



(51) МПК
C07J 53/00 (2006.01)
C07J 63/00 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2006136409/04, 17.03.2005**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.03.2005

(30) Конвенционный приоритет:
17.03.2004 US 60/553,554
02.07.2004 US 60/584,674

(43) Дата публикации заявки: **27.04.2008**

(45) Опубликовано: **27.04.2010** Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: **US 6579828 A, 21.10.1997. RU 2243233 C1,**
27.12.2004.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
 фазу: **17.10.2006**

(86) Заявка РСТ:
US 2005/008935 (17.03.2005)

(87) Публикация РСТ:
WO 2005/090380 (29.09.2005)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

ПАУЭР Мартин Дейл (US),
МАРТИН Дэвид Юджин (US)

(73) Патентообладатель(и):

ПАНАКОС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.
(US)

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОЛИ 3-О-(3', 3'-ДИМЕТИЛСУКЦИНИЛ)БЕТУЛИНОВОЙ
 КИСЛОТЫ**

(57) Реферат:
 Описываются соли 3-О-(3',3'-
 диметилсукцинил)бетулиновой кислоты (DSB).
 В частности, раскрыто получение,
 фармацевтическая оценка и оценка
 биодоступности *in vivo* N-метил-D-
 глюкаминовой соли и соли щелочных

металлов. Фармацевтические композиции,
 включающие эти солевые формы,
 используются в способах лечения ВИЧ
 инфекции и родственных заболеваний. Описан
 также способ получения солей DSB. 8 н. и 4 з.п.
 ф-лы, 5 табл.

RU 2 387 665 C2

RU 2 387 665 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C07J 53/00 (2006.01)
C07J 63/00 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2006136409/04, 17.03.2005**

(24) Effective date for property rights:
17.03.2005

(30) Priority:
17.03.2004 US 60/553,554
02.07.2004 US 60/584,674

(43) Application published: **27.04.2008**

(45) Date of publication: **27.04.2010 Bull. 12**

(85) Commencement of national phase: **17.10.2006**

(86) PCT application:
US 2005/008935 (17.03.2005)

(87) PCT publication:
WO 2005/090380 (29.09.2005)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj

(72) Inventor(s):

PAUEhR Martin Dejl (US),
MARTIN Dehvid Judzhin (US)

(73) Proprietor(s):

PANAKOS FARMAS'JuTIKALZ, INK. (US)

(54) PHARMACEUTICAL SALTS OF 3-O-(3',3-DIMETHYLSUCCINYL) BETULINIC ACID

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: there are described salts of 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid (DSB). Particularly, there is disclosed production process, pharmaceutical estimation and bioavailability estimation in vivo of N-methyl-D-glucamine salt and

alkali salt. The pharmaceutical compositions containing these salt forms are used in methods of treating HIV infection and related diseases. There is also described method for preparing DBS salts.

EFFECT: improved clinical effectiveness.

12 cl, 5 ex, 5 tbl

R U
2 3 8 7 6 6 5
C 2

R U
2 3 8 7 6 6 5
C 2

Настоящая заявка претендует на положительный результат предварительной заявки на патент США 60/553554, поданной 17 марта 2004 г, и предварительной заявки на патент США 60/584674, поданной 2 июля 2004 г, которые обе полностью включены в описание в качестве ссылки.

Предпосылки изобретения

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к новым солевым формам 3-О-(3',3'-диметилсукцинил)бетулиновой кислоты, также известной как "DSB". Это изобретение также относится к способам лечения ВИЧ инфекции и родственных заболеваний с использованием фармацевтических композиций, включающих солевые формы DSB. Изобретение, кроме того, относится к лекарственным формам фармацевтических композиций, включающих соли DSB.

Предшествующий уровень техники

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является членом семейства лентивирусов, подсемейства ретровирусов. ВИЧ инфицирует и внедряется в клетки иммунной системы, он разрушает иммунную систему организма и делает пациента восприимчивым к оппортунистическим инфекциям и новообразованиям. Иммунный дефект оказывается прогрессирующим и необратимым при высокой смертности, которая достигает 100% в течение нескольких лет.

ВИЧ-1 тропичен и цитопатичен для Т4 лимфоцитов, клеток иммунной системы, которые экспрессируют клеточный поверхностный антиген дифференциации CD4, также известный как ОКТ4, Т4 и leu3. Вирусный тропизм вызван взаимодействиями между гликопротеидом вирусной оболочки, gp20, и молекулами CD4 клеточной поверхности (Dalglish et al., Nature 312:763-767, 1984). Эти взаимодействия не только опосредуют инфекцию восприимчивых клеток ВИЧ, но ВИЧ-1 также тропичен и цитопатичен для Т4 лимфоцитов, клеток иммунной системы, которые экспрессируют клеточный поверхностный антиген дифференциации CD4, также известный как ОКТ4, Т4 и leu3. Вирусный тропизм вызван взаимодействиями между гликопротеидом вирусной оболочки, gp20, и молекулами CD4 клеточной поверхности (Dalglish et al., Nature 312:763-767, 1984). Эти взаимодействия не только опосредуют инфекцию восприимчивых клеток ВИЧ, но также ответственны за вызванное вирусом слияние инфицированных и неинфицированных Т клеток. Это слияние клеток приводит к образованию гигантского многоядерного синцития, гибели клеток и прогрессирующему истощению клеток CD4 у пациентов со СПИДом. Эти явления приводят к вызванному ВИЧ подавлению иммунитета и его последствиям, оппортунистическим инфекциям и новообразованиям.

В дополнение к CD4+ клеткам, диапазон хозяев ВИЧ включает клетки мононуклеарной фагоцитарной линии (см. выше ссылку Dalglish et al.), включая моноциты крови, тканевые макрофаги, клетки Лангерганса кожи и дендритные клетки ретикулула внутри лимфоузлов. ВИЧ также является нейротропным, способным инфицировать моноциты и макрофаги в центральной нервной системе, вызывая тяжелое неврологическое поражение. Макрофаги/моноциты представляют собой главный резервуар ВИЧ. Они могут взаимодействовать и сливаться с Т клетками, несущими CD4, вызывая истощение запаса Т клеток и, таким образом, участвуя в патогенезе СПИДа.

Был достигнут значительный прогресс в разработке лекарственных средств для лечения инфекции ВИЧ-1. Лекарственные средства по поводу ВИЧ инфекции могут включать, но не ограничиваются, по меньшей мере, один из AZT, 3ТС, ddC, d4Т, ddI,

тенофовира, абакавира, невирапина, делавирдина, эфавиренца, саквинавира, ритонавира, иддинавира, нелфинавира, лопинавира, ампренавира и атазанавира или любые другие антиретровирусные препараты или антитела в комбинации друг с другом, или ассоциированные с биологически основанным терапевтическим средством, таким как, например, пептид, полученный из gp41 энфувиртид (Fuzeon; Timeris-Roche)), или растворимый CD4, антитела к CD4 и конъюгаты CD4 или анти-CD4, или как дополнительно представлено в настоящем описании. Комбинации этих препаратов особенно эффективны, и они могут снизить уровни вирусной РНК до не выявляемых уровней в плазме и замедлить развитие вирусной устойчивости с итоговым улучшением состояния здоровья и продолжительности жизни пациента.

Несмотря на эти достижения, еще остаются проблемы, связанные с имеющимися в настоящее время медикаментозными схемами лечения. Многие из препаратов проявляют тяжелую токсичность, имеют другие побочные эффекты (например, перераспределение жира) или требуют сложных схем введения, которые снижают соблюдение пациентами предписанного лечения и, ввиду этого, ограничивают эффективность. В течение длительных периодов времени появляются устойчивые штаммы ВИЧ, даже при комбинированном лечении. Высокая стоимость этих препаратов также представляет собой ограничение их широко распространенному применению, особенно за пределами развитых стран.

Еще существует большая потребность в разработке дополнительных препаратов для преодоления этих проблем. В идеале, они должны были бы быть нацелены на различные стадии жизненного цикла вируса, дополняя арсенал комбинированной терапии, и проявлять минимальную токсичность, в то же время имея более низкие производственные затраты.

Бетулиновая кислота и платановая кислота были выделены из *Syzygium claviform* и, как было определено, обладают активностью против ВИЧ. Бетулиновая кислота и платановая кислота проявили ингибирующую активность против репликации ВИЧ-1 в лимфоцитарных клетках H9 с величинами EC₅₀ соответственно 1,4 мкМ и 6,5 мкМ, и величинами терапевтического индекса (Т.И.) соответственно 9,3 и 14. Гидрирование бутелиновой кислоты дало дигидробетулиновую кислоту, которая проявила несколько более высокую активность против ВИЧ при величине EC₅₀ 0,9 и величине Т.И. 14 (Fujioka, T., et al., J. Nat. Prod. 57:243-247 (1994)). Этерификация бетулиновой кислоты определенными замещенными ацильными группами, такими как 3',3'-диметилглутарильная и 3',3'-диметилсукцинильная группы дала производные, имеющие усиленную активность (Kashiwada, Y., et al., J. Med. Chem. 39:1016-1017 (1996)).

Ацилированные производные бетулиновой кислоты и дигидробетулиновой кислоты, которые представляют собой сильнодействующие средства против ВИЧ, описаны также в патенте США №5679828. Анализы анти-ВИЧ указали на то, что и 3-О-(3',3'-диметилсукцинил)бетулиновая кислота, и аналог дигидробетулиновой кислоты продемонстрировали крайне высокую активность против ВИЧ в остроинфицированных H9 лимфоцитах с величинами EC₅₀ соответственно менее чем $1,7 \times 10^{-5}$ мкМ. Эти соединения проявляют удивительные величины Т.И. соответственно более чем 970000 и более чем 400000.

В патенте США №5468888 раскрываются 28-амидо производные лупанов, которые описаны как оказывающие цитопротективный эффект на клетки, инфицированные ВИЧ.

Ряд тритерпеноидов, включая бетулиновую кислоту, имеют несколько известных видов медицинского применения, включая применение в качестве противоракового

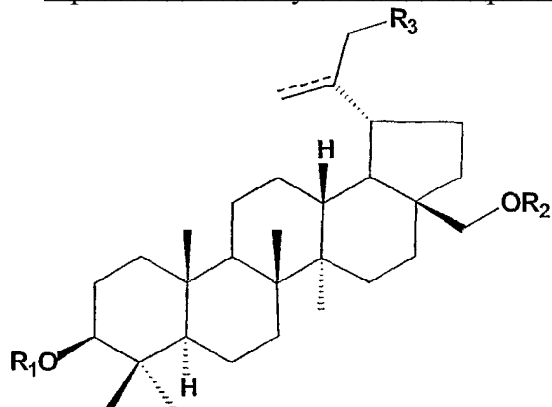
препарата. Anderson et al. в WO 95/04526 обсуждают производные тритерпеноидов, которые применялись при лечении рака, включая их активность против полиаминов, которые требуются клетками для роста с оптимальной скоростью. Было обнаружено, что некоторые из этих тритерпеноидов препятствуют ферментативному синтезу полиамина, требуемому для оптимального клеточного роста, и, таким образом, ингибируют рост раковых клеток, в частности, ингибированием орнитин-декарбоксилазы. Сообщалось также, что бетулиновая кислота обладает противовоспалительной активностью, которая может быть связана с его способностью ингибировать ферменты, участвующие в биосинтезе лейкотриена, включая 5-липоксигеназу.

Chan в патенте Великобритании 1425601 раскрывает то, что карбоксилированные производные дигидробетулиновой кислоты могут быть включены в фармацевтические композиции, но там нет даже намека на то, какое применение имеют эти соединения.

В заявке на патент Японии № JP 01143832 раскрыто, что бетулин и его сложные 3,28-диэфиры могут применяться в области противоракового лечения.

В патенте США №6172110 В1, полностью включенном сюда в качестве ссылки, раскрыты производные бетулина и дигидробетулина, которые имеют следующие формулы или их фармацевтически приемлемые соли.

Производные бетулина и дигидробетулина



где R_1 представляет собой C_2 - C_{20} замещенный или незамещенный карбоксиацил, R_2 представляет собой C_2 - C_{20} замещенный или незамещенный карбоксиацил и R_3 представляет собой водород, галоген, амина, необязательно замещенную моно- или ди-алкиламино, или $-OR_4$, где R_4 представляет собой водород, C_1 - C_4 алканоил, бензоил или C_2 - C_{20} замещенный или незамещенный карбоксиацил, где пунктирная линия представляет необязательную двойную связь между C_{20} и C_{29} .

Производные в патенте США №6172110 В1 образуются введением C_2 - C_{20} замещенной или незамещенной ацильной группы в C_3 -гидрокси или C_{28} -гидрокси группе бетулина и дигидробетулина для получения соответствующих 3-О-ацильных и/или 28-О-ацильных производных. Эти соединения были описаны как полезные для лечения субъекта, инфицированного ретровирусной инфекцией, в частности, ВИЧ, введением, по меньшей мере, одного из указанных выше производных бетулина, необязательно в комбинации с одним или более известных средств для лечения СПИДа или стимуляторов иммунитета.

В заявке на патент США №60/413451 раскрыт 3,3-диметилсукцинилбетулин, и она включена в описание в качестве ссылки. В публикациях Y-M. et al, Bioorg. Chem Lett. 77: 3115-3118 (2001); Kashiwada Y. et al, J. Nat. Prod. 67:1090-1095 (1998); Kashiwada Y. et al, J. Nat. Prod. 63:1619-1622 (2000); и Kashiwada Y. et al, Chem. Pharm. Bull. 45:1387-1390 (2000) раскрыта диметилсукцинилбетулиновая кислота и диметилсукцинилолеанолевая

кислота. Этерификация 3' углерода бетулина янтарной кислотой дает соединение, способное ингибировать активность ВИЧ-1 (Pokrovskii, A.G. et ah, Gos. Nauchnyi Tsentr Virusol. Biotekhnol. "Vector,"9:485-491 (2001)).

В опубликованной международной заявке № WO 02/26761 раскрывается применение бетулина и его аналогов для лечения грибковых инфекций.

Существует потребность в новых способах ингибирования ВИЧ, которые эффективны против устойчивых к лекарственным средствам штаммов вируса. В одном варианте осуществления настоящее изобретение предоставляет способы лечения и соединения, которое ингибируют вирус иначе, чем утвержденные способы лечения. В определенном варианте осуществления настоящее изобретение предоставляет терапевтическую композицию, включающую соль DSB, имеющую повышенную растворимость и биодоступность, которая ингибирует вирус *in vivo* иначе, чем утвержденные способы лечения. Композиции по настоящему изобретению можно применять для лечения инфекции ВИЧ-1 у людей.

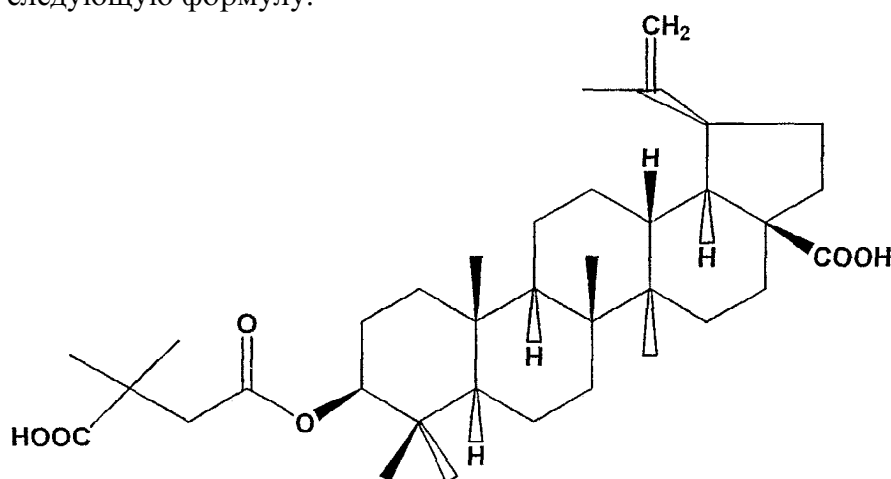
Соединение и способы по настоящему изобретению имеют новый механизм действия и поэтому активны против штаммов ВИЧ, которые устойчивы к современным способам лечения. По существу, настоящее изобретение предоставляет совершенно новый подход к лечению ВИЧ инфекции/СПИДа.

Краткое описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к определенным солевым формам 3-О-(3',3'-диметилсукцинил)бетулиновой кислоты ("DSB"), их получению, их фармацевтическим композициям и способам их применения. В частности, это изобретение относится к аминным солям, таким как солевая форма N-метил-D-глюкамин (NmG) DSB. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям и лекарственным формам, включающим эти солевые формы DSB. Эти композиции и лекарственные формы можно применять в способах лечения ВИЧ и родственных заболеваний. Предоставляются также способы получения таких солей DSB и фармацевтических композиций.

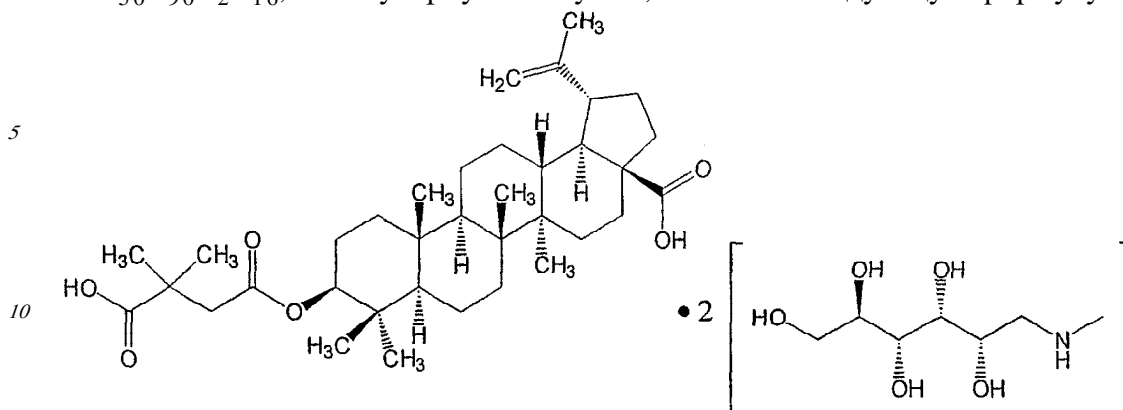
Подробное описание изобретения

Первый аспект настоящего изобретения относится к солевой форме 3-О-(3',3'-диметилсукцинил)бетулиновой кислоты, далее именуемой "DSB". DSB имеет следующую формулу:



Второй аспект настоящего изобретения относится к соли NmG DSB. В одном варианте осуществления глюкаминная соль DSB представляет собой ди-(N-метил-D-глюкаминную) соль DSB (соль ди-NmG). Соль ди-NmG имеет 2 связанные молекулы NmG на молекулу DSB, имеет молекулярную формулу

$C_{50}H_{90}N_2O_{16}$, молекулярную массу 975,28 и имеет следующую формулу:



15 Третий аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, включающей соль NmG DSB, такую как ди-(N-метил-D-глюкаминовую) соль DSB, и фармацевтический носитель или разбавитель.

20 Четвертый аспект настоящего изобретения относится к способу получения соли NmG DSB. В одном варианте осуществления изобретения способ получения соли включает смешивание NmG и DSB в водном растворе для получения N-метил-D-глюкаминовой соли 3-O-(3',3'-диметилсукцинил)бетулиновой кислоты. Смешивание может происходить в присутствии циклодекстрина, такого как гидроксипропил-бета-циклодекстрин.

25 Пятый аспект настоящего изобретения относится к лекарственной форме, такой как оральная таблетка, включающей фармацевтическую композицию соли NmG DSB. Лекарственную форму можно применять для лечения ретровирусной инфекции, такой как ВИЧ, у субъекта.

30 Шестой аспект настоящего изобретения относится к способу применения фармацевтической композиции, включающей соль NmG DSB, для лечения ретровирусной инфекции, такой как ВИЧ, у субъекта.

35 В настоящем изобретении можно использовать любую нетоксичную, фармацевтически приемлемую соль амина или четвертичного аммония DSB. Эти соли можно получить *in situ* во время конечного выделения и очистки соединений или отдельным взаимодействием очищенного соединения в его форме свободной кислоты с подходящим органическим основанием и выделением образованной таким образом соли. Они включают нетоксичные катионы аммония, четвертичного амина и амина, но не ограничиваются аммонием, тетраметиламмонием, тетраэтиламмонием, метиламином, диметиламином, триметиламином, этиламином, N-метилглюкамином и им подобными.

40

45 Особый интерес представляет солевая форма NmG DSB, а именно N-метил-D-глюкаминовая соль 3-O-(3',3'-диметилсукцинил)бетулиновой кислоты и солевые формы щелочных металлов. Эти солевые формы были получены объединением DSB с NmG или с гидроксидом щелочных металлов для получения моно- и ди-солей DSB. Солевые формы по настоящему изобретению обладают повышенной биодоступностью.

50 Соли по настоящему изобретению обладают противоретровирусной активностью, таким образом, предоставляя подходящие соединения и композиции для лечения ретровирусных инфекций, необязательно, с дополнительными фармацевтически активными ингредиентами, такими как антиретровирусные и/или иммуностимулирующие соединения или антивирусные антитела или их фрагменты.

Под термином "антиретровирусная активность" или "активность против ВИЧ"

предназначены для обозначения способности ингибировать, по меньшей мере, одно из:

(1) интеграцию вирусной про-ДНК в геном клетки-хозяина;

(2) прикрепление ретровируса к клеткам;

(3) вхождение вируса в клетки;

(4) клеточный метаболизм, который обеспечивает возможность репликации вируса;

(5) ингибирование межклеточного распространения вируса;

(6) синтез и/или клеточную экспрессию вирусных антигенов;

(7) почкование или созревание вируса;

(8) активность кодируемых вирусом ферментов (таких как обратная транскриптаза, интегразы и протеазы); и/или

(9) любые известные патогенные действия ретровируса или ВИЧ, такие как, например, подавление иммунитета. Таким образом, любая активность, которая имеет тенденцию ингибировать любой из этих механизмов, представляет собой "антиретровирусную активность" или "активность против ВИЧ".

Соль DSB по настоящему изобретению можно применять для лечения ретровирусной (например, ВИЧ) инфекции или отдельно, или в комбинации с другими видами лечения, известными в данной области. Однако, ввиду того, что соли DSB по настоящему изобретению являются менее токсичными или по существу нетоксичными для нормальных клеток, возможность их применения не ограничивается лечением установленных ретровирусных инфекций. Например, соль DSB в соответствии с настоящим изобретением можно применять при обработке продуктов крови, таких как продукты, хранящиеся в банках крови. В настоящее время поставки крови в стране тестируются на наличие антител к ВИЧ. Однако этот тест еще несовершенен, и образцы, которые дают отрицательные результаты тестов, могут все же содержать вирус ВИЧ. Обработка крови и продуктов крови солями DSB по настоящему изобретению могут расширить пределы безопасности уничтожением любого ретровируса, который может пройти невыявленным.

Соль DSB в соответствии с настоящим изобретением можно применять при лечении ВИЧ инфекции у пациентов, которых неадекватно лечили с использованием других способов лечения. Соответственно, изобретение также относится к способу лечения нуждающегося в терапии человека, где ВИЧ-1, инфицирующий указанные клетки, не реагируют на другие способы лечения инфекции ВИЧ-1. В другом варианте осуществления способы по изобретению применяются у субъекта, инфицированного ВИЧ, который устойчив к препарату, применяемому для лечения ВИЧ инфекции. При различных видах применения ВИЧ устойчив к одному или более ингибиторам протеазы, ингибиторам обратной транскриптазы, ингибиторам входа, нуклеозидным аналогам, вакцинам, ингибиторам связывания, иммуномодуляторам и/или к любым другим ингибиторам. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по изобретению применяются у субъекта, инфицированного ВИЧ, который устойчив к одному или более препаратам, применяемым для лечения ВИЧ инфекций, например, без ограничения, зидовудину, ламивудину, диданозину, залцитабину, ставудину, абакавиру, невирапину, делавирдину, эмтрицитабину, эфавиренцу, саквинавиру, ритонавиру, лопинавиру, индинавиру, нелфинавиру, тенофовиру, ампренавиру, адефовиру, атазанавиру, фосампренавиру, энфувиртиду, гидроксимочевине, AL-721, амплигену, бутилированному гидрокситолуолу; полиманноацетату, кастаноспермину; контракану; крему фармадекс, CS-87, пенцикловиру, фамцикловиру, ацикловиру, цитофовиру, ганцикловиру, декстрансульфату, D-пеницилламину, тринатрийфосфонформату, фусидовой кислоте, НРА-23, эфлорнитину, ноноксинолу,

пентамидинизетионату, пептиду Т, фенитоину, изониазиду, рибавирину, рифабутину, ансамицину, триметрексату, SK-818, сурамину, UA001, и их комбинациям.

Кроме того, соль DSB по настоящему изобретению можно применять в качестве профилактического средства для предотвращения передачи ВИЧ инфекции между индивидуумами. Например, соль DSB можно вводить орально или путем инъекции инфицированной ВИЧ беременной женщине и/или плоду во время беременности или непосредственно перед родами, во время родов или после родов, для снижения вероятности того, что новорожденный младенец станет инфицированным. Также соль DSB можно вводить вагинально непосредственно перед родами для предотвращения инфекции младенца во время прохождения через родовый канал. Далее, соль DSB по настоящему изобретению можно применять во время полового акта для предотвращения передачи ВИЧ нанесением ингибирующего ретровирус эффективного количества местной композиции, включающей одну или более солей DSB, на слизистую оболочку влагалища или другую слизистую оболочку перед половым актом. Например, соль DSB по настоящему изобретению можно применять для предотвращения передачи ВИЧ от инфицированного мужчины неинфицированной женщине или наоборот.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать, по меньшей мере, одну соль DSB, необязательно, в комбинации с одним или более дополнительных средств, как описано здесь. Аналогичным образом, в способах лечения используются фармацевтические композиции, которые включают, по меньшей мере, одну соль DSB, как описано здесь, отдельно или в комбинации с дополнительными средствами, как описано далее. Такие виды лечения могут включать химиотерапию, по меньшей мере, одним дополнительным препаратом, как представлено здесь.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может включать, по меньшей мере, одно другое антивирусное средство, такое как без ограничения AZT (зидовудин, RETROVIR®, GlaxoSmithKline), 3TC (ламивудин, EPIVIR®, GlaxoSmithKline), AZT+3TC, (COMB1УЖ®, GlaxoSmithKline), AZT+3TC+абакавир (TRIZIVIR®, GlaxoSmitliKline), ddl (диданозин, VIDEX®, Bristol-Myers Squibb), ddC (залцитабин, HIVED®, Hoffmann-La Roche), D4T (ставудин, ZERIT®, Bristol-Myers Squibb), тенофовир (VEREAD®, Gilead), абакавир (ZIAGEN®, GlaxoSmitliKline), невирапин (VIRAMUNE®, Boehringer Ingelheim), делавирдин (Pfizer), эфавиренц (SUSTIVA®, DuPont Pharmaceuticals), саквинавир (INVIRASE®, FORTOVASE®, Hofmann-LaRoche), ритонавир (NORVIR®, Abbott Laboratories), индинавир (CRIXTVAN®, Merck и Company), нелфинавир (VIRACEPT®, Pfizer), лопинавир, ампренавир GlaxoSmithKline), адефовир (PREVEON®, HEPSERA®, Gilead Sciences), атазанавир (Bristol-Myers Squibb), фосампренавир (LEXTVA®, GlaxoSmithKline) и гидроксимочевина (HYDREA®, Bristol-Meyers Squibb, или любые антиретровирусные препараты или антитела в комбинации друг с другом, или ассоциированные с биологически основанным терапевтическим средством, таким как, например, полученные из gp41 пептиды, энфувиртид (FUZEON(R), Roche and Trimeris) и T-1249, или растворимые CD4, антитела к CD4 и конъюгаты CD4 или анти-CD4, или как дополнительно представлено здесь.

Дополнительные подходящие противовирусные средства для оптимального применения, по меньшей мере, с одной солью DSB могут включать, но не ограничиваются, амфотерицин В 9FUNGIZONE(R)); амплиген (PHK с ошибочным спариванием оснований), разработанная Hemispherx Biopharma; BETASERON(R) (бета-

интерферон, Chiron); бутилированный гидрокситолуол; карросин (полиманноацетат); кастаноспермин; контракан (производное стеариновой кислоты); крем фарматекс (содержащий бензалконийхлорид); 5-незамещенное производное зидовудина; пенцикловир (DENAVIR(R) Novartis); фамцикловир (FAMVIR® Novartis); ацикловир (ZOVIRAX® GlaxoSmithKline); цитофовир (VISTIDE® Gilead); ганцикловир (CYTOVENE®, HoffmanLaRoche); декстрансульфат; D-пеницилламин (3-меркапто-D-валин); FOSCARNEBT® (тринатрийфосфонформат; AstraZeneca); фусидовая кислота; глицирризин (ингредиент корня солодки); НРА-23 (аммоний-21-тунгсто-9-антимонат); ORNIDYL® (эфлорнитин; Aventis); ноноксинол; пентамидинизетионат (PENTAM-300); пептид Т (октапептидная последовательность, Peninsula Laboratories); фенитоин (Pfizer); INH или изониазид; рибавирин (VIRAZOLE®), Valeant Pharmaceuticals); рифабутин, ансамицин (MYCOBUTIN® Pfizer); CD4-IgG2 (Progenics Pharmaceuticals) или другие молекулы, содержащие CD4 или основанные на CD4; триметрексат (Medimmune); сурамин и его аналоги (Bayer) и WELLFERON® (альфа-интерферон, GlaxoSmithKline).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут также, кроме того, включать иммуномодуляторы. Подходящие иммуномодуляторы для необязательного применения с бетулиновой кислотой или производным бетулина по настоящему изобретению, могут в соответствии с настоящим изобретением включать, но не ограничиваются: АВРР (броприримин); амплиген (РНК с ошибочным спариванием оснований, Hemisphere Biopharma); антитело против человеческого интерферона-α, аскорбиновую кислоту и ее производные; интерферон-β; циамексон; циклоспорин; циметидин; CL-246,738; колониестимулирующие факторы, включающие GM-CSF (клетки, образующие колонии гранулоцитов и макрофагов); HE2000 (Hollis-Eden Pharmaceuticals); интерферон-γ; глюкан; гипериммунный гамма-глобулин (Bayer); иммутиол (диэтилтиокарбамат натрия); интерлейкин-1 (Hoffman-LaRoche; Amgen), интерлейкин-2 (IL-2) (Chiron); изопринозин (инозин пранобекс); крестин; LC-9018 (Yakult); лентинан (Yamanouchi); LF-1695; метионин-энкефалин; минофаген С; мурамилтрипептид; МТР-РЕ; налтрексон (Barr Laboratories); РНК иммуномодулятор; REMUNE® (Immune Response Corporation); RETICULOSE® (Advanced Viral Research Corporation); шосайкото; женьшень; тимусный гуморальный фактор; тимопентин; фактор 5 тимозина; тимозин 1 (ZADAXIN®, SciClone); тимостимулин; TNF (фактор опухолевого некроза, Genetech) и витаминные препараты.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут также, кроме того, включать противораковые терапевтические средства. Подходящие противораковые терапевтические средства для необязательного применения включают противораковую композицию, эффективную для ингибирования новообразований, включающую соединение или фармацевтически приемлемую соль или пролекарство указанного противоракового средства, которое можно применять для комбинированного лечения; противораковые терапевтические средства включают, но не ограничиваются алкилирующие средства, такие как бусульфан, цис-платин, митомицин С и карбоплатиновые антимиотические средства, такие как колхицин, винбластин, таксолы, такие как паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb), доцетаксел (TAXOTERE®, Aventis), ингибиторы топо I, такие как камтотецин, иринотекан и топотекан (HYCAMTIN®, GlaxoSmithKline), ингибиторы топо II, такие как доксорубицин, даунорубицин и этопозиды, такие как VP16; РНК/ДНК антиметаболиты, такие как 5-азациитидин, 5-фторурацил и метотрексат, ДНК антиметаболиты, такие как 5-фтор-2'-деоксиуридин, ара-С, гидроксимочевина,

тиогуанин и антитела, такие как трастузумаб (HERCEPTIN®, Genetech), и ритуксимаб (RITUXAN®, Genetech и Biogen-Idex), мелфалан, хлорамбуцил, циклофосфамид, ифосфамид, винкристин, митогуазон, эпирубицин, акларубицин, блеомицин, митоксантрон, эллиптиний, флударабин, октреотид, ретиноевую кислоту, такмоксифен, аланозин и их комбинации.

Изобретение, кроме того, предоставляет способы обеспечения антибактериальных терапевтических средств, антипаразитарных терапевтических средств и противогрибковых терапевтических средств для применения в комбинации с соединениями по изобретению и их фармацевтически приемлемыми солями. Примеры антибактериальных терапевтических средств включают такие соединения, как пенициллины, ампициллин, амоксициллин, циклациллин, эпициллин, метициллин, нафциллин, оксациллин, клоксациллин, диклоксациллин, флюклоксациллин, карбенициллин, цефалексин, цефарадин, цефадоксил, цефаклор, цефокситин, цефотаксим, цефтизоксим, цефиненоксин, цефтриаксон, моксалактам, имипенем, клавуланат, тиментин, сулбактам, эритромицин, неомицин, гентамицин, стрептомицин, метронидазол, хлорамфеникол, клиндамицин, линкомицин, хинолоны, рифампин, сульфонамиды, бацитрацин, полимиксин В, ванкомицин, доксициклин, метациклин, миноциклин, тетрациклин, амфотерицин В, циклосерин, ципрофлоксацин, изониазид, этамбутол и налидиксовую кислоту, а также производные и измененные формы каждого из этих соединений.

Примеры антипаразитарных терапевтических средств включают битионол, диэтилкарбамазинцитрат, мебендазол, метрифонат, никлозамин, ниридазол, оксамнихин и другие производные хинина, пиперазинцитрат, празиквантел, пирантелпамоат и тиабендазол, а также производные и измененные формы каждого из этих соединений.

Примеры противогрибковых терапевтических средств включают амфотерицин В, клотримазол, эконазолнитрат, флуцитозин, гризеофульвин, кетоконазол и миконазол, а противогрибковые соединения также включают акулацин А и папулокандин В.

Предпочтительным субъектом-животным по настоящему изобретению является человек. В определенном варианте осуществления настоящее изобретение можно использовать при лечении людей-пациентов.

Термин «лечение» означает введение субъектам соли DSB в соответствии с настоящим изобретением с целями, которые могут включать предотвращение, облегчение или излечение патологии, связанной с ретровирусами.

Считается, что лекарственные средства предоставляются «в комбинации» друг с другом, если они предоставляются пациенту одновременно, или если время между введением каждого лекарственного средства таково, что оно обеспечивает возможность перекрытия биологической активности.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция включает ди-(N-метил-D-глюкаминовую) соль 3-O-(3',3'-диметилсукцинил)бетулиновой кислоты.

Фармацевтические композиции для введения в соответствии с настоящим изобретением, включающие, по меньшей мере, одну соль DSB, в соответствии с настоящим изобретением, в фармацевтически приемлемой форме необязательно комбинируются с фармацевтически приемлемым носителем. Эти композиции можно вводить средствами, которые достигают их предполагаемого назначения. Количества и схемы введения солей DSB в соответствии с настоящим изобретением легко могут определить средние специалисты в клинической области лечения ретровирусной

патологии.

Например, введение может осуществляться парентеральными путями, такими как подкожный, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, трансдермальный и буккальный пути. Альтернативно, или одновременно введение может
5 осуществляться оральным путем. Введенная дозировка зависит от возраста, состояния здоровья и массы реципиента, типа предыдущего или одновременного лечения, если оно проводится, частоты лечения и природы желаемого эффекта.

Композиции в пределах диапазона настоящего изобретения включают все
10 композиции, включающие, по меньшей мере, одну соль DSB в соответствии с настоящим изобретением, в количестве, эффективном для достижения предполагаемого назначения. Хотя индивидуальные потребности варьируются, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств каждого компонента находится в пределах возможностей уровня техники. Типичные дозировки, по
15 меньшей мере, одной соли DSB включают от примерно 0,05 до примерно 100 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления полезная дозировка одной или более солей DSB включает от примерно 0,1 до примерно 100 мг активного ингредиента на 1 кг массы тела, предпочтительно, от примерно 0,1 до примерно 20 мг
20 активного ингредиента на 1 кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления более предпочтительная дозировка одной или более солей DSB включает от примерно 0,2 до примерно 10 мг/кг массы тела. Полезная дозировка одной или более солей DSB включает от примерно 0,5 до примерно 5 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления более предпочтительная дозировка одной или более
25 солей DSB включает от примерно 10 до примерно 100 мг/кг массы тела.

Для обеспечения различных уровней DSB в плазме можно вводить различные количества дозировки композиции по изобретению. В некоторых вариантах осуществления предпочтительное количество дозировки представляет собой
30 количество, которое обеспечивает фактическую концентрацию DSB в плазме пациента от примерно 1 микромоля (мкМ) до примерно 1 миллимоля (мМ). В некоторых вариантах осуществления количество дозировки представляет собой количество, которое обеспечивает фактическую концентрацию DSB в плазме пациента от примерно 4 мкМ (2,34 мкг/мл) до примерно 1000 мкМ, от примерно 40 мкМ до
35 примерно 1000 мкМ или от примерно 400 мкМ до примерно 1000 мкМ. В некоторых вариантах осуществления количество дозировки представляет собой количество, которое обеспечивает фактическую концентрацию DSB в плазме пациента от примерно 4 мкМ (2,34 мкг/мл) до примерно 200 мкМ, от примерно 10 мкМ до
40 примерно 200 мкМ или от примерно 40 мкМ до примерно 200 мкМ. В некоторых вариантах осуществления количество дозировки представляет собой количество, которое обеспечивает фактическую концентрацию DSB в плазме пациента примерно 4 мкМ (2,34 мкг/мл) или более, по меньшей мере, примерно 10 мкМ или более, по
45 меньшей мере, примерно 40 мкМ или более, по меньшей мере, примерно 100 мкМ или более, или, по меньшей мере, 200 мкМ или более. В некоторых вариантах осуществления количество дозировки представляет собой количество, которое обеспечивает фактическую концентрацию DSB в плазме пациента примерно 400 мкМ. «Фактическая концентрация» представляет собой концентрацию DSB в плазме
50 пациента непосредственно перед последующим введением пациенту.

В соответствии с настоящим изобретением можно вводить различные количества одной или более солей по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления от примерно 10 мг до примерно 1000 мг активных ингредиентов одной

или более солей по настоящему изобретению можно вводить 1 раз/сутки. В некоторых вариантах осуществления от примерно 50 мг до примерно 500 мг активного ингредиента одной или более солей по настоящему изобретению можно вводить 1 раз/сутки. В некоторых вариантах осуществления 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг или 500 мг активного ингредиента одной или более солей по настоящему изобретению можно вводить 1 раз/сутки. Количество одной или более солей, вводимое в сутки, определяется общим количеством одной или более солей, введенным в течение 24-часового периода. Таким образом, схемы дозировки, которые предписывают введение одной или более солей по настоящему изобретению множество раз в течение 24-часового периода, находятся в пределах объема изобретения, если кумулятивное количество, введенное в течение 24-часового периода, находится в пределах указанных выше диапазонов.

Терапевтическое введение может также включать предварительное, одновременное, последующее или дополнительное введение, по меньшей мере, одной дополнительной соли DSB в соответствии с настоящим изобретением или другого терапевтического средства, такого как противовирусное или иммуностимулирующее средство. При таком подходе дозировка второго препарата может быть такой же или отличной от дозировки первого терапевтического средства. В одном варианте осуществления настоящего изобретения препараты вводятся через день в рекомендуемых количествах каждого препарата.

Введение соединения по настоящему изобретению может также необязательно включать предварительную, одновременную, последующую или дополнительную терапию с использованием активаторов иммунитета или иммуномодуляторов. В дополнение к фармакологически активным соединениям, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может также содержать подходящие фармацевтически приемлемые носители, включающие эксципиенты и вспомогательные средства, которые способствуют переработке активных соединений в препараты, которые можно применять фармацевтически. В одном варианте осуществления препараты, особенно те препараты, которые можно вводить орально, такие как таблетки, драже и капсулы, а также препараты, которые можно вводить ректально, такие как суппозитории, а также подходящие растворы для введения инъекцией или орально, содержат примерно от 0,01 до 99% активного ингредиента вместе с эксципиентом. В другом варианте осуществления препарат может включать примерно от 20 до 75% активного соединения(й) вместе с эксципиентом.

Фармацевтические препараты по настоящему изобретению изготавливаются таким методом, который сам по себе известен, например, посредством обычных способов смешивания, гранулирования, изготовления драже, растворения или лиофилизации. Так, фармацевтические препараты для орального применения можно получить объединением активных соединений с твердыми эксципиентами, необязательным размолотом полученной смеси и переработкой смеси гранул, при желании или необходимости, после добавления подходящих вспомогательных средств, для получения сердцевин таблеток или драже.

Подходящие эксципиенты представляют собой, например, наполнители, такие как сахарид, например, лактоза или сахароза, манит или сорбит; препараты целлюлозы и/или фосфаты кальция, такие как трикальцийфосфат или гидрофосфат кальция; а также связывающие агенты, такие как крахмальная паста, с использованием, например, кукурузного крахмала, пшеничного крахмала, рисового крахмала, картофельного крахмала, желатина, трагаканта, метилцеллюлозы,

гидроксипропилметилцеллюлозы, карбоксиметилцеллюлозы натрия и/или поливинилпирролидона. При желании, можно добавить разрыхляющие агенты, такие как указанные выше крахмалы, а также карбоксиметильный крахмал, поперечно сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновую кислоту или ее соль, такую как альгинат натрия. 5 Вспомогательные средства представляют собой, прежде всего, агенты, регулирующие поток, и смазывающие вещества, например, диоксид кремния, тальк, стеариновую кислоту или ее соли, такие как стеарат магния или стеарат кальция, и/или полиэтиленгликоль. Сердцевины драже обеспечены подходящими 10 покрытиями, которые, при желании, устойчивы к желудочному соку. С этой целью можно использовать концентрированные растворы сахара, которые могут необязательно содержать камедь, тальк, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, растворы лака и подходящие органические растворители или смеси растворителей. Для получения покрытий, устойчивых к желудочному соку, 15 используются растворы подходящих препаратов целлюлозы, таких как фталат ацетилцеллюлозы или фталат гидроксипропилметилцеллюлозы. В таблетки или покрытия драже можно добавить красители или пигменты, например, для идентификации или для характеристики комбинаций доз активных соединений.

20 Другие фармацевтические препараты, которые можно применять орально, включают изготовленные из желатина капсулы, половины которых вставляются друг в друга сжатием, а также мягкие, герметизированные капсулы, изготовленные из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Капсулы, половины 25 которых вставляются друг в друга сжатием, могут содержать активные соединения в форме гранул, которые могут смешиваться с наполнителями, такими как лактоза, связывающими агентами, такими как крахмалы, и/или смазывающими агентами, такими как тальк или стеарат магния, и, необязательно, стабилизаторы. В мягких капсулах активные соединения могут быть растворены или суспендированы в 30 подходящих жидкостях, таких как жирные масла или жидкий парафин. Кроме того, могут добавляться стабилизаторы.

Возможные фармацевтические препараты, которые можно применять ректально, включают, например, суппозитории, которые состоят из комбинации активных соединений с основой суппозитория. Подходящие основы суппозитории представляют 35 собой, например, натуральные или синтетические триглицериды или углеводороды парафина. Кроме того, можно также применять желатиновые ректальные капсулы, которые состоят из комбинации активных соединений с основой. Возможные материалы основы включают, например, жидкие триглицериды, полиэтиленгликоли 40 или углеводороды парафина.

Подходящие препаративные формы для парентерального введения включают водные растворы активных соединений в растворимой в воде форме, например, растворимые в воде соли. Кроме того, можно вводить суспензии активных соединений в виде соответствующих масляных инъекционных суспензий. Подходящие лиофильные 45 растворители или носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды. Водные инъекционные суспензии, которые могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, включают, например, карбоксиметилцеллюлозу 50 натрия, сорбит и/или декстран. Необязательно, суспензия может также содержать стабилизаторы.

Жидкие лекарственные формы для орального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к

активным соединениям жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, такие как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, циклодекстрины, такие как гидроксипропил-β-циклодекстрин, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла, такие как масла семян хлопка, арахиса, кукурузы, проростков, оливы, кастора и кунжута, глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот сорбитана, и их смеси.

Суспензии, в дополнение к активным соединениям, могут содержать суспендирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостерилловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбитана, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их комбинации.

Фармацевтическая препаративная форма для системного введения в соответствии с изобретением может состояться для энтерального, парентерального или местного введения. Действительно, все 3 типа препаративной формы можно применять одновременно для достижения системного введения активного ингредиента.

Подходящие препаративные формы для орального введения включают оральные лекарственные формы, такие как без ограничения твердые или мягкие желатиновые капсулы, драже, пилюли, таблетки, включая покрытые таблетки, эликсиры, суспензии, сиропы или ингаляции и их формы контролируемого высвобождения.

Твердые лекарственные формы, в дополнение к формам, составленным для орального введения, включают ректальные суппозитории.

Соли DSB по настоящему изобретению можно также вводить в форме имплантата при компаундировании с биологически разлагаемым носителем медленного высвобождения. Альтернативно, соли DSB по настоящему изобретению можно составлять в виде трансдермальной системы для непрерывного высвобождения активного ингредиента.

Подходящие препаративные формы для местного введения включают кремы, гели, желе, слизи, пасты и мази. Подходящие инъекционные растворы включают растворы для внутривенных, подкожных и внутримышечных инъекций. Альтернативно, соли DSB можно вводить в форме инфузионного раствора, интраназальной ингаляции или аэрозоля, или устройства для доставки через слизистые оболочки или влагалище, такое как влагалищное кольцо, пена, крем, гель, содержащая лекарственное средство суппозитория и содержащий лекарственное средство тампон.

Профилактические местные композиции для предотвращения передачи ВИЧ инфекции между индивидуумами во время деторождения или полового акта включают одну или более солей DSB и, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Местная композиция может быть, например, в форме мази, крема, геля, лосьона, пасты, желе, аэрозоля, пены или губки. Количество дозировки соли DSB в профилактической местной препаративной форме в целом меньше, чем примерно 1000 мг, а в некоторых вариантах осуществления от примерно 0,01 до примерно 100 мг. Местные препаративные формы могут включать другие профилактические ингредиенты. Носитель и разбавители должны быть приемлемы в смысле совместимости с другими ингредиентами препаративной формы и безвредности для реципиента.

Местные профилактические препаративные формы включают формы, подходящие

для влагалищного, ректального или местного введения. При целесообразности, препаративные формы могут быть для удобства представлены в дискретных, стандартных дозировках, и они могут быть получены любым способом, известным в области фармации. Все такие способы включают стадию приведения активного агента в ассоциацию с жидкими носителями, гелями или измельченными носителями, или ими обоими, и затем, при необходимости, профилирования продукта в желательную препаративную форму.

Профилактические препаративные формы, подходящие для влагалищного введения, могут быть представлены в виде пессариев, тампонов, кремов, гелей, паст, желе, пен, или аэрозолей, или водных или масляных суспензий, растворов или эмульсий (жидких препаративных форм), содержащих подходящие носители, известные в данной области, в дополнение к активному агенту. Жидкие композиции могут содержать обычные добавки, такие как суспендирующие агенты, эмульгирующие агенты, неводные носители, включающие пищевые масла или консерванты. Эти препаративные формы можно применять для предотвращения и половой передачи ВИЧ, и инфекции младенца во время прохождения через родовой канал. В одном примере влагалищное введение может происходить перед половым сношением или непосредственно перед родами.

В некоторых вариантах осуществления профилактические препаративные формы, подходящие для ректального или вагинального введения, имеющие твердый носитель, представлены в виде суппозиториев со стандартной дозой. Подходящие носители включают масло какао и другие материалы, обычно используемые в данной области. Суппозитории можно формировать, например, смешиванием одной или более солей DSB с одним или более размягченных или расплавленных носителей с последующим охлаждением и профилированием в пресс-формах.

Профилактические препаративные формы в соответствии с изобретением могут быть также в форме капель, составленных с водной или неводной основой, включающих один или более диспергирующих агентов, солюбилизующих агентов или суспендирующих агентов. Жидкие аэрозоли могут доставляться из упаковок под повышенным давлением.

Профилактические препаративные формы в соответствии с изобретением могут быть адаптированы для обеспечения пролонгированной доставки. Профилактические препаративные формы могут включать другие активные агенты, такие как спермицидные средства, антимикробные средства и противовирусные средства.

Тритерпеновые производные по настоящему изобретению можно также вводить в форме имплантата при компаундировании с биологически разлагаемым носителем медленного высвобождения. Альтернативно, тритерпеновые производные по настоящему изобретению могут быть составлены в виде трансдермальной системы для продолжительного высвобождения активного ингредиента.

Соли по настоящему изобретению получают смешиванием основного или образующего катионы соединения, такого как NmG, и DSB в водном растворе. Смешивание может происходить в присутствии циклодекстрина, такого как гидроксипропил-β-циклодекстрин. Свободную кислоту DSB можно получить способом синтеза, описанного в патенте США №5679828.

Теперь, после общего описания изобретения, его легче будет понять посредством ссылки на следующие примеры.

Пример 1

Получение ди-(N-метил-D-глюкаминовой) соли 3-O-(3',3'-

диметилсукцинил)бетулиновой кислоты

2,09740 г N-метил-D-глюкамина растворяют в 250 мл метилового спирта. Добавляют 3,13295 г DSB и при выдерживании в течение ночи суспензия становится прозрачной. Растворитель удаляют потоком газообразного азота. Образуется густое, бесцветное масло. 200 мл метилового спирта добавляют для растворения масла. Медленное добавление 200 мл простого диэтилового эфира к подвергаемой перемешиванию вихревой мешалкой смеси дает белое твердое вещество. Выделение твердого материала вакуумной фильтрацией дает 5,51993 г кристаллических твердых веществ. Сушка твердых веществ в течение 72 ч в вакууме дает 4,9737 г материала.

Пример 2Получение динатриевой соли 3-O-(3',3'-диметилсукцинил)бетулиновой кислоты

1,35531 г DSB растворяют в 50 мл метанола. 0,18758 г твердого гидроксида натрия растворяют в 2,0 мл деионизированной воды. Эти 2 смеси объединяют и разбавляют дополнительными 15 мл метанола. После того как смесь станет прозрачной, метаноловую смесь концентрируют до 25 мл потоком азота. Добавляют 90 мл простого диэтилового эфира. Вакуумная фильтрация с последующей вакуумной сушкой при окружающей температуре дает 1,45986 г динатриевой соли.

Пример 3Получение дикалиевой соли 3-O-(3',3'-диметилсукцинил)бетулиновой кислоты

4,14657 г DSB растворяют в 50 мл метанола. 0,95287 г твердого 85% гидроксида калия растворяют в 10 мл деионизированной воды. Эти 2 смеси объединяют и разбавляют дополнительными 250 мл метанола. После того как смесь станет прозрачной, метанол удаляют потоком азота. Полученное твердое вещество растворяют в 50 мл метанола и осаждают 200 мл простого диэтилового эфира. Вакуумная фильтрация с последующей вакуумной сушкой при окружающей температуре дает 4,29679 г дикалиевой соли.

Пример 4Оценка солей настоящего изобретения и сравнительные примерыА. Растворимость

Качественные результаты определения растворимости NmG, калиевой и натриевой солевых форм DSB (соответственно, DSB-(NmG)₂, DSB-K₂ и DSB-(Na)₂) представлены соответственно в табл.1, 2 и 3. Испытанные концентрации представлены в мг/мл, за исключением тех, где эксципиенты добавляли по массе. Эти концентрации представлены в мг/г. В представленных концентрациях не учтены факторы коррекции на частоту или дополнительную молярную массу вследствие соли. В большинстве случаев успешная препаративная форма описана в виде прозрачного раствора. Однако некоторые препаративные формы были слегка окрашены или проявляли замутненность, даже когда лекарственная субстанция была солубилизирована. Большинство препаративных форм смешивали при комнатной температуре на тарелке магнитной мешалки. Препаративные формы, содержащие витамин E TPGS (сукцинат ди-α-токоферилполиэтиленгликоля 1000), хранили при 40-45°C для поддержания смеси в жидком состоянии.

Особый интерес представляет растворимость трех солевых форм в растворителе, состоящем из 10% гидроксипропил-β-циклодекстрина в воде. В то время как испытанный раствор 27,7 мг/мл DSB-(Na)₂ в этой системе растворителя является мутным, раствор 50,0 мг/мл DSB-(NmG)₂ в этом растворителе является прозрачным. Это свидетельствует о значимо более высокой растворимости DSB-(NmG)₂ в этом растворителе, чем DSB-(Na)₂.

Растворимость DSB-(NmG)₂ как функцию pH измеряли при 25°C. Визуально DSB-(NmG)₂ был растворим в основных и нейтральных условиях. Растворимость 7,537 мг/мл наблюдалась при pH 9,461, и растворимость 7,463 мг/мл наблюдалась при pH 10,691. Визуально DSB-(NmG)₂ был растворим в сильноокислых растворах при 25°C.

Равновесная концентрация DSB-(NmG)₂ очень высокая в деионизированной воде и пропиленгликоле, обоих являющихся высокополярными растворителями (см. табл.4). При сравнении растворимости DSB-(NmG)₂ в деионизированной воде (>18 мг/мл, диэлектрическая константа = 88,0), в метаноле (37,03 мг/мл, диэлектрическая константа = 32,6) и в этаноле (24,99 мг/мл, диэлектрическая константа = 24,3), очевидно, что растворимость уменьшается с уменьшением диэлектрической константы. Это согласуется с ионной природой DSB-(NmG)₂.

Таблица 1: DSB-(NmG)₂

Система растворителя (%)	Испытанная концентрация (мг/мл)	Внешний вид
Вода 100	2,4	Мутный раствор
Сартех 200 100	24,7 мг/г	Мутный раствор
Гидроксипропил-β-циклодекстрин (в воде) 10	50,0	Раствор прозрачный, но присутствует пена
Вода 56 PEG 400† 40 Пропиленгликоль 4	50,9	Очень пенистый, препарат, очевидно, не растворен
Вода 67 PEG 400 29 Этанол 4	50,8	Раствор прозрачный, исходно пенистый, который, в конечном счете, рассеивается
Вода 78 PEG 400 18 Этанол 4	51,2	Раствор прозрачный, исходно пенистый, который, в конечном счете, рассеивается
Вода 89 PEG 400 7 Этанол 4	50,1	Раствор прозрачный, исходно пенистый, который, в конечном счете, рассеивается
Вода 83 PEG 400 7 Пропиленгликоль 6 Этанол 4	51,7	Раствор прозрачный, исходно пенистый, который, в конечном счете, рассеивается
Вода 96 Этанол 4	50,1	Раствор прозрачный, исходно пенистый, который, в конечном счете, рассеивается
Вода 75 PEG 400 13 Витамин Е TPGS* 10 Этанол 2	50,9	Нерастворенный препарат, очень пенистый, очень вязкий, наблюдается застуднение
Вода 75 PEG 400 12 Витамин Е TPGS 10 Этанол 3	50,1	Раствор прозрачный, очень пенистый, наблюдается застуднение
Вода 75 PEG 400 11 Витамин Е TPGS 10 Этанол 4	50,8	Раствор прозрачный, очень пенистый, наблюдается застуднение
Вода 84 PEG 400 11 Этанол 4 Эмульсия симетикона 1	50,5	Раствор мутный, присутствует некоторое количество пены
Сартех 200 81 Витамин Е TPGS 15 DMA** 4	25,5	Раствор мутный, присутствует некоторое застуднение
Вода 96 DMA 4	52,2	Раствор просветляется при нагревании
Вода 96 DMA 4	71,2	Раствор мутный
Сартех 200 82 Витамин Е TPGS 16 DMA 2	24,5 мг/г	Раствор мутный, присутствует некоторое застуднение

5	Вода 86 PEG 400 10 Этанол 4	67,3	Раствор прозрачный
	Гидроксипропил-β-циклодекстрин (в воде) 10	50,0	Раствор прозрачный
	Вода 84 PEG 400 10 Этанол 4 Витамин E TPGS 2	40,4 мг/г	Препарат представляется растворенным, но раствор мутный от микроскопической «структуры» жидкости
†: Полиэтиленгликоль 400; *: сукцинат ди-α-токоферилполиэтиленгликоля 1000; **: диметилацетамид			

10

Система растворителя (%)	Испытанная концентрация (мг/мл)	Внешний вид
Вода 100	3,5	Раствор мутный
15 Вода 84 PEG 400 12 Этанол 4	42,2	Раствор мутный
Гидроксипропил-β-циклодекстрин 10 (в воде)	29,0	Раствор прозрачный

20

Система растворителя (%)	Испытанная концентрация (мг/мл)	Внешний вид
Гидроксипропил-β-циклодекстрин 10 (в воде)	15,1	Раствор прозрачный
Гидроксипропил-β-циклодекстрин 10 (в воде)	27,7	Раствор мутный
Гидроксипропил-β-циклодекстрин 20 (в воде)	27,9	Раствор прозрачный

25

Носитель	Растворимость DSB (NmG) ₂	Растворимость свободной кислоты DSB	Время уравнивания (дни)
Буфер HERG	17,76 мкг/мл	N/A	3
30 1% DMSO в буфере HERG	87,11 мкг/мл	N/A	3
Пропиленгликоль ^a	>225 мг/мл	N/A	7
PEG 400 ^b	5,12 мг/мл	N/A	7
Метанол	37,03 мг/мл	N/A	7
Этанол ^c	24,99 мг/мл	N/A	7
35 Деионизированная вода	>7 мг/мл	N/A	4
PSS*	80,18 мкг/мл	1,50 мг/мл	3
PSS+1% DMSO	107,9 мкг/мл	1,63 мг/мл	3
PSS+0,1% DMSO	107,7 мкг/мл	N/A	3
Деионизированная вода	>18 мг/мл	35,1 мкг/мл	3

40

^a Соломенно/янтарный цвет раствора. Все другие образцы были бесцветными или белыми.

^b Соединение могло выпадать в осадок из раствора после удаления из водяной бани, уменьшая конечную концентрацию.

45

^c После переноса образца из флакона для уравнивания в центрифужную пробирку, раствор стал мутным. Твердое вещество может выпадать в осадок из раствора. Первоначальная визуальная оценка после уравнивания была «почти ненасыщенный». Ненасыщенная концентрация - 33 мг/мл. Может быть результатом разности температуры между баней для уравнивания и комнатной температурой.

50

* Физиологический солевой раствор

N/A = Неприменимо вследствие того, что образцы не обрабатывали этими растворами.

В. Биодоступность in vivo

Исследование биодоступности при оральном введении проводили у самцов крыс Sprague Dawley. Целью этого исследования было сравнение фармакокинетики различных препаративных форм DSB, введенной в виде свободной кислоты или в виде одной из солевых форм: NmG, Na или K. Раствор суспензии свободной кислоты или соли вводили через рот, используя иглу для подачи с целью обеспечения номинальной оральной дозы 25 мг/кг. Для каждой введенной соли введенная доза основывалась на эквивалентах свободной кислоты. Номер группы и препаративные формы представлены ниже.

Номер группы и препаративная форма

- Группа 1: 25 мг/мл свободной кислоты DSB в 2% DMA (диметилацетамиде), 14% витамин E TPGS, 84% Captex (сложный диэфир, образованный из отобранных растительных жирных кислот высокой чистоты и пропиленгликоля (триглицерида))
- Группа 2: 25 мг/мл свободной кислоты DSB в 4% витамине E TPGS и 96% суспензии карбоксиметилцеллюлозы (СМС) (0,5%) в воде
- Группа 3: 41,7 мг/л соли DSB-(NmG)₂ в 84% воды, 4% этанола и 12% PEG 400 (эквивалентно 25 мг/мл свободной кислоты)
- Группа 4: 41,7 мг/л соли DSB-(NmG)₂ в 84% воды, 4% этанола и 10% PEG 400, 2% витамине E TPGS (эквивалентно 25 мг/мл свободной кислоты)
- Группа 5: 41,7 мг/л соли DSB-(NmG)₂ в 10% гидрокси-β-циклодекстрине в воде (эквивалентно 25 мг/мл свободной кислоты)
- Группа 6: 25 мг/мл микронизированной свободной кислоты DSB в 0,5% суспензии СМС
- Группа 7: 25 мг/мл микронизированной свободной кислоты DSB в 0,5% суспензии СМС и витамин E TPGS
- Группа 8: 28,3 мг/мл соли DSB-K₂ в 10% гидрокси-β-циклодекстрине в воде (эквивалентно 25 мг/мл свободной кислоты)
- Группа 9: 13,5 мг/мл соли DSB-(Na)₂ в 10% гидрокси-β-циклодекстрине в воде (эквивалентно 25 мг/мл свободной кислоты)
- Группа 10: 25 мг/мл свободной кислоты DSB в 96% Capex 200, 4% витамин E TPGS

Образцы крови брали сердечной пункцией (n=2 крысы/препаративную форму/точку времени) в следующие точки времени: 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 12 и 24 ч. Величины биодоступности оральных препаративных форм рассчитывали в виде отношения скорректированных для оральной дозы AUC_{INF}, допуская пропорциональность подгонок доз, к скорректированным для дозы AUC_{INF}, полученным после внутривенного введения (AUC_{INF}=63,3 мкг ч/мл) по исследованию DSB у крыс.

Результаты этого исследования представлены в табл.5. Препаративные формы соли NmG имели самую высокую оральную биодоступность в диапазоне от 49% до 71%. Данные по группам 5, 8 и 9 показывают, что в эквивалентных дозах ранжирный порядок биодоступности солей представляет собой NmG>калий>натрий в растворителе 10% гидрокси-β-циклодекстрине в воде.

Таблица 5

Величины фармакокинетических показателей для DSB в плазме крыс, которым вводили однократные оральные дозы 25 мг/кг

Номер группы	Рассчитанная доза (мг/кг)	C _{max} (мкг/мл) ^b	t _{am} (ч) ^c	AUC _{all} (мкг•ч/мл) ^d	AUC _{INF} (мкг•ч/мл) ^e	Видимая k _c (ч ⁻¹) ^f	F (%) ^g
1	26,05	5,52	1,0	16,6 (0-12 ч)	16,8	0,3327	10,6
2	22,45	0,419	2,0	1,36 (0-6 ч)	2,26	0,2051	1,65
3	20,12	12,0	4,0	65,3 (0-12 ч)	66,4	0,4675	54,2
4	20,48	13,7	4,0	88,9 (0-12 ч)	89,4	0,6019	71,7
5	18,15	11,4	4,0	54,3 (0-12 ч)	54,5	0,6496	49,3

6	21,08	0,570	4,0	3,28 (0-24 ч)	3,82	0,0837	2,98
7	21,80	2,00	6,0	10,2 (0-12 ч)	10,2	0,7486	7,69
8	19,87	7,28	4,0	44,1 (0-24 ч)	44,7	0,1971	37,0
9	20,22	11,0	4,0	39,1 (0-12 ч)	39,2	0,5496	31,9
10	24,54	1,32	2,0	6,05 (0-12 ч)	6,63	0,0876	6,70

^a Измеренная концентрация по анализу растворения дозы.

^b Максимальная измеренная концентрация в плазме.

^c Время до достижения максимальной концентрации.

^d Площадь под кривой изменения концентрации в плазме с течением времени.

^e Площадь под кривой изменения концентрации в плазме с течением времени, экстраполированной в бесконечность.

^f Константа скорости выведения; период полувыведения = $0,693/k_e$

^g биодоступность рассчитывали как скорректированное по дозе отношение AUC_{INF} , полученной после орального, в сравнении с внутривенным введением DSB (доза=10,4 мг/кг, $AUC_{INF}=63,3$ мг•ч/мл). Данные после внутривенного введения были получены по исследованию DSB у крыс.

$$F(\%) = 100 \times \left(\frac{\text{Доза}_{\text{внутривенная}} \times AUC_{INF\text{орально}}}{AUC_{INF\text{внутривенная}} \times AUC_{INF\text{внутривенно}}} \right)$$

Пример 5

Характеристика анти-ВИЧ эффективности in vivo DSB-(NmG)₂ на мышинной модели ВИЧ инфекции SCID-hu Thy/Liv

Это исследование проводилось для оценки противовирусной активности соли DSB (DSB-(NmG)₂) в дозах 100 и 300 мг/кг/д у самцов мышей SCID-hu Thy/Liv (7/группу), получавших лечение дважды в день оральным введением в течение 22 д. (Дозировки относятся к эквивалентам свободной кислоты, т.е. количеству DSB, присутствующему в дозе). На уровне дозы 300 мг/кг/д группе неинфицированных мышей SCID-hu Thy/Liv вводили для оценки переносимости этого уровня дозы. Оральное введение 1 раз/д ЗТС (ламивудина) в дозе 30 мг/кг/д в течение 22 д использовали в качестве положительного контроля. Самцов мышей C.B-17 SCID получали в возрасте 6 нед, и им имплантировали человеческую плодную ткань от одного донора. Через 14 нед мышам имплантировали фрагменты человеческой плодной печени и человеческого плодного тимуса под капсулу почки мышей для получения мышей SCID-hu Thy/Liv.

Когда имплантаты достигали приблизительно 30 мм³, животных включали в эксперимент. Инокуляции ВИЧ-1 мышам SCID-hu Thy/Liv выполняли у наркотизированных мышей в барьерном устройстве, ограничивающем подвижность животных, в соответствии с руководством BSL3. Каждый имплантат Thy/Liv инъецировали с 50 мкл (1000 TCID₅₀) NL4-3 партии JK WSI D3 (разведенные 1:2) или со средой RPMI 1640 в 1-3 места 250-мкл стеклянным шприцем Hamilton и тупой иглой 30 калибра × 1/2 дюйма. Для этого исследования имплантаты инокулировали через 18 нед после имплантации ткани. Все имплантаты собирали через 21 д после инокуляции.

Носитель введения представлял собой 10% гидроксипропил-β-циклодекстрин в стерильном PBS (солевом растворе с фосфатным буфером). Вводимые растворы готовили заново перед каждым введением в концентрациях 12 и 38 мг/мл для введения в дозах 100 и 300 мг/кг/д свободной кислоты DSB.

Мышам препарат орально вводили (200 мкл/дозу) дважды в день и наблюдали для выявления признаков токсичности. Ввиду того, что токсичность наблюдалась у мышей, получавших лечение в дозе 300 мг/кг/д, уровень дозировки снижали до 150 мг/кг/д, начиная с 7 д после начала лечения после периода восстановления 5 д без

5 лечения. Получавших лечение мышей наблюдали во время введения для выявления признаков токсичности, и их взвешивали через каждые 2-5 д. Мышей инокулировали NL4-3 через 1 д после введения первой дозы (1-2 ч после дозы AM), и введение выполняли в течение 22 д.

10 Через 21 д после инокуляции имплантаты Thy/Liv хирургически иссекали и переносили в 6-луночные планшеты для культуры ткани, содержащие холодный стерильный PBS/2% FBS (плодную телячью сыворотку). Одиночную клеточную суспензию получали помещением имплантата в стерильный мешок из нейлоновой сетки, погружая мешок в PBS/2% FBS в 60-мм чашку для тканевой культуры, и

15 диспергируя ткань между слоями нейлона пинцетом. Клетки подсчитывали счетчиком Coulter, и соответствующие количества клеток делили на аликвотные количества для каждого анализа. Для ELISA (иммуноферментного анализа) р24, осадки в пробирках после центрифугирования, содержащие $2,5 \times 10^6$ клеток,

20 ресуспендировали в 400 мкл лизисного буфера р24, вращали в течение ночи при 4°C и хранили при -20°C . Для количественного анализа РНК анализом разветвленной ДНК, сухие осадки в пробирках после центрифугирования, содержащие $2,5 \times 10^6$ клеток, замораживали и хранили при -80°C . Для анализа FACS (лазерным анализатором

25 клеток по интенсивности флюоресценции) 10^6 клеток на лунку помещали в 96-луночную планшету для фиксации и окрашивания и анализировали в тот же день четырехцветным анализом FASC.

В этом исследовании оральное введение DSB-(NmG)₂ в дозах 100 и 150 мг/кг/д, начиная за 24 ч до инокуляции вируса характеризовалось высокой, зависимой от дозы

30 противовирусной активностью против NL4-3. На самом высоком уровне дозировки, р24 снижался на 99% (14, в сравнении с 440 пкг на 10^6 клеток для не получавших лечения мышей) и РНК ВИЧ-1 на 97% ($10^{3,4}$, в сравнении с $10^{5,6}$ копий на 10^6 клеток), и экспрессия МНС-1 на тимоцитах CD4⁺CD8⁺ снижалась до более нормальных

35 уровней (250, в сравнении с 530 при средней интенсивности флюоресценции). Наблюдалось незначительное, но все же статистически значимое снижение р24 имплантата и вирусной РНК в дозе 100 мг/кг/д (60 пкг и $10^{4,0}$ копий на 10^6 клеток), и не было снижений после лечения одним носителем гидроксипропил-β-

40 циклодекстрином (590 пкг 24 и $10^{5,6}$ копий на 10^6 клеток).

В этом исследовании оральное введение 1 раз/д ЗТС в дозе 100 мг/кг/д, начиная за 24 ч до инокуляции вируса, характеризовалось демонстрируемой противовирусной активностью, снижая р24 на 97% (35, в сравнении с 440 пкг р24 на 10^6 клеток), и РНК

45 ВИЧ-1 на 96% ($10^{4,2}$, в сравнении с $10^{5,6}$ копий на 10^6 клеток) и сохраняя жизнеспособность тимоцитов (71% живых тимоцитов).

Эти данные демонстрируют, что DSB-(NmG)₂ является сильнодействующим ингибитором репликации ВИЧ-1 in vivo. На этой модели DSB-(NmG)₂ продемонстрировал силу действия, аналогичную ЗТС.

50 Заключение

Все 3 соли DSB проявили значительно более высокую растворимость в воде, чем свободная кислота (≈ 100 мкг/мл). Соль NmG DSB была более растворимой в растворе 10% гидроксипропил-β-циклодекстрина в воде, чем и калиевая, и натриевая

соли. В исследовании биодоступности у крыс оценивались 3 солевые формы DSB в 5 различных препаративных формах (3 с NmG, одна с натрием и одна с калием), и 5 различных препаративных форм, содержащих свободную кислоту. Препаративные формы соли NmG имели самую высокую оральную биодоступность в диапазоне от 49% до 71%. Кроме того, исследование на мышах SCID-Hu продемонстрировало, что DSG-(NmG)₂ представляет собой сильнодействующий ингибитор in vivo репликации ВИЧ-1.

Представленное выше описание специфических вариантов осуществления настолько полно выявит общую природу изобретения, что другие смогут путем применения современных представлений легко модифицировать и/или адаптировать к различным видам применения таких специфических вариантов осуществления без отхода от родовой концепции, и поэтому предполагается, что такие адаптации и модификации находятся в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов осуществления. Следует понимать, что представленная здесь фразеология или терминология используется с целью описания, а не ограничения.

Все ссылки, приведенные в настоящем описании, включены сюда в качестве ссылки.

Формула изобретения

1. Ди-(N-метил-D-глюкамин) соль 3-O-(3',3'-диметилсукцинил)бетулиновой кислоты.

2. Фармацевтическая композиция, обладающая противоретровирусной активностью, включающая эффективное количество соли по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

3. Фармацевтическая композиция по п.2, где указанный носитель или разбавитель представляет собой водный растворитель.

4. Фармацевтическая композиция по п.3, дополнительно включающая циклодекстрин.

5. Фармацевтическая композиция по п.4, дополнительно включающая гидроксипропил-β-циклодекстрин.

6. Способ лечения ВИЧ-инфекции, включающий введение субъекту эффективного количества соли по п.1.

7. Способ лечения ВИЧ-инфекции, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п.2.

8. Способ лечения ВИЧ-инфекции, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п.3.

9. Способ лечения ВИЧ-инфекции, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п.4.

10. Способ лечения ВИЧ-инфекции, включающей введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п.5.

11. Способ получения соли по п.1, в котором N-метил-D-глюкамин растворяют в метаноле, добавляют 3-O-(3',3'-диметилсукцинил)бетулиновой кислоты к раствору, содержащему N-метил-D-глюкамин, и медленно добавляют простой диэтиловый эфир для получения ди-N-метил-D-глюкаминной соли 3-O-(3',3'-диметилсукцинил)бетулиновой кислоты.

12. Способ по п.11, в котором ди-N-метил-D-глюкаминную соль 3-O-(3',3'-диметилсукцинил)бетулиновой кислоты отделяют вакуум-фильтрацией и сушат в вакууме.