-фторксантин, N⁶-C(=O)-фторгипоксантин, N⁶-C(=O)-иодаденин, N⁶-C(=O)-иодгуанин, N⁶-C(=O)-иодксантин, N⁶-C(=O)-иодгипоксантин, N⁶-виниладенин, N⁶-винилгуанин, N⁶-винилксантин, N⁶-винилгипоксантин, N⁶-ацетиленаденин, N⁶-ацетиленгуанин, N⁶-ацетиленксантин, N⁶-ацетиленгипоксантин, N⁶-C(=O)-аденин, N⁶-C(=O)-гуанин, N⁶-

C(=O)-ксантин, N⁶-C(=O)-гипоксантин, N⁶-гидроксиалкиладенин и N⁶-гидроксиалкилгуанин, N⁶-гидроксиалкилксантин и N⁶-гидроксиалкилгипоксантин, N⁶-C(=O)-хлоргуанин, N⁶-C(=O)-хлораденин, N⁶-C(=O)-хлорксантин, N⁶-C(=O)-хлоргипоксантин, N⁶-тиоалкиладенин и N⁶-тиоалкилгуанин, N⁶-тиоалкилксантин и N⁶-тиоалкилгипоксантин, N²-алкиладенин и N²-алкилгуанин, N²-алкилксантин и N²-алкилгипоксантин, N²-алкил-6-тиоаденин и N²-алкилтиогуанин, N²-алкил-6-тиоксантин и N²-алкил-6-тиогипоксантин, 6-азацитозин, 6-азатимин, 2-меркаптоцитозин, 2-меркаптотимин, 2,4-меркаптоцитозин, 2,4-меркаптотимин, 4-меркаптоцитозин, 4-меркаптотимин, 2-меркаптоурацил, 2,4-меркаптоурацил, 4-меркаптоурацил, C⁵-алкилцитозин, C⁵-алкилтимин, C⁵-алкилурацил, C⁵-бензилцитозин, C⁵-бензилтимин, C⁵-бензилурацил, C⁵-хлорцитозин, C⁵-фторцитозин, C⁵-иодцитозин, C⁵-бромцитозин, C⁵-хлортимин, C⁵-фтортимин, C⁵-иодтимин, C⁵-бромтимин, C⁵-хлорурацил, C⁵-фторурацил, C⁵-иодурацил, C⁵-бромурацил, C⁵-винилцитозин, C⁵-винилтимин, C⁵-винилурацил, C⁵-ацетиленцитозин, C⁵-ацетилентимин, C⁵-ацетиленурацил, C⁵-ацилцитозин, C⁵-ацилтимин, C⁵-ацилурацил, C⁵-амидоцитозин, C⁵-амидотимин, C⁵-амидоурацил, C⁵-цианоцитозин, C⁵-цианотимин, C⁵-цианоурацил, C⁵-нитроцитозин, C⁵-нитротимин, C⁵-нитроурацил, C⁵-аминоцитозин, C⁵-аминотимин, C⁵-аминоурацил, N²-алкилгуанин, N²-алкиладенин, N²-алкилгуанин, N²-тиоаденин, N²-алкил-6-тиогуанин, N²-алкил-6-тиоаденин, N⁴-(диметиламино)метиленицитозин, N⁴-(диметиламино)метилентимин, N⁴-(диметиламино)метиленурацил, 5-азациитидин, 5-азаурацил, триазолопиридин, имидазолопиридин, пирролопиридин, пирролопиримидин, пиразолопиримидин, имидазолопиримидин и тиазолопиримидин; термин «аминокислота» включает природные и синтетические α, β, γ или δ аминокислоты, а также аминокислоты, имеющиеся в белках, такие как глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспартат, глутамат, лизин, аргинин и гистидин, или аминокислота может быть производным аланила, валинила, лейцинила, изолейцинила, пролинила, фенилаланинила, триптофанила, метионила, глицинила, серинила, треонинила, цистеинила, тирозинила, аспарагинила, глутаминила, аспартоила, глутароила, лизинила, аргининила, гистидинила, β-аланина, β-валинила, β-лейцинила, β-изолейцинила, β-пролинила, β-фенилаланинила, β-триптофанила, β-метионинила, β-глицинила, β-серинила, β-треонинила, β-цистеинила, β-тирозинила, β-аспарагинила, β-глутаминила, β-аспартоила, β-глутароила, β-лизинила, β-аргининила или β-гистидинила.

2. Соединение по п.1, в котором X представляет O.

3. Соединение по п.2, в котором R² представляет остаток аминокислоты формулы C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹),

в которой R⁸ представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R⁸ необязательно может быть соединен с R¹⁰ с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R⁸ представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R⁹ представляет водород, алкил (включая C₁₋₄ алкил) или арил и

R¹⁰ и R¹¹ независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R⁸) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил),

где термин «гетероарил» относится к ароматической группе, которая включает по меньшей мере один атом серы, азота или фосфора в ароматическом кольце; термин «гетероциклическая группа» относится к неароматической циклической группе, в которой имеется по меньшей мере один гетероатом, такой как кислород, сера, азот или фосфор, в кольце.

4. Соединение по п.3, в котором R² представляет L-валинил.

5. Соединение по п.2, в котором R¹ представляет водород.

6. Соединение по п.2, в котором R¹ представляет СО-алкил.

7. Соединение по п.2, в котором R¹ представляет остаток аминокислоты формулы C(O)C(R⁸)(R⁹)(NR¹⁰R¹¹),

в которой R⁸ представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R⁸ необязательно может быть соединен с R¹⁰ с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R⁸ представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

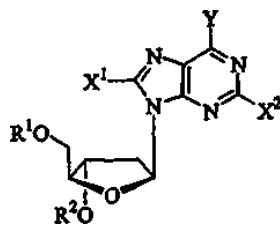
R⁹ представляет водород, алкил (включая C₁₋₄ алкил) или арил и

R¹⁰ и R¹¹ независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R⁸) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

8. Соединение по п.7, в котором R¹ представляет L-валинил.

9. Соединение по п.8, в котором R¹ и R² независимо представляют L-валинил.

10. Соединение по п.1, в котором 3'-замещенный-β-L-нуклеозид представляет β-L-2'-дезоксипуридин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль,

в которой R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 представляет остаток аминокислоты;

Y представляет OR^3 , NR^3R^4 или SR^3 , и

X^1 и X^2 независимо выбраны из группы, состоящей из H, нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, галогена, OR^5 , NR^5R^6 или SR^5 и

R^3 , R^4 , R^5 и R^6 независимо представляют H, нормальный, разветвленный или циклический алкил, диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламиноэтилен), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

11. Соединение по п.10, в котором R^2 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

12. Соединение по п.11, в котором R^2 представляет L-валинил.

13. Соединение по п.10, в котором R^1 представляет водород.

14. Соединение по п.10, в котором R^1 представляет СО-алкил.

15. Соединение по п.10, в котором R^1 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой

R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

16. Соединение по п.15, в котором R^1 представляет L-валинил.

17. Соединение по п.10, в котором R^1 представляет водород и R^2 представляет L-валинил.

18. Соединение по п.10, в котором R^1 и R^2 независимо представляют остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

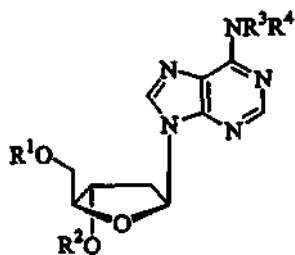
в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

19. Соединение по п.18, в котором R^1 и R^2 независимо представляют L-валинил.

20. Соединение по п.10, в котором β -L-2'-дезоксипуридин представляет β -L-2'-дезоксаденозин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль,

в которой R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 представляет остаток аминокислоты;

R^3 и R^4 независимо представляют Н, нормальный, разветвленный или циклический алкил, диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинотетилен), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

21. Соединение по п.20, в котором R^2 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

22. Соединение по п.21, в котором R^2 представляет L-валинил.

23. Соединение по п.20, в котором R^1 представляет водород.

24. Соединение по п.20, в котором R^1 не является водородом.

25. Соединение по п.20, в котором R^1 представляет СО-алкил.

26. Соединение по п.25, в котором СО-алкил представляет СО-метил.

27. Соединение по п.25, в котором СО-алкил представляет СО-пропил.

28. Соединение по п.20, в котором R^1 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

29. Соединение по п.28, в котором R^1 представляет L-валинил.

30. Соединение по п.20, в котором R^1 представляет водород и R^2 представляет L-валинил.

31. Соединение по п.20, в котором R^1 и R^2 независимо представляют остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу и

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил;

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

32. Соединение по п.31, в котором R^1 и R^2 независимо представляют L-валинил.

33. Соединение по п.31, в котором R^3 и R^4 представляют водород.

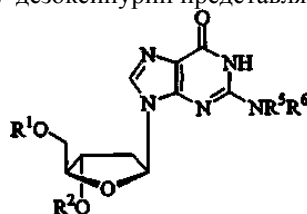
34. Соединение по п.31, в котором R^3 представляет водород и R^4 представляет диметиламинотетилен.

35. Соединение по п.31, в котором R^3 представляет водород и R^4 представляет СО-алкил.

36. Соединение по п.31, в котором R^3 представляет водород и R^4 представляет СО-метил.

37. Соединение по п.31, в котором R^3 представляет водород и R^4 представляет L-валинил.

38. Соединение по п.10, где β -L-2'-дезоксипуридин представляет β -L-2'-дезоксигуанозин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль,

в которой R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 представляет остаток аминокислоты;

R^5 и R^6 независимо представляют Н, нормальный, разветвленный или циклический алкил, диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинотетилен), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-

арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

39. Соединение по п.38, в котором R^2 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

40. Соединение по п.39, в котором R^2 представляет L-валинил.

41. Соединение по п.38, в котором R^1 представляет водород.

42. Соединение по п.38, в котором R^1 не является водородом.

43. Соединение по п.38, в котором R^1 представляет СО-алкил.

44. Соединение по п.43, в котором СО-алкил представляет СО-метил.

45. Соединение по п.43, в котором СО-алкил представляет СО-пропил.

46. Соединение по п.38, в котором R^1 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

47. Соединение по п.46, в котором R^1 представляет L-валинил.

48. Соединение по п.38, в котором R^1 представляет водород и R^2 представляет L-валинил.

49. Соединение по п.38, в котором R^1 и R^2 независимо представляют остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

50. Соединение по п.49, в котором R^1 и R^2 представляют L-валинил.

51. Соединение по п.50, в котором R^5 и R^6 представляют водород.

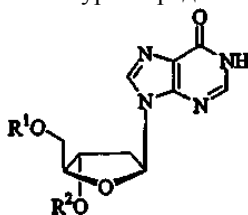
52. Соединение по п.50, в котором R^5 представляет водород и R^6 представляет диметиламинометил.

53. Соединение по п.50, в котором R^5 представляет водород и R^6 представляет СО-алкил.

54. Соединение по п.50, в котором R^5 представляет водород и R^6 представляет СО-метил.

55. Соединение по п.50, в котором R^5 представляет водород и R^6 представляет L-валинил.

56. Соединение по п.10, где β -L-2'-дезоксипуридин представляет β -L-2'-дезоксипуридин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль,

в которой R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 представляет остаток аминокислоты.

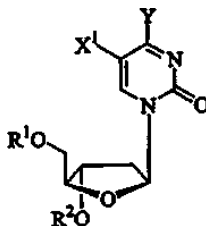
57. Соединение по п. 56, в котором R^2 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$, в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

58. Соединение по п.57, в котором R^2 представляет L-валинил.

59. Соединение по п.56, в котором R^1 представляет водород.
60. Соединение по п.56, в котором R^1 не является водородом.
61. Соединение по п.56, в котором R^1 представляет СО-алкил.
62. Соединение по п.61, в котором СО-алкил представляет СО-метил.
63. Соединение по п.61, в котором СО-алкил представляет СО-пропил.
64. Соединение по п.56, в котором R^1 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,
в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;
 R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и
 R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).
65. Соединение по п.64, в котором R^1 представляет L-валинил.
66. Соединение по п.56, в котором R^1 представляет водород и R^2 представляет L-валинил.
67. Соединение по п.56, в котором R^1 и R^2 независимо представляют остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,
в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;
 R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и
 R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).
68. Соединение по п.67, в котором R^1 и R^2 представляют L-валинил.
69. Соединение по п.2, где 3'-замещенный- β -L-нуклеозид представляет β -L-2'-дезоксипиримидин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль,

в которой R^1 выбран из группы, состоящей из водорода, нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, СО-арилоксиалкила, СО-замещенного арила, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остатка аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата;

R^2 представляет остаток аминокислоты;

Y представляет OR^3 , NR^3R^4 или SR^3 ;

X^1 выбран из группы, состоящей из H, нормального, разветвленного или циклического алкила, СО-алкила, СО-арила, СО-алкоксиалкила, галогена, OR^5 , NR^3R^6 или SR^5 , и

R^3 , R^4 , R^5 и R^6 независимо представляют H, нормальный, разветвленный или циклический алкил, диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинометил), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата.

70. Соединение по п.69, в котором R^2 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

71. Соединение по п.70, в котором R^2 представляет L-валинил.

72. Соединение по п.69, в котором R^1 представляет водород.

73. Соединение по п.69, в котором R^1 представляет СО-алкил.

74. Соединение по п.69, в котором R^1 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

75. Соединение по п.74, в котором R^1 представляет L-валинил.

76. Соединение по п.69, в котором R^1 представляет водород и R^2 представляет L-валинил.

77. Соединение по п.69, в котором R^1 и R^2 независимо представляют остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

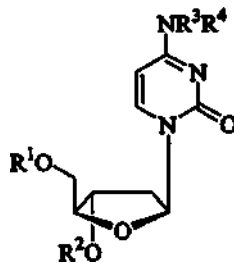
в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

78. Соединение по п.77, в котором R^1 и R^2 независимо представляют L-валинил.

79. Соединение по п.69, где β -L-2'-дезоксипиримидин представляет β -L-2'-дезокситидин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль,

в которой R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аракилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата;

R^2 представляет остаток аминокислоты и

R^3 и R^4 независимо представляют H, нормальный, разветвленный или циклический алкил, диалкиламиноалкилен (в частности, диметиламинометилен), СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аракилсульфонил, остаток аминокислоты, производное моно-, ди- или трифосфата или фосфата.

80. Соединение по п.79, в котором R^2 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропилом и циклопропил).

81. Соединение по п.80, в котором R^2 представляет L-валинил.

82. Соединение по п.79, в котором R^1 представляет водород.

83. Соединение по п.79, в котором R^1 не является водородом.

84. Соединение по п.79, в котором R^1 представляет СО-алкил.

85. Соединение по п.84, в котором СО-алкил представляет СО-метил.

86. Соединение по п.84, в котором СО-алкил представляет СО-пропил.

87. Соединение по п.79, в котором R^1 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

88. Соединение по п.87, в котором R^1 представляет L-валинил.

89. Соединение по п.79, в котором R^1 представляет водород и R^2 представляет L-валинил.

90. Соединение по п.79, в котором R^1 и R^2 независимо представляют остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

91. Соединение по п.90, в котором R^1 и R^2 независимо представляют L-валинил.

92. Соединение по п. 91, в котором R^3 и R^4 представляют водород.

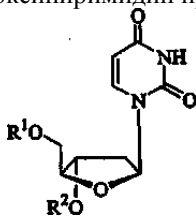
93. Соединение по п.91, в котором R^3 представляет водород и R^4 представляет диметиламинометил.

94. Соединение по п.91, в котором R^3 представляет водород и R^4 представляет СО-алкил.

95. Соединение по п.94, в котором R^3 представляет водород и R^4 представляет СО-метил.

96. Соединение по п.91, в котором R^3 представляет водород и R^4 представляет L-валинил.

97. Соединение по п.69, где β -L-2'-дезоксипиримидин представляет β -L-2'-дезоксиуридин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль,

в которой R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата и R^2 представляет остаток аминокислоты.

98. Соединение по п.97, в котором R^2 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

99. Соединение по п.98, в котором R^2 представляет L-валинил.

100. Соединение по п.97, в котором R^1 представляет водород.

101. Соединение по п.97, в котором R^1 не является водородом.

102. Соединение по п.97, в котором R^1 представляет СО-алкил.

103. Соединение по п.102, в котором СО-алкил представляет СО-метил.

104. Соединение по п.102, в котором СО-алкил представляет СО-пропил.

105. Соединение по п.97, в котором R^1 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

106. Соединение по п.105, в котором R^1 представляет L-валинил.

107. Соединение по п.97, в котором R^1 представляет водород и R^2 представляет L-валинил.

108. Соединение по п.97, в котором R^1 и R^2 независимо представляют остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

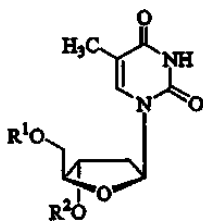
в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

109. Соединение по п.108, в котором R^1 и R^2 независимо представляют L-валинил.

110. Соединение по п.69, где β -L-2'-дезоксипиримидин представляет β -L-тимидин формулы



или его фармацевтически приемлемую соль,

в которой R^1 представляет водород, нормальный, разветвленный или циклический алкил, СО-алкил, СО-арил, СО-алкоксиалкил, СО-арилоксиалкил, СО-замещенный арил, алкилсульфонил, арилсульфонил, аралкилсульфонил, остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфат или производное фосфата и

R^2 представляет остаток аминокислоты, моно-, ди- или трифосфата или производного фосфата.

111. Соединение по п.110, в котором R^2 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

112. Соединение по п.111, в котором R^2 представляет L-валинил.

113. Соединение по п.110, в котором R^1 представляет водород.

114. Соединение по п.110, в котором R^1 не является водородом.

115. Соединение по п.110, в котором R^1 представляет СО-алкил.

116. Соединение по п.115, в котором СО-алкил представляет СО-метил.

117. Соединение по п.115, в котором СО-алкил представляет СО-пропил.

118. Соединение по п.110, в котором R^1 представляет остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

119. Соединение по п.118, в котором R^1 представляет L-валинил.

120. Соединение по п.110, в котором R^1 представляет водород и R^2 представляет L-валинил.

121. Соединение по п.110, в котором R^1 и R^2 независимо представляют остаток аминокислоты формулы $C(O)C(R^8)(R^9)(NR^{10}R^{11})$,

в которой R^8 представляет боковую цепь аминокислоты и в которой, как в пролине, R^8 необязательно может быть соединен с R^{10} с образованием кольцевой структуры или, альтернативно, R^8 представляет алкил, арил, гетероарил или гетероциклическую группу;

R^9 представляет водород, алкил (включая C_{1-4} алкил) или арил и

R^{10} и R^{11} независимо представляют водород, ацил (включая ацильное производное, соединенное с R^8) или алкил (включая, но не ограничиваясь ими, метил, этил, пропил и циклопропил).

122. Соединение по п.121, в котором R^1 и R^2 независимо представляют L-валинил.

123. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики вирусного гепатита В у хозяина, содержащая соединение по любому из предшествующих пп.1-122 или его фармацевтически приемлемую соль вместе с фармацевтически приемлемыми носителем или разбавителем.

124. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики вирусного гепатита В у хозяина, содержащая соединение по любому из предшествующих пп.1-122 или его фармацевтически приемлемую соль в комбинации с одним или более агентом против вируса гепатита В, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

125. Фармацевтическая композиция по п.124, в которой агентом против вируса гепатита В является β -L-дезоксирибонуклеозид.

126. Фармацевтическая композиция по п.125, в которой β -L-дезоксирибонуклеозид выбран из группы, состоящей из β -L-дезоксириботимидина (β -L-dT), β -L-дезоксирибоцитозина (β -L-dC), β -L-дезоксирибоуридина (β -L-dU), β -L-дезоксирибоаденина (β -L-dA), β -L-дезоксирибогуанина (β -L-dG) или β -L-дезоксирибоинозина (β -L-dI).

127. Фармацевтическая композиция по п.126, в которой β -L-дезоксирибонуклеозид представляет β -L-дезоксириботимидин (β -L-dT).

128. Фармацевтическая композиция по п.127, в которой соединение представляет 3'-Val- β -L-dC и агент против вируса гепатита В представляет β -L-dT.

129. Фармацевтическая композиция по п.127, в которой соединение представляет 3',5'-диVal- β -L-dC и агент против вируса гепатита В представляет β -L-dT.

130. Применение соединения или композиции по любому из предшествующих пп.1-129 в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики вирусного гепатита В у хозяина.

131. Фармацевтическая композиция, которая содержит соединение по любому из предшествующих пп.1-129 или его фармацевтически приемлемую соль в комбинации с одним или более агентом против вируса гепатита В, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

132. Фармацевтическая композиция по п.131, в которой агент против вируса гепатита В представляет β -L-дезоксирибонуклеозид.

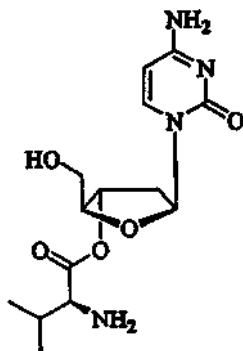
133. Фармацевтическая композиция по п.132, в которой β -L-дезоксирибонуклеозид выбран из группы, состоящей из β -L-дезоксириботимидина (β -L-dT), β -L-дезоксирибоцитозина (β -L-dC), β -L-дезоксирибоуридина (β -L-dU), β -L-дезоксирибоаденина (β -L-dA), β -L-дезоксирибогуанина (β -L-dG) или β -L-дезоксирибоинозина (β -L-dI).

134. Фармацевтическая композиция по п.133, в которой β -L-дезоксирибонуклеозид представляет β -L-дезоксириботимидин (β -L-dT).

135. Фармацевтическая композиция по п.134, в которой соединение представляет 3'-Val- β -L-dC и агент против вируса гепатита В представляет β -L-dT.

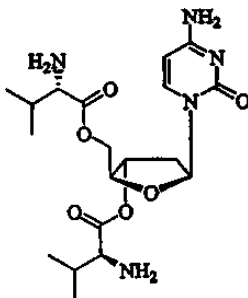
136. Фармацевтическая композиция по п.134, в которой соединение представляет 3',5'-диVal- β -L-dC и агент против вируса гепатита В представляет β -L-dT.

137. Соединение формулы



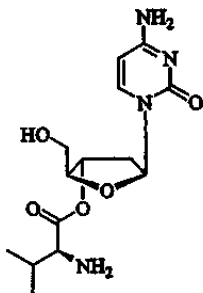
или его фармацевтически приемлемая соль.

138. Соединение формулы



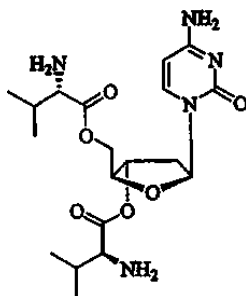
или его фармацевтически приемлемая соль.

139. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики вирусного гепатита В, содержащая соединение формулы



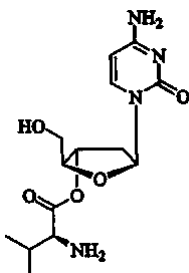
или его фармацевтически приемлемую соль в комбинации с β -L-дезоксириботимидином, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

140. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики вирусного гепатита В, содержащая соединение формулы



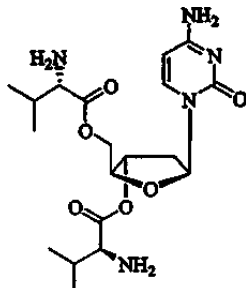
или его фармацевтически приемлемую соль в комбинации с β -L-дезоксириботимидином, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

141. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики вирусного гепатита В, содержащая соединение формулы



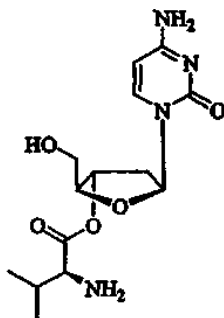
или его фармацевтически приемлемую соль в комбинации с одним или более агентами против вируса гепатита В, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

142. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики вирусного гепатита В, содержащая соединение формулы



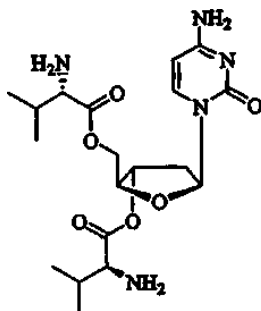
или его фармацевтически приемлемую соль в комбинации с одним или более агентами против вируса гепатита В, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

143. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики вирусного гепатита В, содержащая соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир вместе с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

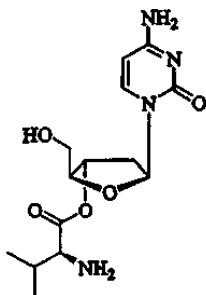
144. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики вирусного гепатита В, содержащая соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир вместе с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

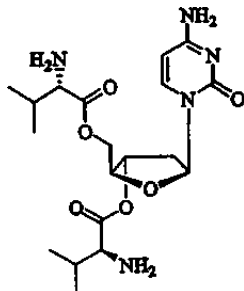
145. Применение соединения или композиции по любому из предшествующих пп.131-144 в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики вирусного гепатита В у хозяина.

146. Применение соединения формулы



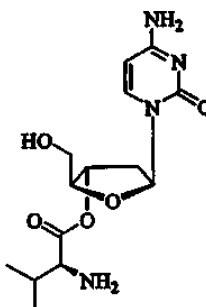
или его фармацевтически приемлемой соли, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики вирусного гепатита В у хозяина.

147. Применение соединения формулы



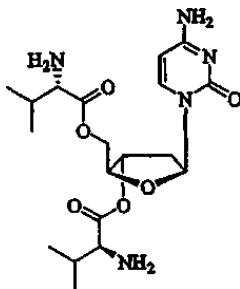
или его фармацевтически приемлемой соли, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики вирусного гепатита В у хозяина.

148. Применение соединения формулы



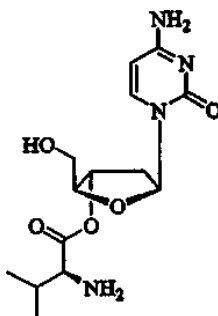
или его фармацевтически приемлемой соли, в комбинации или при чередовании с терапевтическим количеством β -L-дезоксириботимидина, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики вирусного гепатита В у хозяина.

149. Применение соединения формулы



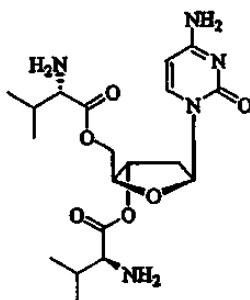
или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации или при чередовании с терапевтическим количеством β -L-дезоксириботимидина, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики вирусного гепатита В у хозяина.

150. Применение соединения формулы



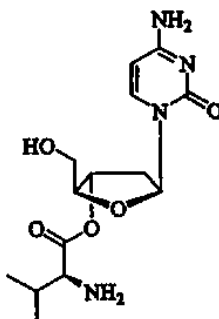
или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации или при чередовании с терапевтическим количеством одного или более агентов против вируса гепатита В, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, для лечения или профилактики вирусного гепатита В у хозяина.

151. Применение соединения формулы



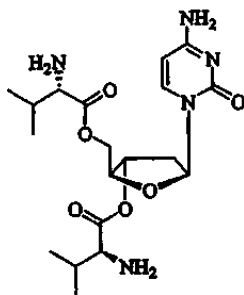
или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации или при чередовании с терапевтическим количеством одного или более агентов против вируса гепатита В, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, для лечения или профилактики вирусного гепатита В у хозяина.

152. Применение соединения формулы



или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации или при чередовании с терапевтическим количеством одного или более агентов против вируса гепатита В, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики вирусного гепатита В у хозяина.

153. Применение соединения формулы



или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации или при чередовании с терапевтическим количеством одного или более агентов против вируса гепатита В, необязательно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики вирусного гепатита В у хозяина.

154. Применение по любому из пп.130 и 145-153, где фармацевтически приемлемый носитель пригоден для пероральной доставки.

155. Применение по любому из пп.130 и 145-153, где фармацевтически приемлемый носитель пригоден для внутривенной доставки.

156. Применение по любому из пп.130 и 145-153, где фармацевтически приемлемый носитель пригоден для парентеральной доставки.

157. Применение по любому из пп.130 и 145-153, где фармацевтически приемлемый носитель пригоден для внутрикожной доставки.

158. Применение по любому из пп.130 и 145-153, где фармацевтически приемлемый носитель пригоден для подкожной доставки.

159. Применение по любому из пп.130 и 145-153, где фармацевтически приемлемый носитель пригоден для местной доставки.

160. Применение по любому из пп.130 и 145-159, где соединение находится в форме дозированной единицы.

161. Применение по п.160, где дозированная единица содержит 10-1500 мг соединения.

162. Применение по п.160 или 161, где дозированная единица представляет собой таблетку или капсулу.

163. Применение по любому из пп.130 и 145-162, где хозяином является человек.

164. Применение по любому из пп.130 и 145-163, где лекарственное средство предназначено для лечения вирусного гепатита В у хозяина.

165. Фармацевтическая композиция по любому из пп.123-129, 131-136, 139-144, где фармацевтически приемлемый носитель пригоден для пероральной доставки.

166. Фармацевтическая композиция по любому из пп.123-129, 131-136, 139-144, где фармацевтически приемлемый носитель пригоден для внутривенной доставки.

167. Фармацевтическая композиция по любому из пп.123-129, 131-136, 139-144, где фармацевтически приемлемый носитель пригоден для парентеральной доставки.

168. Фармацевтическая композиция по любому из пп.123-129, 131-136, 139-144, где фармацевтически приемлемый носитель пригоден для внутрикожной доставки.

169. Фармацевтическая композиция по любому из пп.123-129, 131-136, 139-144, где фармацевтически приемлемый носитель пригоден для подкожной доставки.

170. Фармацевтическая композиция по любому из пп.123-129, 131-136, 139-144, где фармацевтически приемлемый носитель пригоден для местной доставки.

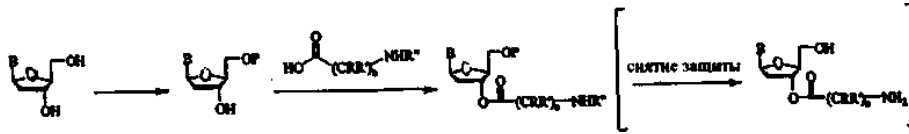
171. Фармацевтическая композиция по любому из пп.123-129, 131-136, 139-144, 165-170, где соединение находится в форме дозированной единицы.

172. Фармацевтическая композиция по п.171, где дозированная единица содержит 10-1500 мг соединения.

173. Фармацевтическая композиция по п.171 или 172, где дозированная единица представляет таблетку или капсулу.

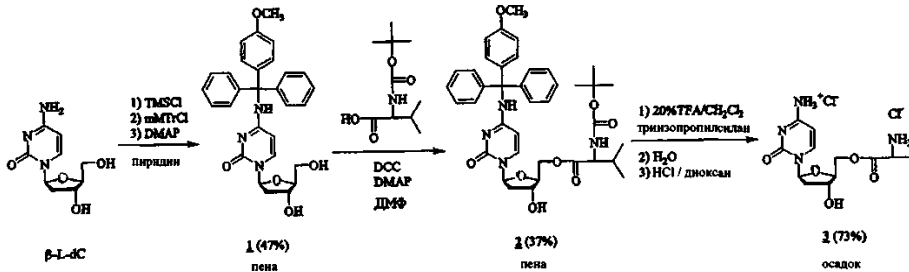
174. Фармацевтическая композиция по любому из пп.123-129, 131-136, 139-144, 165-173, где хозяином является человек.

175. Фармацевтическая композиция по любому из пп.123-129, 131-136, 139-144, 165-174, где композиция предназначена для лечения вирусного гепатита В у хозяина.



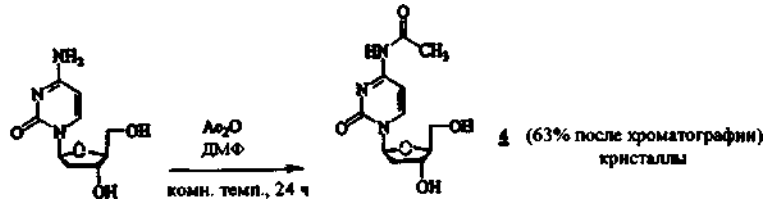
Фиг. 1а

Синтез 3'-валинилового эфира 2'-дезоксид-β-L-цитидина

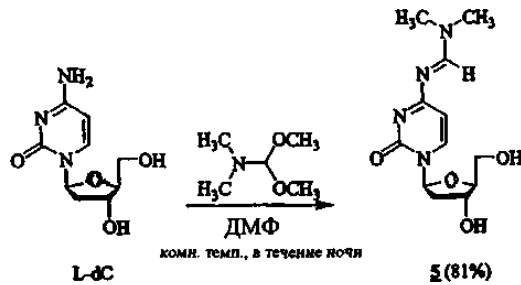


Фиг. 1б

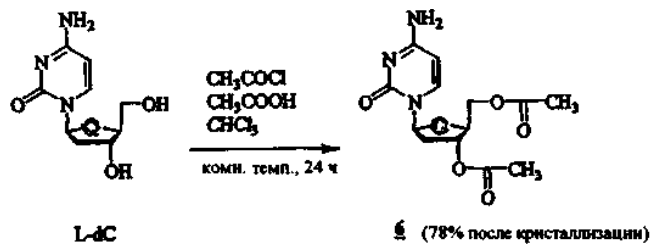
Синтез 5'-валинилового эфира 2'-дезоксид-β-L-цитидина



Фиг. 2

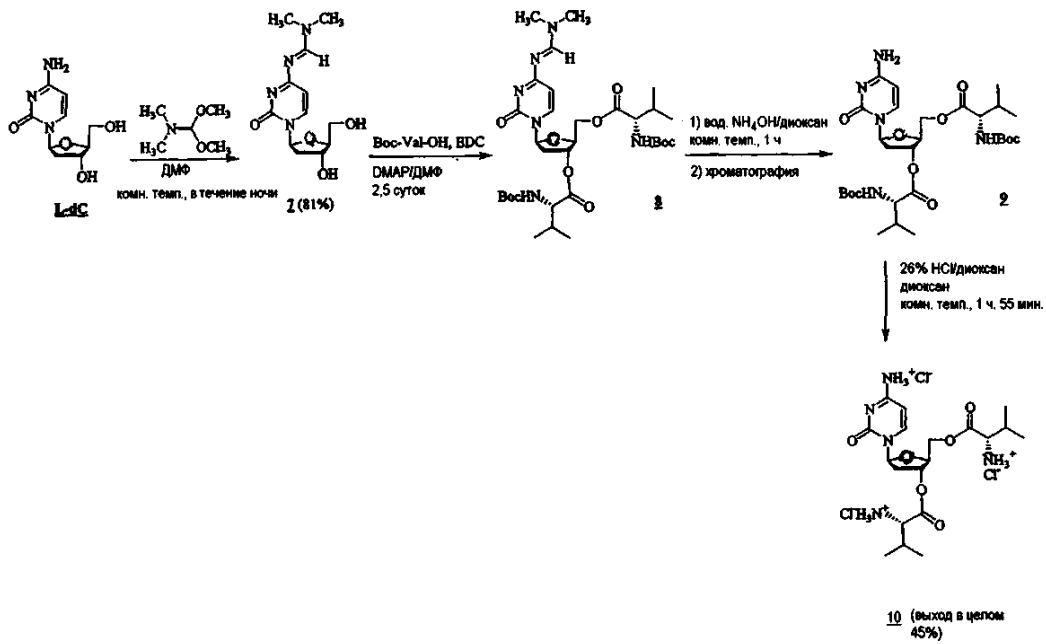
Синтез N⁴-ацетил-2'-дезоксид-β-L-цитидина

Фиг. 3

Синтез N⁴-[(диметиламино)метил]-2'-дезоксид-β-L-цитидина

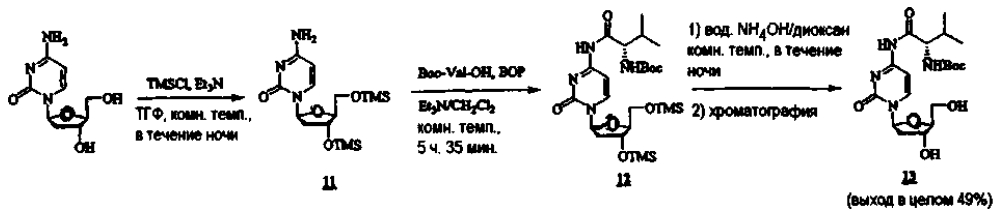
Фиг. 4

Синтез 3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксид-β-L-цитидина

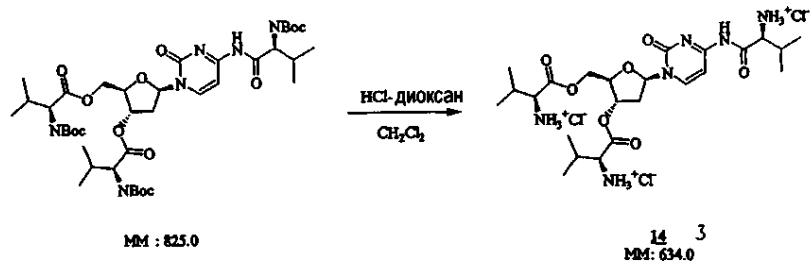


Фиг. 5

Синтез 3',5'-ди-О-валиниловых эфиров 2'-дезоксид-β-L-цитидина

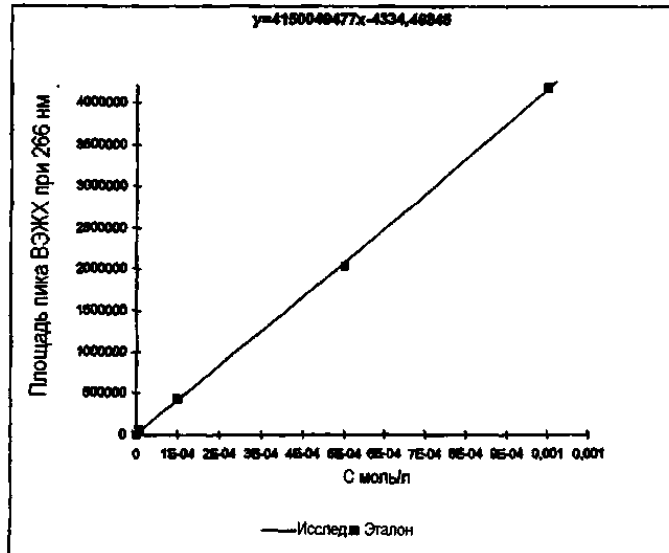


Фиг. 6

Синтез N^4 -Вос-валинилового эфира 2'-дезоксид-β-L-цитидина

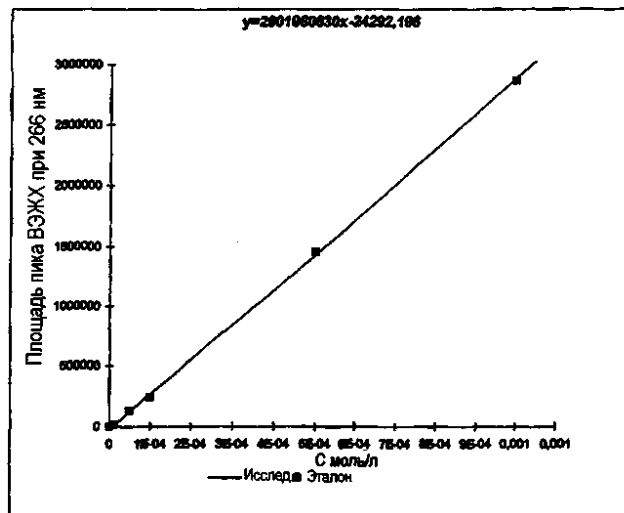
Фиг. 7

Синтез 3',5', N^4 -три-(L-валинил)-L-2'-дезоксидцитидина



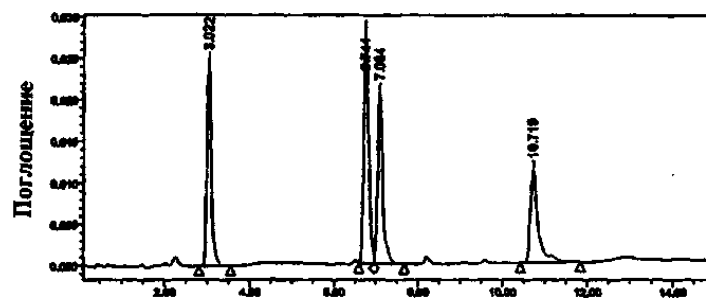
Фиг. 8а

Калибровочная кривая растворимости для D-dc



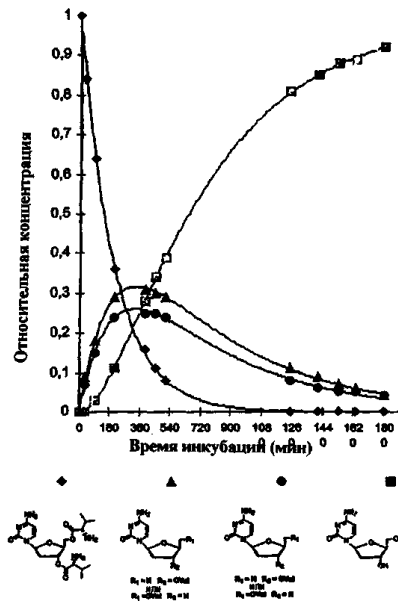
Фиг. 8b

Калибровочная кривая растворимости для 3',5'-дивалинилового эфира L-dC

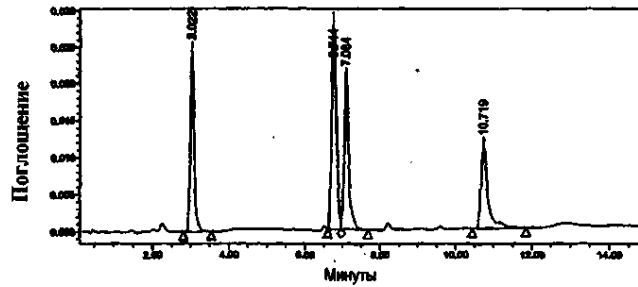


Фиг. 9а

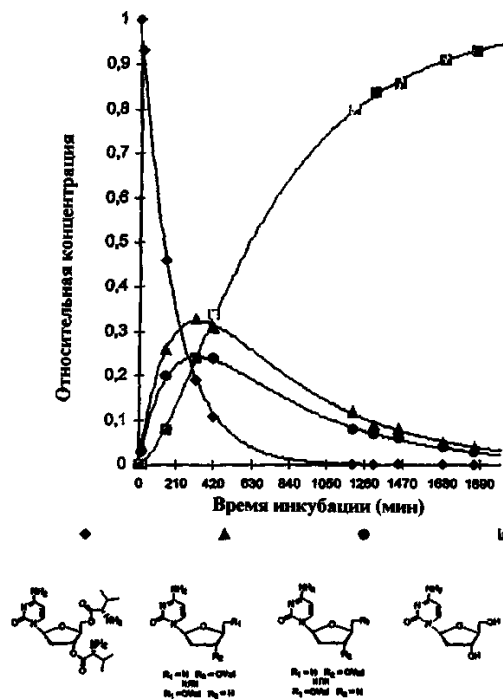
ВЭЖХ-хроматограмма - 7,5 ч при pH 7,42



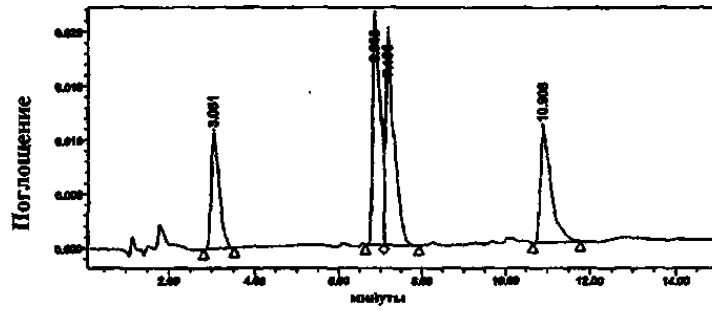
Фиг. 9b
Кинетические кривые при pH 7,42



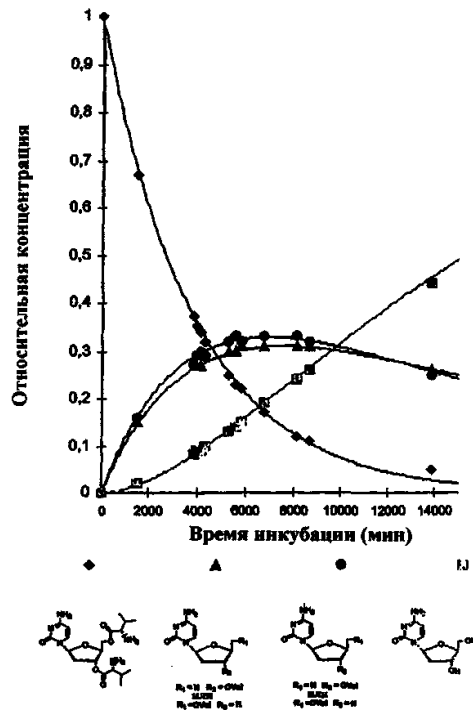
Фиг. 10a
ВЭЖХ-хроматограмма - 5,33 ч при pH 7,20



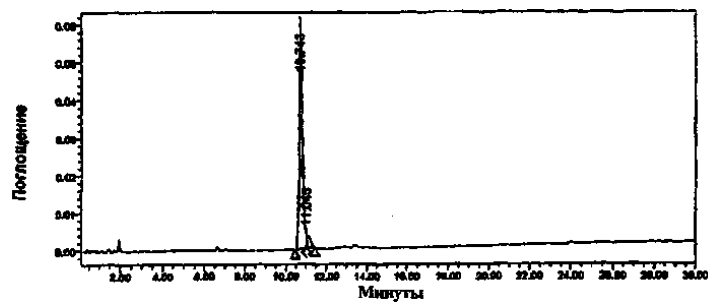
Фиг. 10b
Кинетические кривые при pH 7,20



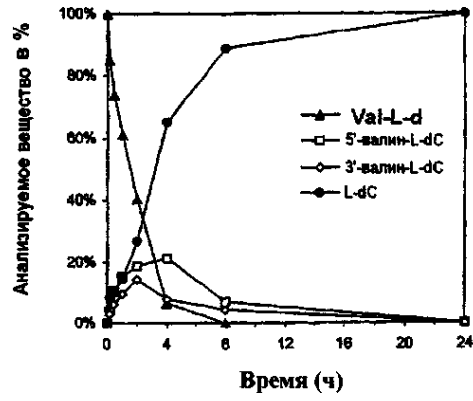
Фиг. 11а
ВЭЖХ-хроматограмма - 95,7 ч при pH 4,51



Фиг. 11б
Кинетические кривые при pH 4,51

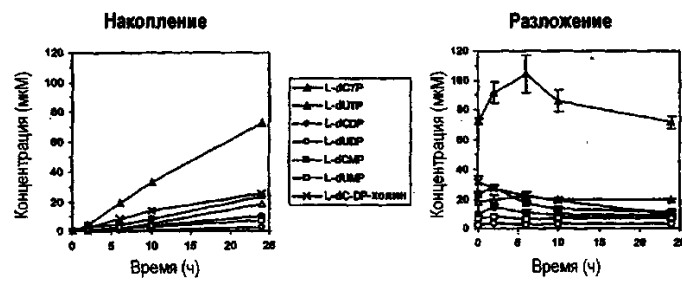


Фиг. 12
ВЭЖХ-хроматограмма - 48 ч при pH 1,23



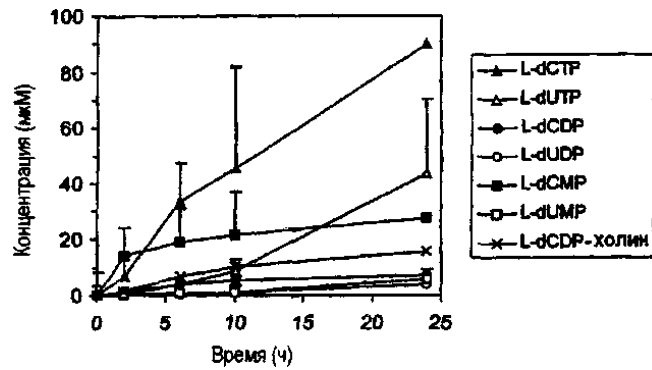
Фиг. 13

Метаболизм in vitro диVal-L-dC в плазме



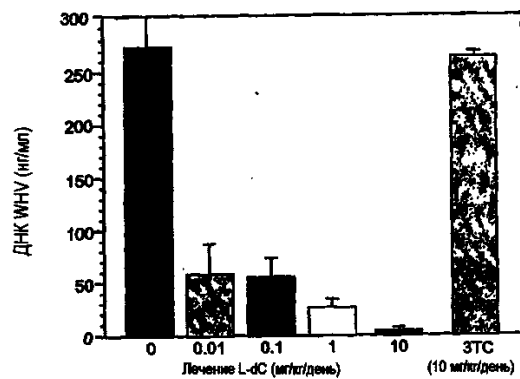
Фиг. 14

Внутриклеточный метаболизм L-dC в клетках HEPG2



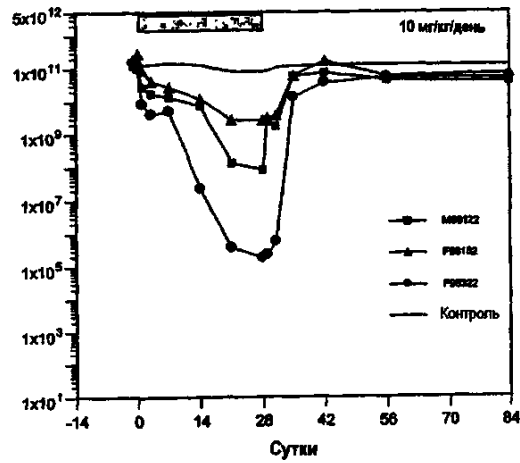
Фиг. 15

Внутриклеточный метаболизм L-dC в первичных гепатоцитах человека



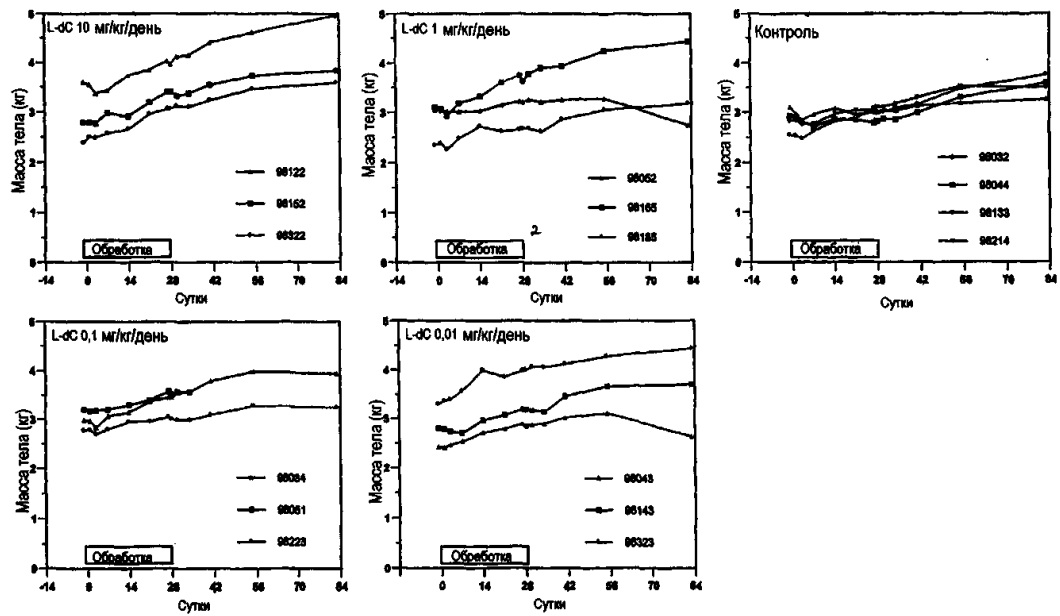
Фиг. 16

Противовирусная активность L-dC в зависимости от дозы на модели лесных сурков



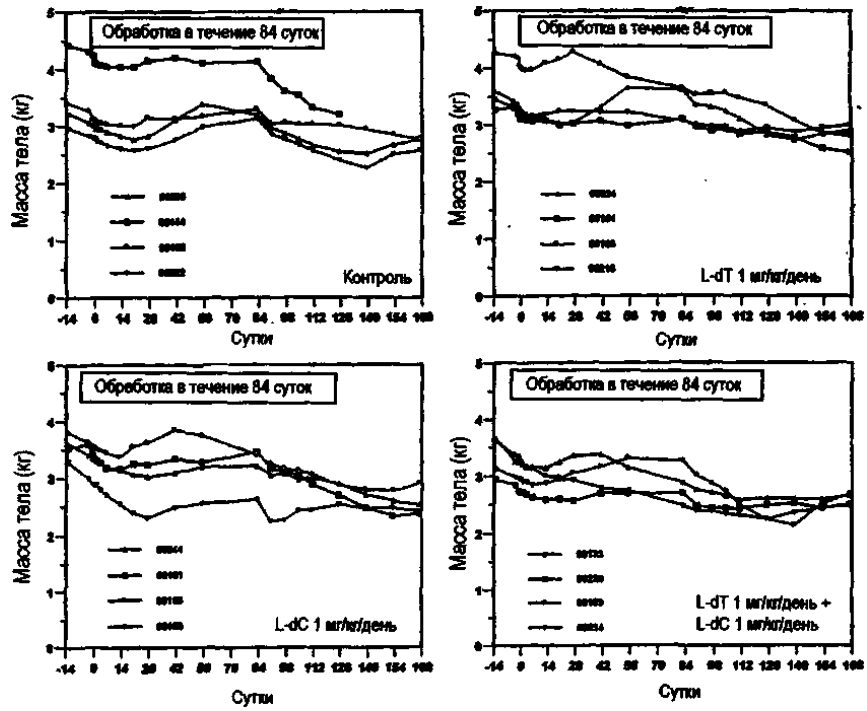
Фиг. 17

Противовирусная активность L-dC на модели лесных сурков



Фиг. 18

Масса тела лесных сурков, обработанных L-dC, перорально в течение 28 суток



Фиг. 19

Масса тела у лесных сурков, обработанных L-dC, перорально в течение 12 недель



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6