

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
Международное бюро



РСТ



(43) Дата международной публикации:
23 декабря 2004 (23.12.2004)

(10) Номер международной публикации:
WO 2004/111071 A1

(51) Международная патентная классификация ⁷:
C07H 19/10, A61K 31/7064, A61P 37/00

(21) Номер международной заявки: РСТ/RU2003/000513

(22) Дата международной подачи:
21 ноября 2003 (21.11.2003)

(25) Язык подачи: русский

(26) Язык публикации: русский

(30) Данные о приоритете:
2003118102 16 июня 2003 (06.06.2003) RU

(71) Заявители (для всех указанных государств, кроме (US):)
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР» [RU/RU]; 630559 Новосибирская обл., Новосибирский район, посёлок Кольцово (RU) [GOSUDARSTVENNY NAUCHNY TSENTR VIRUSOLOGII I BIOTEKHOLOGII «VEKTOR», pos. Koltsovo (RU)]. ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В.А.ЭНГЕЛЬГАРДТА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК [RU/RU]; 119991 Москва, ул. Вавилова, д. 32, ГСП-1 (RU) [INSTITUT MOLEKULARNOI BIOLOGII IM. V.A.ENGELGARDTA ROSSIJSKOI AKADEMII NAUK, Moscow (RU)].

(72) Изобретатели; и

(75) Изобретатели/Заявители (только для (US):)
ПОКРОВСКИЙ Андрей Георгиевич [RU/RU]; Новосибирская обл., Новосибирский район, посёлок Кольцово, д. 32, кв. 41 (RU) [POKROVSKY, Andrei Georgievich, pos. Koltsovo (RU)]. ПРОНЯЕВА Татьяна Рудольфовна [RU/RU]; Новосибирская обл., Новосибирский район, посёлок Кольцово, кв.

6, кв. 58 (RU) [PRONYAEVA, Tatyana Rudolfovna, pos. Koltsovo (RU)]. ФЕДЮК Нина Владимировна [RU/RU]; Новосибирская обл., Новосибирский район, посёлок Кольцово, д. 3, кв. 15 (RU) [FEDYUK, Nina Vladimirovna, pos. Koltsovo (RU)]. КУХАНОВА Марина Константиновна [RU/RU]; 117071 Москва, Малая Калужская ул., д. 8, кв. 44 (RU) [KUKHANOVA, Marina Konstantinovna, Moscow (RU)]. ШИРОКОВА Елена Анатольевна [RU/RU]; 117437 Москва, ул. Академика Арцимовича, д. 9, кв. 17 (RU) [SHIROKOVA, Elena Anatolievna, Moscow (RU)]. ЯСЬКО Максим Владимирович [RU/RU]; 111396 Москва, Зелёный пр-кт, д. 40, корп. 1, кв. 37 (RU) [YASKO, Maksim Vladimirovich, Moscow (RU)]. ХАНДАЖИНСКАЯ Анастасия Львовна [RU/RU]; 119146 Москва, 3-я Фрунзенская ул., д. 12, кв. 27 (RU) [KHANDAZHINSKAYA, Anastasia Lvovna, Moscow (RU)]. ЯНВАРЁВ Дмитрий Васильевич [RU/RU]; 129642 Москва, ул. Сухонская, д. 9, кв. 280 (RU) [YANVAREV, Dmitry Vasilievich, Moscow (RU)].

(81) Указанные государства (национально). CA, IN, JP, US.

(84) Указанные государства (регионально): европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

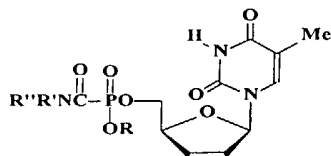
Опубликована

С отчётом о международном поиске.

В отношении двухбуквенных кодов, кодов языков и других сокращений см. «Пояснения к кодам и сокращениям», публикуемые в начале каждого очередного выпуска Бюллетеня РСТ.

(54) Title: 5'-AMINOCARBONYL-PHOSPHONATES d4T INHIBITORS FOR REPRODUCING HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS

(54) Название изобретения: 5'-АМИНОКАРБОНИЛФОСФОНАТЫ d4T-ИНГИБИТОРЫ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА



R' = H, alkyl, aryl; R'' = H, alkyl, aryl; R' = cyclic alkyl
R = alkyl

(57) Abstract: The invention relates to molecular biology, virology and medicine, namely to the use of novel derivatives of 2'3'-dideoxyl-2'3'-didehydrothymidine (d4T)-aminocarbonyl-phosphonates of general formula (I), wherein R'=H, alkyl, aryl, R''=H, alkyl, aryl; R'=cycloalkyl, R=alkyl, in the form of HIV inhibitors. In particular, said compounds exhibit the ability to suppress the reproduction of a type-one human immunodeficiency virus in a passage culture of MT-4 lymphocytes. The antiviral activity of the inventive novel compounds is higher than the d4T activity with respect to HIV.

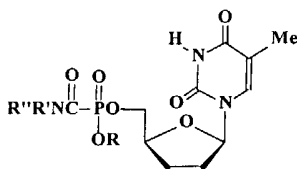
[Продолжение на след. странице]



WO 2004/111071 A1



(57) Реферат: Изобретение относится к области молекулярной биологии, вирусологии и медицины, а именно к применению новых производных 2'3'-дидезокси-2'3'-дидегидротимидина (d4T) – аминокарбонилфосфонатов с общей формулой:



R' = H, alkyl, aryl; R'' = H, alkyl, aryl; R', R'' = cyclic alkyl

R = alkyl

в качестве ингибиторов ВИЧ, в частности, эти соединения обладают способностью подавлять репродукцию вируса иммунодефицита человека I типа в перевиваемой культуре лимфоцитов МТ-4. Антивирусная активность новых соединений в отношении ВИЧ превосходит активность d4T.

5'-Аминокарбонилфосфонаты d4T - ингибиторы репродукции вируса иммунодефицита человека

Изобретение относится к области молекулярной биологии,
5 вирусологии и медицины, а именно к применению новых производных
нуклеозидов, а именно амидов d4T для подавления репродукции вируса
иммунодефицита человека.

Новые соединения являются высокоэффективными ингибиторами
репродукции вируса иммунодефицита человека 1-го типа в культуре
10 перевиваемых лимфоцитов MT-4, а так же обеспечивают защиту клеток от
цитопатогенного действия вируса.

В настоящее время известен целый ряд соединений, обладающих
противовирусной активностью в отношении ВИЧ, в том числе и
используемых в медицинской практике. К ним относятся производные
15 нуклеозидов, ингибиторы протеаз и так называемые ненуклеозидные
ингибиторы. Среди нуклеозидных производных наиболее известны и
используются 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZT), 2'3'-дидезоксицитидин,
2'3'-дидезоксиинозин, 2'3'-дидезокси-2'3'-дидегидротимидин и 2'3'-
дидезокси-3'-тиотимидин [1-2].

20 Наиболее близким аналогом заявляемого соединения (прототипом)
является соединение, относящееся к группе нуклеозидных ингибиторов
2'3'-дидезокси-2'3'-дидегидротимидин (d4T) [2]. При умеренной
токсичности для неинфицированных перевиваемых клеток лимфоидной
линии MT-4 это соединение обладает высокой анти-ВИЧ активностью.
25 Механизм действия указанных соединений-аналогов состоит в том, что
после проникновения в инфицированные клетки они подвергаются
трифосфорилированию и специфично блокируют синтез ДНК,
катализируемый обратной транскриптазой ВИЧ.

Однако, к сожалению, по сравнению с природными нуклеозидами,
30 процесс фосфорилирования модифицированных нуклеозидов клеточными

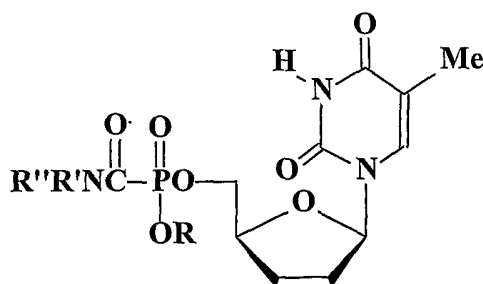
ферментами значительно менее эффективен и протекает медленно, что дает время проникшему в клетки вирусу интегрироваться в геном в форме провирусной ДНК. Кроме того, высокая изменчивость ВИЧ приводит к быстрому возникновению резистентных штаммов вируса [3,4], и, следовательно, к необходимости смены препарата на основе выше

приведенных соединений-аналогов, в том числе и на основе соединения-прототипа. К тому же, в условиях длительного применения, используемые препараты оказывают выраженное токсическое действие на организм.

Техническим результатом изобретения является создание новых

высокоэффективных в отношении ВИЧ модифицированных нуклеозидных производных, способных проникать внутрь клетки, устойчивых к действию ферментов дефосфорилирования и обладающих избирательной активностью в подавлении синтеза ДНК, катализируемого обратной транскриптазой ВИЧ.

Указанный технический результат достигается тем, что согласно изобретению, заявляются новые соединения 5'-аминокарбонилфосфонаты – производные 2'-дезокси-2'-дидегидротимицина (d4T- прототип, [2]) общей формулы:



где: R' = H, alkyl, aryl; R'' = H, alkyl, aryl; R', R'' = cyclic alkyl

R = alkyl

которые являются низкотоксичными ингибиторами вируса иммунодефицита человека.

Относящийся к группе нуклеозидных ингибиторов 2'3'-дидезокси-2'3'-дидегидротимидин (d4Т- прототип, [2]) при умеренной токсичности для неинфицированных перевиваемых клеток лимфоидной линии МТ-4 обладает высокой анти-ВИЧ активностью, что позволило провести на его основе направленный синтез новых эффективных производных.

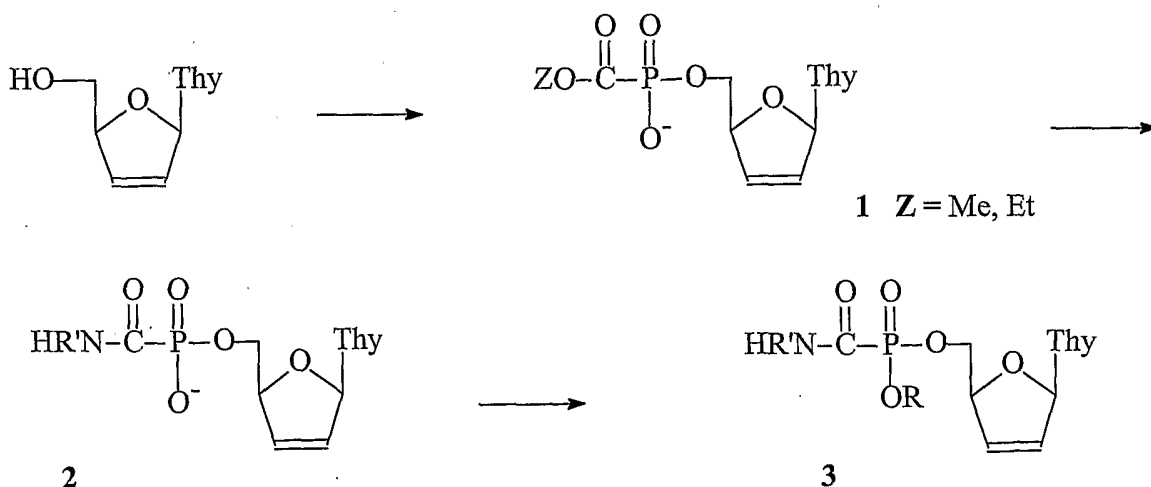
На фиг. 1 приведены дозозависимые кривые для расчета количественных характеристик ингибирования ВИЧ-1 исследуемыми соединениями (на примере соединения 3 б) при одновременном внесении с вирусом. Аналогичные графики получены и для соединений 3 а; 3 с.

На фиг. 2 приведены дозозависимые кривые для расчета количественных характеристик ингибирования ВИЧ-1 исследуемыми соединениями (на примере соединения 3 б) при внесении после адсорбции вируса. Аналогичные графики получены и для соединений 3 а; 3 с.

Схема получения заявляемых целевых

5'аминокарбонилфосфонатов

Целевые 5'аминокарбонилфосфонаты получали по следующей схеме:



Исходным соединением послужил 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-этоксикарбонилфосфонат (1) (или соответствующий 5'-метоксикарбонилфосфонат), синтезированный ранее. Аминирование этоксикарбонилфосфоната (1) соответствующими аминами приводит к амидофосфонатам (2), которые алкилируют спиртами в присутствии триизопропилсульфонилхлорида (TPSCl) или в условиях реакции Мицунобу.

Ниже приведены конкретные примеры, раскрывающие сущность изобретения.

10

Пример 1.

2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин -5'-аминокарбонилфосфонат (соединение 2a) (R'=H).

2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-этоксикарбонилфосфонат (73 мг, 0,2 ммоль) (или -5'-метоксикарбонилфосфонат, 70 мг, 0,2 ммоль) растворили в 25% водном растворе аммиака (3 мл), полученный раствор перемешивали 2 часа при комнатной температуре, а затем сконцентрировали в вакууме. Остаток растворили в воде и хроматографировали на DEAE-Toyopearl, элюировали линейным градиентом NH_4HCO_3 (0-0,2 М), целевой продукт элюировали 0,12 М NH_4HCO_3 . Получили 62 мг (94%) соединения (1). УФ УФ (MeOH, $\lambda_{\text{макс}}$): 266 нм. ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7,51 (1H, с, H6), 6,87 (1H, м, H1'), 6,41 (1H, м, H2'), 5,90 (1H, м, H3'), 5,03 (1H, м, H4'), 4,09 (2H, м, H5'), 1,81 (3H, с, CH_3). ^{31}P ЯМР (D_2O , δ , м.д.): -1,62 с.

25

2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(этил)(аминокарбонил)фосфонат (соединение 3a) (R=Et, R'=H).

Метод А. Соединение (2a) (70 мг, 0,21 ммоль) растворили в пиридине (2 мл) и раствор сконцентрировали в вакууме. Эту процедуру повторили три раза, а затем остаток растворили в пиридине (3 мл) и

добавили EtOH (0.5 мл) и TPSCl (90 мг, 0.3 ммоль). Реакционную массу перемешивали 16 часов при комнатной температуре. Растворитель удалили в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (2 x 25 см), элюируя системой хлороформ-метанол 96:4.

- 5 Получили 54 мг (72%) соединения **3a**. УФ (MeOH, $\lambda_{\text{макс}}$): 266 нм. ^1H ЯМР (CD_3OD , δ , м.д.): 7.35 (1H, с, H6), 6.96 (1H, м, H1'), 6.37 (1H, м, H2'), 5.94 (1H, м, H3'), 5.02 (1H, м, H4'), 4.37 (2H, м, H5'), 4.19 (2H, м, CH_2CH_3), 1.88 (3H, с, CH_3), 1.35 (3H, м, CH_2CH_3). ^{31}P ЯМР (CD_3OD , δ , м.д.): 0.15 с, -0.12 с.

- 10 **Метод Б.** К раствору соединения **1** (120 мг, 0.5 ммоль) в ДМФА (2 мл) прибавили трифенилфосфин (130 мг, 0.5 ммоль) и этанол (100 мкл), раствор охладили до 4°C и прибавили к нему раствор диэтилазодикарбоксилата (0.5 ммоль, 77 мкл) в ТГФ (1 мл). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре 5 ч, упаривали, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (2.5 x 30 см), элюируя градиентом метанола в хлороформе (0→10%). Получили 45 мг (60%) соединения **3a**.

Пример 2.

- 20 **2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(N-метиламинокарбонил)фосфонат (соединение 2b) (R'=Me).**

- Соединение **2b** синтезировали из соединения **1** по методу, описанному для аминокарбонилфосфоната **2a** кипячением в водном растворе метиламина. Выход соединения **2b** составил 92%. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм. ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7.43 (1H, с, H6), 6.85 (1H, м, H1'), 6.35 (1H, м, H2'), 5.86 (1H, м, H3'), 4.97 (1H, м, H4'), 4.03 (2H, м, H5'), 2.61 (3H, с, CH_3NH), 1.76 (3H, с, CH_3). ^{31}P ЯМР (D_2O , δ , м.д.): -1.53 с.

2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(этил)(N-метиламинокарбонил)фосфонат (соединение 3b) (R'=Me, R=Et). Соединение **3b** синтезировали аналогично аминокарбонилфосфонату **3a** с

выходом 48% по методу А и 80% по методу В. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм. ^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 8.92 (1H, с, NH), 7.39 (1H, с, NH), 7.34 и 7.32 (1H, 2с, H6), 7.00 (1H, м, H1'), 6.28 (1H, м, H2'), 5.88 (1H, м, H3'), 4.98 (1H, м, H4'), 4.40 (2H, м, H5'), 4.19 (2H, м, CH_2CH_3), 2.87 и 2.86 (3H, 2с, CH_3NH),
5 1.93 (3H, с, CH_3), 1.34 (3H, м, CH_2CH_3). ^{31}P ЯМР (CD_3CN , δ , м.д.): -0.27 с, -0.76 с.

Пример 3.

2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(N-фенилэтиламинокарбонил)фосфонат (соединение 2с) ($\text{R}'=\text{PhCH}_2\text{CH}_2-$).

10 Соединение 2с синтезировали из соединения 1 по методу, описанному для аминокарбонилфосфоната 2а перемешиванием в фенилэтиламине. Выход соединения 2с составил 94%. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм. ^1H ЯМР (D_2O , δ , м.д.): 7.43 (1H, с, H6), 7.45-7.17 (5H, м, Ph), 6.89 (1H, м, H1'), 6.25 (1H, м, H2'), 5.86 (1H, м, H3'), 4.95 (1H, м, H4'), 4.10 (2H, м, H5'), 3.60 (2H, м, CH_2NH), 2.61 (2H, с, CH_2Ph), 1.86 (3H, с, CH_3). ^{31}P ЯМР (D_2O , δ , м.д.): -1.47 с.

2',3'-Дидезокси-2',3'-дидегидротимидин-5'-(этил)(N-фенилэтиламинокарбонил)фосфонат (соединение 3с) ($\text{R}'=\text{PhCH}_2\text{CH}_2-$, $\text{R}=\text{Et}$). Соединение 3с синтезировали аналогично
20 аминокарбонилфосфоната 3а с выходом 51% по методу А и 72% по методу В. УФ (MeOH): $\lambda_{\text{макс}}$ 267 нм. ^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 9.17 (1H, с, NH), 7.45 (1H, с, NH), 7.33 и 7.31 (1H, 2с, H6), 7.45-7.17 (5H, м, Ph), 6.99 (1H, уш. с, H1'), 6.27 и 6.17 (1H, 2м, H2'), 5.84 (1H, м, H3'), 4.91 (1H, м, H4'), 4.29 (2H, м, H5'), 4.09 (2H, м, CH_2CH_3), 3.62 (2H, м, CH_2NH), 2.85
25 (2H, с, CH_2Ph), 1.91 (3H, 2с, CH_3), 1.29 (3H, м, CH_2CH_3). ^{31}P ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): -0.14 с, -0.75 с.

Исследование ингибирования репродукции ВИЧ включает культивирование первично инфицированных лимфоидных клеток линии МТ-4 в присутствии исследуемых соединений, конечные концентрации

которых в культуральной среде составляют 0,0001-100 мкг/мл, на протяжении одного пассажа - в течение 4 суток.

Об ингибировании репродукции ВИЧ в культуре чувствительных клеток судят по снижению накопления вирусспецифического белка p24 (по данным иммуноферментного анализа), а так же по увеличению жизнеспособности клеток в присутствии препарата по сравнению с контролем, определяемому на 4-е сутки культивирования [5-6] при окрашивании 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

10 **Пример 4.**

Оценка цитотоксичности соединений.

Цитотоксичность препарата оценивают путем добавления его разведений в бессывороточной среде RPMI-1640 к клеточной суспензии МТ-4, помещенной в лунки 96-луночного планшета ("Cel-Cult", England), до конечных концентраций 0,001-100 мкг/мл (по три лунки на каждую дозу) с последующим культивированием при 37°C в течение 4 суток [7]. Посевная концентрация составляет $0,5 \times 10^6$ клеточных частиц в миллилитре. Контролем служат клетки без добавления препарата, вместо которого вносят такое же количество бессывороточной среды.

20 Жизнеспособность клеток подсчитывают на 4 сутки культивирования, пользуясь формазановым методом (прижизненным окрашиванием клеток 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Токсичность различных доз препарата определяют по жизнеспособности клеток относительно контроля (Фиг.1, 2), по полученным результатам

25 строят дозозависимую кривую и определяют концентрацию, на 50% снижающую жизнеспособность клеток (CD_{50}). Следует отметить, что исследуемые соединения не оказывают токсического действия на клетки МТ-4 в эффективных концентрациях: 50% токсичные дозы на 5-6 порядков превышают эффективные в отношении ВИЧ-1 дозы (таблица 1).

Пример 5.**Изучение влияния исследуемых соединений на репродукцию ВИЧ-1 в культуре клеток МТ-4.**

Исследование противовирусной активности соединений в отношении ВИЧ-1 проводят на перевиваемой линии чувствительных клеток МТ-4. Для заражения используют супернатант инфицированных клеток, хранящийся в жидком азоте, множественность заражения составляет 0,2-0,5 инфекционных единиц на клетку. Суспензию клеток МТ-4 с концентрацией $2,0 \times 10^6$ клеточных частиц в миллилитре и жизнеспособностью не менее 90% помещают в лунки 96-луночного планшета ("Orange") непосредственно после внесения вирусодержащего материала и сразу же добавляют исследуемые соединения, разведенные в среде RPMI-1640 без сыворотки, до конечных концентраций 0,0001-100 мкг/мл (по три лунки на каждую дозу). Контролями служат инфицированные ВИЧ-1 клетки МТ-4 без добавления препарата (вместо препарата вносят такое же количество среды RPMI-1640 без добавок) и неинфицированные клетки.

Планшет инкубируют в течение часа при 37°C для адсорбции вируса; затем клетки разводят до посевной концентрации ($0,5 \times 10^6$ в миллилитре) питательной средой RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки КРС, предварительно инактивированной прогреванием при 56°C в течение 30 минут, 300 мг/мл L-глутамина и 100 мкг/мл гентамицина. Затем планшет помещают в термостат на 37°C в атмосфере 5% CO_2 . На 4 сутки культивирования подсчитывают концентрацию и жизнеспособность клеток формазановым методом. По полученным данным строят графики зависимости прироста жизнеспособности клеток относительно контроля под действием возрастающих доз препаратов, т.е. определяют способность препаратов защищать инфицированные клетки от цитопатогенного действия вируса.

Оценку анти-ВИЧ активности соединений проводят с использованием количественного определения вирусспецифического белка р24 методом прямого иммуноферментного анализа, как описано в [8], и строят дозозависимые кривые (Фиг. 1,2), по которым рассчитывают концентрации, на 50 и 90% подавляющие прирост вирусного антигена (ID₅₀ и ID₉₀). Терапевтический индекс, или индекс селективности (IS) считают как отношение 50%-ной токсической концентрации соединения к его 50%-ной эффективной дозе (результаты представлены в таблице). На основании этих количественных показателей ингибирования можно судить об эффективности противовирусного действия соединений, заключающейся в высокой степени подавления репликации ВИЧ-1 в культуре клеток МТ-4, сравнимой с эффективностью d4Т при одновременном внесении препарата и вируса и в 2 – 5 раз превышающей ее при проведении исследования в постадсорбционных условиях.

Из полученных экспериментальных данных видно, что исследуемые соединения, не оказывая токсического действия на клетки в эффективных концентрациях (50%-е токсические дозы на 5–6 порядков превышают 50%-е ингибирующие дозы), помимо способности защищать клетки от гибели в результате цитопатогенного действия вируса (>50% в дозах 0,1 – 0,5 мкг/мл), в высокой степени подавляют репродукцию вируса иммунодефицита 1 типа в культуре клеток МТ-4. Терапевтические индексы исследуемых соединений (IS) сравнимы с IS d4Т при одновременном внесении препарата и вируса и в 2–5 раз превышают IS d4Т в постадсорбционных условиях.

Это говорит о перспективности новых производных d4Т для дальнейших исследований с целью создания на их основе лекарственных форм для лечения ВИЧ/СПИД.

Таблица 1.

Противовирусная активность аминокарбонилфосфонатов d4T против ВИЧ-1 ГКВ-4046:

5

Соединение	CD ₅₀ , μM	при одновременном внесении препарата и			при внесении препарата после адсорбции вируса		
		ID ₅₀ , PD ₅₀ , μM	ID ₉₀ , μM	IS	ID ₅₀ , PD ₅₀ , μM	ID ₉₀ , μM	IS
d4T	314,0	0,01	0,3	31400	0,24	23,8- 2,4	1308,3
(3a)	214,31	0,006 0,36	0,72	35718,3	0,03 0,51	7,21	7143,7
(3b)	88,4	0,0013 0,19	0,5	68000	0,027 0,13	1,34	3274,1
(3c)	66,3	0,0021 0,24	0,1	31857	0,043 0,5	-	1555,8

*Относительную степень защиты инфицированных клеток от гибели различными дозами препарата рассчитывают по формуле:

$$\text{Защита (\%)} = (X - V) / (K - V) * 100,$$

10 где X – % жизнеспособности инфицированных клеток в присутствии препарата на 4 сутки культивирования, K – % жизнеспособности в контроле клеток, V – % жизнеспособности инфицированных клеток в контроле вируса (без добавления препарата).

Относительную степень ингибирования репродукции вирусного
15 белка считают по формуле:

$$\% \text{ингибир.} = (P_x - P_o) / (P - P_o) * 100,$$

где P_x – концентрация белка p24 на 4 сутки культивирования в присутствии препарата, P_o – концентрация p24 после 1 часа

инкубирования ВИЧ-1 с клетками без добавления препарата ("О" точка), Р – концентрация р24 на 4 сутки культивирования ВИЧ-1 в клетках без добавления препарата (контроль вируса).

Терапевтический индекс, или индекс селективности (IS),
5 определяют как отношение концентрации препарата, токсичной для 50% клеток (CD_{50}), к концентрации, на 50% подавляющей прирост вирусного антигена (ID_{50}):

$$IS = CD_{50} / ID_{50}$$

Промышленная применимость

10 Заявляемые соединения обладают выраженной ингибирующей активностью в отношении вируса иммунодефицита человека и могут являться потенциальными кандидатами для получения противовирусных средств, используемых в медицине и фармацевтической промышленности.

15

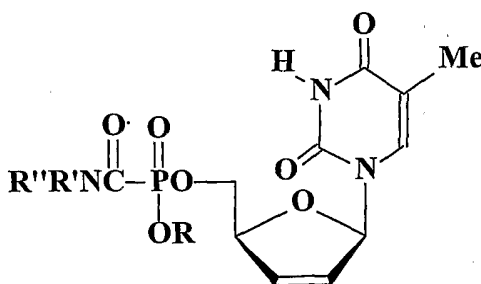
Источники научно-технической и патентной информации:

1. Veal G.J., Agrawal S., Byrn R.A. Synergistic inhibition of HIV-1 by an antisense oligonucleotide and nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors. *Antiviral Research* 1998, 38, 63-73.
- 20 2. Cardona V.M., Ayi A.I., Aubertin A.M., Guedj R. Synthesis and anti-HIV activity of some novel arylphosphate and H-phosphonate derivatives of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine and 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxythymidine. *Antiviral Res* 1999, 42(3), 189-196.
3. Schinazi R.F., Lloyd R.M., Ramanathan C.S. and Taylor E.W.
25 Antiviral Drug Resistance Mutation in Human Immunodeficiency Virus Ttype 1 Reverse Transcriptase Occur in Specific RNA Structural Regions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994, 38(2), 268-274.

4. Avramis V.I., Kwock R., Solorzano M.M. and Gomperts E. Evidence of In Vitro Development of Drug Resistance to Azidothymidine in T-Lymphocytic Leukemia Cell Lines (Jurkat E6-1/AZT-100) and in Pediatric Patients with HIV-1 Infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 1993, 6, 1287-1296.
5. Svinarchuk F.P., Konevets D.A., Pliasunova O.A., Pokrovsky A.G., Vlasov V.V. Inhibition of HIV proliferation in MT-4 cells by antisense oligonucleotide conjugated to lipophilic groups. *Biochimie* 1993, 75, 49-54.
- 10 6. Pokrovskii A.G., Pliasunova O.A., Blinov V.M., Vlasov V.V., Svinarchuk F.P., Abramova T.V., Gorn V.V. and Konevets D.A. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus by Sense and Antisense Oligodeoxynucleotides. *Molecular Biology* 1993, 27(5), N1, 641-644.
- 15 7. Патент РФ 2144956, МПК. С 12 N 7/04, опубли. 27.01.2000 г.
8. Иммуноферментный анализ // под ред. Т-Т. Нго, Г. Ленхоффа. – М: Мир. – 1988.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

5'-Аминокарбонилфосфонаты d4T, имеющие общую формулу

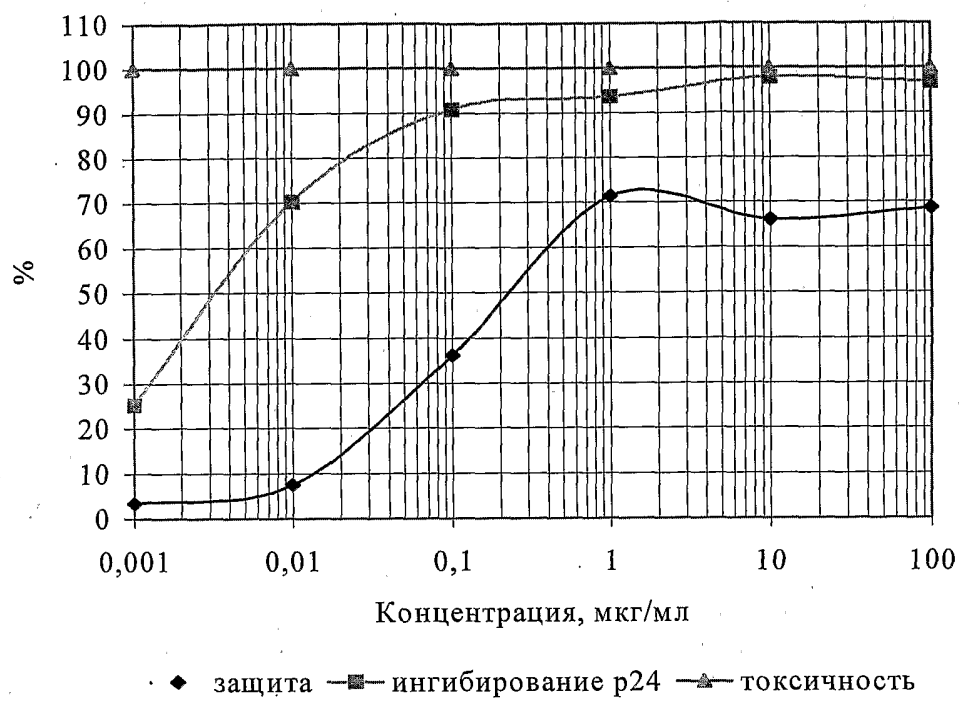


где: R' = H, alkyl, aryl; R'' = H, alkyl, aryl; R', R'' = cyclic alkyl

R = alkyl

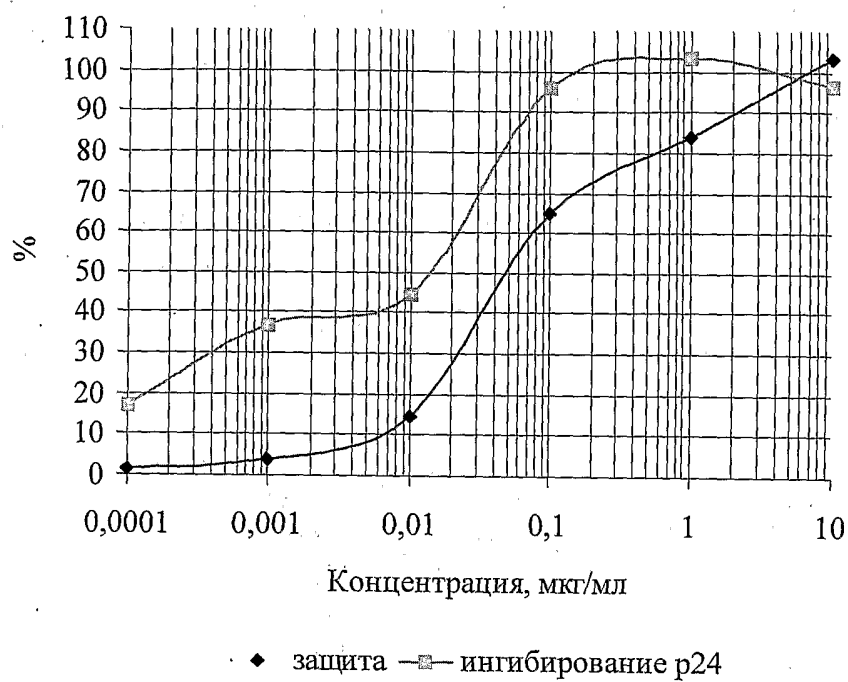
- ингибиторы репродукции вируса иммунодефицита человека.

1/2



Фиг.1

2/2



Фиг. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2003/000513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07H 19/10, A61K 31/7064, A61P 37/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC -7:		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) -7:		
C07H 19/10, A61K 31/7064, A61P 37/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RU 2188203 C2 (GOSUDARSTVENNIY NAUCHNIY TSENTR VIRUSOLOGII I BIOTEKHNOLOGII "VEKTOR" et al.) 27.08.2002	1
A	EP 0306597 A2 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 15.03.1989	1
A	RU 2130942 C1 (S END TI SAIENS END TEKHNOLODJI INK) 27.05.1999	1
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 April 2004 (15.04.2004)		29 April 2004 (29.04.2004)
Name and mailing address of the ISA/		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2003/000513

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07H 19/10, A61K 31/7064, A61P 37/00

Согласно международной патентной классификации (МПК-7)

В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-7:

C07H 19/10, A61K 31/7064, A61P 37/00

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, поисковые термины):

С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2188203 C2 (ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ "ВЕКТОР" и др.) 27.08.2002	1
A	EP 0306597 A2 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 15.03.1989	1
A	RU 2130942 C1 (С ЭНД ТИ САЙЕНС ЭНД ТЕКНОЛОДЖИ ИНК) 27.05.1999	1

последующие документы указаны в продолжении графы С.

данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

A документ, определяющий общий уровень техники

E более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее

O документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

P документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета и т.д.

T более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень

Y документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории

& документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска: 15 апреля 2004 (15.04.2004)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 29 апреля 2004 (29.04.2004)

Наименование и адрес Международного поискового органа
Федеральный институт промышленной собственности

Уполномоченное лицо:

О. Парменова

РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30,1 Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Телефон № 240-25-91

Форма PCT/ISA/210 (второй лист)(июль 1998)