

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045093**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |   |  |
|---|--|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента<br/><b>2023.10.27</b></p> <p>(21) Номер заявки<br/><b>202091005</b></p> <p>(22) Дата подачи заявки<br/><b>2018.12.07</b></p> | <p>(51) Int. Cl. <i>A61K 31/706</i> (2006.01)<br/><i>A61K 31/7064</i> (2006.01)<br/><i>A61K 31/7068</i> (2006.01)<br/><i>C07H 19/06</i> (2006.01)<br/><i>C07H 19/067</i> (2006.01)<br/><i>C07H 19/10</i> (2006.01)</p> |
|---|--|

---

(54) **ПРОИЗВОДНОЕ N4-ГИДРОКСИЦИТИДИНА, СОДЕРЖАЩАЯ ЕГО  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СВЯЗАННЫЕ С ЭТИМ  
ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

- |   |  |
|---|--|
| <p>(31) 62/595,907; 62/626,998; 62/760,434<br/>(32) 2017.12.07; 2018.02.06; 2018.11.13<br/>(33) US<br/>(43) 2020.06.04<br/>(86) PCT/US2018/064503<br/>(87) WO 2019/113462 2019.06.13<br/>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:<br/><b>ЭМОРИ ЮНИВЕРСИТИ (US)</b></p> <p>(72) Изобретатель:<br/><b>Пейнтер Джордж Р., Блюмлиг<br/>Грегори Р., Натчес Майкл Дж., Гетри<br/>Дэвид (US)</b></p> <p>(74) Представитель:<br/><b>Медведев В.Н. (RU)</b></p> | <p>(56) WO-A1-2016106050<br/>US-A1-20090105186<br/>MERTES et al. Nucleic Acid Components<br/>and Their Analogues. Cxv.* synthesis of<br/>n4-hydroxy-6-azacytidine 5'-phosphate and 5'-<br/>diphosphate, Collection of Czechoslovak Chemical<br/>Communications, Vol. 33, Issue. 10, 1968 [retrieved<br/>on 23 January 2019]. Retrieved from the Internet:<br/>&lt;URL: <a href="http://cccc.uochb.cas.cz/33/10/3304/">http://cccc.uochb.cas.cz/33/10/3304/</a>&gt; Pgs.<br/>3304-3312<br/>BROWN et al. Mechanism of the Mutagenic<br/>Action of Hydroxylamine, Journal of Molecular<br/>Biology, Vol. 11, No. 4, 01 April 1965 [retrieved<br/>on 23 January 2019]. Retrieved from the Internet:<br/>&lt;URL: <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283665800249">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283665800249</a>&gt; Pgs. 663-671<br/>US-A1-20030008841<br/>US-A1-20140235566<br/>WO-A1-2017165489</p> |
|---|--|

- 
- (57) Изобретение относится к производному нуклеозида N4-гидроксицитидина, а именно 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридину, к содержащей его композиции и способам, связанным с ними. В некоторых вариантах воплощения изобретение относится к лечению или профилактике заболевания, вызываемого коронавирусом человека, коронавирусом SARS, коронавирусом MERS, вирусом восточного лошадиного энцефалита, вирусом западного лошадиного энцефалита, вирусом венесуэльского энцефалита лошадей, вирусом чикунгунья, инфекцией Росс-ривер, вирусом Orthomyxoviridae, вирусом Paramyxoviridae, вирусом RSV, вирусом гриппа А и вирусом гриппа В, вирусом Filoviridae или инфекцией вируса Эбола.

**B1****045093****045093 B1**

### Подтверждение государственной поддержки

Данное изобретение было выполнено при государственной поддержке в рамках грантов, номера HDTRA1-13-C-0072 и HDTRA1-15-C-0075, предоставленных Министерством обороны, и гранта номер HNSN272201500008С, предоставленным Национальным Институтом Здоровья. Правительство имеет определенные права на это изобретение.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к производному нуклеозида N4-гидроксицитидина, а именно 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридину, к содержащей его композиции и способам, связанным с ними. В некоторых вариантах воплощения, изобретение относится к лечению или профилактике заболевания, вызываемого коронавирусом человека, коронавирусом SARS, коронавирусом MERS, вирусом восточного лошадиного энцефалита, вирусом западного лошадиного энцефалита, вирусом венесуэльского энцефалита лошадей, вирусом чикунгунья, инфекцией Росс-ривер, вирусом Orthomyxoviridae, вирусом Paramyxoviridae, вирусом RSV, вирусом гриппа А и вирусом гриппа В, вирусом Filoviridae, или инфекцией вируса Эбола.

### Уровень техники

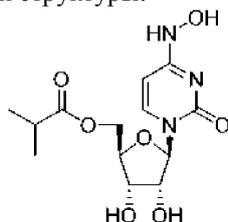
Возбудителями восточного, западного и венесуэльского энцефалита лошадей (соответственно, EEE, WEE и VEE) и лихорадки Чикунгунья (CHIK) являются вирусы-переносчики (семейство Togaviridae, род Alphavirus), которые могут передаваться человеку через укусы комаров. Вирусы энцефалита лошадей являются патогенами категории В по CDC, а вирусы CHIK относятся к категории С. Существует серьезная озабоченность по поводу использования в качестве биологического оружия против войск вирулентных штаммов вируса VEE, доставляемых через аэрозоль. Исследования на животных показали, что заражение вирусом VEE при аэрозольном воздействии быстро приводит к массивной инфекции мозга с высокой смертностью и заболеваемостью, см. Roy et al., Pathogenesis of aerosolized Eastern equine encephalitis virus infection in guinea pigs. *Virology*, 2009, 6:170.

По сообщениям Stuyver et al.  $\beta$ -D-N(4)-гидроксицитидин (NHC) обладает активностью против псевдотифирусов и гепацивирусов. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(1):244-54. Constantini et al. описывают оценку эффективности 2'-С-МеС, 2'-F-2'-С-МеС и NHC при воздействии на норовирус, см. также Purohit et al., *J Med Chem*, 2012, 55(22):9988-9997; Ivanov et al., *Collection of Czechoslovak Chem Commun*, 2006, 71(7): 1099-1106; и Fox et al., *JACS*, 1959, 81:178-87.

Существует необходимость в новых соединениях и методах лечения вирусных инфекций. Соединения и способы, раскрытые в данном документе, удовлетворяют эти потребности.

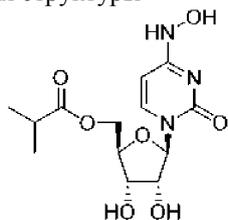
### Раскрытие изобретения

Данное изобретение относится к определенному N4-гидроксицитидину, содержащей его фармацевтической композиции и способам, связанным с ними. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и соединение следующей структуры:



или его фармацевтически приемлемую или физиологически приемлемую соль.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения или предупреждения заболевания, вызываемого коронавирусом человека, коронавирусом SARS, коронавирусом MERS, вирусом восточного лошадиного энцефалита, вирусом западного лошадиного энцефалита, вирусом венесуэльского энцефалита лошадей, вирусом чикунгунья, инфекцией Росс-ривер, вирусом Orthomyxoviridae, вирусом Paramyxoviridae, вирусом RSV, вирусом гриппа А и вирусом гриппа В, вирусом Filoviridae, или инфекцией вируса Эбола у пациента, включающего введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения структуры



или его фармацевтически приемлемой или физиологически приемлемой соли.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом человека, коронавирусом SARS или коронавирусом MERS.

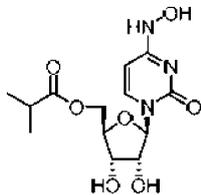
В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом человека.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом SARS.

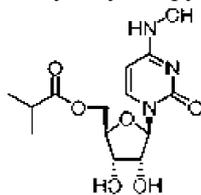
В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом MERS.

В определенных вариантах осуществления указанным пациентом, нуждающимся в этом, является человек.

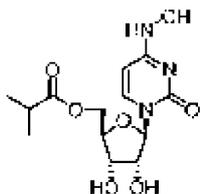
В определенных вариантах осуществления изобретение относится к соединению, имеющему следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемой или физиологически приемлемой соли. В определенных вариантах осуществления соединение имеет следующую структуру:



В определенных вариантах осуществления соединение представляет собой фармацевтически приемлемую или физиологически приемлемую соль



В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая или физиологически приемлемая соль образуется путем переноса атома водорода от гетероатома, отдающего водород, к основному атому внутри соединения.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к соединению 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин, полученное способом, включающим:

а) взаимодействие гидроксильных групп в положениях 2', 3' и 5' уридина с ацетоном для защиты гидроксильных групп в положениях 2' и 3' уридина с образованием первого промежуточного соединения;

б) этерификацию гидроксильной группы в положении 5' первого промежуточного соединения, используя 2-метилпропаноил-2-метилпропаноат, с образованием изобутилового сложного эфира в качестве второго промежуточного соединения;

в) взаимодействие второго промежуточного соединения с соединением 1,2,4-триазол с последующей реакцией с гидроксиламином в положении 4, получая таким образом 4-гидроксиламин-5'-сложный эфир нуклеозида; и

д) снятие защиты с 4-гидроксиламин-5'-сложного эфира нуклеозида в положениях 2' и 3' с образованием соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый эксципиент и соединение 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин, полученное способом, включающим:

а) взаимодействие гидроксильных групп в положениях 2', 3' и 5' уридина с ацетоном для защиты гидроксильных групп в положениях 2' и 3' уридина с образованием первого промежуточного соединения;

б) этерификацию гидроксильной группы в положении 5' первого промежуточного соединения, используя 2-метилпропаноил-2-метилпропаноат, с образованием изобутилового сложного эфира в качестве второго промежуточного соединения;

в) взаимодействие второго промежуточного соединения с соединением 1,2,4-триазол с последующей реакцией с гидроксиламином в положении 4, получая таким образом 4-гидроксиламин-5'-сложный эфир нуклеозида; и

д) снятие защиты с 4-гидроксиламин-5'-сложного эфира нуклеозида в положениях 2' и 3' с образованием соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения или предупреждения заболевания, вызываемого коронавирусом человека, коронавирусом SARS, коронавирусом

MERS, вирусом восточного лошадиного энцефалита, вирусом западного лошадиного энцефалита, вирусом венесуэльского энцефалита лошадей, вирусом чикунгунья, инфекцией Росс-ривер, вирусом Orthomyxoviridae, вирусом Paramyxoviridae, вирусом RSV, вирусом гриппа А и вирусом гриппа В, вирусом Filoviridae, или инфекцией вируса Эбола у пациента, включающего введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин, полученного способом, включающим:

- а) взаимодействие гидроксильных групп в положениях 2', 3' и 5' уридина с ацетоном для защиты гидроксильных групп в положениях 2' и 3' уридина с образованием первого промежуточного соединения;
- б) этерификацию гидроксильной группы в положении 5' первого промежуточного соединения, используя 2-метилпропаноил-2-метилпропаноат, с образованием изобутилового сложного эфира в качестве второго промежуточного соединения;
- в) взаимодействие второго промежуточного соединения с соединением 1,2,4-триазол с последующей реакцией с гидроксиламином в положении 4, получая таким образом 4-гидроксиламин-5'-сложный эфир нуклеозида; и
- д) снятие защиты с 4-гидроксиламин-5'-сложного эфира нуклеозида в положениях 2' и 3' с образованием соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом человека, коронавирусом SARS или коронавирусом MERS.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом человека.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом SARS.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом MERS.

В определенных вариантах осуществления указанным пациентом, нуждающимся в этом, является человек.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способу получения соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин, включающему:

- а) взаимодействие гидроксильных групп в положениях 2', 3' и 5' уридина с ацетоном для защиты гидроксильных групп в положениях 2' и 3' уридина с образованием первого промежуточного соединения;
- б) этерификацию гидроксильной группы в положении 5' первого промежуточного соединения, используя 2-метилпропаноил-2-метилпропаноат, с образованием изобутилового сложного эфира в качестве второго промежуточного соединения;
- в) взаимодействие второго промежуточного соединения с соединением 1,2,4-триазол с последующей реакцией с гидроксиламином в положении 4, получая таким образом 4-гидроксиламин-5'-сложный эфир нуклеозида; и
- д) снятие защиты с 4-гидроксиламин-5'-сложного эфира нуклеозида в положениях 2' и 3' с образованием соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин.

Дополнительные преимущества будут изложены частично в последующем описании и частично будут очевидны из описания или могут быть изучены на практике из аспектов, описанных ниже. Преимущества, описанные ниже, будут реализованы и достигнуты посредством элементов и комбинаций, конкретно указанных в прилагаемой формуле изобретения. Следует понимать, что как предшествующее общее описание, так и последующее подробное описание являются только иллюстративными и пояснительными и не являются ограничивающими.

#### Краткое описание фигур

Прилагаемые фигуры, которые включены в данное описание и составляют его часть, иллюстрируют несколько аспектов, описанных ниже.

Фиг. 1 является схемой, иллюстрирующей приготовление  $\beta$ -D-N-гидроксицитидина. Этапы синтеза следующие: а) TBSCl, DMAP, DIPEA, DCM; б) (2,4,6-*i*Pr)PhSO<sub>2</sub>Cl, DIPEA, DMAP, DCM; в) NH<sub>2</sub>OH-HCl, DIPEA, DCM; д) F- источник и е) водн. NH<sub>2</sub>OH, AcOH, 50°C.

Фиг. 2 демонстрирует определенные иллюстративные соединения.

Фиг. 3 демонстрирует определенные иллюстративные соединения.

Фиг. 4 демонстрирует средние концентрации в плазме и фармакокинетические параметры у мышей, получавших иллюстративное соединение.

Фиг. 5 демонстрирует накопление нуклеозидов в органах мышей, получавших иллюстративное соединение.

Фиг. 6 демонстрирует накопление трифосфата в органах мыши, получавших иллюстративное соединение.

Фиг. 7 демонстрирует уменьшение отека подушечки у мышей, зараженных CHIKV и получавших иллюстративное соединение.

Фиг. 8 демонстрирует снижение числа копий РНК CHIKV по данным ПЦР у мышей, зараженных CHIKV и получавших иллюстративное соединение.

Фиг. 9 демонстрирует выживаемость в течение 7 дней у мышей, зараженных ZIKV и получавших иллюстративное соединение.

Фиг. 10 демонстрирует выживаемость в течение 7 дней у мышей, зараженных ZIKV и получавших иллюстративное соединение с различным временем начала лечения после инфицирования.

Фиг. 11 демонстрирует концентрации N4-гидроксицитидинового нуклеозида в тканях яванских макак, которым перорально вводили EIDD-1931 (100 мг/кг).

Фиг. 12 демонстрирует концентрации N4-гидроксицитидинового нуклеозида в тканях яванских макак, которым внутривенно вводили EIDD-1931 (10 мг/кг).

Фиг. 13 демонстрирует структуру соединений, которые перорально вводили яванским макакам.

Фиг. 14 демонстрирует средние концентрации N4-гидроксицитидин нуклеозида в плазме у яванских макак, которым перорально вводили сложноэфирное производное.

Фиг. 15 демонстрирует среднюю максимальную концентрацию N4-гидроксицитидинового нуклеозида в плазме у яванских макак, которым перорально вводили сложноэфирное производное.

Фиг. 16 демонстрирует титр вируса из назального лаважа и лихорадку у хорьков, инфицированных вирусом гриппа A/California/07/2009 (H1N1), получавших перорально EIDD-2801 два раза в день или носитель.

Фиг. 17 демонстрирует титр вируса из назального лаважа, лихорадку и титр вируса в носовых раковинах у хорьков, зараженных гриппом A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), получавших перорально EIDD-2801 два раза в день или носитель.

Фиг. 18 демонстрирует влияние лечения при помощи EIDD-2801 на выживаемость мышей, зараженных интраназально VEEV.

Фиг. 19 демонстрирует влияние времени начала лечения при помощи EIDD-2801 на выживаемость мышей, зараженных интраназально VEEV.

Фиг. 20 демонстрирует влияние профилактики при помощи EIDD-2801 на вирусные титры в легких у мышей, зараженных SARS.

Фиг. 21 демонстрирует влияние времени лечения при помощи EIDD-2801 на легочные кровоизлияния в баллах у мышей, зараженных SARS.

Фиг. 22 демонстрирует влияние времени лечения при помощи EIDD-2801 на титры вируса в легких у мышей, зараженных SARS.

Фиг. 23 демонстрирует влияние лечения при помощи EIDD-2801 на легочные кровоизлияния в баллах у мышей, зараженных MERS.

#### Подробное описание

Прежде чем представить настоящее изобретение более подробно, следует понимать, что данное описание не ограничено конкретными описанными вариантами воплощения и, следовательно, может, конечно, варьироваться. Также следует понимать, что терминология, использованная в данном контексте, предназначена лишь для описания конкретных вариантов воплощения без ограничений, следовательно, данное изобретение ограничено лишь прилагаемой формулой изобретения.

Если не определено иное, все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. При том, что при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы или их эквиваленты, описанные в настоящем документе, далее будут представлены предпочтительные способы и материалы.

Все публикации и патенты, цитируемые в данном документе, включены в него посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патент были специально и в отдельности указаны, как включенные посредством ссылки, и включены в данный документ посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми цитированы данные публикации. Цитирование любой публикации предназначено для ее описания до даты подачи, и его не следует толковать как признание того, что данное изобретение не имеет права предшествовать такой публикации в силу предшествующего изобретения. Кроме того, приведенные даты публикаций могут отличаться от фактических дат публикаций, для которых может потребоваться независимое подтверждение.

Специалистам в данной области техники, при ознакомлении с данным описанием, станет понятно, что каждый из независимых вариантов воплощения, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет отдельные компоненты и признаки, которые можно без труда выделить или объединить с признаками любого из нескольких других вариантов воплощения, без отступления от объема и раскрытия данного изобретения. Любой цитированный способ может быть осуществлен в порядке перечисленных действий или в любом другом порядке, который является логически возможным.

В вариантах осуществления настоящего изобретения использованы, если не указано иное, технологии из области медицины, органической химии, биохимии, молекулярной биологии, фармакологии и т.п., которые известны в данных областях техники. Такие технологии подробно описаны в литературе.

В некоторых вариантах осуществления в способах, описанных в настоящем документе, вводят фармацевтический агент, который может быть в форме соли или пролекарства, которые точно определены по весу. Это отсылает к массе указанного соединения. В случае формы соли или пролекарства, масса представляет собой молярный эквивалент соответствующей соли или пролекарства.

Следует отметить, что в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единст-

венного числа включают ссылку на множественное число, если из контекста, очевидно, не следует обратное.

"Субъект" относится к любому животному, предпочтительно к человеку-пациенту, сельскохозяйственному животному или домашнему питомцу.

В данном контексте термины "предупреждать" и "предупреждение" включают предотвращение рецидива, распространения или возникновения. Это не значит, что настоящее изобретение ограничено полным предотвращением. В некоторых вариантах происходит задержка возникновения или облегчение тяжести заболевания.

В данном контексте термины "лечить" и "лечение" не ограничены тем случаем, в котором вылечен субъект (например, пациент) и устранено заболевание. Скорее, варианты воплощения настоящего изобретения предусматривают также лечение, которое лишь облегчает симптомы и/или замедляет развитие заболевания.

В данном контексте термин "в комбинации с", используемый для описания введения с дополнительными средствами лечения, означает, что данный агент может быть введен до, вместе или после дополнительного лечения, или в комбинации указанных приемов.

В данном контексте "алкил" означает неразветвленные или разветвленные насыщенные углеводородные фрагменты, такие как те, которые содержат от 1 до 10 атомов углерода. "Высший алкил" относится к насыщенному углеводороду, содержащему 11 или более атомов углерода. "C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub>" относится к алкилу, содержащему от 6 до 16 атомов углерода. Аналогично, "C<sub>6</sub>-C<sub>22</sub>" относится к алкилу, содержащему от 6 до 22 атомов углерода. Представленные насыщенные неразветвленные алкилы включают метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил, н-септил, н-октил, н-нонил и т.п.; а насыщенные разветвленные алкилы включают изопропил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, изопентил и т.п.

В данном контексте термин "алкенил" относится к ненасыщенным неразветвленным или разветвленным углеводородным фрагментам, содержащим двойную связь. Если не указано иное, предусмотрены C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> (например, C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>) алкенильные группы. Алкенильные группы могут содержать более одной ненасыщенной связи. Примеры включают этинил, 1-пропенил, 2-пропенил, 1-метилэтинил, 1-бутенил, 2-бутенил, 3-бутенил, 1-метил-1-пропенил, 2-метил-1-пропенил, 1-метил-2-пропенил, 2-метил-2-пропенил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-пентенил, 4-пентенил, 1-метил-1-бутенил, 2-метил-1-бутенил, 3-метил-1-бутенил, 1-метил-2-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 3-метил-2-бутенил, 1-метил-3-бутенил, 2-метил-3-бутенил, 3-метил-3-бутенил, 1,1-диметил-2-пропенил, 1,2-диметил-1-пропенил, 1,2-диметил-2-пропенил, 1-этил-1-пропенил, 1-этил-2-пропенил, 1-гексенил, 2-гексенил, 3-гексенил, 4-гексенил, 5-гексенил, 1-метил-1-пентенил, 2-метил-1-пентенил, 3-метил-1-пентенил, 4-метил-1-пентенил, 1-метил-2-пентенил, 2-метил-2-пентенил, 3-метил-2-пентенил, 4-метил-2-пентенил, 1-метил-3-пентенил, 2-метил-3-пентенил, 3-метил-3-пентенил, 4-метил-3-пентенил, 1-метил-4-пентенил, 2-метил-4-пентенил, 3-метил-4-пентенил, 4-метил-4-пентенил, 1,1-диметил-2-бутенил, 1,1-диметил-3-бутенил, 1,2-диметил-1-бутенил, 1,2-диметил-2-бутенил, 1,2-диметил-3-бутенил, 1,3-диметил-1-бутенил, 1,3-диметил-2-бутенил, 1,3-диметил-3-бутенил, 2,2-диметил-3-бутенил, 2,3-диметил-1-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил, 2,3-диметил-3-бутенил, 3,3-диметил-1-бутенил, 3,3-диметил-2-бутенил, 1-этил-1-бутенил, 1-этил-2-бутенил, 1-этил-3-бутенил, 2-этил-1-бутенил, 2-этил-2-бутенил, 2-этил-3-бутенил, 1,1,2-триметил-2-пропенил, 1-этил-1-метил-2-пропенил, 1-этил-2-метил-1-пропенил и 1-этил-2-метил-2-пропенил. Термин "винил" относится к группе, имеющей структуру -CH=CH<sub>2</sub>; 1-пропенил относится к группе со структурой -CH=CH-CH<sub>3</sub>; и 2-пропенил относится к группе со структурой -CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>. Предусмотрено, что асимметричные структуры, такие как (Z<sup>1</sup>Z<sup>2</sup>)C=C(Z<sup>3</sup>Z<sup>4</sup>), включают и E-, и Z-изомеры. Это может быть предполагаться в структурных формулах данного контекста, в которых присутствует асимметричный алкен, или может быть указано в явном виде символом связи C=C.

В данном контексте термин "алкинил" относится к неразветвленным или разветвленным углеводородным фрагментам, содержащим тройную связь. Если не указано иное, предусмотрены C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> (например, C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> или C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>) алкинильные группы. Алкинильные группы могут содержать более одной ненасыщенной связи. Примеры включают C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил, такой как этинил, 1-пропинил, 2-пропинил (или пропаргил), 1-бутинил, 2-бутинил, 3-бутинил, 1-метил-2-пропинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-пентинил, 4-пентинил, 3-метил-1-бутинил, 1-метил-2-бутинил, 1-метил-3-бутинил, 2-метил-3-бутинил, 1,1-диметил-2-пропинил, 1-этил-2-пропинил, 1-гексинил, 2-гексинил, 3-гексинил, 4-гексинил, 5-гексинил, 3-метил-1-пентинил, 4-метил-1-пентинил, 1-метил-2-пентинил, 4-метил-2-пентинил, 1-метил-3-пентинил, 2-метил-3-пентинил, 1-метил-4-пентинил, 2-метил-4-пентинил, 3-метил-4-пентинил, 1,1-диметил-2-бутинил, 1,1-диметил-3-бутинил, 1,2-диметил-3-бутинил, 2,2-диметил-3-бутинил, 3,3-диметил-1-бутинил, 1-этил-2-бутинил, 1-этил-3-бутинил, 2-этил-3-бутинил и 1-этил-1-метил-2-пропинил.

Неароматические моно- или полициклические алкилы упомянуты в данном контексте как "карбоциклы" или "карбоциклильные" группы. Представленные насыщенные карбоциклы включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т.п.; а ненасыщенные карбоциклы включают циклопентенил и циклогексенил и т.п.

"Гетерокарбоциклы" или "гетерокарбоциклильные" группы представляют собой карбоциклы, которые содержат от 1 до 4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, которые могут быть насыщенными или ненасыщенными (но не ароматическими), моноциклическими или полициклическими, и при этом гетероатомы азота и серы могут быть необязательно окислены, а гетероатом азота может быть необязательно кватернизован. Гетерокарбоциклы включают морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, гидантоинил, валеролактамыл, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил и т.п.

Термин "арил" относится к ароматическим гомоциклическим (т.е. углеводородным) группам, содержащим моно-, би- или трициклические кольца, предпочтительно содержащим от 6 до 12 членов, таким как фенил, нафтил и бифенил. Фенил является предпочтительной арильной группой. Термин "замещенный арил" относится к арильным группам, замещенным одной или более группами, предпочтительно выбранными из алкила, замещенного алкила, алкенила (необязательно замещенного), арила (необязательно замещенного), гетероцикло (необязательно замещенного), галогена, гидрокси, алкокси (необязательно замещенного), арилокси (необязательно замещенного), алканоила (необязательно замещенного), ароила (необязательно замещенного), сложного алкилового эфира (необязательно замещенного), сложного арилового эфира (необязательно замещенного), циано, нитро, amino, замещенного amino, амидо, лактама, мочевины, уретана, сульфонила и т.п., причем необязательно одна или более пар заместителей вместе с атомами, с которыми они связаны, образуют 3-7-членное кольцо.

В данном контексте "гетероарил" или "гетероароматический" относится к ароматическому гетерокарбоциклу, содержащему от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из азота, кислорода и серы, и содержащему по меньшей мере, 1 атом углерода, включая моно- и полициклические кольцевые системы. Полициклические кольцевые системы могут, но не обязательно должны содержать одно или более неароматических колец, при условии, что одно из колец является ароматическим. Характерными гетероариламинами являются фурил, бензофуранил, тиофенил, бензотиофенил, пирролил, индолил, изоиндолил, азаиндолил, пиридил, хинолинил, изохинолинил, оксазолил, изоксазолил, бензоксазолил, пиразолил, имидазолил, бензимидазолил, тиазолил, бензотиазолил, изотиазолил, пиридазинил, пиримидинил, пиразинил, триазинил, циннолинил, фталазинил и хиназолинил. Предусмотрено, что использование термина "гетероарил" включает N-алкилированные производные, такие как 1-метилимидазол-5-ильный заместитель.

В данном контексте "гетероцикл" или "гетероциклил" относится к моно- и полициклическим кольцевым системам, содержащим от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из азота, кислорода и серы, и содержащим по меньшей мере 1 атом углерода. Моно- и полициклические кольцевые системы могут быть ароматическими, неароматическими или смесями ароматических и неароматических колец. Гетероцикл включает гетерокарбоциклы, гетероарилы и т.п.

"Алкилтио" относится к алкильной группе, определение которой приведено выше, с указанным количеством атомов углерода, присоединенной через мостиковый атом серы. Примером алкилтио является метилтио (т.е. -S-CH<sub>3</sub>).

"Алкокси" относится к алкильной группе, определение которой приведено выше, с указанным количеством атомов углерода, присоединенной через мостиковый атом кислорода. Примеры алкокси включают, но не ограничиваются ими, метокси, этокси, n-пропокси, изопропокси, n-бутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, n-пентокси и втор-пентокси. Предпочтительные алкоксигруппы представляют собой метокси, этокси, n-пропокси, изопропокси, n-бутокси, втор-бутокси, трет-бутокси.

"Алкиламино" относится к алкильной группе, определение которой приведено выше, с указанным количеством атомов углерода, присоединенной через мостиковую аминогруппу. Примером алкиламино является метиламино (т.е. -NH-CH<sub>3</sub>).

"Алканоил" относится к алкилу, определение которого приведено выше, с указанным количеством атомов углерода, присоединенному через карбонильный мостик (т.е. -(C=O)алкил).

"Алкилсульфонил" относится к алкилу, определение которого приведено выше, с указанным количеством атомов углерода, присоединенному через сульфонильный мостик (т.е. -S(=O)<sub>2</sub>алкил), такому как мезил и т.п., и "арилсульфонил" относится к арилу, присоединенному через сульфонильный мостик (т.е. -S(=O)<sub>2</sub>арил).

"Алкилсульфамоил" относится к алкилу, определение которого приведено выше, с указанным количеством атомов углерода, присоединенному через сульфамоильный мостик (т.е. -NHS(=O)<sub>2</sub>алкил), и "арилсульфамоил" относится к алкилу, присоединенному через сульфамоильный мостик (т.е. -NHS(=O)<sub>2</sub>арил).

"Алкилсульфинил" относится к алкилу, определение которого приведено выше, с указанным количеством атомов углерода, присоединенному через сульфинильный мостик (т.е. -S(=O)алкил).

Термины "циклоалкил" и "циклоалкенил" относятся к моно-, би- или тригомоциклическим кольцевым группам из 3-15 атомов углерода, которые, соответственно, являются полностью насыщенными и частично ненасыщенными. Термин "циклоалкенил" включает би- и трициклические кольцевые системы, которые не являются ароматическими в целом, но содержат ароматические части (например, флуорен, тетрагидронафталин, дигидроинден и т.п.). Кольца в многокольцевых циклоалкильных группах могут

быть конденсированными, мостиковыми и/или соединенными одной или более спиро-связями. Термины "замещенный циклоалкил" и "замещенный циклоалкенил" относятся, соответственно, к циклоалкильным и циклоалкенильным группам, замещенным одной или более группами, предпочтительно выбранными из арила, замещенного арила, гетероцикло, замещенного гетероцикло, карбоцикло, замещенного карбоцикло, галогена, гидрокси, алкокси (необязательно замещенного), арилокси (необязательно замещенного), сложного алкилового эфира (необязательно замещенного), сложного арилового эфира (необязательно замещенного), алканоила (необязательно замещенного), ариола (необязательно замещенного), циано, нитро, amino, замещенного amino, амидо, лактама, мочевины, уретана, сульфонила и т.п.

Термины "галоген" и "гало" относятся к фтору, хлору, бром и йоду.

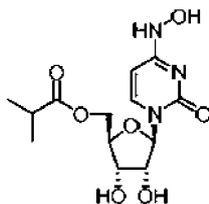
Термин "замещенная" относится к молекуле, в которой по меньшей мере один атом водорода заменен на заместитель. При наличии замещения, одна или более таких групп являются "заместителями". Молекула может быть замещена несколькими заместителями. В случае оксозаместителя ("=O") замещены два атома водорода. Примеры заместителей в данном контексте могут включать галоген, гидрокси, алкил, алкокси, нитро, циано, оксо, карбоциклил, карбоциклоалкил, гетерокарбоциклил, гетерокарбоциклоалкил, арил, арилалкил, гетероарил, гетероарилалкил, -NRaRb, -NRaC(=O)Rb, -NRaC(=O)NRaNRb, -NRaC(=O)ORb, -NRaSO<sub>2</sub>Rb, -C(=O)Ra, -C(=O)ORa, -C(=O)NRaRb, -OC(=O)NRaRb, -ORa, -SRa, -SORa, -S(=O)<sub>2</sub>Ra, -OS(=O)<sub>2</sub>Ra и -S(=O)<sub>2</sub>ORa. Ra и Rb в данном контексте могут быть одинаковыми или различными и, независимо, представляют собой водород, галоген, гидроксил, алкил, алкокси, алкил, amino, алкиламино, диалкиламино, карбоциклил, карбоциклоалкил, гетерокарбоциклил, гетерокарбоциклоалкил, арил, арилалкил, гетероарил, гетероарилалкил.

Термин "необязательно замещенный" в данном контексте означает, что замещение дополнительной группой является необязательным и, следовательно, указанный атом может быть незамещенным. Таким образом, с помощью термина "необязательно замещенный" настоящее описание включает примеры, в которых указанная группа является замещенной, и примеры, в которых она не является замещенной.

Примеры пролекарств, которые можно использовать для улучшения биодоступности, включают сложные эфиры, необязательно замещенные сложные эфиры, разветвленные сложные эфиры, необязательно замещенные разветвленные сложные эфиры, карбонаты, необязательно замещенные карбонаты, карбаматы, необязательно замещенные карбаматы, сложные тиоэфиры, необязательно замещенные сложные тиоэфиры, разветвленные сложные тиоэфиры, необязательно замещенные разветвленные сложные тиоэфиры, тиокарбонаты, необязательно замещенные тиокарбонаты, S-тиокарбонат, необязательно замещенный S-тиокарбонат, дитиокарбонаты, необязательно замещенные дитиокарбонаты, тиокарбаматы, необязательно замещенные тиокарбаматы, оксиметоксикарбонил, необязательно замещенный оксиметоксикарбонил, оксиметокситиокарбонил, необязательно замещенный оксиметокситиокарбонил, оксиметилкарбонил, необязательно замещенный оксиметилкарбонил, оксиметилтиокарбонил, необязательно замещенный оксиметилтиокарбонил, сложные эфиры L-аминокислот, сложные эфиры D-аминокислот, сложные эфиры N-замещенных L-аминокислот, сложные эфиры N,N-дизамещенных L-аминокислот, сложные эфиры N-замещенных D-аминокислот, сложные эфиры N,N-дизамещенных D-аминокислот, сульфенил, необязательно замещенный сульфенил, имидат, необязательно замещенный имидат, гидразонат, необязательно замещенный гидразонат, оксимил, необязательно замещенный оксимил, имидинил, необязательно замещенный имидинил, имидил, необязательно замещенный имидил, аминаль, необязательно замещенный аминаль, гемиаминаль, необязательно замещенный гемиаминаль, ацеталь, необязательно замещенный ацеталь, гемиацеталь, необязательно замещенный гемиацеталь, карбонимидат, необязательно замещенный карбонимидат, тиокарбонимидат, необязательно замещенный тиокарбонимидат, карбонимидил, необязательно замещенный карбонимидил, карбамимидат, необязательно замещенный карбамимидат, карбамимидил, необязательно замещенный карбамимидил, тиацеталь, необязательно замещенный тиацеталь, S-ацил-2-тиоэтил, необязательно замещенный S-ацил-2-тиоэтил, сложные бис-(ацилксибензил)эфиры, необязательно замещенные сложные бис-(ацилксибензил)эфиры, сложные (ацилксибензил)эфиры, необязательно замещенные сложные (ацилксибензил)эфиры и сложные ВАВ-эфиры.

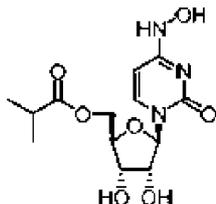
Соединения.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к соединению, имеющему следующую структуру:

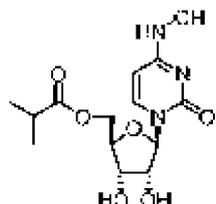


или его фармацевтически приемлемой или физиологически приемлемой соли.

В определенных вариантах осуществления соединение имеет следующую структуру:



В определенных вариантах осуществления соединение представляет собой фармацевтически приемлемую или физиологически приемлемую соль



В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая или физиологически приемлемая соль образуется путем переноса атома водорода от гетероатома, отдающего водород, к основному атому внутри соединения.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к соединению 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин, полученное способом, включающим:

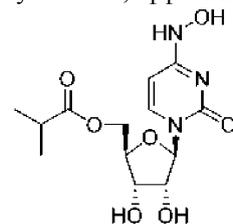
- взаимодействие гидроксильных групп в положениях 2', 3' и 5' уридина с ацетоном для защиты гидроксильных групп в положениях 2' и 3' уридина с образованием первого промежуточного соединения;
- этерификацию гидроксильной группы в положении 5' первого промежуточного соединения, используя 2-метилпропаноил-2-метилпропаноат, с образованием изобутилового сложного эфира в качестве второго промежуточного соединения;
- взаимодействие второго промежуточного соединения с соединением 1,2,4-триазол с последующей реакцией с гидроксиламином в положении 4, получая таким образом 4-гидроксиламин-5'-сложный эфир нуклеозида; и
- снятие защиты с 4-гидроксиламин-5'-сложного эфира нуклеозида в положениях 2' и 3' с образованием соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способу получения соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин, включающему:

- взаимодействие гидроксильных групп в положениях 2', 3' и 5' уридина с ацетоном для защиты гидроксильных групп в положениях 2' и 3' уридина с образованием первого промежуточного соединения;
- этерификацию гидроксильной группы в положении 5' первого промежуточного соединения, используя 2-метилпропаноил-2-метилпропаноат, с образованием изобутилового сложного эфира в качестве второго промежуточного соединения;
- взаимодействие второго промежуточного соединения с соединением 1,2,4-триазол с последующей реакцией с гидроксиламином в положении 4, получая таким образом 4-гидроксиламин-5'-сложный эфир нуклеозида; и
- снятие защиты с 4-гидроксиламин-5'-сложного эфира нуклеозида в положениях 2' и 3' с образованием соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин.

#### Способы применения

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения или предупреждения заболевания, вызываемого коронавирусом человека, коронавирусом SARS, коронавирусом MERS, вирусом восточного лошадиного энцефалита, вирусом западного лошадиного энцефалита, вирусом венесуэльского энцефалита лошадей, вирусом чикунгуны, инфекцией Росс-ривер, вирусом Orthomyxoviridae, вирусом Paramyxoviridae, вирусом RSV, вирусом гриппа А и вирусом гриппа В, вирусом Filoviridae, или инфекцией вируса Эбола у пациента, включающего введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения структуры



или его фармацевтически приемлемой или физиологически приемлемой соли.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом человека, коронавирусом SARS или коронавирусом MERS.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом человека.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом SARS.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом MERS.

В определенных вариантах осуществления указанным пациентом, нуждающимся в этом, является человек.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения или предупреждения заболевания, вызываемого коронавирусом человека, коронавирусом SARS, коронавирусом MERS, вирусом восточного лошадиного энцефалита, вирусом западного лошадиного энцефалита, вирусом венесуэльского энцефалита лошадей, вирусом чикунгунья, инфекцией Росс-ривер, вирусом Orthomyxoviridae, вирусом Paramyxoviridae, вирусом RSV, вирусом гриппа А и вирусом гриппа В, вирусом Filoviridae, или инфекцией вируса Эбола у пациента, включающего введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин, полученного способом, включающим:

а) взаимодействие гидроксильных групп в положениях 2', 3' и 5' уридина с ацетоном для защиты гидроксильных групп в положениях 2' и 3' уридина с образованием первого промежуточного соединения;

б) этерификацию гидроксильной группы в положении 5' первого промежуточного соединения, используя 2-метилпропаноил-2-метилпропаноат, с образованием изобутилового сложного эфира в качестве второго промежуточного соединения;

в) взаимодействие второго промежуточного соединения с соединением 1,2,4-триазол с последующей реакцией с гидроксиламином в положении 4, получая таким образом 4-гидроксиламин-5'-сложный эфир нуклеозида; и

д) снятие защиты с 4-гидроксиламин-5'-сложного эфира нуклеозида в положениях 2' и 3' с образованием соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом человека, коронавирусом SARS или коронавирусом MERS.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом человека.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом SARS.

В определенных вариантах осуществления указанное заболевание вызвано коронавирусом MERS.

В определенных вариантах осуществления указанным пациентом, нуждающимся в этом, является человек.

Составы.

В иллюстративных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый наполнитель, такой как фармацевтически приемлемый носитель, и иллюстративное соединение, описанное в настоящем документе.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит или находится в форме фармацевтически приемлемой соли, как в целом описано ниже. Некоторыми предпочтительными, но не ограничивающими примерами подходящих фармацевтически приемлемых органических и/или неорганических кислот являются соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, уксусная кислота и лимонная кислота, а также другие фармацевтически приемлемые кислоты, известные сами по себе (для которых ссылаются на указанные ниже ссылки).

Когда иллюстративные соединения содержат кислотную группу, а также основную группу, соединения могут образовывать внутренние соли, которые также могут быть использованы в композициях и способах, описанных здесь. Когда иллюстративное соединение содержит гетероатом-донор водорода (например, NH), предполагается, что эти соли охватывают изомеры, образующиеся при переносе указанного атома водорода в основную группу или атом внутри молекулы.

Фармацевтически приемлемые соли иллюстративных соединений включают кислотно-аддитивные и основные соли этих соединений. Подходящие кислотно-аддитивные соли образуются из кислот, которые образуют нетоксичные соли. Примеры включают следующие соли: ацетат, адипат, аспартат, бензоат, бесилат, бикарбонат/карбонат, бисульфат/сульфат, борат, камсилат, цитрат, цикламат, эдисилат, эзилат, формиат, фумарат, глюцептат, глюконат, глюкуронат, гексафторфосфат, гибензат, гидрохлорид/хлорид, гидробромид/бромид, гидройодид/йодид, изетионат, лактат, малат, малеат, малонат, мезилат, метилсульфат, нафтиллат, 2-напсилат, никотинат, нитрат, оротат, оксалат, пальмитат, памоат, фосфат/гидрогенфосфат/дигидрогенфосфат, пироглутамат, сахарат, стеарат, сукцинат, таннат, тартрат, тозилат, трифторацетат и кинофоат. Подходящие основные соли образуются из оснований, которые образуют нетоксичные соли. Примеры включают соли алюминия, аргинина, бензатина, кальция, холина, диэтиламина, диоламина, глицина, лизина, магния, меглумина, оламина, калия, натрия, трометамин и цинка. Полусоли также могут образовываться из кислот и оснований, например, из полусульфата и солей гемикальция. Обзор подходящих солей см. в Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, авторы Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, 2002), включенных в данный документ посредством ссылки.

Физиологически приемлемые соли иллюстративных соединений представляют собой соли, которые

образуются внутри соединения, вводимого субъекту для лечения или профилактики заболевания. Подходящие соли включают соли лития, натрия, калия, магния, кальция, марганца и соли желчной кислоты.

Иллюстративные соединения могут быть введены в форме пролекарств. Пролекарство может включать ковалентно связанный носитель, который высвобождает активное исходное лекарственное средство при введении субъекту-млекопитающему. Пролекарства могут быть получены путем модификации функциональных групп, присутствующих в соединениях, таким образом, что модификации расщепляются, либо в ходе обычных манипуляций, либо *in vivo*, до исходных соединений. Пролекарства включают, например, соединения, в которых гидроксильная группа связана с любой группой, которая при введении субъекту расщепляется с образованием свободной гидроксильной группы. Примеры пролекарств включают, без ограничений, ацетатные, формиатные и бензоатные производные спиртовых функциональных групп в соединениях. Способы конструирования соединения в виде пролекарств можно найти в книге Testa and Mayer, *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism*, Wiley (2006). Типичные пролекарства образуют активный метаболит путем превращения пролекарства гидролитическими ферментами, гидролиза амидов, лактамов, пептидов, сложных эфиров карбоновых кислот, эпоксидов или расщепления сложных эфиров неорганических кислот.

В иллюстративных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит эффективное количество иллюстративного соединения и фармацевтически приемлемый носитель. Как правило, для фармацевтического применения соединения могут быть составлены в виде фармацевтического препарата, содержащего по меньшей мере одно соединение и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель и/или адъювант, и, необязательно, одно или более других фармацевтически активных соединений. Препараты могут быть получены известным по сути способом, который обычно включает смешивание по меньшей мере одного соединения согласно изобретению с одним или более фармацевтически приемлемых носителей и, при желании, в сочетании с другими фармацевтически активными соединениями, когда это необходимо, при асептических условиях. Ссылка снова сделана на патент США № 6372778, патент США № 6369086, патент США № 6369087 и патент США № 6372733 и дальнейшие ссылки, упомянутые выше, а также на стандартные справочники, такие как последнее издание Remington's *Pharmaceutical Sciences*. Раскрываемые фармацевтические композиции могут быть в стандартной лекарственной форме, и они могут быть надлежащим образом упакованы, например, в коробку, блистер, флакон, бутылку, саше, ампулу или в любой другой подходящий держатель или контейнер на одну или несколько доз (который может быть должным образом помечены); необязательно с одной или более листовок, содержащих информацию о продукте и/или инструкции по применению. Обычно такие стандартные дозы будут содержать от 1 до 1000 мг и, как правило, от 5 до 500 мг, по меньшей мере одного соединения по настоящему изобретению, например, приблизительно 10, 25, 50, 100, 200, 300 или 400 мг на единицу дозировки.

Соединения могут вводиться различными путями, включая пероральный, глазной, ректальный, трансдермальный, подкожный, внутривенный, внутримышечный или интраназальный, в зависимости, главным образом, от конкретного используемого препарата. Соединение обычно вводят в "эффективном количестве", под которым подразумевается любое количество соединения, которое при подходящем введении является достаточным для достижения желаемого терапевтического или профилактического эффекта у субъекта, которому его вводят. Обычно, в зависимости от состояния, которое необходимо предотвратить или лечить, и от пути введения, такое эффективное количество обычно составляет от 0,01 до 1000 мг на килограмм массы тела пациента в день, чаще от 0,1 до 500 мг, в частности, от 1 до 250 мг, например, приблизительно 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 или 250 мг на килограмм веса тела пациента в день, которые можно вводить в виде однократной суточной дозы, разделенной на одну или более суточных доз. Количество, которое должно быть введено, путь введения и дальнейший режим лечения могут быть определены лечащим врачом в зависимости от таких факторов, как возраст, пол и общее состояние пациента, а также характер и тяжесть заболевания/симптомов, которые необходимо лечить. Ссылка снова сделана на патент США № 6372778, патент США № 6369086, патент США № 6369087 и патент США № 6372733 и другие ссылки, упомянутые выше, а также на стандартные справочники, такие как последнее издание Remington's *Pharmaceutical Sciences*.

В зависимости от способа введения соединения, описанные в настоящем документе, могут быть составлены различными способами. Составы, содержащие одно или более соединений, могут быть приготовлены в различных фармацевтических формах, таких как гранулы, таблетки, капсулы, суппозитории, порошки, составы с контролируемым высвобождением, суспензии, эмульсии, кремы, гели, мази, бальзамы, лосьоны или аэрозоли и тому подобное. В определенных вариантах осуществления композиции используют в твердых дозированных формах, подходящих для простого и предпочтительно перорального введения точных дозировок. Твердые лекарственные формы для перорального введения включают, без ограничений, таблетки, мягкие или твердые желатиновые или нежелатиновые капсулы и капсуловидные таблетки. Однако также могут быть использованы жидкие лекарственные формы, такие как растворы, сиропы, суспензии, коктейли и т.д. В другом варианте воплощения композиции вводят местно. Подходящие составы для местного применения включают, без ограничений, лосьоны, мази, кремы и гели. В предпочтительном варианте воплощения композиция для местного применения представляет собой гель.

В другом варианте воплощения препарат вводят интраназально.

Составы, содержащие одно или более соединений, описанных в настоящем документе, могут быть получены с использованием фармацевтически приемлемого носителя, состоящего из материалов, которые считаются безопасными и эффективными, и могут вводиться индивидууму, не вызывая нежелательных биологических побочных эффектов или нежелательных взаимодействий. Носителем являются все компоненты, присутствующие в фармацевтической композиции, кроме активного ингредиента или ингредиентов. В контексте данного документа, термин "носитель" включает, без ограничений, разбавители, связующие вещества, смазывающие вещества, дезинтеграторы, наполнители, модифицирующие pH агенты, консерванты, антиоксиданты, усилители растворимости и композиции покрытия.

Носитель также включает в себя все компоненты композиции покрытия, которые могут включать пластификаторы, пигменты, красители, стабилизаторы и глитанты. Дозированные лекарственные формы с отсроченным высвобождением, пролонгированным высвобождением и /или импульсным высвобождением могут быть получены, как описано в стандартных ссылках, таких как "Pharmaceutical dosage form tablets", eds. Liberman et al. (New York, Marcel Dekker, Inc., 1989), "Remington - The science and practice of pharmacy", 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000 и "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6th Edition, Ansel et al., (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995). В этих ссылках представлена информация о носителях, материалах, оборудовании и способах приготовления таблеток и капсул, и лекарственных форм таблеток, капсул и гранул с замедленным высвобождением.

Примеры подходящих материалов для покрытия включают, без ограничений, полимеры целлюлозы, такие как ацетатфталат целлюлозы, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы и ацетат сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы; поливинилацетатфталат, полимеры и сополимеры акриловой кислоты и метакриловые смолы, коммерчески доступные под торговым названием EUDRAGIT™ (Roth Pharma, Westerstadt, Германия), зеин, шеллак и полисахариды.

Кроме того, материал покрытия может содержать обычные носители, такие как пластификаторы, пигменты, красители, глитанты, стабилизаторы, порообразователи и поверхностно-активные вещества.

Необязательные фармацевтически приемлемые наполнители, присутствующие в таблетках, шариках, гранулах или частицах, содержащих лекарственное средство, включают, без ограничений, разбавители, связующие вещества, смазывающие вещества, разрыхлители, красители, стабилизаторы и поверхностно-активные вещества. Разбавители, также называемые "наполнителями", как правило, необходимы для увеличения массы твердой лекарственной формы, чтобы обеспечить практический размер для пресования таблеток или образования шариков и гранул. Подходящие разбавители включают, без ограничений, дигидрат дикальцийфосфата, сульфат кальция, лактозу, сахарозу, маннит, сорбит, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, каолин, хлорид натрия, сухой крахмал, гидролизованные крахмалы, прежелатинизированный крахмал, диоксид кремния, оксид титана, силикат магния и алюминия и сахарную пудру.

Связующие вещества используются для придания связующих качеств твердой дозированной композиции и, таким образом, гарантируют, что таблетка, шарик или гранула остаются неповрежденными после образования дозированных форм. Подходящие связующие материалы включают, без ограничений, крахмал, прежелатинизированный крахмал, желатин, сахара (включая сахарозу, глюкозу, декстрозу, лактозу и сорбит), полиэтиленгликоль, воски, природные и синтетические смолы, такие как камедь, трагакант, альгинат натрия, целлюлоза, включая гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, этилцеллюлозу и вигум, и синтетические полимеры, такие как сополимеры акриловой кислоты и метакриловой кислоты, сополимеры метакриловой кислоты, сополимеры метилметакрилата, сополимеры аминоалкилметакрилата, полиакриловую кислоту/полиметакриловую кислоту и поливинилпирролидон.

Смазочные материалы используются для облегчения производства таблеток. Примеры подходящих смазывающих веществ включают, без ограничений, стеарат магния, стеарат кальция, стеариновую кислоту, бегенат глицерина, полиэтиленгликоль, тальк и минеральное масло.

Разрыхлители используются для облегчения дезинтеграции лекарственной формы или "распада" после введения и обычно включают, без ограничений, крахмал, крахмалгликолят натрия, карбоксиметилкрахмал натрия, карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилцеллюлозу, прежелатинизированный крахмал, глины, целлюлозу, альгинин, смолы или сшитые полимеры, такие как сшитый поливинилпирролидон (Polypladone XL от GAF Chemical Corp).

Стабилизаторы используются для ингибирования или замедления реакций разложения лекарственного средства, которые включают, например, окислительные реакции.

Поверхностно-активные вещества могут представлять собой анионные, катионные, амфотерные или неионные поверхностно-активные вещества. Подходящие анионные поверхностно-активные вещества включают, без ограничений, те, которые содержат карбоксилатные, сульфатные и сульфатные ионы. Примеры анионных поверхностно-активных веществ включают натрий, калий, аммоний с длинной цепью алкилсульфонатов и алкиларилсульфонатов, таких как додецилбензолсульфонат натрия; диалкилсульфосукцинаты натрия, такие как додецилбензолсульфонат натрия; диалкилсульфосукцинаты натрия, такие как бис-(2-этилтиоксил) сульфосукцинат натрия; и алкилсульфаты, такие как лаурилсульфат на-

трия. Катионные поверхностно-активные вещества включают, без ограничений, соединения четвертичного аммония, такие как хлорид бензалкония, хлорид бензетония, бромид цетримония, хлорид стеарилдиметилбензиламмония, полиоксиэтилен и амин кокосового ореха. Примеры неионных поверхностно-активных веществ включают этиленгликоль моностеарат, пропиленгликоль миристат, глицерил моностеарат, глицерил стеарат, полиглицерил-4-олеат, сорбитан акрилат, акрилат сахара, ПЭГ-150 лаурат, ПЭГ-400 монолаурат, полиоксиэтилен монолаурат, полисорбаты, полиоксиэтилен октилфенилового эфира, ПЭГ -1000 цетиловый эфир, полиоксиэтилен тридециловый эфир, полипропиленгликоль бутиловый эфир, POLOXAMER™ 401, стеароилмоноизопропаноламид и полиоксиэтилен гидрированный талловый амид. Примеры амфотерных поверхностно-активных веществ включают N-додецил-β-аланин натрия, N-лаурил-β-иминодипропионат натрия, миристоамфоацетат, лаурилбетаин и лаурилсульфобетаин.

При желании таблетки, шарики, гранулы или частицы могут также содержать незначительное количество нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, красители, pH-буферные агенты или консерванты.

Концентрация иллюстративного соединения для фармацевтически приемлемого носителя, наполнителя и/или других веществ может варьироваться от приблизительно 0,5 до приблизительно 100 мас.% (весовой процент). Для перорального применения фармацевтическая композиция обычно может содержать от приблизительно 5 до приблизительно 100 мас.% действующего вещества. Для других применений фармацевтическая композиция может обычно иметь от приблизительно 0,5 до приблизительно 50 мас.% действующего вещества.

Композиции, описанные здесь, могут быть составлены для модифицированного или контролируемого высвобождения. Примеры лекарственных форм с контролируемым высвобождением включают лекарственные формы с пролонгированным высвобождением, лекарственные формы с отсроченным высвобождением, лекарственные формы с импульсным высвобождением и их комбинации.

Композиции с пролонгированным высвобождением обычно получают в виде диффузионных или осмотических систем, например, как описано в "Remington - The science and practice of pharmacy" (20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000). Диффузионная система обычно состоит из двух типов устройств, резервуара и матрицы и хорошо известна и описана в данной области техники. Матричные устройства обычно получают прессованием лекарственного средства с медленно растворяющимся полимерным носителем в форме таблеток. Три основных типа материалов, используемых при изготовлении матричных устройств - это нерастворимые пластики, гидрофильные полимеры и жирные соединения. Пластмассовые матрицы включают, без ограничений, метилакрилатметилметакрилат, поливинилхлорид и полиэтилен. Гидрофильные полимеры включают, без ограничений, целлюлозные полимеры, такие как метил- и этилцеллюлоза, гидроксилалкилцеллюлозы, такие как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия и CARBOPOL™ 934, полиэтиленоксиды и их смеси. Жирные соединения включают, без ограничений, различные воски, такие как воск карнауба и глицерилтристеарат, и вещества типа воска, включая гидрогенизированное касторовое масло или гидрогенизированное растительное масло, или их смеси.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления пластический материал представляет собой фармацевтически приемлемый акриловый полимер, включая, без ограничений, сополимеры акриловой кислоты и метакриловой кислоты, метилметакрилат, метилметакрилатные сополимеры, этоксиэтилметакрилаты, цианоэтилметакрилат, аминоалкилметакрилатный сополимер, поли(акриловую кислоту), поли(метакриловую кислоту), сополимер метилакриловой кислоты и алкиламина, поли(метилметакрилат), ангидрид поли(метакриловой кислоты), полиметакрилат, полиакриламид, поли(ангидрид метакриловой кислоты) и глицидилметакрилатные сополимеры.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления акриловый полимер состоит из одного или более аммоний-метакрилатных сополимеров. Аммоний-метакрилатные сополимеры хорошо известны в данной области техники и описаны в Национальном формуляре XVII как полностью полимеризованные сополимеры сложных эфиров акриловой и метакриловой кислот с низким содержанием четвертичных аммониевых групп.

В одном предпочтительном варианте воплощения акриловый полимер представляет собой лак на основе акриловой смолы, такой как тот, который коммерчески доступен от Rohm Pharma под торговым названием EUDRAGIT. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления акриловый полимер содержит смесь двух лаков на основе акриловой смолы, коммерчески доступных от Rohm Pharma под торговыми названиями, соответственно, EUDRAGIT RL30D и EUDRAGIT RS30D. EUDRAGIT RL30D и EUDRAGIT RS30D являются сополимерами акриловых и метакриловых сложных эфиров с низким содержанием четвертичных аммониевых групп, причем молярное отношение аммониевых групп к остальным нейтральным (мет)акриловым сложным эфирам составляет 1:20 в EUDRAGIT RL30D и 1:40 в EUDRAGIT RS30D. Средний молекулярный вес составляет приблизительно 150000. EUDRAGIT S-100 и EUDRAGIT L-100 также являются предпочтительными. Обозначения кода RL (высокая проницаемость) и RS (низкая проницаемость) относятся к свойствам проницаемости этих агентов. Смеси EUDRAGIT RL/RS нерастворимы в воде и пищеварительных жидкостях. Однако системы, состоящие из

множества частиц, образованные таким образом, чтобы их включать, набухают и являются проницаемыми в водных растворах и пищеварительных жидкостях.

Полимеры, описанные выше, такие как EUDRAGIT RL/RS, могут быть смешаны вместе в любом желаемом соотношении, чтобы в конечном итоге получить композицию с замедленным высвобождением, имеющую желательный профиль растворения. Желательные системы замедленного высвобождения в форме отдельных частиц могут быть получены, например, из 100% EUDRAGIT RL, 50% EUDRAGIT RL и 50% EUDRAGIT RS и 10% EUDRAGIT RL и 90% EUDRAGIT RS. Специалист в данной области техники поймет, что также можно использовать другие акриловые полимеры, такие как, например, EUDRAGIT L.

Альтернативно, композиции с пролонгированным высвобождением могут быть получены с использованием осмотических систем или путем нанесения полупроницаемого покрытия на лекарственную форму. В последнем случае желаемый профиль высвобождения лекарственного средства может быть достигнут путем сочетания низкопроницаемых и высокопроницаемых материалов покрытия в подходящей пропорции.

Устройства с различными механизмами высвобождения лекарственного средства, описанные выше, могут быть объединены в готовую лекарственную форму, содержащую одну или множество единиц. Примеры множества единиц включают, без ограничений, многослойные таблетки и капсулы, содержащие таблетки, шарики или гранулы. Часть с немедленным высвобождением можно добавлять в систему с пролонгированным высвобождением посредством нанесения слоя с немедленным высвобождением поверх ядра с пролонгированным высвобождением с использованием процесса покрытия или сжатия, или в системе из множества единиц, такой как капсула, содержащая гранулы с пролонгированным и немедленным высвобождением.

Таблетки с пролонгированным высвобождением, содержащие гидрофильные полимеры, получают способами, широко известными в данной области техники, такими как прямое прессование, влажное гранулирование или сухое гранулирование. Их составы обычно включают полимеры, разбавители, связующие и смазывающие вещества, а также активный фармацевтический ингредиент. Обычные разбавители включают инертные порошкообразные вещества, такие как крахмалы, порошкообразную целлюлозу, главным образом, кристаллическую и микрокристаллическую целлюлозу, сахара, такие как фруктоза, маннит и сахароза, зерновая мука и аналогичные пищевые порошки. Типичные разбавители включают, например, различные типы крахмала, лактозы, маннита, каолина, фосфата или сульфата кальция, неорганические соли, такие как хлорид натрия и сахарная пудра. Порошкообразные производные целлюлозы также полезны. Типичные связующие для таблеток включают вещества, такие как крахмал, желатин и сахара, такие как лактоза, фруктоза и глюкоза. Также могут быть использованы природные и синтетические смолы, включая аравийскую камедь, альгинаты, метилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Полиэтиленгликоль, гидрофильные полимеры, этилцеллюлоза и воски также могут служить связующими веществами. Смазывающее вещество необходимо в составе таблетки для предотвращения прилипания в матрице таблетки и штампов. Смазку выбирают из таких скользких твердых веществ, как тальк, стеарат магния и кальция, стеариновая кислота и гидрогенизированные растительные масла.

Таблетки с пролонгированным высвобождением, содержащие восковые материалы, обычно готовят с использованием способов, известных в данной области техники, таких как способ прямого смешивания, способ отверждения и способ водной дисперсии. В способе отверждения лекарственное средство смешивают с восковым материалом и затвердевают распылением, либо затвердевают, просеивают и обрабатывают.

Композиции с отсроченным высвобождением создаются путем покрытия твердой лекарственной формы полимерной пленкой, которая нерастворима в кислой среде желудка и растворима в нейтральной среде тонкой кишки.

Дозированные лекарственные формы с отсроченным высвобождением могут быть получены, например, путем покрытия лекарственного средства или композиции, содержащей лекарственное средство, выбранным материалом покрытия. Лекарственная композиция может представлять собой, например, таблетку для введения в капсулу, таблетку для использования в качестве внутреннего ядра в лекарственной форме с "покрытым ядром" или множество шариков, частиц или гранул, содержащих лекарственное средство, для включения в таблетку или капсулу. Предпочтительные материалы для покрытия включают биоразрушаемые, постепенно гидролизующиеся, постепенно растворимые в воде и/или ферментативно разлагаемые полимеры и могут быть обычными "кишечнорастворимыми" полимерами. Кишечнорастворимые полимеры, как будет понятно специалистам в данной области техники, становятся растворимыми в среде с более высоким рН в нижних отделах желудочно-кишечного тракта или медленно разрушаются, когда лекарственная форма проходит через желудочно-кишечный тракт, в то время как разлагаемые ферментами полимеры разлагаются бактериальными ферментами, присутствующими в нижних отделах желудочно-кишечного тракта, в частности, в толстой кишке. Подходящие материалы покрытия для осуществления замедленного высвобождения включают, без ограничений, целлюлозные полимеры, такие как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлозы ацетат сукцинат, гидроксипропилметилцеллюлозы фта-

лат, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, ацетат целлюлозы, ацетат фталат целлюлозы, ацетат тримеллитат целлюлозы и натрия карбоксиметилцеллюлоза; полимеры и сополимеры акриловой кислоты, предпочтительно образованные из акриловой кислоты, метакриловой кислоты, метилакрилата, этилакрилата, метилметакрилата и/или этилметакрилата и других метакриловых смол, коммерчески доступных под торговым наименованием EUDRAGIT™ (Rohm Pharma; Westerstadt, Германия), в том числе EUDRAGIT™ L30D-55 и L100-55 (растворимый при pH 5,5 и выше), EUDRAGIT™ L-100 (растворимый при pH 6,0 и выше), EUDRAGIT™ S (растворимый при pH 7,0 и выше, в результате более высокой степени этерификации) и EUDRAGIT™ NE, RL и RS (нерастворимые в воде полимеры, имеющие различные степени проницаемости и коэффициенты расширения); виниловые полимеры и сополимеры, такие как поливинилпирролидон, винулацетат, винулацетатфталат, сополимер винулацетата и кротоновой кислоты и сополимер этилена и винулацетата; ферментативно разлагаемые полимеры, такие как азополимеры, пектин, хитозан, амилоза и гуаровая смола; зеин и шеллак. Также могут использоваться комбинации различных материалов покрытия. Также могут использоваться многослойные покрытия с использованием различных полимеров.

Специалисты в данной области могут легко определить предпочтительный вес покрытия для конкретных материалов покрытия путем оценки индивидуальных профилей высвобождения для таблеток, шариков и гранул, приготовленных с различными количествами различных материалов покрытия. Именно сочетание материалов, способа и формы применения дает желаемые характеристики высвобождения, которые можно определить только в клинических исследованиях.

Композиция для покрытия может включать обычные добавки, такие как пластификаторы, пигменты, красители, стабилизирующие агенты, глиданты и т.д. Обычно присутствует пластификатор для уменьшения хрупкости покрытия, и он обычно составляет от приблизительно 10 до 50 мас.% по отношению к сухой массе полимера. Примеры типичных пластификаторов включают полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, триацетин, диметилфталат, диэтилфталат, дибутилфталат, дибутилсебаат, триэтилцитрат, трибутилцитрат, триэтилацетилцитрат, касторовое масло и ацетилированные моноглицериды. Для стабилизации частиц в дисперсии предпочтительно используется стабилизирующий агент. Типичными стабилизирующими агентами являются неионогенные эмульгаторы, такие как сложные эфиры сорбита, полисорбаты и поливинилпирролидон. Глиданты рекомендуются для уменьшения эффекта прилипания во время формирования и высыхания пленки и обычно составляют приблизительно от 25 до 100 мас.% от массы полимера в растворе покрытия. Одним из эффективных глидантов является тальк. Также могут использоваться другие глиданты, такие как стеарат магния и моностеараты глицерина. Также могут использоваться пигменты, такие как диоксид титана. Небольшие количества пеногасителя, такого как силикон (например, симетикон), также могут быть добавлены в композицию покрытия.

Состав композиции может обеспечивать пульсирующую доставку одного или более соединений. Под "пульсирующим" подразумевается, что множество доз лекарственного средства высвобождается через разнесенные интервалы времени. Обычно при приеме лекарственной формы высвобождение начальной дозы происходит по существу немедленно, то есть первый "импульс" высвобождения лекарственного средства происходит в течение приблизительно одного часа после приема. За этим начальным импульсом следует первый временной интервал (время задержки), в течение которого из лекарственной формы высвобождается очень мало лекарственного средства или оно не высвобождается совсем, после чего высвобождается вторая доза. Точно так же может быть разработан второй интервал почти без высвобождения лекарственного средства между вторым и третьим импульсами высвобождения лекарственного средства. Продолжительность временного интервала, практически свободное от высвобождения лекарственного средства, будет варьироваться в зависимости от дизайна лекарственной формы, например, профиля дозирования два раза в день, профиля дозирования три раза в день и т.д. Для лекарственных форм, обеспечивающих профиль дозирования два раза в день, интервал почти без высвобождения лекарственного средства имеет продолжительность приблизительно от 3 до 14 ч между первой и второй дозой. Для лекарственных форм, обеспечивающих профиль дозирования три раза в день, интервал почти без высвобождения лекарственного средства имеет продолжительность приблизительно от 2 до 8 ч между каждой из трех доз.

В одном варианте воплощения профиль пульсирующего высвобождения достигается с помощью дозированных форм, которые являются закрытыми и предпочтительно герметичными капсулами, содержащими по меньшей мере две лекарственные "дозированные единицы", где каждая дозированная единица в капсуле обеспечивает различный профиль высвобождения лекарственного средства. Контроль дозированной единицы (единиц) с отсроченным высвобождением осуществляется путем нанесения полимерного покрытия с контролируемым высвобождением на единицу дозирования или путем включения активного агента в полимерную матрицу с контролируемым высвобождением. Каждая дозированная единица может содержать прессованную или формованную таблетку, где каждая таблетка в капсуле обеспечивает различный профиль высвобождения лекарственного средства. Для дозированных форм, имитирующих профиль дозирования два раза в день, первая таблетка высвобождает лекарственное средство, по существу, сразу после приема лекарственной формы, тогда как вторая таблетка высвобождает лекар-

ственное средство приблизительно от 3 до менее 14 ч после приема лекарственной формы. Для дозированных форм, имитирующих профиль дозирования три раза в день, первая таблетка высвобождает лекарственное средство, по существу, сразу после приема лекарственной формы, тогда как вторая таблетка высвобождает лекарственное средство приблизительно от 3 до менее 10 ч после приема лекарственной формы, а третья таблетка высвобождает лекарственное средство по меньшей мере от 5 до приблизительно 18 ч после приема лекарственной формы. Возможно, что лекарственная форма включает более чем три таблетки. Обычно лекарственная форма не включает более третьей таблетки, но могут применяться лекарственные формы, содержащие более трех таблеток.

Альтернативно, каждая дозированная единица в капсуле может содержать множество шариков, гранул или частиц, содержащих лекарственное средство. Как известно в данной области техники, "шарики", содержащие лекарственное средство, относятся к шарикам, изготовленным из лекарственного средства и одного или более наполнителей или полимеров. Шарик, содержащий лекарственное средство, может быть получен путем нанесения лекарственного средства на инертную подложку, например, на инертные сахарные шарики, покрытые препаратом, или путем создания "ядра", содержащего как лекарственное средство, так и один или более наполнителей. Также известно, что содержащие лекарственное средство "гранулы" и "частицы" содержат частицы лекарственного средства, которые могут включать или не включать один или более дополнительных наполнителей или полимеров. В отличие от шариков, содержащих лекарство, гранулы и частицы не содержат инертного носителя. Гранулы обычно содержат частицы лекарственного средства и требуют дальнейшей обработки. Как правило, частицы меньше, чем гранулы, и не подвергаются дальнейшей обработке. Хотя шарики, гранулы и частицы могут быть включены в состав для обеспечения немедленного высвобождения, шарики и гранулы обычно используются для обеспечения замедленного высвобождения.

В одном варианте воплощения соединение включено в состав для местного применения. Подходящие лекарственные формы для местного применения включают лосьоны, кремы, мази и гели. "Гель" представляет собой полутвердую систему, содержащую дисперсию действующего вещества, то есть соединения, в жидком носителе, который становится полутвердым под действием загустителя или полимерного материала, растворенного или суспендированного в жидком носителе. Жидкость может включать липофильный компонент, водный компонент или оба. Некоторые эмульсии могут быть гелями или иным образом включать гелевый компонент. Однако некоторые гели не являются эмульсиями, поскольку они не содержат гомогенизированной смеси несмешивающихся компонентов.

Способы приготовления лосьонов, кремов, мазей и гелей хорошо известны в данной области техники.

### Примеры

Следующие примеры представлены ниже для иллюстрации композиций, способов и результатов в соответствии с описанным объектом изобретения. Приведенные примеры не предназначены для охвата всех аспектов рассматриваемого объекта изобретения, описанного в данном документе, а предназначены скорее для иллюстрации типичных способов, композиций и результатов. Приведенные примеры не предназначены для исключения эквивалентов и вариантов настоящего изобретения, понятных специалистам в данной области техники.

Авторы настоящего изобретения старались обеспечить точность в отношении чисел (например, количеств, температуры и так далее), но для них следует учитывать некоторые погрешности и отклонения. Если не указано иное, части выражены в массовых частях. Существует множество вариантов и комбинаций реакционных условий, например, концентраций компонентов, температур, давлений и других реакционных диапазонов и условий, которые можно использовать для оптимизации чистоты продукта и выхода, получаемого в описанном процессе. Для оптимизации таких технологических условий необходимы лишь целесообразные и стандартные эксперименты.

Все химические реакции проводили в высушенной в печи стеклянной посуде в атмосфере азота, если не указано иное. Химические реактивы и растворители были чистыми для анализа, и их приобретали у коммерческих поставщиков (обычно Aldrich, Fisher, Acros, Carbosynth Limited и Oakwood Chemical) и использовали в состоянии заводской поставки, если не указано иное. В частности, EIDD-1910, EIDD-1993 и EIDD-2003 приобретали у компании Carbosynth Limited. Растворители, использованные для реакций (тетрагидрофуран, метанол, ацетонитрил, дихлорметан, толуол, пиридин, диметилформамид) были безводными на  $\geq 99,9\%$  во всех случаях. Завершение всех реакции отслеживали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), если не указано иное. Анализ ТСХ проводили на силикагеле, используя освещение УФ лампой (254 нм), или окрашивание  $\text{KMnO}_4$  и нагревание. Колоночную флэш-хроматографию проводили вручную с использованием силикагеля RediSep  $R_f$  размером 40-60 мкм (размер частиц 60 А), который приобретали у компании Teledyne Isco, в качестве неподвижной фазы. Автоматизированную градиентную колоночную флэш-хроматографию проводили на системе Teledyne Isco CombiFlash Companion; нормально-фазовое разделение осуществляли с помощью предварительно упакованного силикагеля RediSep  $R_f$  в качестве неподвижной фазы, а обращенно-фазовое разделение осуществляли с помощью предварительно упакованной неподвижной фазы RediSep  $R_f$  C<sub>18</sub> High Performance Gold. Очистку трифосфата проводили с помощью ионообменной хроматографии, используя DEAE (диэтиламиноэтил)

Sephadex A-25 в качестве неподвижной фазы и водный раствор ТЕАВ (бикарбонат триэтиламония) в качестве подвижной фазы.

Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР записывали на приборе Varian при 400 МГц и обрабатывали в программном обеспечении MestReNova версии 9.0.1. Химические сдвиги измеряли относительно соответствующего пика растворителя:  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  7,27),  $\text{DMCO-d}_6$  ( $\delta$  2,50),  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta$  3,31),  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\delta$  4,79). Использовали следующие сокращения для описания связывания: с=синглет, д=дублет, т=триплет, к=квартет, п=пентет, м=мультиплет, ш=широкий. Спектры  $^{13}\text{C}$  ЯМР записывали на приборе Varian при 100 МГц с химическими сдвигами относительно соответствующего пика растворителя:  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  77,0),  $\text{DMCO-d}_6$  ( $\delta$  39,5),  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta$  49,0). Спектры  $^{19}\text{F}$  записывали на приборе Varian при 376 МГц, а спектры  $^{31}\text{P}$  записывали на приборе Varian при 162 МГц. Химические сдвиги для спектров  $^{19}\text{F}$ , спектров  $^{31}\text{P}$  и спектров  $^{13}\text{C}$  (только в  $\text{D}_2\text{O}$ ) калибровали с помощью программного обеспечения MestReNova, используя функцию эталонного образца, по соответствующему спектру  $^1\text{H}$  ЯМР в том же растворителе.

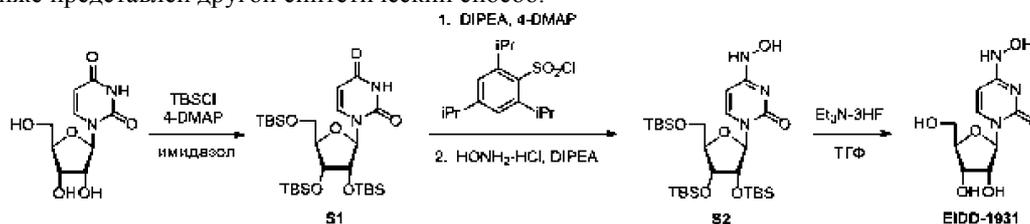
Стандартную жидкостную хроматографию (низкого разрешения)/масс-спектрометрию проводили на приборе Agilent 1200 серии LC (датчик УФ поглощения при 254 нм), используя колонку Zorbax Eclipse XDB  $\text{C}_{18}$  4,6×50 мм, 3,5 мкм, элюируя смесью  $\text{MeOH}$ /вода (обычно изократическая 95/5) и квадрупольный прибор для ЖХМС Agilent 6120. Масс-спектрометрию высокого разрешения проводили в масс-спектрометрическом центре университета Эмори на приборе Thermo LTQ-FTMS, используя химическую ионизацию при атмосферном давлении (ХИАД) или ионизацию электрораспылением (ИЭР).

Пример 1. Синтез  $\text{N}^4$ -гидроксицитидина или 1-(3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-4-(гидроксиамино)пиримидин-2-она (EIDD-1931).

Защиту уридина посредством персиллирования осуществляли активацией 4-положения нуклеоснования стерически затрудненной арилсульфонильной группой (см. фиг. 1). Замещение указанной группы гидросиламином обеспечивает внедрение  $\text{N}^4$ -гидроксильного фрагмента. Полное снятие защиты с использованием любого из множества доступных источников фторида приводит к образованию требуемого продукта.

Указанное соединение может быть получено в одну стадию из цитидина посредством нагревания в растворе гидросиламина с отрегулированным pH. Несмотря на то что такой способ короче, он обычно дает более низкий выход и требует очистки обращенно-фазовой колоночной флэш-хроматографией, что ограничивает его применение для получения меньшего количества продукта.

Ниже представлен другой синтетический способ.



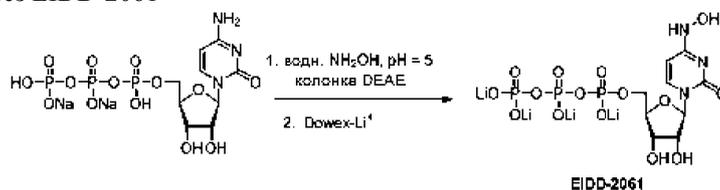
В 3-горлую колбу объемом 2 л, оснащенную верхнеприводной мешалкой и отверстием для подачи азота, загружали уридин (25 г, 102 ммоль) и 1 л дихлорметана. Полученный раствор охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и последовательно добавляли 4-DMAP (1,251 г, 10,24 ммоль) и имидазол (27,9 г, 409 ммоль). В течение 10 мин добавляли TBSCl (61,7 г, 409 ммоль) и нагревали полученную смесь до комнатной температуры, и перемешивали 18 ч. К реакционной смеси добавляли воду (300 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, разделяли слои и экстрагировали водный слой дополнительным количеством дихлорметана. Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором (1×300 мл), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением 75 г прозрачного бесцветного маслянистого вещества. После очистки флэш-хроматографией (градиент от 5 до 20%  $\text{EtOAc}$  в гексанах) получали S1 (45 г, 75%) в виде прозрачного бесцветного маслянистого вещества, которое затвердевало при высыхании *in vacuo*:  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,09 (с, 1H), 8,02 (д,  $J=8,2$  Гц, 1H), 5,87 (д,  $J=3,6$  Гц, 1H), 5,67 (дд,  $J=8,1, 2,2$  Гц, 1H), 4,07 (к,  $J=3,8, 3,3$  Гц, 1H), 3,98 (дд,  $J=11,7, 1,7$  Гц, 1H), 3,75 (дд,  $J=11,7, 1,1$  Гц, 1H), 0,94 (с, 9H), 0,90 (с, 9H), 0,88 (с, 9H), 0,13 (с, 3H), 0,12 (с, 3H), 0,08 (с, 3H), 0,07 (с, 3H), 0,07 (с, 3H), 0,06 (с, 3H).

В круглодонную колбу объемом 1 л загружали S1 (28 г, 47,7 ммоль) и дихлорметан (700 мл). Раствор охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  на ледяной бане; последовательно добавляли 4-DMAP (0,583 г, 4,77 ммоль) и  $\text{N,N}$ -диизопропилэтиламин (41,7 мл, 239 ммоль). В колбу медленно добавляли 2,4,6-триизопропилбензол-1-сульфонилхлорид (28,9 г, 95 ммоль) и после завершения добавления нагревали колбу до комнатной температуры, и перемешивали в течение 18 ч. Темно-оранжевый раствор охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  на ледяной бане и через шприц добавляли  $\text{N,N}$ -диизопропилэтиламин (24,66 г, 191 ммоль), затем твердый гидроксид гидросиламина (13,26 г, 191 ммоль) одной порцией. Смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 3 ч. Реакцию гасили водой (200 мл) и разделяли полученные слои. Водный слой экстрагировали дихлорметаном (200 мл) и промывали объединенные органические экстракты насыщенным солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали при пони-

женном давлении с получением темно-оранжевого маслянистого вещества. После очистки флэш-хроматографией (градиент от 15 до 50% EtOAc в гексанах) получали S2 (19,8 г, 69% за 2 стадии) в виде маслянистого вещества, которое затвердевало до полутвердого вещества при высушивании *in vacuo*:  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,15 (с, 1H), 6,31 (с, 1H), 5,91 (д,  $J=4,6$  Гц, 1H), 5,56 (дд,  $J=8,2, 2,0$  Гц, 1H), 4,07 (м, 2H), 4,02 (м, 1H), 3,91 (дд,  $J=11,6, 2,4$  Гц, 1H), 3,73 (дд,  $J=11,6, 2,4$  Гц, 1H), 0,95 (с, 9H), 0,92 (с, 9H), 0,89 (с, 9H), 0,12 (с, 6H), 0,098 (с, 3H), 0,083 (с, 3H), 0,063 (с, 3H), 0,057 (с, 3H); МСНР  $m/z$  602,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

В круглодонную колбу объемом 50 мл загружали S2 (23,3 г, 38,7 ммоль) и ТГФ (50 мл). Одной порцией добавили тригидрофторид триэтиламина (6,30 мл, 38,7 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 18 ч. Смесь концентрировали при пониженном давлении и растворяли остаток в минимальном количестве MeOH, и медленно добавляли полученный раствор в колбу Эрленмейера, содержащую быстро перемешиваемый дихлорметан (500 мл), в результате чего продукт выпадал в осадок; смесь перемешивали при комнатной температуре 15 мин. Растертое в порошок твердое вещество собирали вакуумным фильтрованием и промывали дихлорметаном, затем эфиром. Твердое вещество сушили *in vacuo* с получением указанного в заголовке соединения (7,10 г, 71%) в виде белого твердого вещества:  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,16 (д,  $J=8,2$  Гц, 1H), 5,86 (д,  $J=5,6$  Гц, 1H), 5,59 (д,  $J=8,2$  Гц, 1H), 4,19-4,04 (м, 2H), 3,93 (к,  $J=3,3$  Гц, 1H), 3,77 (дд,  $J=12,2, 2,9$  Гц, 1H), 3,68 (дд,  $J=12,1, 2,9$  Гц, 1H);  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  9,95 (с, 1H), 9,46 (с, 1H), 7,02 (д,  $J=8,2$  Гц, 1H), 5,71 (д,  $J=6,3$  Гц, 1H), 5,54 (д,  $J=7,7$  Гц, 1H), 5,23 (д,  $J=6,0$  Гц, 1H), 5,02 (д,  $J=4,6$  Гц, 1H), 4,98 (т,  $J=5,1$  Гц, 1H), 3,95 (к,  $J=5,9$  Гц, 1H), 3,89 (тд,  $J=4,9$  Гц, 3,0 Гц, 1H), 3,75 (к,  $J=3,4$  Гц, 1H), 3,50 (кдд,  $J=11,9$  Гц, 5,2 Гц, 3,5 Гц, 2H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  150,0, 143,9, 130,5, 98,89, 87,1, 85,0, 72,8, 70,8, 61,8. МСНР  $m/z$  260,1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

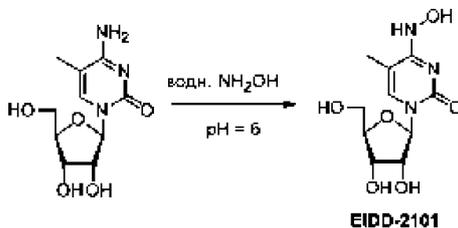
#### Пример 2. Синтез EIDD-2061



В закрываемую пробирку для работы под давлением помещали стержень мешалки, динатриевую соль трифосфата цитидина (0,137 г, 0,260 ммоль) и 2н. водный раствор гидроксилamina с pH 5 (2,0 мл, 4,0 ммоль). После смешивания реагентов измеряли pH раствора (pH 3) и добавляли несколько капель 10% мас./мас. водного раствора NaOH для корректировки pH раствора до pH 5. Пробирку закрывали и нагревали при перемешивании при 55°C в течение 5 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры, открывали закрытую пробирку и добавляли 100 мМ раствор бикарбоната триэтиламония (ТЕАВ) (2 мл). Содержимое пробирки переносили в круглодонную колбу и концентрировали на ротационном испарителе. Неочищенное вещество растворяли в 100 мМ ТЕАВ и проводили хроматографию на DEAE с последующей лиофилизацией продукта, с получением триэтиламониевой соли требуемого продукта.

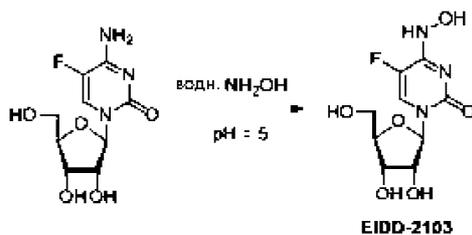
Ионообменную колонку (об. кол. 17 мл) из свежеполученного Dowex ( $\text{Li}^+$ -форма) промывали 5 об. кол. воды. Полученную триэтиламониевую соль растворяли в воде и элюировали через ионообменную колонку. Фракции, содержащие продукт, объединяли и лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения (0,030 г, 22%) рыхлого светло-коричневого твердого вещества:  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,19 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 5,95 (д,  $J=6,3$  Гц, 1H), 5,82 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 4,42-4,34 (м, 2H), 4,24-4,10 (м, 3H);  $^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  -8,5 (шс), -11,2 (д,  $J=19,6$  Гц), -22,0 (т,  $J=19,3$  Гц); МСНР  $m/z$  498,0  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

#### Пример 3. Синтез EIDD-2101



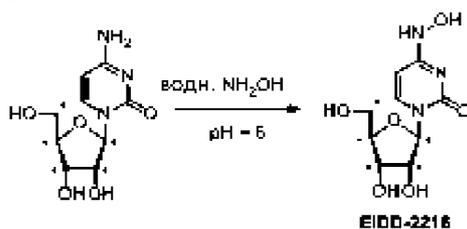
Раствор 5-метилцитидина (0,257 г, 1,00 ммоль) в 2н. водном растворе гидроксилamina с pH 6 (8 мл, 16,0 ммоль) нагревали до 55°C в закрытой пробирке, при перемешивании, в течение 5 ч. Раствор охлаждали до комнатной температуры, переносили в круглодонную колбу, концентрировали на ротационном испарителе и выпаривали вместе с MeOH (2x20 мл). Неочищенный остаток растворяли в MeOH и иммобилизовали на силикагеле. В результате флэш-хроматографии (градиент от 2 до 10% MeOH в ДХМ) получали указанное в заголовке соединение (140 мг, 51%) в виде светло-пурпурного твердого вещества:  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  6,99 (с, 1H), 5,86 (д,  $J=5,7$  Гц, 1H), 4,23-4,06 (м, 2H), 3,93 (к,  $J=3,2$  Гц, 1H), 3,78 (дд,  $J=12,1$  Гц, 2,8 Гц, 1H), 3,70 (дд,  $J=12,1$  Гц, 3,4 Гц, 1H), 1,79 (с, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  152,0, 146,6, 128,4, 108,4, 89,4, 86,1, 74,4, 71,8, 62,8, 12,9; МСВР расч. для  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_6\text{N}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 274,10336, найдено: 274,10350.

#### Пример 4. Синтез EIDD-2103



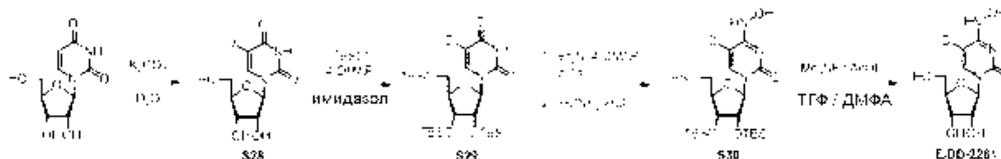
Получали 2н. раствор гидрохлорида гидроксиламина (1,11 г, 16,0 ммоль) в воде (8 мл) и доводили до pH 5, используя небольшое количество водного раствора NaOH (10% мас./мас.). В закрываемую пробирку для работы под давлением загружали полученный раствор и 5-фторцитидин (0,261 г, 1,00 ммоль), колбу закрывали и нагревали при перемешивании при 55°C в течение 16 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры, переносили в круглодонную колбу и концентрировали на ротационном испарителе. Неочищенное вещество суспендировали в MeOH и иммобилизовали на целите. После автоматизированной флэш-хроматографии (колонка 40 г, градиент от 0 до 20% MeOH в ДХМ) получали 600 мг получистого розового твердого вещества. Полученное твердое вещество растворяли в 2 мл воды, и после автоматизированной обращенно-фазовой хроматографии (колонка 43 г, градиент от 5 до 100% MeOH в воде) получали требуемый продукт, не содержащий органических и неорганических примесей. Твердое вещество растворяли в воде, замораживали на бане из сухого льда/аcetона и лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения (0,066 г, 0,238 ммоль, выход 24%) в виде белого хлопьевидного вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, D<sub>2</sub>O) δ 7,31 (д, J=7,6 Гц, 1H), 5,87 (дд, J=5,5 Гц, 1,8 Гц, 1H), 4,26 (т, J=5,5 Гц, 1H), 4,19 (т, J=4,8 Гц, 1H), 4,07 (к, J=3,8 Гц, 1H), 3,85 (дд, J=12,8 Гц, 3,1 Гц, 1H), 3,77 (дд, J=12,7 Гц, 4,2 Гц, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц, D<sub>2</sub>O) δ 150,0, 139,7, 137,4, 115,6 (д, J=36,1 Гц), 88,0, 84,2, 72,8, 69,8, 61,0; <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, D<sub>2</sub>O) δ -164,70 (д, J=7,6 Гц); МСВР расч. для C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 278,07829, найдено: 278,07848.

#### Пример 5. Синтез EIDD-2216



Получали 5н. раствор гидрохлорида гидроксиламина (4,71 г, 67,8 ммоль) в воде (13,5 мл) и доводили до pH 6, используя небольшое количество водного раствора NaOH (10% мас./мас.). В закрываемую пробирку для работы под давлением загружали полученный раствор и [1',2',3',4',5'-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]цитидин (0,661 г, 2,26 ммоль), колбу закрывали и нагревали при перемешивании при 37°C в течение 16 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры (комн. темп.), переносили в круглодонную колбу и концентрировали на ротационном испарителе. Неочищенное вещество растворяли в воде и после автоматизированной обращенно-фазовой флэш-хроматографии (колонка C<sub>18</sub> 240 г, градиент от 0 до 100% ацетонитрила в воде) удаляли основную часть примесей с получением 1,4 г влажного твердого вещества. Полученное твердое вещество растворяли в воде и после второй автоматизированной обращенно-фазовой флэш-хроматографии (колонка C<sub>18</sub> 240 г, градиент от 0 до 100% ацетонитрила в воде) удаляли дополнительное количество примесей с получением 400 мг получистого вещества. Полученное вещество растворяли в MeOH и иммобилизовали на целите. После автоматизированной флэш-хроматографии (колонка 24 г, градиент от 5 до 25% MeOH в дихлорметане) получали 200 мг почти чистого продукта. Полученное твердое вещество растворяли в воде, и после последней автоматизированной обращенно-фазовой хроматографии (колонка C<sub>18</sub> 48 г, градиент от 0 до 100% ацетонитрила в воде) получали требуемый продукт, не содержащий органических и неорганических примесей. Твердое вещество растворяли в воде, замораживали на бане из сухого льда/аcetона и лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения (0,119 г, 20%) в виде бледно-пурпурного хлопьевидного вещества с чистотой приблизительно 95%, по данным анализа ЯМР/ЖХМС: <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, D<sub>2</sub>O) δ 7,03 (дд, J=8,2 Гц, 2,2 Гц, 1H), 5,82 (ддд, J=167,5 Гц, 5,3 Гц, 2,9 Гц, 1H), 5,70 (д, J=8,2 Гц, 1H), 4,47-4,30 (шм, 1H), 4,23-4,03 (шм, 1H), 4,00-3,80 (шм, 2H), 3,65-3,50 (шм, 1H); <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц, D<sub>2</sub>O) δ 151,3, 146,6, 131,3, 98,7, 87,9 (дд, J=43,1 Гц, 4,0 Гц), 84,0 (дд, J=41,5 Гц, 38,0 Гц), 72,5 (дд, J=43,3 Гц, 37,8 Гц), 69,8 (тд, J=37,9 Гц, 3,9 Гц), 61,1 (д, J=41,5 Гц); МСНР m/z 265,1 [M+H]<sup>+</sup>.

## Пример 6. Синтез EIDD-2261



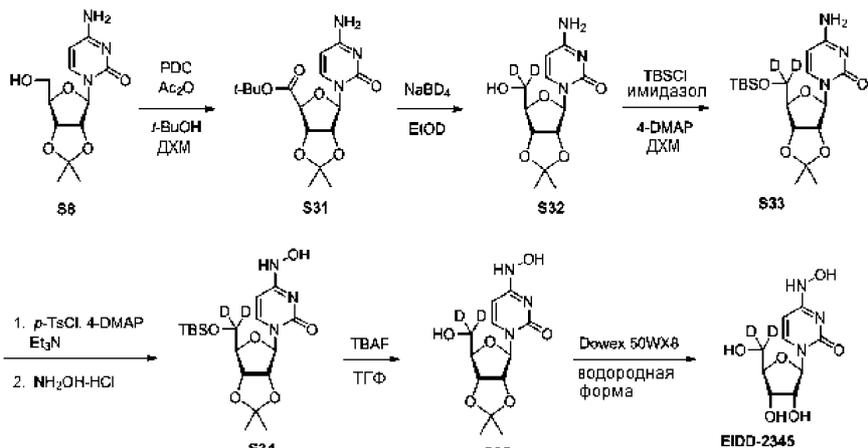
В закрываемую пробирку для работы под давлением загружали уридин (1,00 г, 4,09 ммоль),  $K_2CO_3$  (0,679 г, 4,91 ммоль) и оксид дейтерия (8,2 мл). Смесь продували азотом в течение 15 мин, закрывали пробирку и нагревали содержимое при перемешивании при  $95^\circ C$  в течение 16 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры, пробирку открывали и переносили смесь в круглодонную колбу, и концентрировали на ротационном испарителе. Полученное неочищенное вещество выпаривали совместно с MeOH ( $\times 3$ ) для удаления воды. Анализ ЯМР показал  $>95\%$  внедрение дейтерия в 5-положении нуклеосооснования. Полученное светло-коричневое твердое вещество S28 (1,00 г, 100%) использовали на следующей стадии без дополнительной очистки:  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7,76 (с, 1H), 5,88 (д,  $J=4,2$  Гц, 1H), 4,17-4,12 (м, 2H), 4,00-3,96 (м, 1H), 3,84 (дд,  $J=12,3$  Гц, 2,8 Гц, 1H), 3,72 (дд,  $J=12,3$  Гц, 3,5 Гц, 1H);  $^{13}C$  ЯМР (100 МГц,  $CD_3OD$ )  $\delta$  185,6, 177,4, 160,4, 141,1, 91,8, 85,8, 75,9, 71,2, 62,4.

В круглодонную колбу загружали S28 (1,00 г, 4,09 ммоль) и дихлорметан (8 мл) в атмосфере азота. Полученную смесь охлаждали до  $0^\circ C$  и добавляли 4-DMAP (0,050 г, 0,408 ммоль) и имидазол (1,11 г, 16,3 ммоль) одной порцией. Одной порцией добавляли TBSCl (2,15 г, 14,3 ммоль) в виде твердого вещества, смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. К реакционной смеси добавляли воду, слои разделяли и экстрагировали водный слой дихлорметаном ( $2 \times 25$  мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором ( $1 \times 25$  мл), сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали на ротационном испарителе. После автоматизированной флэш-хроматографии (колонка 40 г, градиент от 0 до 35% EtOAc в гексанах) получали S29 (2,52 г, 84%) в виде грязновато-белого пенящего вещества:  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,08 (шс, 1H), 8,03 (с, 1H), 5,89 (д,  $J=3,6$  Гц, 1H), 4,12-4,06 (м, 3H), 3,99 (дд,  $J=11,5$  Гц, 1,8 Гц, 1H), 3,76 (д,  $J=12,0$  Гц, 1H), 0,96 (с, 9H), 0,92 (с, 9H), 0,90 (с, 9H), 0,14 (с, 3H), 0,13 (с, 3H), 0,10 (с, 3H), 0,09 (с, 3H), 0,08 (с, 3H), 0,07 (с, 3H);  $^{13}C$  ЯМР (100 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  163,7, 150,3, 140,3, 89,0, 84,3, 76,1, 70,5, 61,6, 26,0 (3C), 25,8 (3C), 25,7 (3C), 18,4, 18,3, 17,9, -4,2, -4,6, -4,8, -4,9, -5,4, -5,6; МСВР расч. для  $C_{27}H_{54}DN_2NaO_6Si$   $[M+Na]^+$ : 610,32446, найдено: 610,32482.

К перемешанному раствору S29 (0,840 г, 1,43 ммоль) в ацетонитриле (14,3 мл) при  $0^\circ C$  в атмосфере азота последовательно добавляли п-толуолсульфонилхлорид (0,545 г, 2,86 ммоль), 4-DMAP (0,175 г, 1,43 ммоль) и триэтиламин (0,80 мл, 5,71 ммоль). Смесь перемешивали при  $0^\circ C$  в течение 2,5 ч, после чего одной порцией добавляли гидрохлорид гидроксилamina (0,993 г, 14,3 ммоль) в виде твердого вещества. Смесь нагревали при  $50^\circ C$  в течение 3 дней, затем охлаждали до комнатной температуры. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (100 мл), затем промывали водой ( $2 \times 100$  мл) и насыщенным солевым раствором ( $1 \times 100$  мл), сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали на ротационном испарителе. После автоматизированной флэш-хроматографии (колонка 40 г, градиент от 5 до 35% EtOAc в гексанах) получали смесь исходного вещества и требуемого продукта. После второй автоматизированной флэш-хроматографии (колонка 24 г, градиент от 10 до 40% EtOAc в гексанах) получали S30 (0,332 г, 39%) в виде грязновато-белого пенящего вещества:  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,37 (шс, 1H), 5,92 (д,  $J=4,6$  Гц, 1H), 4,10-4,05 (м, 2H), 4,04-4,00 (м, 1H), 3,91 (дд,  $J=11,6$  Гц, 2,4 Гц, 1H), 3,73 (дд,  $J=11,6$  Гц, 1,8 Гц, 1H), 0,95 (с, 9H), 0,92 (с, 9H), 0,89 (с, 9H), 0,12 (с, 6H), 0,10 (с, 3H), 0,08 (с, 3H), 0,06 (с, 3H), 0,05 (с, 3H).

В круглодонную колбу загружали S30 (0,332 г, 0,551 ммоль), фторид тетраметиламмония (0,196 г, 2,64 ммоль), ТГФ (8,25 мл) и ДМФА (2,75 мл) в атмосфере азота при  $0^\circ C$ . Через шприц добавляли уксусную кислоту (0,157 мл, 2,75 ммоль) одной порцией. Смесь нагревали до  $45^\circ C$  и продолжали нагревать при перемешивании в течение 4 дней, затем концентрировали на ротационном испарителе. После автоматизированной флэш-хроматографии (колонка 40 г, градиент от 0 до 20% MeOH в ДХМ) получали указанное в заголовке соединение (0,106 г, 74%) в виде белого твердого вещества. Окончательный анализ ЯМР показал  $>95\%$  внедрение дейтерия в 5-положении нуклеосооснования:  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  7,16 (с, 1H), 5,85 (д,  $J=5,6$  Гц, 1H), 4,14 (т,  $J=5,5$  Гц, 1H), 4,10 (дд,  $J=5,6$  Гц, 3,8 Гц, 1H), 3,93 (к,  $J=3,4$  Гц, 1H), 3,77 (дд,  $J=12,2$  Гц, 2,9 Гц, 1H), 3,68 (дд,  $J=12,2$  Гц, 3,4 Гц, 1H);  $^{13}C$  ЯМР (100 МГц,  $CD_3OD$ )  $\delta$  151,8, 146,3, 132,1, 89,7, 86,1, 74,6, 71,8, 62,8; МСВР расч. для  $C_9H_{13}DN_3O_6$   $[M+H]^+$ : 261,09399, найдено: 261,09371.

## Пример 7. Синтез EIDD-2345



В круглодонную колбу загружали соединение S8 (3,13 г, 11,0 ммоль) и дихлорметан (75 мл) в атмосфере азота при комнатной температуре. К полученной перемешанной смеси последовательно добавляли дихромат пиридиния (8,28 г, 22,0 ммоль), уксусный ангидрид (10,4 мл, 110 ммоль) и трет-бутанол (21,1 мл, 220 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали 22 ч при комнатной температуре, затем промывали водой (1×75 мл). Водный слой экстрагировали дихлорметаном (2×75 мл), а объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором (1×100 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали на ротационном испарителе. Полученный остаток растворяли в EtOAc и фильтровали через слой целита, затем промывали EtOAc. Фильтрат концентрировали на ротационном испарителе и после автоматизированной флэш-хроматографии (колонка 120 г, градиент от 40 до 80% EtOAc в гексанах) получали S31 (3,10 г, 72%) в виде грязновато-белого пенящего вещества: <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,36 (шс, 1H), 7,42 (д, J=8,0 Гц, 1H), 5,76 (дд, J=8,0 Гц, 2,3 Гц, 1H), 5,59 (с, 1H), 5,27 (дд, J=6,0 Гц, 1,8 Гц, 1H), 5,19 (д, J=6,0 Гц, 1H), 4,62 (д, J=1,8 Гц, 1H), 1,56 (с, 3H), 1,48 (с, 9H), 1,39 (с, 3H).

К перемешанному раствору S31 (2,61 г, 7,37 ммоль) в EtOD (75 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота добавляли NaBD<sub>4</sub> (1,234 г, 29,5 ммоль) одной порцией. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, нагревали до 55°C в течение 6 ч, затем в течение ночи при комнатной температуре. Смесь охлаждали до 0°C и гасили избыток реагента с помощью AcOD. Смесь концентрировали на ротационном испарителе с получением неочищенного S32 (2,57 г), который напрямую использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

К перемешанной суспензии неочищенного S32 (2,00 г неочищенного вещества, 5,74 ммоль) в дихлорметане (70 мл) при 0°C добавляли твердый имидазол (1,90 г, 27,9 ммоль) и 4-DMAP (0,171 г, 1,40 ммоль). Добавляли твердый трет-бутилдиметилсилилхлорид (2,11 г, 14,0 ммоль) и нагревали смесь до комнатной температуры, и перемешивали 4 дня. Смесь последовательно промывали водой и насыщенным солевым раствором (1×70 мл каждого), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали на ротационном испарителе. После автоматизированной флэш-хроматографии (колонка 120 г, градиент от 0 до 35% EtOAc в гексанах) получали S33 (1,42 г, 66% за 2 стадии) в виде белого твердого вещества: <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,30 (шс, 1H), 7,72 (м, 1H), 5,99 (д, J=2,8 Гц, 1H), 5,69 (дд, J=8,2 Гц, 2,3 Гц, 1H), 4,77 (дд, J=6,1 Гц, 2,9 Гц, 1H), 4,69 (дд, J=6,2 Гц, 2,8 Гц, 1H), 4,33 (д, J=3,0 Гц, 1H), 1,60 (с, 3H), 1,37 (с, 3H), 0,91 (с, 9H), 0,11 (с, 3), 0,10 (с, 3H); <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 162,7, 149,9, 140,5, 114,1, 102,1, 91,9, 86,5, 85,4, 80,3, 27,4, 25,9 (3C), 25,4, 18,4, -5,4, -5,5; MCBP расч. для C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>D<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>: 401,20714, найдено: 401,20663.

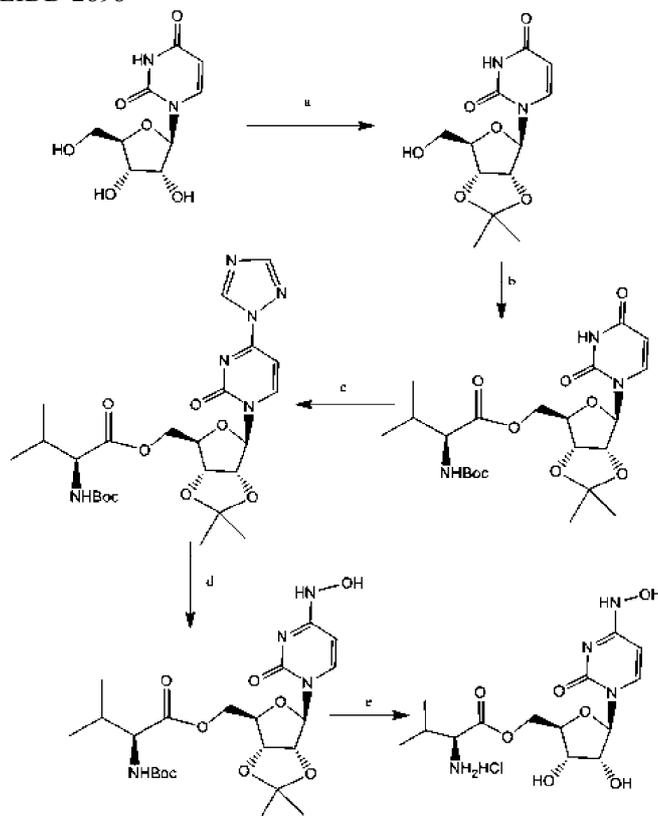
К перемешанному раствору S33 (1,42 г, 3,55 ммоль) в ацетонитриле (35 мл) при 0°C в атмосфере азота последовательно добавляли п-толуолсульфонилхлорид (1,35 г, 7,09 ммоль), 4-DMAP (0,433 г, 3,55 ммоль) и триэтиламин (9,88 мл, 70,9 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 2,5 ч. Добавляли гидрохлорид гидроксилamina (2,46 г, 35,5 ммоль) и нагревали смесь при перемешивании при 50°C в течение 2 дней. Смесь снова охлаждали до комнатной температуры и разбавляли EtOAc (100 мл), затем промывали водой (2×50 мл) и насыщенным солевым раствором (1×50 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали на ротационном испарителе. После автоматизированной флэш-хроматографии (колонка 120 г, градиент от 1 до 3,5% метанола в дихлорметане) получали S34 (0,416 г, 28%) в виде грязновато-белого твердого вещества: <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,36 (шс, 1H), 7,00 (м, 1H), 5,97 (д, J=3,1 Гц, 1H), 5,58 (д, J=8,2 Гц, 1H), 4,77 (дд, J=6,2 Гц, 3,2 Гц, 1H), 4,68 (дд, J=6,3 Гц, 3,2 Гц, 1H), 4,22 (д, J=3,2 Гц, 1H), 1,59 (с, 3H), 1,36 (с, 3H), 0,92 (с, 9H), 0,11 (с, 3H), 0,10 (с, 3H); <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 149,0, 145,4, 131,4, 114,1, 98,3, 90,8, 85,5, 84,5, 80,2, 27,4, 25,9 (3C), 25,5, 18,4, -5,4, -5,5; MCBP расч. для C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>D<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>: 416,21804, найдено: 416,21827.

К перемешанному раствору S34 (0,416 г, 1,00 ммоль) в ТГФ (5 мл) при 0°C в атмосфере азота добавляли 1,0 М раствор TBAF (1,50 мл, 1,5 ммоль) в ТГФ и поддерживали полученную смесь при 0°C в

течение 24 ч. Реакционную смесь концентрировали на ротационном испарителе, и после автоматизированной флэш-хроматографии (колонка 40 г, градиент от 0 до 8% метанола в дихлорметане) получали S35 (0,257 г, 85%) в виде белого твердого вещества:  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,02 (м, 1H), 5,81 (д,  $J=3,2$  Гц, 1H), 5,58 (д,  $J=8,2$  Гц, 1H), 4,86 (дд,  $J=6,4$  Гц, 3,2 Гц, 1H), 4,79 (дд,  $J=6,5$  Гц, 3,6 Гц, 1H), 4,09 (д,  $J=3,7$  Гц, 1H), 1,54 (с, 3H), 1,34 (с, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  151,3, 146,2, 133,4, 115,2, 99,4, 92,9, 87,2, 84,9, 82,1, 27,6, 25,6; МСВР расч. для  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{D}_2\text{N}_3\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 302,13157, найдено: 302,13130.

К перемешанному раствору S35 (0,140 г, 0,465 ммоль) в метаноле (8,4 мл) и воде (0,93 мл) при комнатной температуре добавляли водородную форму Dowex 50WX8 (0,30 г) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 24 ч. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали фильтрат на ротационном испарителе. После автоматизированной флэш-хроматографии (колонка 40 г, градиент от 5 до 20% метанола в дихлорметане) получали указанное в заголовке соединение (0,050 г, 41%) в виде грязновато-белого твердого вещества:  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,17 (м, 1H), 5,86 (д,  $J=5,6$  Гц, 1H), 5,60 (д,  $J=8,2$  Гц, 1H), 4,15 (т,  $J=5,5$  Гц, 1H), 4,11 (дд,  $J=5,6$  Гц, 3,5 Гц, 1H), 3,94 (д,  $J=3,8$  Гц, 1H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  151,8, 146,3, 132,2, 99,3, 89,7, 86,0, 74,6, 71,7, МСВР расч. для  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{D}_2\text{N}_3\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 260,08571, найдено: 260,08578.

Пример 8. Синтез EIDD-2898



Реагенты и условия: а) ацетон,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2,2-DMP, комнатная температура, 12 ч, 80-85%; б) Boc-L-Val-OH, DCC, DMAP, ДХМ, комнатная температура, 5-6 ч; в) 1,2,4-триазол,  $\text{POCl}_3$ , триэтиламин, MeCN; д) 50%  $\text{NH}_2\text{OH}$  в воде, MeCN; е) конц. HCl, MeOH, комнатная температура, 24 ч.

В 3-горлую круглодонную колбу объемом 2 л загружали 1-[(3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил]пиримидин-2,4-дион (61,4 г, 251,43 ммоль) и ацетон (1400 мл). Полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре и добавляли серную кислоту (2 мл). Перемешивание продолжали в течение ночи. Прозрачный бесцветный раствор гасили/доводили до щелочного pH с помощью 100 мл триметиламина. Неочищенный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением бледно-желтого маслянистого вещества. Остаток растворяли в 600 мл EtOAc и промывали водой  $\times 2$ , бикарбонатом  $\times 2$ , водой, насыщенным солевым раствором  $\times 2$  и сушили над сульфатом натрия. Бесцветный раствор концентрировали при пониженном давлении с получением 1-[(3aR,6R,6aR)-6-(гидроксиметил)-2,2-диметил-3a,4,6,6a-тетрагидрофурано[3,4-d][1,3]диоксол-4-ил]пиримидин-2,4-диона (45 г) в виде белого твердого вещества.

В круглодонную колбу объемом 200 мл загружали 1-[(3aR,6R,6aR)-6-(гидроксиметил)-2,2-диметил-3a,4,6,6a-тетрагидрофурано[3,4-d][1,3]диоксол-4-ил]пиримидин-2,4-дион (2,36 г, 8,3 ммоль) и ДХМ (50 мл). Реакционную смесь перемешивали до образования раствора. Затем добавляли (2S)-2-(трет-бутоксикарбониламино)-3-метилбутановую кислоту (2,16 г, 9,96 ммоль) и N,N-диметилпиримидин-4-амин (0,1 г, 0,8300 ммоль). Реакционную смесь охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  на ледяной бане. Медленно добавляли рас-

твор N,N'-дициклогексилкарбодимида (2,06 г, 9,96 ммоль) в ДХМ. Реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры. Контролировали по ТСХ (EtOAc).

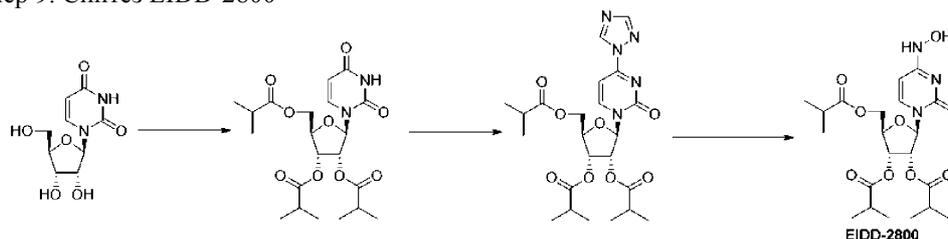
Примерно через 1 ч образовался осадок (DCU), а через 3 ч исходное вещество не обнаруживалось. Твердое вещество отфильтровывали и промывали EtOAc. Фильтрат промывали водой, насыщенным соевым раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением белого липкого вещества. Смолистое вещество растирали с эфиром и фильтровали для удаления твердого вещества. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением приблизительно 8 г густого вязкого маслянистого вещества. Продукт очищали с помощью СГХ, собирали фракции 6-25 и концентрировали при пониженном давлении с получением [(3aR,6R,6aR)-4-(2,4-диоксопиримидин-1-ил)-2,2-диметил-3a,4,6,6a-тетрагидрофуро[3,4-d][1,3]диоксол-6-ил]метил-(2S)-2-(трет-бутоксикарбониламино)-3-метилбутаноата (3,8 г, 7,8592 ммоль, выход 94,667%) в виде пенистого белого вещества после высушивания *in vacuo*.

1,2,4-Триазол растворяли в безводном ацетонитриле и перемешивали при комнатной температуре 30 мин, реакционную смесь охлаждали до 0°C и по каплям добавляли POCl<sub>3</sub>, и продолжали перемешивать в течение 2 ч. Через 2 ч по каплям добавляли триэтиламин и продолжали перемешивание в течение 1 ч, реакционную смесь медленно доводили до комнатной температуры и добавляли полученный из уридина субстрат из представленной выше реакции в виде раствора в ацетонитриле. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После завершения реакции растворитель удаляли при пониженном давлении и растворяли в ДХМ, и экстрагировали водой. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали колоночной флэш-хроматографией.

К раствору полученного субстрата в ацетонитриле (10 мл/г) по каплям добавляли 50% раствор гидроксилamina в воде и перемешивали при комнатной температуре в течение 2-3 ч. После завершения реакции растворитель удаляли при пониженном давлении и очищали неочищенный продукт колоночной флэш-хроматографией, используя гексан и EtOAc в качестве элюента.

1 г субстрата растворяли в 20 мл метанола и обрабатывали 2 мл конц. HCl (36%), и через 3-4 ч наблюдали завершение на 30%. Добавляли еще 5 мл конц. HCl и перемешивали в течение ночи. После завершения реакции растворитель удаляли и растворяли неочищенный продукт в минимальном количестве метанола, и по каплям добавляли к избытку диэтилового эфира при перемешивании, продукт выделялся из раствора, и его оставляли оседать, эфир декантировали и добавляли свежий эфир, перемешивали, осаждали и декантировали, тот же процесс повторяли два раза. После декантации эфира сушили твердое вещество на ротационном испарителе и под высоким вакуумом с получением сыпучего белого твердого вещества. Эфир был внедрен в твердое вещество, и его было трудно удалить. Твердое вещество растворяли в метаноле, выпаривали и сушили с получением бесцветной пены, которая все еще содержала метанол. Пену растворяли в воде и получали пурпурный раствор. Пурпурный раствор очищали обращенно-фазовой колоночной хроматографией ISCO, используя воду и ацетонитрил. Фракции, содержащие продукт, выпаривали при пониженном давлении и лиофилизировали с получением бесцветного твердого вещества.

#### Пример 9. Синтез EIDD-2800



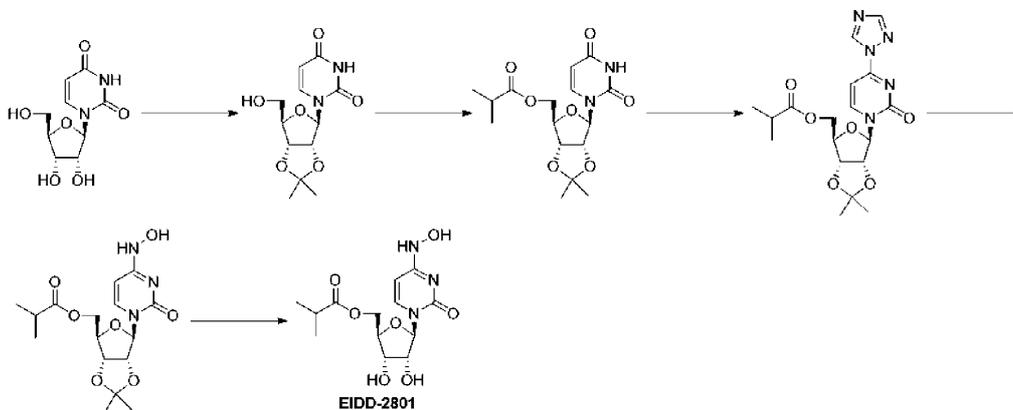
В 3-горлую круглодонную колбу объемом 1 л, оснащенную верхнеприводной мешалкой, датчиком температуры и капельной воронкой, загружали уридин (25 г, 102,38 ммоль) и этилацетат (500 мл). Белую суспензию перемешивали при комнатной температуре, добавляя к полученной смеси триэтиламин (71,39 мл, 511,88 ммоль) и DMAP (0,63 г, 5,12 ммоль). Суспензию охлаждали на ледяной бане и медленно добавляли к реакционной смеси изомасляный ангидрид (56,02 мл, 337,84 ммоль) в течение 5 мин. Во время добавления температура повысилась до 25°C. Полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре и контролировали по ТСХ. Через 1 ч получали прозрачный бесцветный раствор, и ТСХ показала отсутствие исходного вещества. Реакцию гасили 200 мл воды, перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Слои разделяли и промывали органический слой водой (2×100 мл), насыщенным водным раствором бикарбоната (100 мл × 2), 100 мл воды, насыщенным соевым раствором (100 мл × 2) и затем сушили над сульфатом натрия. Органический слой фильтровали и концентрировали фильтрат при пониженном давлении при 45°C с получением желтого маслянистого вещества. Полученное маслянистое вещество использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

В 3-горлую колбу объемом 2 л, оснащенную отверстием для подачи аргона, верхнеприводной мешалкой и датчиком температуры, загружали 1Н-1,2,4-триазол (50,88 г, 736,68 ммоль), триэтиламин

(114,17 мл, 818,54 ммоль) и MeCN (350 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Добавляли этилацетатный раствор (350 мл) [(2R,3R,4R)-5-(2,4-диоксопиримидин-1-ил)-3,4-бис-(2-метилпропаноилокси)тетрагидрофуран-2-ил]метил-2-метилпропаноата (46,5 г, 102,32 ммоль) и охлаждали смесь до ниже 5°C на ледяной бане. Продолжали перемешивание в течение 20 мин. Затем медленно добавляли оксихлорид фосфора (V) (14,35 мл, 153,48 ммоль) в атмосфере аргона при температуре менее 20°C в течение 15 мин. Реакцию контролировали по ТСХ (100% EtOAc), исходное вещество ( $R_f=0,89$ ) было израсходовано менее чем за 2 ч, и наблюдали новое пятно, обусловленное продуктом ( $R_f=0,78$ ). Реакцию гасили, используя 500 мл воды и 400 мл EtOAc. Погашенную реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре на 15 мин. Слои разделяли и промывали органический слой водой (2×100 мл), 200 мл 0,5н. HCl и насыщенным соевым раствором (2×100 мл). Органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением [(2R,3R,4R)-3,4-бис-(2-метилпропаноилокси)-5-[2-оксо-4-(1,2,4-триазол-1-ил)пиримидин-1-ил]тетрагидрофуран-2-ил]метил-2-метилпропаноата (49 г, 96,93 ммоль, выход 94,735%) в виде желтого маслянистого вещества. Неочищенный материал использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

В круглодонную колбу объемом 500 мл загружали [(2R,3R,4R)-3,4-бис-(2-метилпропаноилокси)-5-[2-оксо-4-(1,2,4-триазол-1-ил)пиримидин-1-ил]тетрагидрофуран-2-ил]метил-2-метилпропаноат (48,9 г, 96,73 ммоль), этилацетат (400 мл) и изопропиловый спирт (100 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до полного растворения исходного вещества. Оранжевый раствор обрабатывали гидроксиламином (6,52 мл, 106,41 ммоль) и перемешивали полученный желтый раствор при комнатной температуре, и контролировали по ТСХ (EtOAc). Через 1 ч исходное вещество не наблюдали. Реакцию гасили, используя 500 мл воды, и разделяли слои. Органический слой промывали, используя 100 мл воды, 100 мл × 2 насыщенного солевого раствора, и затем сушили над сульфатом натрия. Органический слой фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт растворяли в 180 мл МТБЭ и оставляли охлаждаться до комнатной температуры. Добавляли затравочные кристаллы и ставили колбу в холодильник. Образовавшееся белое твердое вещество собирали фильтрованием, промывали минимальным количеством МТБЭ и сушили *in vacuo* с получением требуемого продукта.

Пример 10. Синтез EIDD-2801



В круглодонную колбу объемом 1 л загружали уридин (25 г, 102,38 ммоль) и ацетон (700 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре. Затем суспензию обрабатывали серной кислотой (0,27 мл, 5,12 ммоль). Продолжали перемешивание при комнатной температуре в течение 18 ч. Реакцию гасили, используя 100 мл триметиламина, и использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

В круглодонную колбу объемом 1 л загружали реакционную смесь из предыдущей реакции. Затем добавляли триэтиламин (71,09 мл, 510,08 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (0,62 г, 5,1 ммоль). Колбу охлаждали на ледяной бане и затем медленно добавляли 2-метилпропаноил-2-метилпропаноат (17,75 г, 112,22 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре до завершения реакции. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и растворяли остаток в 600 мл этилацетата, и промывали насыщенным водным раствором бикарбоната × 2, водой × 2 и насыщенным соевым раствором × 2. Органический слой сушили над сульфатом натрия и концентрировали при пониженном давлении с получением прозрачного бесцветного маслянистого вещества. Неочищенный продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

В круглодонную колбу объемом 1 л загружали неочищенный продукт, полученный выше (36 г, 101,59 ммоль) и MeCN (406,37 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться до полного растворения исходного вещества. Затем добавляли 1,2,4-триазол (50,52 г, 731,46 ммоль), после чего добавляли N,N-диэтилэтанамин (113,28 мл, 812,73 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при ком-

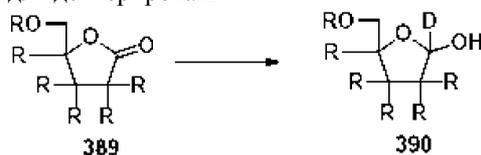
натной температуре до полного растворения твердых веществ. Затем реакционную смесь охлаждали до 0°C на ледяной бане. Медленно добавляли оксихлорид фосфора (24,44 мл, 152,39 ммоль). Полученную суспензию оставляли перемешиваться в атмосфере аргона, медленно нагревая до комнатной температуры. Затем реакционную смесь оставляли перемешиваться до завершения реакции, по данным ТСХ (EtOAc). Затем реакцию гасили, добавляя 100 мл воды. Затем суспензия превращалась в раствор темного цвета, который затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в ДХМ и промывали водой и насыщенным соевым раствором. Затем сушили органический слой над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Продукт очищали хроматографией на силикагеле (2 колонки × 330 г). Все фракции, содержащие продукт, собирали и концентрировали при пониженном давлении.

В круглодонную колбу объемом 500 мл загружали продукт из предыдущей стадии (11,8 г, 29,11 ммоль) и изопропиловый спирт (150 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре до полного растворения твердых веществ. Затем добавляли гидроксилламин (1,34 мл, 43,66 ммоль) и продолжали перемешивание при комнатной температуре. После завершения реакции (ВЭЖХ) удаляли небольшое количество растворителя под высоким вакуумом при комнатной температуре. Оставшийся растворитель удаляли при пониженном давлении при 45°C. Полученный остаток растворяли в EtOAc и промывали водой и насыщенным соевым раствором. Органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением маслянистого вещества. При стоянии при комнатной температуре образовывались кристаллы. Кристаллы собирали фильтрованием, промывали эфиром × 3 и сушили *in vacuo* с получением продукта в виде белого твердого вещества.

В круглодонную колбу объемом 200 мл загружали продукт из предыдущей стадии (6,5 г, 17,6 ммоль) и муравьиную кислоту (100 мл, 2085,6 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение ночи. Ход реакции контролировали по ВЭЖХ. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении при 42°C с получением прозрачного бледно-розового маслянистого вещества. Затем добавляли 30 мл этанола. Затем удаляли растворитель при пониженном давлении. К твердому веществу добавляли МТБЭ (50 мл) и нагревали. Затем добавляли изопропиловый спирт и продолжали нагревание до полного растворения твердого вещества (5 мл). Затем раствор оставляли остывать и стоять при комнатной температуре. Приблизительно через 1 ч начиналось образование твердого вещества. Твердое вещество собирали фильтрованием, промывали МТБЭ и сушили *in vacuo* с получением EIDD-2801 в виде белого твердого вещества. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением вязкого вещества, которое растворяли в небольшом количестве изопропилового спирта при нагревании. Раствор оставляли стоять при комнатной температуре в течение ночи. В колбе образовывалось твердое вещество, которое собирали фильтрованием, промывали изопропиловым спиртом и МТБЭ, и сушили *in vacuo* с получением дополнительного количества требуемого продукта.

EIDD-2801 (25 г) растворяли в 250 мл изопропилового спирта при нагревании до 70°C с получением прозрачного раствора. Теплый раствор фильтровали через тонкий фильтр и переносили фильтрат в трехгорлую колбу объемом 2 л с верхнеприводной мешалкой. Его снова нагревали до 70°C, и в колбу медленно добавляли МТБЭ (250 мл). В прозрачный раствор вносили затравочные кристаллы и оставляли медленно остывать до комнатной температуры при перемешивании в течение 18 ч. Образовавшееся твердое вещество EIDD-2801 отфильтровывали и промывали МТБЭ, и сушили при 50°C под вакуумом в течение 18 ч. Фильтрат концентрировали, снова растворяли в 50 мл изопропилового спирта и 40 мл МТБЭ при нагревании с получением прозрачного раствора, и оставляли стоять при комнатной температуре с получением второй партии EIDD-2801.

Пример 11. Общий синтез для дейтерирования



Лактон 389 (0,0325 моль) добавляли в сухую колбу в атмосфере аргона и затем растворяли в сухом ТГФ (250 мл). Затем раствор охлаждали до минус 78°C и по каплям добавляли раствор DIBAL-D в толуоле (0,065 моль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при минус 78°C в течение 3-4 ч. Затем реакцию гасили, медленно добавляя воду (3 мл). Затем реакционную смесь оставляли перемешиваться, одновременно нагреваясь до комнатной температуры. Затем смесь разбавляли двумя объемами диэтилового эфира и затем выливали в равный объем насыщенного раствора тартрата натрия-калия. Органический слой отделяли, сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали на диоксиде кремния, элюируя смесью гексаны/этилацетат. Затем полученный лактол 390 превращали в ацетат или бензоилат и обрабатывали в условиях сочетания с цитозином, а затем дополнительно превращали в N-гидроксицитидин.

Пример 12. Протоколы анализов.

Скрининговые тесты на DENV, JEV, POWV, WNV, YFV, PTV, RVFV, CHIKV, EEEV, VEEV, WEEV, TCRV, PCV, JUNV, MPRLV.

Первичный тест на снижение цитопатического действия (ЦПД).

Тесты на ингибирование ЦПД проводят с четырьмя концентрациями. Готовят конфлоэнтные или почти конфлоэнтные монослои клеточных культур в 96-луночных одноразовых микропланшетах. Клетки содержатся в MEM или DMEM с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) в соответствии с требованиями для каждой клеточной линии. Для противовирусных анализов используется та же среда, но с содержанием FBS, сниженным до 2% или менее с добавлением 50 мкг/мл гентамицина. Испытуемое соединение готовят в четырех логарифмических конечных концентрациях, обычно 0,1, 1, 10 и 100 мкг/мл или мкМ. На каждом микропланшете находятся лунки для вирусного контроля и контроля клеток. Параллельно с этим тестируют известное активное лекарственное средство в качестве положительного контрольного лекарственного средства, используя тот же способ, что и для испытуемых соединений. В каждом тесте тестируют положительный контроль. Анализ начинают, вначале удаляя питательную среду из 96-луночных планшетов с клетками. Затем испытуемое соединение наносят в объеме 0,1 мл в лунки при концентрации 2X. Вирус помещают в лунки, предназначенные для вирусной инфекции обычно в дозе менее 100, 50%-х инфекционных доз клеточных культур (CCID<sub>50</sub>) в объеме 0,1 мл. Среду без вируса, помещают в лунки контроля токсичности и лунки контроля клеток. Лунки контроля вируса обрабатывают вирусом аналогичным образом. Планшеты инкубируют при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> до тех пор, пока в лунках контроля вируса не будет отмечаться максимальное ЦПД. Планшеты затем окрашивают 0,011% нейтральным красным в течение приблизительно двух часов в инкубаторе при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Нейтральную красную среду удаляют путем полной аспирации, и клетки можно промыть 1 раз раствором фосфатного буфера (PBS) для удаления остаточного красителя. PBS полностью удаляют и включенный нейтральный красный элюируют с помощью 50% цитратного буфера Соренсена/50% этанола (pH 4,2) в течение по меньшей мере 30 мин. Нейтральный красный краситель проникает в живые клетки, поэтому, чем интенсивнее красный цвет, тем больше количество жизнеспособных клеток, присутствующих в лунках. Содержание красителя в каждой лунке количественно определяют с использованием 96-луночного спектрофотометра при длине волны 540 нм. Содержание красителя в каждом наборе лунок преобразуется в процентное содержание красителя, присутствующего в необработанных контрольных лунках, с использованием компьютерной таблицы на основе Microsoft Excel. 50% эффективные (EC<sub>50</sub>, ингибирующие вирус) концентрации и 50% цитотоксические (CC<sub>50</sub>, ингибирующие клетки) концентрации затем рассчитывают с помощью линейного регрессионного анализа. Коэффициент CC<sub>50</sub>, деленный на EC<sub>50</sub>, дает значение индекса селективности (SI).

Вторичный тест на снижение ЦПД/урожае вируса (VYR).

Этот тест включает методологию, аналогичную методике, описанной в предыдущих абзацах, с использованием 96-луночных микропланшетов с клетками. Различия отмечены в этом разделе. Восемь полулугарифмических концентраций ингибитора тестируют на противовирусную активность и цитотоксичность. После того, как произойдет достаточная репликация вируса, из каждой зараженной лунки отбирается образец супернатанта (объединяются три повторные лунки) и при необходимости его сохраняют для проведения части этого теста - VYR. Альтернативно, можно приготовить отдельный планшет и заморозить для теста на VYR. После того, как отмечено максимальное ЦПД, планшеты с живыми клетками окрашивают нейтральным красным красителем. Содержание включенного красителя определяют количественно, как описано выше. Данные, полученные из этой части теста, представляют собой значения EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> и SI для нейтрального красного. Соединения, в отношении которых наблюдается активность, указанная выше, дополнительно оценивают с помощью анализа VYR. Тест VYR является прямым определением того, насколько тестируемое соединение ингибирует репликацию вируса. Вирус, который был реплицирован в присутствии тестируемого соединения, титруют и сравнивают с вирусом из необработанных инфицированных контролей. Титрование объединенных образцов вируса (собранных, как описано выше) проводят путем разведения в конечной точке. Это достигается путем титрования логарифмического разведения вируса с использованием 3 или 4 микролунок на одно разведение на свежих монослоях клеток путем титрования в конечной точке. Лунки оценивают на наличие или отсутствие вируса после того, как наблюдается отчетливое ЦПД (измеренное по поглощению нейтрального красного). Построение графика зависимости логарифмической концентрации ингибитора от логарифмической концентрации вируса, продуцируемого при каждой концентрации, позволяет рассчитать эффективную концентрацию 90% (один log<sub>10</sub>) линейной регрессией. Деление EC<sub>90</sub> на значение CC<sub>50</sub>, полученное в первой части теста, дает значение SI для этого теста.

Пример 13. Скрининговые тесты для вируса лихорадки Ласса (LASV).

Первичный тест для вируса лихорадки Ласса.

Готовят конфлоэнтные или почти конфлоэнтные монослои клеточных культур в 12-луночных одноразовых микропланшетах. Клетки содержатся в DMEM с добавлением 10% FBS. Для противовирусных анализов используется та же среда, но с содержанием FBS, сниженным до 2% или менее с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина. Испытуемое соединение готовят в четырех логарифмических ко-

нечных концентрациях, обычно 0,1, 1,0, 10 и 100 мкг/мл или мкМ. Вирусный контроль и клеточный контроль с каждым тестируемым соединением проводятся параллельно. Кроме того, известное активное лекарственное средство испытывают в качестве положительного контроля препарата средства с использованием тех же условий постановки теста, что описаны для контроля вируса и клеток. Положительный контроль тестируется в каждом тесте. Анализ начинают вначале с удаления питательной среды из 12-луночных планшетов с клетками и инфицирования клеток при помощи 0,01 MOI (множественность инфицирования) вирусом LASV штамм Josiah. Клетки инкубируют в течение 90 мин: 500 мкл инокулята/лунку M12, при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> с постоянным легким покачиванием. Инокуляты удаляют и клетки промывают 2 раза средой. Затем испытуемое соединение вносят в 1 мл общего объема среды. Супернатант тканевой культуры (TCS) собирают в определенные временные точки. Затем TCS будет использоваться для определения ингибирующего влияния соединений на репликацию вируса. Вирус, который реплицировался в присутствии тестируемого соединения, титруют и сравнивают с вирусом из необработанных инфицированных контролей. Для титрования TCS готовят серийные десятикратные разведения и используют их для заражения свежих монослоев клеток. Клетки покрывают 1% агарозой, смешанной 1:1 с 2X MEM с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина, и определяют количество бляшек. Построение графика зависимости логарифмической концентрации ингибитора от логарифма вируса, продуцируемого при каждой концентрации, позволяет рассчитать эффективную концентрацию 90% (один log<sub>10</sub>) с помощью линейной регрессии.

Вторичный тест для вируса лихорадки Ласса.

Вторичный тест включает методологию, аналогичную методике, описанной в предыдущих параграфах, с использованием 12-луночных планшетов с клетками. Различия отмечены в этом разделе. Клетки инфицируют, как описано выше, но на этот раз их покрывают 1% агарозой, разбавленной 1:1 2X MEM с добавлением 2% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина и дополненной соответствующей концентрацией лекарственного средства. Клетки инкубируют при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 6 дней. Затем верхний слой удаляют, и планшеты окрашивают 0,05% кристаллического фиолетового красителя в 10% забуференном формалине в течение приблизительно двадцати минут при комнатной температуре. Затем планшеты промывают, сушат и подсчитывают количество бляшек. Количество бляшек в каждом наборе разведений соединения переводят в проценты относительно необработанного вирусного контроля. 50% эффективные (EC<sub>50</sub>, вирус-ингибирующие) концентрации затем рассчитывают с помощью линейного регрессионного анализа.

Пример 14. Скрининговые тесты для вируса Эболы (EBOV) и вируса Нипах (NIV).

Первичный тест для вируса Эболы/Нипах.

Тесты снижения концентрации бляшек проводятся с четырьмя концентрациями. Готовят конфлоэнтные или почти конфлоэнтные монослои клеточных культур в 12-луночных одноразовых микропланшетах. Клетки содержатся в DMEM с добавлением 10% FBS. Для противовирусных анализов используется та же среда, но с содержанием FBS, сниженным до 2% или менее с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина. Испытуемое соединение готовят в четырех логарифмических конечных концентрациях, обычно 0,1, 1,0, 10 и 100 мкг/мл или мкМ. Параллельно с каждым тестируемым соединением проводится контроль вируса и контроль клеток. Далее известное активное лекарственное средство испытывают в качестве положительного контрольного лекарственного средства с использованием тех же условий постановки теста, что описаны для контроля вируса и клеток. В каждом тесте тестируется положительный контроль. Анализ начинают вначале с удаления питательной среды из 12-луночных планшетов с клетками. Затем испытуемое соединение наносят в объеме 0,1 мл в лунки при концентрации 2X. Вирус, обычно в количестве приблизительно 200 единиц, образующих бляшки в объеме 0,1 мл, помещают в лунки, предназначенные для вирусной инфекции. Среду без вируса, помещают в лунки контроля токсичности и лунки контроля клеток. Вирусные контрольные лунки обрабатывают вирусом аналогичным образом. Планшеты инкубируют при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение одного часа. Инокуляты, содержащие вирус, удаляют, клетки промывают и покрывают 1,6% трагакантом, разведенным 1:1 2X MEM с добавлением 2% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина и соответствующей концентрации препарата. Клетки инкубируют при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 10 дней. Затем верхний слой удаляют, и планшеты окрашивают 0,05% кристаллического фиолетового красителя в 10% забуференном формалине в течение приблизительно двадцати минут при комнатной температуре. Затем планшеты промывают, сушат и подсчитывают количество бляшек. Количество бляшек в каждом наборе разведений соединений пересчитывают в процентах относительно необработанного вирусного контроля. 50% эффективные (EC<sub>50</sub>, вирус-ингибирующие) концентрации затем рассчитывают с помощью линейного регрессионного анализа.

Вторичный тест на вирус Эболы/Нипах с компонентом VYR.

Вторичный тест включает методологию, аналогичную методике, описанной в предыдущих абзацах, с использованием 12-луночных микропланшетов с клетками. Различия отмечены в этом разделе. Восемь полулогарифмических концентраций ингибитора тестируют на противовирусную активность. В каждой партии оцениваемых соединений тестируется одно положительное контрольное лекарственное средство. Для этого теста клетки инфицируют вирусом. Клетки инфицируют, как описано выше, но на этот раз инкубируют с DMEM с добавлением 2% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина и с соответствующей

концентрацией лекарственного средства. Клетки инкубируют в течение 10 дней при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> с ежедневным наблюдением под микроскопом для определения количества зеленых флуоресцентных клеток. Аликвоты супернатанта из инфицированных клеток отбирают ежедневно с объединением трех повторных лунок. Объединенные супернатанты затем используют для определения ингибирующего действия соединений на репликацию вируса. Вирус, который реплицировался в присутствии тестируемого соединения, титруют и сравнивают с вирусом из необработанных инфицированных контролей. Для титрования объединенных образцов вируса готовят серийные десятикратные разведения и используют их для заражения свежих монослоев клеток. Клетки покрывают трагакантом и определяют количество бляшек. Построение графика зависимости log<sub>10</sub> концентрации ингибитора от log<sub>10</sub> концентрации вируса, продуцируемого при каждой концентрации, позволяет рассчитать эффективную концентрацию 90% (один log<sub>10</sub>) с помощью линейной регрессии.

Пример 15. Тест цитопротекторного действия против вируса Денге.

Приготовление клеток: перед использованием в противовирусном анализе пассируют клетки ВНК21 (клетки почек сирийского золотистого хомячка, каталог ATCC номер CCL-10), клетки Vero (клетки почек африканской зеленой марьшишки, каталог ATCC номер CCL-81) или клетки Huh-7 (гепатоцеллюлярная карцинома человека) в DMEM с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина во флаконах T-75. В день, предшествующий анализу, клетки рассеивают в соотношении 1:2 для обеспечения экспоненциальной фазы роста во время инфекции. Количественную оценку клеток и их жизнеспособности проводили с использованием гемоцитометра и исключения красителя трипанового синего. Для клеток, используемых в тесте, жизнеспособность составляла более 95%. Клетки ресуспендировали при концентрации 3×10<sup>3</sup> (5×10<sup>5</sup> для клеток Vero и клеток Huh-7) на лунку в среде для культуры тканей и добавляли в планшеты для микротитрования с плоским дном в объеме 100 мкл. Планшеты инкубировали при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в течение ночи для обеспечения адгезии клеток. По данным наблюдения, монослой был приблизительно на 70% конфлюэнтным.

Получение вируса. Штамм New Guinea C вируса Денге типа 2 был получен из ATCC (каталожный номер VR-1584) и выращивался в клетках LLC-MK2 (клетки почек макаки-резус; каталожный номер CCL-7.1) для получения исходных вирусных пулов. Аликвоту вируса, предварительно окрашенного в клетках ВНК21, вынимали из морозильника (-80°C) и оставляли медленно оттаивать до комнатной температуры в камере биологической безопасности. Вирус ресуспендировали и разводили в среде для анализа (DMEM с добавлением 2% инактивированной нагреванием FBS, 2 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина), так что количество вируса добавленного в каждую лунку в объем, равный 100 мкл, представляло собой количество, определенное для уничтожения клеток на 85-95% через 6 дней после заражения.

Формат планшета - каждый планшет содержал лунки для контроля клеток (только клетки), лунки для контроля вируса (клетки плюс вирус), лунки токсичности лекарственного средства в трех повторах на соединение (клетки плюс только препарат), а также экспериментальные лунки в трех повторах (препарат плюс клетки плюс вирус).

Эффективность и токсичность ХТТ. После инкубации при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> тестовые планшеты окрашивали тетразолиевым красителем ХТТ (2,3-бис (2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-5-[(фениламино)карбонил]-2Н-тетразолий гидроксид). ХТТ-тетразолий метаболизируется митохондриальными ферментами метаболически активных клеток до растворимого продукта формазана, что позволяет проводить быстрый количественный анализ ингибирования вызванного вирусом уничтожения клеток антивирусными тестируемыми веществами. Раствор ХТТ готовили ежедневно в виде маточного раствора 1 мг/мл в RPMI 1640. Раствор феназинметосульфата (PMS) готовили в концентрации 0,15 мг/мл в PBS и хранили в темноте при минус 20°C. Исходный материал ХТТ/PMS готовили непосредственно перед использованием путем добавления 40 мкл PMS на один мл раствора ХТТ. Пятьдесят микролитров ХТТ/PMS добавляли в каждую лунку планшета и планшет повторно инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Планшеты закрывали герметизирующими клеевыми полосками и осторожно встряхивали или переворачивали несколько раз, чтобы смешать растворимый продукт формазан, затем планшет считывали спектрофотометрически при 450/650 нм с помощью ридера планшетов Molecular Devices Vmax.

Анализ данных. Необработанные данные были собраны из программного обеспечения Softmax Pro 4.6 и импортированы в электронную таблицу Microsoft Excel для анализа. Для каждого соединения рассчитывали процент снижения вирусного цитопатического действия по сравнению с необработанными вирусными контролями. Значение процента контроля клеток рассчитывали для каждого соединения, сравнивая неинфицированные клетки, обработанные препаратом, с неинфицированными клетками, находящимися только в среде.

Пример 16. Тест цитопротекторного действия против RSV.

Подготовка клеток - Клетки HEp2 (человеческие эпителиальные клетки, каталог TCC номер CCL-23) пассировали в DMEM с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1 mM пирувата натрия, и 0,1 mM NEAA в флаконах T-75 перед использованием в анализе противовирусного действия. В день, предшествующий анализу, клетки рассеивали в соотношении 1:2 для обеспечения экспоненциальной фазы роста во время инфекции. Количественную оценку

клеток и их жизнеспособности проводили с использованием гемоцитометра и исключения красителя трипановым синим. Для клеток, используемых в тесте, жизнеспособность составляла более 95%. Клетки ресуспендировали при концентрации  $1 \times 10^4$  клеток на лунку в среде для культур тканей и добавляли в планшеты для микротитрования с плоским дном в объеме 100 мкл. Планшеты инкубировали при  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$  в течение ночи для обеспечения адгезии клеток. Приготовление вируса. Штамм RSV Long и штамм RSV 9320 были получены из ATCC (соответственно, каталожный номер VR-26 и каталожный номер VR-955) и выращены в клетках HEp2 для получения исходных вирусных пулов. Предварительно титрованную аликвоту вируса извлекали из морозильника ( $-80^\circ\text{C}$ ) и давали медленно оттаивать до комнатной температуры в камере биологической безопасности. Вирус ресуспендировали и разводили в среде для анализа (DMEM с добавлением 2% инактивированной нагреванием FBS, 2 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1 мМ пирувата натрия и 0,1 мМ NEAA), так что количество вируса, добавленного в каждую лунку в объеме 100 мкл, определяли как количество, убивающее от 85 до 95% клеток через 6 дней после заражения. Эффективность и токсичность ХТТ - планшеты окрашивали и анализировали, как описано ранее для анализа цитопротекторного действия при Денге.

Пример 17. Тест цитопротекторного действия против вируса гриппа.

Приготовление клеток. Клетки МОК (клетки почек собак, каталог ATCC номер CCL-34) пассировали в DMEM с добавлением 10% FBS, 2 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1 мМ пирувата натрия и 0,1 мМ NEAA во флаконах T-75 перед использованием в противовирусном анализе. В день, предшествующий анализу, клетки рассеивали в соотношении 1:2 для обеспечения экспоненциальной фазы роста во время инфицирования. Количественную оценку клеток и их жизнеспособности проводили с использованием гемоцитометра и исключения красителя трипановым синим. Для клеток, используемых в тесте, жизнеспособность составляла более 95%. Клетки ресуспендировали при концентрации  $1 \times 10^4$  клеток на лунку в среде для культур тканей и добавляли в планшеты для микротитрования с плоским дном в объеме 100 мкл. Планшеты инкубировали при  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$  в течение ночи для обеспечения адгезии клеток.

Приготовление вируса. Штаммы вируса гриппа A/PR/8/34 (А ТСС номер VR-95), A/CA/05/09 (CDC), A/NY/18/09 (CDC) и A/NWS/33 (ATCC номер VR-219) были получены от ATCC или от Центра по контролю за заболеваниями и выращивались на клетках MDCK для получения исходных вирусных пулов. Предварительно титрованную аликвоту вируса извлекали из морозильника ( $-80^\circ\text{C}$ ) и давали медленно оттаивать до комнатной температуры в камере биологической безопасности. Вирус ресуспендировали и разбавляли в среде для анализа (DMEM с добавлением 0,5% BSA, 2 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1 мМ пирувата натрия, 0,1 мМ NEAA и 1 мкг/мл трипсина, обработанного ингибитором протеаз TPCK) таким образом, чтобы количество вируса, добавляемого в каждую лунку в объеме 100 мкл, определялось как количество, обеспечивающее от 85 до 95% гибели клеток через 4 дня после заражения. Эффективность и токсичность ХТТ - планшеты окрашивали и анализировали, как описано ранее для анализа цитопротекции при Денге.

Пример 18. Тест противовирусного действия против вируса гепатита С.

Клеточная культура. Репортерная клеточная линия Huh-luc/neo-ET была получена по специальному лицензионному соглашению от доктора Ральфа Бартеншлагера (Кафедра молекулярной вирусологии, Институт гигиены, Гейдельбергский университет, Германия) компанией ImQuest BioSciences. Эта клеточная линия содержит постоянно реплицирующийся репликон  $I_{389}\text{luc-ubi-neo/NS3-3'/ET}$ , содержащий слитый ген белка люциферазы светляков-убиквитин-неомицин-фосфотрансферазы и EMCV-управляемые IRES NS3-5B, кодирующие последовательности HCV, содержащие адаптивные мутации культуры ткани ET (E1202G, T12081 и K1846T). Исходную культуру Huh-luc/neo-ET размножали путем культивирования в DMEM с добавлением 10% FCS, 2 мМ глутамин, пенициллина (100 мкг/мл)/стрептомицина (100 мкг/мл) и IX заменимых аминокислот плюс 1 мг/мл G418. Клетки рассеивали в соотношении 1:4 и культивировали в течение двух пассажей в одной и той же среде плюс 250 мкг/мл G418. Клетки обрабатывали трипсином, подсчитывали путем окрашивания трипановым синим и высевали в 96-луночные планшеты для тканевых культур при плотности культуры клеток  $7,5 \times 10^3$  клеток на лунку и инкубировали при  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$  в течение 24 ч. После 24-часовой инкубации среду удаляли и заменяли той же средой, за исключением G418, плюс тестируемые соединения в трех повторях. В шесть лунок в каждой планшете в качестве контроля вносили только среду без обработки. Клетки инкубировали в течение дополнительных 72 ч при  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ , затем измеряли активность в отношении HCV по конечной точке люциферазы. Для оценки клеточной токсичности путем окрашивания ХТТ параллельно обрабатывали и инкубировали планшеты в двух повторях.

Жизнеспособность клеток. Монослой клеточных культур из обработанных клеток окрашивали тетразолиевым красителем ХТТ для оценки жизнеспособности клеток репортерной линии Huh-luc/neo-ET в присутствии соединений.

Измерение репликации вируса. Репликацию вируса гепатита С из тестовой системы репликона измеряли по активности люциферазы с использованием набора репортерных генов britelite плюс люминесценция в соответствии с инструкциями производителя (Perkin Elmer, Shelton, CT). Вкратце, один флакон

с britelite и лиофилизированным субстратом растворяли в 10 мл буфера для восстановления britelite и осторожно перемешивали путем переворачивания. После 5-минутной инкубации при комнатной температуре в 96-луночные планшеты добавляли britelite плюс реагент в дозе 100 мкл на лунку. Планшеты герметизировали клейкой пленкой и инкубировали при комнатной температуре в течение приблизительно 10 мин для лизиса клеток. Содержимое лунок переносили в белый 96-луночный планшет, и люминесценцию измеряли в течение 15 мин с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика Wallac 1450Microbeta Trilux. Данные были импортированы в настроенную электронную таблицу Microsoft Excel 2007 для определения концентрации, вызывающей 50% ингибирование вируса ( $EC_{50}$ ).

Пример 19. Тест цитопротекторного действия против вируса парагриппа-3.

Приготовление клеток. Клетки HEp2 (человеческие эпителиальные клетки, каталог ATCC номер CCL-23) пассировали в DMEM с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1 mM пирувата натрия и 0,1 mM NEAA, флаконы T-75 перед использованием в противовирусном анализе. В день, предшествующий анализу, клетки рассеивали в соотношении 1:2 для обеспечения экспоненциальной фазы роста во время инфицирования. Количественную оценку клеток и их жизнеспособности проводили с использованием гемоцитометра и исключения при помощи красителя трипанового синего. Для клеток, используемых в тесте, жизнеспособность составляла более 95%. Клетки ресуспендировали при концентрации  $1 \times 10^4$  клеток на лунку в среде для культур тканей и добавляли в планшеты для микротитрования с плоским дном в объеме 100 мкл. Планшеты инкубировали при  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$  в течение ночи для обеспечения адгезии клеток.

Приготовление вируса. Штамм SF4 вируса парагриппа типа 3 был получен из ATCC (каталожный номер VR-281) и выращивался в клетках HEp2 для получения исходных вирусных пулов. Предварительно титрованную аликвоту вируса извлекали из морозильника ( $-80^\circ\text{C}$ ) и давали медленно оттаять до комнатной температуры в камере биологической безопасности. Вирус ресуспендировали и разбавляли в среде для анализа (DMEM с добавлением 2% инактивированной нагреванием FBS, 2 mM L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина), так что количество вируса, добавляемого в каждую лунку в объеме 100 мкл, представляло собой количество, определенное для уничтожения клеток на 85-95% через 6 дней после заражения.

Формат планшета. Каждый планшет содержал лунки для контроля клеток (только клетки), лунки для контроля вируса (клетки плюс вирус), лунки токсичности лекарственного средства в трех повторах на соединение (клетки плюс только препарат), а также экспериментальные лунки в трех повторах (препарат плюс клетки плюс вирус). Эффективность и токсичность ХТТ - после инкубации при  $37^\circ\text{C}$  в инкубаторе с  $5\% \text{CO}_2$  тестовые планшеты окрашивали тетразолиевым красителем ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-5-[(фениламино)карбонил]-2Н-тетразолий гидроксид). ХТТ-тетразолий метаболизируется митохондриальными ферментами метаболически активных клеток до растворимого продукта формазана, что позволяет проводить быстрый количественный анализ ингибирования вызванного вирусом уничтожения клеток антивирусными тестируемыми веществами. Раствор ХТТ готовили ежедневно в виде маточного раствора 1 мг/мл в RPMI 1640. Раствор феназинметосульфата (PMS) готовили в концентрации 0,15 мг/мл в PBS и хранили в темноте при минус  $20^\circ\text{C}$ . Исходный материал ХТТ/PMS готовили непосредственно перед использованием путем добавления 40 мкл PMS на один мл раствора ХТТ. Пятьдесят микролитров ХТТ/PMS добавляли в каждую лунку планшета и планшет повторно инкубировали в течение 4 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Планшеты закрывали герметизирующими клеевыми полосками и осторожно встряхивали или переворачивали несколько раз, чтобы смешать растворимый продукт формазан, затем планшет считывали спектрофотометрически при 450/650 нм с помощью ридера планшетов Molecular Devices Vmax.

Анализ данных. Необработанные данные были собраны из программного обеспечения Softmax Pro 4.6 и импортированы в электронную таблицу Microsoft Excel для анализа. Для каждого соединения рассчитывали процент снижения вирусного цитопатического действия по сравнению с необработанными вирусными контролями. Значение процента контроля клеток рассчитывали для каждого соединения, сравнивая неинфицированные клетки, обработанные препаратом, с неинфицированными клетками, находящимися только в среде.

Пример 20. Тест ингибирования полимеразы гриппа.

Приготовление вируса. Очищенный вирус гриппа A/PR/8/34 (1 мл) был получен от Advanced Biotechnologies, Inc. (Колумбия, MD), его оттаивали и разделяли на пять аликвот для хранения при минус  $80^\circ\text{C}$  до использования. В день проведения анализа к 180 мкл очищенного вируса добавили 20 мкл 2,5% Тритона N-101. Разрушенный вирус разводили в соотношении 1:2 в растворе, содержащем 0,25% тритона и PBS. В результате разрушения был получен источник рибонуклеопротеина гриппа (RNP), содержащий РНК-зависимую РНК-полимеразу гриппа и матричную РНК. Образцы до использования в анализе хранили на льду.

Полимеразная реакция. Каждые 50 мкл полимеразной реакции содержали следующие компоненты: 5 мкл разрушенного RNP, 100 mM Трис-HCl (pH 8,0), 100 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM дитиотреитол, 0,25% тритон N-101, 5 мкКи  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{GTP}$ , 100 мкМ АТФ, по 50 мкМ CTP и UTP, 1 мкМ GTP и 200 мкМ

аденил(3'-5')гуанозина, Для тестирования ингибитора реакции содержали ингибитор и тоже самое было осуществлено в отношении реакций, обладающих положительным контролем (2'-дезоксидефторгуанозин-5'-трифосфат). Другие контроли включали RNP+реакционную смесь и RNP+1% ДМСО. Реакционную смесь без праймера АрG и NTP инкубировали при 30°C в течение 20 мин. После добавления АрG и NTP к реакционной смеси образцы инкубировали при 30°C в течение 1 ч, затем сразу же реакцию переносили на стеклянные фильтры с последующим осаждением 10% трихлоруксусной кислотой (ТСА). Затем планшет пять раз промывали 5% ТСА и один раз 95% этанолом. После высушивания фильтра включение [ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTP измеряли с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика (Microbeta).

Формат планшета. Каждый тестовый планшет содержал три образца трех соединений (6 концентраций), а также три образца RNP+реакционная смесь (только RNP), RNP+1% ДМСО и только реакционная смесь (без RNP).

Анализ данных. Необработанные данные были получены из сцинтилляционного счетчика Microbeta. Включение радиоактивного GTP напрямую коррелирует с уровнями активности полимеразы. "Значения ингибирования в процентах" были получены путем деления среднего значения каждого испытуемого соединения на значения, полученные в опыте с RNP+контроль 1% ДМСО. Среднее значение, полученное при каждой концентрации 2DFGTP, сравнивали с контролем реакции RNP +. Затем данные были импортированы в электронную таблицу Microsoft Excel для расчета значений IC<sub>50</sub> с помощью линейного регрессионного анализа.

Пример 21. Тест ингибирования полимеразы HCV.

Активность соединений для ингибирования полимеразы HCV оценивали с использованием ранее описанных способов (Lam et al. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54 (8): 3187-3196). Анализы полимеразы HCV NS5B проводили в объемах по 20 мкл в 96-луночных реакционных планшетах. Каждая реакция содержала 40 нг/мкл очищенной рекомбинантной полимеразы NS5BA22 генотипа-1b, 20 нг/мкл комплементарной IRES-матрицы с генотипом-1b HCV, 1 мкМ каждого из четырех природных рибонуклеотидов, 1 ед./мл ингибитора РНКазы Optizyme (Promega, Madison, WI), 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,75 мМ MnCl<sub>2</sub> и 2 мМ дитиотреитола (ДТТ) в 50 мМ буфере HEPES (pH 7,5). Реакционные смеси собирали на льду в два этапа. Этап 1 состоял из объединения всех компонентов реакции, за исключением природных нуклеотидов и меченого UTP, в реакционную смесь полимеразы. Десять микролитров (10 мкл) смеси полимераз распределяли в отдельные лунки 96-луночного реакционного планшета на льду. В качестве контролей фермента были включены полимеразные реакционные смеси без NSSB-полимеразы. Серийные полулогарифмические разведения тестируемых и контрольных соединений, 2'-О-метил-СТР и 2'-О-метил-ОТР (Trilink, San Diego, Калифорния) готовили в воде, и 5 мкл серийных разбавленных соединений или одну воду (без контроля соединения) добавляли в лунки, содержащие смесь полимераз. Затем в лунки реакционного планшета добавляли пять микролитров смеси нуклеотидов (природных нуклеотидов и меченого UTP) и планшет инкубировали при 27°C в течение 30 мин. Реакции гасили добавлением 80 мкл стоп-раствора (12,5 мМ ЭДТА, 2,25 М NaCl и 225 мМ цитрата натрия), и продукты РНК наносили на мембрану Hybond-N + (GE Healthcare, Piscataway, Нью-Джерси) под вакуумным давлением, используя устройство для дотблоттинга. Мембрану удаляли из устройства для дотблоттинга и промывали четыре раза 4X SSC (0,6 М NaCl и 60 мМ цитрата натрия), а затем промывали один раз водой и один раз 100% этанолом. Мембрану высушивали на воздухе и экспонировали на экране для фосфоизображения, а изображение получали с использованием устройства для визуализации Phospho Typhoon 8600. После получения изображения мембрану помещали в кассету Microbeta вместе со сцинтилляционной жидкостью, и данные количества импульсов в минуту (СРМ) в каждой реакции подсчитывали на Microbeta 1450. Данные СРМ импортировали в пользовательскую электронную таблицу Excel для определения IC<sub>50</sub> соединения.

Пример 22. Условия реакции РНК-зависимой РНК-полимеразы NS5B.

Соединения оценивали на способность ингибирования NS5B- $\delta$ 21 из HCV GT-1b Con-1. Реакции включали очищенный рекомбинантный фермент, 1 мкг/мкл РНК-матрицы отрицательной цепи IRES HCV и 1 мкМ субстратов NTP, включающих [ $^{32}$ P]-СТР или [ $^{32}$ P]-УТР. Планшеты с тестами инкубировали при 27°C в течение 1 ч перед остановкой реакции. Включение [ $^{32}$ P] в макромолекулярный продукт оценивали по связыванию на фильтре.

Пример 23. Тест ингибирования ДНК полимеразы человека.

Альфа-полимераза ДНК человека (каталожный номер 1075), ее бета-версия (каталожный номер 1077) и гамма-версия (каталожный номер 1076) были приобретены у CHIMERx (Madison, WI). Ингибирование активности бета- и гамма-ДНК-полимеразы анализировали в микротитровальных планшетах в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Трис-НCl (pH 8,7), KCl (10 мМ для бета и 100 мМ для гамма), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 мг/мл BSA, 1 мМ ДТТ, 15% глицерин, 0,05 мМ dCTP, dTTP и dATP, 10 мкКи [ $^{32}$ P]-альфа-dGTP (800 Ки/ммоль), 20 мкг активированной ДНК тимуса теленка и тестируемое соединение в указанных концентрациях. Реакционная смесь альфа-ДНК-полимеразы в объеме 50 мкл на образец имела следующий состав: 20 мМ Трис-НCl (pH 8), 5 мМ ацетата магния, 0,3 мг/мл BSA, 1 мМ ДТТ, 0,1 мМ спермина, 0,05 мМ dCTP, dTTP и dATP, 10 мкКи [ $^{32}$ P]-альфа-dGTP (800 Ки/ммоль), 20 мкг акти-

вированной ДНК тимуса теленка и тестируемое соединение в указанных концентрациях. Для каждого анализа ферментативные реакции протекали в течение 30 мин при 37°C с последующим переносом на стеклянные фильтры с последующим осаждением 10% трихлоруксусной кислотой (ТСА). Затем планшет промывали 5% ТСА, и затем один раз 95% этанолом. После высыхания фильтра включение радиоактивности измеряли с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика (Micro Beta).

Пример 24. Тест на заражение HIV мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

Свежие мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) были получены из коммерческого источника (Biological Specialty), и было определено, что они являются серонегативными в отношении HIV и HBV. В зависимости от объема полученной донорской крови клетки крови после лейкофореза несколько раз промывали PBS. После промывания лейкофорезную кровь разбавляли в соотношении 1:1 физиологическим раствором Дульбекко с фосфатным буфером (PBS) и наслаивали на 15 мл градиента плотности Ficoll-Нураце в конической центрифужной пробирке объемом 50 мл. Эти пробирки центрифугировали в течение 30 мин при 600g. Кольца PBMC аккуратно удаляли из полученной интерфазы и трижды промывали PBS. После последнего промывания определяли количество клеток методом исключения при помощи красителя трипанового синего, и клетки ресуспендировали при  $1 \times 10^6$  клеток/мл в RPMI 1640 с 15% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS), 2 ммоль/л L-глутамина, 2 мкг/мл РНА-Р, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и оставляли для инкубации в течение 48-72 ч при 37°C. После инкубирования PBMC центрифугировали и ресуспендировали в среде для тканевых культур. Культуры поддерживали до использования путем изменений культуры на половину объема каждые 3 дня при помощи свежей среды для культуры тканей, содержащей IL-2. Тесты с PBMC начинали проводить через 72 ч после стимуляции при помощи РНА-Р.

Чтобы минимизировать эффекты, обусловленные изменчивостью доноров, PBMC, использованные в анализе, представляли собой смесь клеток, полученных от 3 доноров. Непосредственно перед использованием клетки-мишени ресуспендировали в свежей среде для тканевых культур при концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл и высевали во внутренние лунки 96-луночного круглодонного планшета для микротитрования в дозе 50 мкл/лунку. Затем 100 мкл 2X концентрации среды, содержащей соединение, переносили в 96-луночный планшет, содержащий клетки в 50 мкл среды. В качестве внутреннего стандарта для анализа использовали AZT.

После добавления испытуемого соединения в лунки добавляли 50 мкл предварительно определенного разведения вируса HIV (полученного из 4-кратной конечной желаемой концентрации в лунках) и хорошо перемешивали. Для заражения добавляли 50-150 TCID<sub>50</sub> каждого вируса на лунку (конечное значение MOI приблизительно 0,002). PBMC трижды подвергали воздействию вируса и культивировали в присутствии или в отсутствие тестируемого материала в различных концентрациях, как описано выше, в 96-луночных планшетах для микротитрования. После 7 дней в культуре репликацию HIV-1 количественно определяли в супернатанте культуры ткани путем измерения активности обратной транскриптазы (RT). Лунки только с клетками и вирусом служили контролем вируса. Аналогичным образом были приготовлены отдельные планшеты без вируса для исследований цитотоксичности препарата.

Тест на активность обратной транскриптазы - Активность обратной транскриптазы измеряли в бесклеточных супернатантах с использованием стандартного анализа полимеризации с включением радиоактивной метки. Третированный тимидин трифосфат (TTP; New England Nuclear) был приобретен с активностью 1 Ки/мл, и для ферментативной реакции был использован 1 мкл. Исходный раствор гAdT готовили путем смешивания 0,5 мг/мл поли(гА) и 1,7 ед./мл олиго(дТ) в дистиллированной воде и хранили при минус 20°C. Ежедневно готовили свежий реакционный буфер RT, состоящий из 125 мкл 1 моль/л EGTA, 125 мкл dH<sub>2</sub>O, 125 мкл 20% Triton X-100, 50 мкл 1 моль/л трис (pH 7,4), 50 мкл 1 моль/л DTT и 40 мкл 1 моль/л MgCl<sub>2</sub>. Для каждой реакции смешивали 1 мкл TTP, 4 мкл dH<sub>2</sub>O, 2,5 мкл гAdT и 2,5 мкл реакционного буфера. Десять микролитров этой реакционной смеси помещали в круглодонный планшет для микротитрования и добавляли 15 мкл вирусосодержащего супернатанта и перемешивали. Планшет инкубировали при 37°C в инкубаторе с увлажнением в течение 90 мин. После инкубации 10 мкл реакционного объема наносили на плоский фильтр из DEAE в планшете соответствующего формата, промывали 5 раз (по 5 мин) в 5% натрий-фосфатном буфере, 2 раза (по 1 мин) в дистиллированной воде, 2 раза (по 1 мин) в 70% этаноле, а затем высушивали на воздухе. Высушенный плоский фильтр помещали в пластиковый корпус и туда добавляли 4 мл Opti-Fluor O. Включение радиоактивности определяли количественно с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика Wallac 1450 Microbeta Trilux.

Пример 25. HBV.

Клетки HepG2.2.15 (100 мкл) в среде RPMI1640 с 10% эмбриональной бычьей сывороткой добавляли во все лунки 96-луночного планшета с плотностью  $1 \times 10^4$  клеток на лунку, и планшет инкубировали при 37°C в среде 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. После инкубации шесть отдельных десятикратных серийных разведений тестируемого соединения, приготовленного в среде RPMI1640 с 10% эмбриональной бычьей сывороткой, добавляли в отдельные лунки планшета в трех повторах. В шесть лунок в планшете вносили только среду в качестве контроля одного только вируса. Планшет инкубировали в течение 6 дней при 37°C в среде с 5% CO<sub>2</sub>. Культуральную среду заменяли на 3 день средой, содержащей указанную кон-

центрацию каждого соединения. Сто микролитров супернатанта собирали из каждой лунки для анализа вирусной ДНК с помощью кПЦР и оценивали цитотоксичность путем окрашивания ХТТ монослоя клеточной культуры на шестой день.

Десять микролитров супернатанта клеточной культуры, собранного на шестой день, разводили в буфере для разведения кПЦР (40 мкг/мл ДНК из собранной спермы лосося) и кипятили в течение 15 мин. Количественную ПНР в реальном времени проводили в 386-луночных планшетах с использованием системы обнаружения последовательностей Applied Biosystems 7900HT и поддерживающего программного обеспечения SDS 2.4. С пятью микролитрами (5 мкл) прокипяченной ДНК для каждого образца и серийными 10-кратными разведениями количественного стандарта ДНК проводили кПЦР в реальном времени с использованием Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen) и специфических олигонуклеотидных праймеров ДНК (IDT, Coralville, ID) HBV-AD38-qF1 (5'-CCG TCT GTG CCT TCT CAT CTG-3') (SEQ ID NO:1), HBV-AD38-qR1 (5'-AGT CCA AGA GTY CTC TTA TRY AAG ACC TT-3')(SEQ ID NO:2) и HBV-AD38-qP1 (5'-FAM CCG TGT GCA/ZEN/CTT CGC TTC ACC TCT GC-3'BHQ1) (SEQ ID NO:3) в конечной концентрации каждого праймера 0,2 мкМ в общем объеме реакции 15 мкл. Число копий ДНК HBV в каждом образце интерполировали из стандартной кривой с помощью программного обеспечения SDS.24, и данные были импортированы в электронную таблицу Excel для анализа.

50% цитотоксическую концентрацию для испытуемых материалов определяли путем измерения снижения содержания тетразолиевого красителя ХТТ в обработанных планшетах для культивирования тканей. ХТТ метаболизируется митохондриальным ферментом NADPH-оксидазой до растворимого продукта формазана в метаболически активных клетках. Раствор ХТТ готовили ежедневно в виде стокового раствора 1 мг/мл в PBS. Исходный раствор феназинметосульфата (PMS) готовили в концентрации 0,15 мг/мл в PBS и хранили в темноте при минус 20°C. Раствор ХТТ/PMS готовили непосредственно перед использованием путем добавления 40 мкл PMS на 1 мл раствора ХТТ. В каждую лунку планшета добавляли пятьдесят микролитров ХТТ/PMS и планшет инкубировали в течение 2-4 ч при 37°C. Эмпирически было определено, что 2-4-часовая инкубация находится в пределах линейного диапазона ответа для снижения красителя ХТТ с указанным количеством клеток для каждого анализа. Вместо крышек использовались герметики с липкой поверхностью, запечатанный планшет несколько раз переворачивали для перемешивания растворимого продукта формазана и планшет считывали при 450 нм (длина волны сравнения 650 нм) на спектрофотометре Molecular Devices SpectraMax Plus 384. Данные собирались при помощи программного обеспечения Softmax 4.6 и импортировались в электронную таблицу Excel для анализа.

Пример 26. Условия реакции РНК-зависимой РНК-полимеразы Денге.

Анализ РНК-полимеразы проводили при 30°C с использованием 100 мкл реакционной смеси в 1,5 мл пробирке. Конечные условия реакции: 50 мМ Hepes (pH 7,0), 2 мМ DTT, 1 мМ MnCl<sub>2</sub>, 10 мМ KCl, 100 нМ UTR-Poly A (праймер для самоотжига), 10 мкМ UTP, 26 нМ фермент RdRp. Реакционную смесь с различными соединениями (ингибиторами) инкубировали при 30°C в течение 1 ч. Для оценки количества пирофосфата, образующегося во время реакции полимеразы, 30 мкл реакционной смеси полимеразы смешивали с реакционной смесью, связанной с ферментом люциферазой (70 мкл). Конечные условия реакции люциферазы: 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 200 мкМ АТФ-сульфуриказы, 5 мкМ APS, 10 нМ люциферазы, 100 мкМ D-люциферина. Белые планшеты, содержащие образцы реакции (100 мкл), сразу же переносили на люцинометр Veritas (Turner Biosystems, CA) для обнаружения светового сигнала.

Пример 27. Методика инкубирования и анализа клеток.

Клетки Huh-7 высевали в концентрации  $0,5 \times 10^6$  клеток/лунку в 1 мл полной среды в 12-луночные планшеты, обработанные культурой ткани. Адгезию клеток проводили в течение ночи при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Исходный раствор 40 мкМ испытуемого соединения готовили в 100% ДМСО. Из 40 мкМ исходного раствора готовили 20 мкМ раствор испытуемого соединения в 25 мл полной среды DMEM. Для обработки соединения среду удаляли из лунок и в соответствующие лунки добавляли 1 мл 20 мкМ раствора в полной среде DMEM. Также готовили отдельный планшет с клетками "без" добавления соединения. Планшеты инкубировали при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. в следующие временные точки: 1, 3, 6 и 24 ч. После инкубации в исследуемые временные точки клетки промывали 2 раза 1 мл DPBS. Клетки экстрагировали путем добавления 500 мкл 70% метанола/30% воды с добавлением внутреннего стандарта в каждую лунку, обработанную тестируемым соединением. Необработанный, свободный от соединения планшет подвергали экстракции раствором 500 мкл 70% метанола/30% воды на лунку. Образцы центрифугировали при 16000 об/мин в течение 10 мин при 4°C. Образцы анализировали при помощи жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией/масс-спектрометрии (LC-MS/MS) с использованием системы ABSCIEX 5500 QTRAP LC-MS/MS с колонкой Hupercarb (PGC).

Пример 28. Методика фармакокинетического эксперимента на грызунах.

Мышей DBA-1J (6-8 недель, самки) акклиматизировали в течение более 2 дней после получения. Мышей взвешивали за день до дозирования, чтобы рассчитать объемы дозирования. Мышам вводили перорально через желудочный зонд препарат в дозе 30 мг/кг, 100 мг/кг и 300 мг/кг. Мышей отбирали в 8 временных точках: 0,5, 1, 2, 3, 4, 8 и 24 ч (3 мыши на момент времени для испытуемого препарата). Мы-

шей умерщвляли и собирали их органы (см. ниже). Для отбора крови, мышей умерщвляли с помощью  $\text{CO}_2$  в соответствующий момент времени, указанный выше. Кровь получали путем пункции сердца (0,3 мл) в каждый момент времени. После сбора крови удаляли органы из мышей (см. ниже). Кровь обрабатывали, осторожно 2 или 3 раза переворачивая пробирку Li-Herafin с кровью для хорошего перемешивания. Затем пробирки помещали в штатив в ледяной воде перед центрифугированием ( $\leq 1$  ч). В кратчайшие практически сроки кровь центрифугировали при  $2000 \times g$  в течение 10 мин в центрифуге с охлаждением для получения плазмы. Затем при помощи 200 мкл пипетки плазму переносили в маркированную пробирку Эппендорфа объемом 1,5 мл в ледяной воде. Затем плазму замораживали в морозильной камере или на сухом льду. Образцы до проведения анализа хранили при минус  $80^\circ\text{C}$ . У умерщвленных мышей собирали органы. Органы (легкие, печень, почки, селезенка и сердце) извлекали, помещали в пробирку и немедленно замораживали в жидком азоте. Затем пробирки переносили на сухой лед. Образцы хранили в криогенных тканевых флаконах. Образцы анализировали с помощью ЖХ-МС/МС с использованием системы ABSCIEX 5500 QTRAP для ЖХ-МС/МС с колонкой Hurecarb (PGC).

Фармакокинетические параметры:

$T_{\max}$  после перорального дозирования 0,25-0,5 ч;

$C_{\max}$  составили 3,0, 7,7 и 11,7 нг/мл после перорального дозирования при помощи 30, 100 и 300 мг/кг;

Биодоступность (по сравнению с внутрибрюшинной доставкой) составляет 65% при 30 мг/кг и 39-46% при пероральном дозировании 100 и 300 мг/кг;

$T_{1/2}$  для EIDD-1931 в плазме составляет 2,2 ч после внутривенного дозирования и 4,1-4,7 ч после перорального дозирования.

После пероральной дозы 300 мг/кг уровни в плазме через 24 ч составляют 0,4 пМ и 0,1 пМ после дозы 100 мг/кг.

Пример 29. Протокол инфекции Чикунгунья на модели у мышей.

Мышам C57BL-6J вводили в виде инъекции 100 БОЕ вируса СНЖ в подушечку лапы. Тестовые группы включали неинфицированную и нелеченную группу, инфицированную и нелеченную группу, инфицированную группу, получавшую высокую дозу 35 мг/кг EIDD-01931 внутрибрюшинно и инфицированную группу, получающую низкую дозу 25 мг/кг EIDD-01931 внутрибрюшинно. Две тестовые группы, получавшие EIDD-01931, получали соединение за 12 ч до заражения, а затем ежедневно в течение 7 дней. Подушечки лап оценивали на предмет воспаления (толщина лап) ежедневно в течение 7 дней. Артрит, вызванный вирусом СНЖ (по данным гистологии), оценивали в голеностопных суставах с помощью ПЦР через 7 дней.

Пример 30. N(4)-Гидроксицитидин для профилактики и лечения альфавирусных инфекций.

Тестирование воздействия на клеточное цитопатическое действие (ЦПД) на моделях инфекции клеток Vero показало, что аналог рибонуклеозида N(4)-гидроксицитидин (EIDD-01931) обладает активностью против вируса реки Росс, EEE, WEE, VEE и СНЖ со значениями  $EC_{50}$ , соответственно, 2,45 мкМ, 1,08 мкМ, 1,36 мкМ, 1,00 мкМ и 1,28 мкМ. Профиль цитотоксичности соединения является приемлемым, с индексами селективности в диапазоне от низкого уровня 8 в клетках CEM до высокого 232 в клетках Huh7 (печень).

Пример 31.

Учитывая, что высокие титры вируса VEE могут развиваться в головном мозге в течение нескольких часов после воздействия аэрозоля, желательным, чтобы противовирусное средство прямого воздействия было способно быстро достигать терапевтических уровней лекарственного средства в мозге. Пилотное фармакокинетическое исследование было проведено на крысах-самцах SD, которым вводили через желудочный зонд 5 и 50 мг/кг EIDD-01931 чтобы определить фармакокинетические параметры и профиль распределения соединения в тканях по ключевым системам органов, включая мозг. EIDD-01931 доступен для перорального приема и он пропорциональный дозе с расчетной биодоступностью (% F), составляющей 28%. Образцы органов (мозг, легкое, селезенка, почка и печень) отбирались через 2,5 и 24 ч после введения дозы в группе, получавшей дозу 50 мг/кг. EIDD-01931 хорошо распределялся по всем протестированным тканям; особо следует отметить, что препарат, основываясь на оценках, полученных на клеточных данных, легко распределялся в ткани мозга в терапевтических уровнях. После попадания в мозг EIDD-01931 быстро метаболизируется до активной 5'-трифосфатной формы, что обеспечивает уровни в мозге 526 и 135 нг/г через, соответственно, 2,5 и 24 ч. Даже после 24 ч уровни EIDD-01931 и его 5'-трифосфата в головном мозге значительны, что свидетельствует о том, что для лечения может быть адекватным пероральное введение один раз в день.

Альтернативно, доставка препарата посредством аэрозольного введения (назальный спрей) может приводить к немедленному достижению терапевтических уровней лекарственного средства в слизистой оболочке носа и головном мозге. EIDD-01931 имеет приемлемый токсикологический профиль через 6 дней после внутрибрюшинных (в/б) инъекций мышам один раз в два дня, при этом NOEL (доза, не вызывающая отрицательных реакций) составляла 33 мг/кг; потеря веса наблюдалась при самой высокой испытанной дозе (100 мг/кг), при этом вес возвращался к норме при прекращении приема дозы.

Пример 32. Активность N4-гидроксицитидина против аренавирусов.

Вирус	Линия клеток	EC <sub>50</sub> (мкМ)	EC <sub>90</sub> (мкМ)	CC <sub>50</sub> (мкМ)
Вирус Такарибе	Vero	14,4		136
Вирус Такарибе	Vero	18,8		104
Вирус Пичинде	Vero	18,4		184
Вирус Пичинде	Vero	21,6		128
Вирус Юнин	Vero	18,4		136
Вирус Юнин	Vero	20,8		124
Вирус лихорадки Ласса	Vero	4,04		30
Вирус лимфоцитарного хориоменингита	Vero		25,2	>400

Пример 33. Активность N4-гидроксицитидина против тогавирусов.

Вирус	Линия клеток	EC <sub>50</sub> (мкМ)	EC <sub>90</sub> (мкМ)	CC <sub>50</sub> (мкМ)
	клеток			
VEEV	Vero76	1,28		128
VEEV	Vero76	1		13,6
VEEV	Vero76		0,8	32,8
VEEV	Vero76	1,92		32,8
EEEV	Vero76	0,96		128
EEEV	Vero76	1,08		84
EEEV	Vero76		1,68	132
EEEV	Vero76	8		132
WEEV	Vero76	1,28		>400
WEEV	Vero76	1,36		288
WEEV	Vero76		<1,28	120
WEEV	Vero76	0,76		256
CHIKV	Vero76	1,28		76
CHIKV	Vero76	1,28		22,8
CHIKV	Vero76		0,72	96
CHIKV	Vero76	1,8		96

Пример 34. Активность N4-гидроксицитидина против флавивирусов.

Вирус	Линия клеток	EC <sub>50</sub> (мкМ)	EC <sub>90</sub> (мкМ)	CC <sub>50</sub> (мкМ)
DENV2	Vero76	12,8		60
DENV2	Vero76	14		128
WNV	Vero76	>400		>400
WNV	Vero76	>400		>400
YFV	Vero76	1,88		224
YFV	Vero76	20,4		30
YFV	Vero76		26	52
YFV	Vero76	>52		52
JEV	Vero76	112		>400
JEV	Vero76	268		>400
POWV	BHK	11,2		30
POWV	BHK	8,8		19,2
ZIKV	Vero76	1,44		>400
ZIKV	Vero76	6,8		152

ZIKV	Vero76		2,36	80
ZIKV	Vero76	3,12		80
Вирус Усугу	Vero 76	228		>400
Вирус Усугу	Vero 76	100		212
ZIKV	Vero 76	1,46		400
ZIKV	Vero 76	3,04		16,4

Пример 35. Активность N4-гидроксицитидина против буньявирусов.

Вирус	Линия клеток	EC <sub>50</sub> (мкМ)	EC <sub>90</sub> (мкМ)	CC <sub>50</sub> (мкМ)
RVFV	Vero76	1,48		60
RVFV	Vero76	1,44		48
RVFV	Vero76	6,8		96
RVFV	Vero76	7,6		96
RVFV	Vero		1	20,4
RVFV	Vero	1,68		20,4
Вирус Пунга Торо	Vero76	20,4		184
Вирус Пунга Торо	Vero76	20		160
Вирус Ла Кросс	Vero76	25,2		268
Вирус Ла Кросс	Vero76	15,2		188
Вирус Ла Кросс	Vero76		1	112
Вирус Ла Кросс	Vero76	1,96		112
Вирус Мапорал	Vero76	84		140
Вирус Мапорал	Vero76	>124		124
Heartland virus	Vero		7,84	>400
Lymphocytic choriomeningitis virus	Vero		25,2	>400
Severe fever thrombocytopenia syndrome virus	Vero		4,96	>400

Пример 36. Активность N4-гидроксицитидина против коронавирусов.

Вирус	Линия клеток	EC <sub>50</sub> (мкМ)	EC <sub>90</sub> (мкМ)	CC <sub>50</sub> (мкМ)
MERS	Vero E6	<0,80	<0,80	20
SARS	Vero76	<0,4		252
SARS	Vero76	<0,4		144

SARS	Vero76		0,56	76
SARS	Vero76	2,2		76
SARS	Vero E6	<0,80	<0,80	20
HCoV	HEL	1,28		100
HCoV	HEL	5,6		36
HCoV	HEL		<0,128	192
HCoV	HEL	0,228		192
HCoV	Vero76	<0,4		400
HCoV	Vero E6	<0,4		400
HCoV	HEL	1,28		100
HCoV	HEL	4		60
HCoV	HEL		0,4	232
HCoV	HEL	0,212		232
HCoV	Vero76	12,8		400
HCoV	Vero76		0,32	44
HCoV	Vero76	0,44		44

Пример 37. Активность N4-гидроксицитидина против гриппа.

Вирус	Линия клеток	EC <sub>50</sub> (мкМ)	EC <sub>90</sub> (мкМ)	CC <sub>50</sub> (мкМ)
Грипп А H1N1	MDCK	1,28		168
Грипп А H1N1	MDCK	1,16		136
Грипп А H7N9 (высокопатогенный)	MDCK	>48		48
Грипп А H7N9 (высокопатогенный)	MDCK	>44		44
Грипп А H5N1 (высокопатогенный)	MDCK	>96		96
Грипп А H5N1 (высокопатогенный)	MDCK	>88		88
Грипп А H1N1	MDCK	1,44		76
Грипп А H1N1	MDCK	1,24		68
Грипп А H3N2	MDCK	0,96		60
Грипп А H3N2	MDCK	0,88		52
Грипп А H5N1 (низкопатогенный)	MDCK	1,28		48
Грипп А H5N1 (низкопатогенный)	MDCK	1,28		27,6
Грипп В	MDCK	<0,4		48
Грипп В	MDCK	<0,4		30,4
Грипп В	MDCK	<0,4		48
Грипп В	MDCK	<0,4		76

Пример 38. Активность N4-гидроксицитидина против Эболы.

Вирус	Линия клеток	EC <sub>50</sub> (мкМ)	EC <sub>90</sub> (мкМ)	CC <sub>50</sub> (мкМ)
EBOV	Vero	4,7		>100
EBOV	Vero		25	>320

Пример 39. Активность N4-гидроксицитидина против норовируса.

Вирус	Линия клеток	EC <sub>50</sub> (мкМ)	EC <sub>90</sub> (мкМ)	CC <sub>50</sub> (мкМ)
NV	HG23	>100	>100	>100

Пример 40. Активность N4-гидроксицитидина против пикорнавирусов.

Вирус	Линия клеток	EC <sub>50</sub> (мкМ)	EC <sub>90</sub> (мкМ)	CC <sub>50</sub> (μМ)
Энтеровирус-71	Vero76	3,44		>400
Энтеровирус-71	Vero76	3,36		256
Энтеровирус-68	RD	1,28		>400
Энтеровирус-68	RD	1,16		25,6
Полиовирус -1	Vero76	12,8		128
Полиовирус -1	Vero76	10,4		76
Вирус Коксаки В3	Vero 76	1,44		184
Вирус Коксаки В3	Vero 76	1,4		76
HRV-14	HeLa-Ohio	1,28		>40
HRV-14	HeLa-Ohio	1,36		>40
Вирус Коксаки В3	Vero 76		2,24	56
Вирус Коксаки В3	Vero 76	2,12		56
Энтеровирус-71	Vero76		0,76	48
Энтеровирус-71	Vero76	2,32		48
Энтеровирус-68	RD		0,92	52
Энтеровирус-68	RD	2,28		52

Пример 41. Активность N4-гидроксицитидина против парагриппа и RSV.

Вирус	Линия клеток	EC <sub>50</sub> (мкМ)	EC <sub>90</sub> (мкМ)	CC <sub>50</sub> (мкМ)
Вирус парагриппа 3	MA-104	212		272
Вирус парагриппа 3	MA-104	248		264
RSV	MA-104	14		>400
RSV	MA-104	27,6		>400

Пример 42. Способы фармакокинетических исследований у яванских макаков.

Восемь яванских макаков (4 самца/4 самки) получали перорально через желудочный зонд однократную дозу EIDD-1931 или пролекарственного конъюгата, как показано в табл. 1. Между дозами были периоды вымывания в одну неделю. Образцы крови собирали после каждого дозирования, перед дозированием и 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18 и 24 ч после введения дозы.

Таблица 1

Дизайн исследования для фармакокинетической оценки EIDD-1931 и 4 пролекарственных конъюгатов

Группа №	Соединение	Кол-во животных (самцы/самки)	Уровень дозы ммоль/кг	Уровень дозы (мг/кг)	Состояние питания
1	EIDD-1931	4/4	0,4	100	Голодание
2	EIDD-1931	4/4	0,4	100	Кормление
3	EIDD-2800	4/4	0,4	180	Кормление
4	EIDD-2801	4/4	0,4	130	Кормление
5	EIDD-2776	4/4	0,4	175	Кормление
6	EIDD-2898	4/4	0,4	160	Кормление

Аликвоты плазмы экстрагировали ацетонитрилом, который включал <sup>13</sup>C<sub>5</sub> EIDD-1931 в качестве внутреннего стандарта. Затем образцы встряхивали и центрифугировали в центрифуге Sorvall RT1 (Thermo Fisher, Waltham, MA) при 3500 об/мин в течение 10 мин. Супернатант переносили в микроцентрифужную пробирку и снова центрифугировали в пикоцентрифуге Biofuge (Heraeus, Hanau, Germany) в течение 10 мин при 13000 об/мин. Оставшийся супернатант затем переносили во флакон ВЭЖХ для анализа.

Условия проведения LC-MS/MS для EIDD-02898. Разделение в ВЭЖХ проводили в системе Agilent 1200 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США). Для разделения EIDD-1931, EIDD-2898 и

$^{13}\text{C}_5$  EIDD-1931 (используемый в качестве внутреннего стандарта) использовали колонку с диоксидом кремния Atlantis HILIC 50×4,6 мм, размер частиц 5 мкм (Waters Corporation, Milford, MA, USA) с изократическим режимом (70:30) с ацетонитрилом в 100 мМ аммоний-ацетатном буфере, pH 5,0 при скорости потока 1,0 мл/мин в течение 2 мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре QTrap 5500 (AB Sciex, Farmingham, MA) с использованием ионизации электрораспылением в положительном режиме (ESI) в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Стандартная кривая из восьми точек, полученная с контрольной плазмой, охватывает концентрации в диапазоне от 10 до 10000 нг/мл. В начале каждого набора образцов для обеспечения точности в пределах 20% анализировали приготовленные отдельно образцы для контроля качества 30, 500 и 5000 нг/мл с контрольной плазмой. Калибровка в каждой матрице продемонстрировала линейность со значением  $R^2 > 0,99$ . Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Analyst (AB Sciex, Farmingham).

Условия проведения LC-MS/MS для EIDD-02800 и EIDD-02801. Разделение в ВЭЖХ проводили в системе Agilent 1200 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США). Для разделения EIDD-1931, EIDD-2800, EIDD-2801, and  $^{13}\text{C}_5$  EIDD-1931 (используемый в качестве внутреннего стандарта) использовали колонку Acclaim HILIC-1 150×4,6 мм, размер частиц 5 мкм (Thermo Fisher, Waltham, MA) в изократическом режиме (90:10) с ацетонитрилом в 100 мМ аммоний-ацетатном буфере, pH 5,0 при скорости потока 1,0 мл/мин в течение 5 мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре QTrap 5500 (AB Sciex, Farmingham, MA) с использованием ионизации электрораспылением в отрицательном режиме (ESI) в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Стандартная кривая из восьми точек, полученная с контрольной плазмой, охватывает концентрации в диапазоне от 10 до 10000 нг/мл. В начале каждого набора образцов для обеспечения точности в пределах 20% анализировали приготовленные отдельно образцы для контроля качества 30, 500 и 5000 нг/мл с контрольной плазмой. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Analyst (AB Sciex, Farmingham).

Пример 43. Фармакокинетические параметры, полученные у яванских макак.

Как видно из фиг. 11-15, эти данные показывают, что после введения пероральным зондом яванским макакам исходный рибонуклеозид неожиданно секвестрируется в энтероцитах кишечника, в целом, без изменений. Это приводит к низкой кажущейся биодоступности соединения у яванских макак. Тем не менее, при внутривенной инъекции соединение широко распространяется в организме. В результате этих исследований выяснилось, что EIDD-1931 обладает низкой биодоступностью у яванских обезьян в результате неэффективного транзита/высвобождения в циркулирующую кровь из слизистых оболочек кишечника и желудка.

Низкая биодоступность EIDD-1931 у яванских макак может быть успешно разрешена путем использования химически и/или ферментативно расщепляемых пролекарственных фрагментов, которые облегчают проникновение EIDD-1931 через стенку кишечника в циркулирующую кровь. Три пролекарства, EIDD-2800, EIDD-2801 и EIDD-2898, значительно улучшали биодоступность EIDD-1931 в 4-8 раз у яванских макак, как это видно из фиг. 14 и 15.

Дополнительные результаты показаны в табл. 2 и 3.

Таблица 2

Фармакокинетические параметры, полученные у яванских макак-самцов

Вводимое соединение	$t_{\max}$ (час)	$C_{\max}$ (нмоль/мл)	$AUC_{0-24h}$ (час·нмоль/мл)	CL (л/час·кг)	$t_{1/2}$ (час)	F* (%)
EIDD-1931	0,75 ± 0,28	3,31 ± 1,82	5,75 ± 1,99	70,1 ± 18,7	1,2 ± 1,2	~3
EIDD-2800	0,37 ± 0,14	16,3 ± 13,2	38,9 ± 7,58	9,1 ± 1,3	5,5 ± 4,2	~27
EIDD-2801	2 ± 0,81	8,08 ± 1,32	31,7 ± 7,82	13 ± 3,7	1,8 ± 0,91	~22
EIDD-2898	2,3 ± 0,96	9,1 ± 2,7	26,1 ± 5,2	16,4 ± 3,1	0,53 ± 0,16	~18
EIDD-2776	5 ± 1,2	0,58 ± 0,21	2,6 ± 0,65	142 ± 37,3	0,97 ± 0,21	~2

Таблица 3

## Фармакокинетические параметры, полученные у яванских макак-самок

Вводимое соединение	$t_{\max}$ (час)	$C_{\max}$ (нмоль/ мл)	$AUC_{0 \rightarrow 24h}$ (час·нмоль/ мл)	CL (л/час* кг)	$t_{1/2}$ (час)	F (%)
EIDD-1931	0,87 ± 0,75	3,31 ± 1,99	7,21 ± 4,21	65,7 ± 31,6	0,78 ± 0,2	~ 3
EIDD-2800	0,31 ± 0,12	8,10 ± 5,06	27,4 ± 11,5	15,9 ± 7,7	4,4 ± 1,2	~ 16
EIDD-2801	1,25 ± 0,5	12,3 ± 2,33	43,8 ± 17,0	10,3 ± 5,6	1,9 ± 1,3	~ 26
EIDD-2898	1,3 ± 0,5	15,9 ± 8,1	26,9 ± 4,8	15,9 ± 3,2	0,55 ± 0,25	~ 15
EIDD-2776	3 ± 2,4	0,69 ± 0,26	3,3 ± 2,7	158 ± 85,5	1,2 ± 0,41	~ 2

Пример 44. Способы фармакокинетических исследований у хорьков.

EIDD-2801 и контроль носителя вводили через один пероральный зонд (пероральное введение). EIDD-2801 и контроль носителя вводили через пероральный зонд (пероральное введение) два раза в сутки. Первая доза была за 3 ч (-3 ч) до заражения вирусом; вторая доза в 0 ч, а затем каждые 12 ч в течение 3,5 дней; всего 8 доз. Используемый носитель состоял из 1% метилцеллюлозы в воде (вес/объем). Для исследования ФК и эффективности использовали беспородных хорьков - самок в возрасте 6-8 месяцев (*Mustela putorius furo*), приобретенных у Triple F Farms, весом 0,8-1,0 кг.

Фармакокинетика: всего 8 хорьков (2 группы, 4 хорька на группу).

Исследование эффективности: Профилактическое введение против A/Netherlands/602/2009 (H1N1) NL/09;  $5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/животное интраназально - всего 12 хорьков (3 группы, 4 хорька на группу).

Фармакокинетическое исследование. EIDD-2801 вводили в виде суспензии через желудочный зонд в общем объеме 3,5 мл с последующей промывкой катетера раствором MIRACLEVET. Образцы крови собирали из передней полой вены. Через 72 ч после предварительной дозы у каждого животного отбирали 0,5 мл крови. После дозирования пробы крови (0,3 мл) собирали через 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 и 24 ч в охлажденных льдом пробирках с Li-гепарином для плазмы. Плазму готовили в течение 1 ч после забора крови и хранили до 12 ч на льду, а затем переносили в морозильник при минус 80°C. Образцы анализировали методом ЖХ-МС/МС.

Пример 45. Фармакокинетические параметры, полученные у хорьков.

## Фармакокинетические параметры для EIDD-1931 у хорьков после однократных доз EIDD-2801

Доза мг/кг	$C_{\max}$ (нмоль/мл)	$AUC_{inf}$ (час·нмоль/мл)	$t_{1/2}$ (час)
4	3,5 ± 1,5	13,2 ± 4,8	8,2 ± 1,7
20	15,4 ± 1,9	73 ± 32	4,7 ± 1,3
128	100 ± 22	322 ± 43	5,1 ± 0,8
512	209 ± 106	791 ± 391	4,2 ± 0,6

Пример 46. Способы лечения при помощи EIDD-2801 на модели гриппозной инфекции у хорьков.

Дозу  $5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/животное вируса NL/09 вводили интраназально в 0,2 мл (0,1 мл в каждую ноздрию). Исходный вирус разводили в фосфатно-солевом буфере (PBS). Перед заражением хорьков анестезировали смесью кетамина/декседетомидина.

Конечные точки. Ежедневно оценивали лихорадку, массу тела, клинические признаки (выделения из носа; уровни активности; дыхательную недостаточность) и вирусную нагрузку при промывании носа. Дозирование начинали через 3 ч до заражения, после чего вводили дозу через 1 ч после заражения, а затем каждые 12 ч до эвтаназии животных. Хорьков умерщвляли через 3,5 дня после заражения и через 12 ч после последней дозы лечения, отдельно собирали ткани верхних и нижних дыхательных путей и отбирали образцы крови. Образцы крови (0,3 мл) собирали, обрабатывали и хранили, как описано в разделе ФК выше. В крови исследовали концентрацию EIDD-1931. Определяли вирусную нагрузку в тканях нижних дыхательных путей.

Дозирование. EIDD-2801 вводили перорально. Общий объем в желудочном зонде составлял 3,5 мл с последующим промыванием желудочных катетеров при помощи 3,5 мл MIRACLEVET.

Дизайн исследования результатов эффективности EIDD-2801 при заражении гриппом

Экспер.	Группа	Вирус	n	Пол	Соединение	Общая доза/день	Уровень дозы	Объем дозы	Режим лечения*
1	1	IAV (H1N1)	4	самки	EIDD-2801	200 мг/кг/день	100 мг/кг два раза в день	3,5 мл/кг	перорально два раза в день, -3 часа, +1 час, и 6 доз каждые 12 часов ФД; всего 8 доз
1	2	IAV (H1N1)	4	самки	EIDD-2801	1000 мг/кг/день	500 мг/кг два раза в день	3,5 мл/кг	перорально два раза в день, -3 часа, +1 час, и 6 доз каждые 12 часов ФД; всего 8 доз
1	3	Имитатор	4	самки	Носитель	0 мг/кг/день	0 мг/кг два раза в день	3,5 мл/кг	перорально два раза в день, -3 часа, +1 час, и 6 доз каждые 12 часов ФД; всего 8 доз

Пример 47. Результаты лечения при помощи EIDD-2801 на модели гриппозной инфекции у хорьков.

Результаты лечения EIDD-2801 на модели гриппа у хорька (A/California/07/2009 (H1N1)) можно найти на фиг. 16. Титры вируса в образцах назального лаважа были значительно снижены при профилактике и через 12 ч после лечения инфекции при помощи EIDD-2801. Лихорадка у хорьков была полностью предотвращена EIDD-2801 при профилактическом введении и через 12 ч после заражения. Лечение при помощи EIDD-2801 даже через 24 ч после заражения позволило быстро снизить как титры вируса в образцах назального лаважа, так и лихорадку. Результаты лечения при помощи EIDD-2801 на модели инфекции вирусом гриппа (A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)) у хорьков можно найти на фиг. 17. Титры вируса в носовом лаваже, лихорадка и вирусные титры в носовых раковинах были значительно снижены с помощью EIDD-2801 (100 мг/кг) когда лечение было начато через 12 и 24 ч после заражения. Даже когда доза EIDD-2801 была снижена со 100 мг/кг до 20 мг/кг и вводилась через 24 ч после заражения, вирусные титры в носовом лаваже и носовых раковинах значительно снижались.

Пример 48. Способы фармакокинетических исследований у мышей.

Мышей ICR (CD-1) в возрасте 7-8 недель акклиматизировали в течение ~ 1 недели после получения. Мышей взвешивали с точностью до  $\pm 1$  г в день или утро перед дозированием для расчета объемов дозирования. EIDD-2801 растворяли полностью в 5 мл раствора А (PEG 400/ Tween 80 (90%/10%)) при нагревании и встряхивании, и затем разбавляли 5 мл раствора В (30% Solutol/10% DMA). Мыши получали дозу перорально. В каждой группе было 3 мыши, которых следовало отбирать в 8 различных временных точках: 0,25, 0,50, 1, 2, 3, 4, 8 и 24 ч. Во всех 7 временных точках производился забор крови. Кровь получали путем ретроорбитального кровотоечения под изофлурановой анестезией. От каждой мыши получали кровь один раз (300 мкл), и кровь немедленно переносили в пробирки Li-Herapin на ледяной воде. Пробирки Li-Herapin с кровью осторожно переворачивали 2 или 3 раза для хорошего перемешивания и затем помещали в штатив в ледяной воде до центрифугирования ( $\leq 1$  ч). Пробирки центрифугировали при  $\sim 2000 \times g$  в течение 10 мин в охлаждаемой центрифуге для отделения плазмы от эритроцитов. Плазму немедленно переносили в пробирки Эппендорфа, которые затем помещали в ледяную воду. Все образцы замораживали на сухом льду в течение  $\sim 1$  ч. Образцы хранили при минус  $80^\circ\text{C}$  до анализа методом ЖХ-МС/МС.

Пример 49. Способы фармакокинетических исследований у крыс.

Самцов крыс Sprague Dawley (SD) весом 225-249 г акклиматизировали в течение по меньшей мере двух дней перед экспериментом. За день до эксперимента крыс взвешивали для определения среднего объема дозирования EIDD-2801. Для введения через желудочный зонд EIDD-2801 растворяли в 10% ПЭГ 400, 2,5% Cremophor RH40 в воде в концентрации 64 мг/мл и вводили в дозе 5 мл/кг. Трех крыс умерщв-

ляли, каждый раз путем удушения диоксидом углерода. Ткани и плазму собирали через 1, 2, 4, 6, 8 и 24 ч после введения дозы. Одной крысе вводили носитель и умерщвляли путем удушения через 6 ч после введения дозы. Плазму собирали у каждого животного путем разрезания аорты для сбора приблизительно 0,3 мл цельной крови в пробирку с литий-гепарином. Кровь центрифугировали при 2000 × g в течение 10 мин при 5°C. Затем плазму переносили в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и хранили при минус 80°C до анализа. У каждой крысы отбирали мозг, селезенку, легкое, почку, печень и сердце. Ткани быстро замораживали в жидком азоте и хранили при минус 80°C. По 30-70 мг кусочков замороженной животной ткани взвешивали в 2 мл толстостенных пробирках и регистрировали вес. Образцы гомогенизировали в 70% ацетонитриле в воде, которая включала EIDD-1931, меченную <sup>13</sup>C<sub>5</sub>, и EIDD-1931-TP, меченную <sup>13</sup>C<sub>5</sub>, в качестве внутренних стандартов, при 4°C, используя шаровой гомогенизатор Omni-ruptor (Omni International, Inc., Kennesaw, GA). Гомогенаты переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл и центрифугировали в течение 5 мин при 15000 об/мин в центрифуге Eppendorf 5415D (Eppendorf, Гамбург, Германия) для удаления крупных твердых частиц. Супернатант затем переносили в новые микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл и снова центрифугировали в центрифуге Eppendorf 5415D в течение 10 мин при 15000 об/мин для удаления любых оставшихся твердых веществ. Оставшийся супернатант переносили во флакон ЖХМС и анализировали с помощью ЖХМС-МС.

Аликвоты плазмы крыс экстрагировали ацетонитрилом, который включал EIDD-1931, меченный <sup>13</sup>C<sub>5</sub>, в качестве внутреннего стандарта. Образцы осветляли центрифугированием в центрифуге Eppendorf 5415D в течение 10 мин при 15000 об/мин. Осветленные супернатанты переносили во флаконы для ВЭЖХ для анализа с использованием квалифицированного способа ВМ-106.

Образцы выдерживали при 4°C в автосамплере Leap Pal (CTC Analytics AG, Zwingen, Швейцария). Разделение в ВЭЖХ проводили на системе Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, США), оборудованной нагревателем колонки, УФ-лампой и бинарным насосом. Для образцов ткани использовали колонку SeQuant ZIC-pHTLIC (100×4,6 мм, 5 мкм) (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) для разделения EIDD-1931, EIDD-2781, EIDD-2061, АТР, <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-меченого-EIDD-1931 и <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-меченого-EIDD-1931-TP. Подвижная фаза А состояла из 25 мМ бикарбонатного буфера аммония в воде класса ВЭЖХ, pH 9,8, а подвижная фаза В состояла из чистого ацетонитрила. Для разделения аналитов применялся 8,5-минутный изократический метод ВЭЖХ на 35% подвижной фазы А. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре QTRAP 5500 (AB Sciex, Framingham, MA, USA) с использованием ионизации электрораспылением в отрицательном режиме (ESI) в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Для анализа EIDD-2801 использовали колонку Acclaim Polar Advantage II (3,0×50 мм, размер частиц 3 мкм) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Подвижная фаза А состояла из 100 мМ буфера с формиатом аммония в воде класса ВЭЖХ, а подвижная фаза В состояла из чистого ацетонитрила. Применяли градиентный метод с 5-100% подвижной фазы В в течение 3 мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре QTRAP 5500 (AB Sciex, Framingham, MA, USA) с использованием ионизации электрораспылением в положительном режиме (ESI) в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Для образцов плазмы для разделения EIDD-1931, EIDD-2801 и меченого <sup>13</sup>C<sub>5</sub> 1931, использовали колонку SeQuant ZIC-pHILIC (100×4,6 мм, 5 мкм) (Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Подвижная фаза А состояла из 25 мМ бикарбонатного буфера аммония в воде класса ВЭЖХ, pH 9,8, а подвижная фаза В состояла из чистого ацетонитрила. Для разделения аналитов использовали 4,5-минутный способ изократической ВЭЖХ на 35% подвижной фазы А. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре QTRAP 5500 (AB Sciex, Framingham, MA, USA) с использованием ионизации электрораспылением в отрицательном режиме (ESI) в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения (AB Sciex, Framingham, MA, USA).

Пример 50. Способы фармакокинетических исследований у собак.

Собак, подвергавшихся экспериментальному воздействию (от Marshall Biosciences) в возрасте от 6,5 до 6,8 месяцев и весом от 7,1 до 7,95 акклиматизировали по отношению к окружению по меньшей мере за три дня до первого события дозирования. Последующие дозирования проводились после 7-дневного периода вымывания. Собак взвешивали по меньшей мере один раз перед каждым дозированием для определения объема дозирования. EIDD-1931 растворяли в стерильном физиологическом растворе при 8 мг/мл для внутривенного дозирования. Для перорального введения EIDD-2801 ресуспендировали в 1% (об./об.) метилцеллюлозе в воде при концентрациях 6, 20 и 60 мг/мл. Для внутривенного дозирования собакам вводили дозу 1 мл/кг, а пероральное дозирование проводилось с объемом дозы 5 мл/кг. Образцы крови от собак, получавших препарат через желудочный зонд, собирали до введения дозы и через 0,25, 0,50, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 18 и 24 часа после введения дозы. Образцы крови от собак, получавших препарат внутривенно, собирали до введения дозы и через 0,083, 0,25, 0,50, 1, 2, 4, 6, 8, 12 и 24 часа после введения дозы. Образцы крови отбирали из яремной и/или головной вены в литий-гепариновые микропробирки, центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин при 5°C и плазму переносили в свежие пробирки и хранили при минус 80°C перед обработкой для количественного определения с помощью ЖХ-МС/МС. Аликвоты плазмы собак по 50 мкл экстрагировали 950 мкл ацетонитрила, который включал EIDD-1931,

меченный  $^{13}\text{C}_5$ , в качестве внутреннего стандарта. Образцы осветляли центрифугированием при 20000 g при 4°C в течение 5 мин. Осветленные супернатанты переносили во флаконы для ВЭЖХ для анализа. Образцы выдерживали при 4°C в автосамплере Leap Pal (CTC Analytics AG, Zwingen, Швейцария). Разделение в ВЭЖХ проводили на системе Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, США), оборудованной нагревателем колонки, УФ-лампой и бинарным насосом. Колонку SeQuant ZIC-pHTLIC (100×4,6 мм, 5 мкм) (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) использовали для разделения EIDD-1931, EIDD-2801 и EIDD-1931, меченного  $^{13}\text{C}_5$ . Подвижная фаза А состояла из 25 мМ аммонийного бикарбонатного буфера в воде класса ВЭЖХ, pH 9,8, а подвижная фаза В состояла из чистого ацетонитрила. Для разделения аналитов применяли 4-минутный способ изократической ВЭЖХ на 35% подвижной фазы А. Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре QTRAP 5500 (AB Sciex, Farmingham, MA, США) с использованием ионизации электрораспылением в отрицательном режиме (ESI) в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Analyst (AB Sciex, Farmingham, MA, США). Параметры ФК рассчитывались с использованием инструмента для некомпартментного анализа Phoenix WinNonLin 6.4 (Вариант программы 6.4.0.768) (Certara, Princeton, NJ, USA). Биодоступность EIDD-2801 рассчитывается путем сравнения воздействия (AUC-inf) EIDD-1931 после перорального введения EIDD-2801 с воздействием EIDD-1931 после внутривенного введения EIDD-1931 по следующей формуле:

$$\text{Доза}_{\text{в/в}} \text{AUC}_{\text{п/о}}$$

$$\text{Пероральная биодоступность} = \frac{\text{Доза}_{\text{п/о}} \text{AUC}_{\text{в/в}}}{\text{Доза}_{\text{в/в}} \text{AUC}_{\text{п/о}}} \times 100\%$$

$$\text{Доза}_{\text{п/о}} \text{AUC}_{\text{в/в}}$$

Пример 51. Стабильность EIDD-2800, 2801 и 2898 в плазме и микросомах печени.

Субстрат	Вид	$t_{1/2}$ (мин)	$t_{1/2}$ (мин)
		в плазме	в микросомах печени
EIDD-2800	Мышь	1	< 1
	Обезьяна	2	2
	Человек	1	1
EIDD-2801	Мышь	1	2
	Крыса	1	5
	Собака	192	1
	Обезьяна	24	1
	Человек	63	73
EIDD-2898	Мышь	144	6
	Обезьяна	138	13
	Человек	198	14

Пример 52. Фармакокинетические параметры у мышей.

Фармакокинетические параметры в плазме для EIDD-1931 и EIDD-2898 у мышей после однократных доз EIDD-2898

Доза EIDD-2989	Исслед. ве щ-во	$t_{\text{max}}$	$C_{\text{max}}$	AUC <sub>inf</sub>	$t_{1/2}$
мг/кг		(час)	(нмоль/мл)	(час·нмоль/мл)	(час)
15	1931	0,25	11	10,2	2,9
	2898	0,08	23,1	8,23	0,34
225	1931	0,5	69,3	83,4	4,2
	2989	0,5	7,61	9,57	3,1
750	1931	0,5	71,3	228,9	5,2
	2989	0,25	7,3	21,9	6,7

Пример 53. Фармакокинетические параметры у мышей.

Фармакокинетические параметры в тканях для EIDD-1931 и EIDD-2061 (EIDD-1931-5'-трифосфат) у мышей после однократных доз EIDD-2898

Доза EIDD- 2898	Исслед. вещ-во	Селезенка		Мозг		Легкое	
		AUC <sub>0→t</sub>	C <sub>max</sub>	AUC <sub>0→t</sub>	C <sub>max</sub>	AUC <sub>0→t</sub>	C <sub>max</sub>
мг/кг		(час· нмоль/г)	(нмоль/ г)	(час· нмоль/г)	(нмоль/ г)	(час· нмоль/г)	(нмоль/г)
225	1931	536,4	285,1	202,4	12,6	113,4	76,7
	2061	110,8	9,9	63,1	3,5	35,0	2,5
750	1931	1420,8	373,1	107,9	18,8	386,9	82,4
	2061	257,0	24,7	64,1	5,5	120,2	10,9

Пример 54. Фармакокинетические параметры у мышей.

Фармакокинетические параметры в плазме для EIDD-1931 у мышей после однократной дозы EIDD-2800 (180 мг/кг). Ни в одной временной точке не был отмечен EIDD-2800 (исходное вещество).

Исследуемое вещество	t <sub>max</sub>	C <sub>max</sub>	AUC <sub>inf</sub>	t <sub>1/2</sub>
	(час)	(нмоль/мл)	(час·нмоль/мл)	(h)
EIDD-1931	0,5	11,4	42,5	1,86

Пример 55. Фармакокинетические параметры у собак.

Фармакокинетические параметры в плазме для EIDD-1931 у собак после однократной дозы EIDD-2800 (140 мг/кг). Ни в одной временной точке не был отмечен EIDD-2800 (исходное вещество).

Исследуемое вещество	t <sub>max</sub>	C <sub>max</sub>	AUC <sub>inf</sub>	t <sub>1/2</sub>
	(час)	(нмоль/мл)	(час·нмоль/мл)	(h)
EIDD-1931	1,4 ± 0,5	112,8 ± 21,1	497,7 ± 40,4	4,8 ± 1

Пример 56. Протокол оценки EIDD-2801 на модели интраназальной инфекции VEEV у мышей.

Для этого исследования использовали самок мышей CD-1 возрастом 7-8 недель. Вирус венецуэльского энцефаломиелита лошадей VEEV, штамм Trinidad donkey, первоначально получали из Центров по контролю за заболеваниями, дополнительно пассировали один раз на клетках Vero для размножения вируса и титровали методом бляшек. Остатки инокулята, использованного для эксперимента, после титрования подвергали обратному титрованию для подтверждения доставленной дозы. Мышей случайным образом распределяли по группам из 10 животных. Заражение вирусом осуществлялось интраназальным введением ~100 БОЕ вируса, что соответствует ~100 LD<sub>50</sub>, в объеме 25 мкл PBS, этот объем вводили в две ноздри под анестезией с применением кетамин-ксилазина. EIDD-2801 вводили перорально путем кормления через желудочный зонд дважды в день в течение 6 дней. Первое лечение проводили через 6 ч после заражения вирусом, затем последующее лечение проводили каждые 12 ч (дважды в день), начиная с 12 ч после заражения (всего 13 доз, 6 дней лечения). После заражения вирус из инокулята подвергали обратному титрованию для подтверждения дозы.

Животным препарат вводили через желудочный зонд с использованием стерильной иглы для желудочного зондирования. Титры вируса в сыворотке и мозге анализировали с использованием стандартного анализа бляшек под агаром: вводили в клетки Vero по 0,1 мл серийных разведений гомогената сыворотки или мозга и культивировали в 6-луночных планшетах. Бляшки подсчитывали через ~48 ч после инокуляции и рассчитывали титры в пересчете на мл сыворотки или грамм мозга. Предел обнаружения этого анализа составлял 100 бляшек на мл или на грамм. Выживаемость животных анализировали с использованием теста Log-rank (Mantel-Cox), теста Logrank для тренда и теста Gehan-Breslow-Wilcox для сравнения групп (все части Prism 6, GraphPad Software, Inc.).

Пример 57. Результаты дозирования EIDD-2801 на модели интраназальной инфекции VEEV у мышей.

Мышей, инфицированных путем интраназального введения VEEV, лечили четырьмя различными уровнями дозы EIDD-2801. Влияние лечения на выживаемость показано на фиг. 18.

Пример 58. Протокол для оценки времени лечения при помощи of EIDD-2801 на модели интраназальной инфекции VEEV у мышей.

Для этого исследования использовали самок мышей ICR возрастом 7-8 недель. Вирус VEEV, штамм Trinidad donkey, пассировали один раз на клетках Vero для размножения вируса и титровали методом бляшек. Остатки инокулята, использованного для эксперимента, после титрования подвергали обратному титрованию для подтверждения доставленной дозы. Мышей случайным образом распределяли по группам из 10 животных. Заражение вирусом представляло собой интраназальное введение ~100 БОЕ виру-

са, что соответствует  $\sim 100 LD_{50}$ , в объеме 25 мкл PBS, этот объем вводили в две ноздри под анестезией с применением кетамин-ксилазина. EIDD-2801 вводили перорально путем кормления через желудочный зонд. Лечение начинали через 6, 24, 48 или 72 ч после заражения и продолжали два раза в сутки (каждые 12 ч) в течение 6 дней независимо от времени начала. Контрольную группу с носителем (группа 6) обрабатывали таким же способом, только носителем (10% PEG-400, 2,5% Cremophor RH 40 в воде). Титры вируса в сыворотке и мозге анализировали с использованием стандартного анализа бляшек: вводили в клетки Vero по 0,1 мл серийных разведений гомогената сыворотки или мозга и культивировали в 6-луночных планшетах. Бляшки подсчитывали через  $\sim 48$  ч после инокуляции и рассчитывали титры в пересчете на мл сыворотки или грамм мозга. Предел обнаружения этого анализа составлял 100 бляшек на мл или на грамм. Выживаемость животных анализировали с использованием теста Log-rank (Mantel-Cox) для сравнения групп (Prism 6, GraphPad Software, Inc.).

Пример 59. Результаты оценки времени лечебного дозирования EIDD-2801 на модели интраназальной инфекции VEEV у мышей.

Мышей, инфицированных интраназально VEEV, лечили EIDD-2801 (600 мг/кг). Влияние задержки начала лечения на выживаемость показано на фиг. 19.

Пример 60. Протокол оценки профилактического лечения при помощи EIDD-2801 на модели инфекции SARS у мышей.

Самок и самцов мышей C57BL/6J в возрасте 20 недель использовали после периода акклиматизации в течение пяти дней или более в BSL3. Для каждого пола животных случайным образом распределяли по группам лечения и индивидуально маркировали перфорацией ушей. Исходный вирусный материал, использованный для этих исследований, был получен из инфекционного клона адаптированного к мышам штамма SARS-CoV MA15 (MA15). После электропорации клеток Vero E6 вирусной геномной РНК из SARS MA15 супернатант собирали, когда на монослое регистрировалось больше 80% ЦПД. Полученный исходный материал дважды пассировали на клетках Vero E6 для получения рабочего исходного материала с титром  $6,3 \times 10^7$  БОЕ/мл.

Большую левую долю легкого каждой мыши отбирали в пробирку с винтовой крышкой объемом 2 мл, содержащую стеклянные шарики и 1 мл PBS. Этот образец замораживали при минус  $80^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа на бляшки. За 24 ч до проведения анализа на бляшки засеивали 6-луночные планшеты клетками Vero E6 при 500000 клеток/луночку/2 мл. Клетки инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в 5%  $\text{CO}_2$  в течение 24 ч. В день анализа легкие гомогенизировали, используя Roche Magnalyzer, гомогенаты легких осветляли центрифугированием при более  $10000 \times g$ , серийно разводили в PBS, добавляли к монослоям клеток Vero E6 и инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  с 5%  $\text{CO}_2$  в течение часа, после чего клетки покрывали средой, содержащей 0,8% агарозы. Через два дня для визуализации бляшек монослой окрашивали красителем нейтральный красный, определяющим жизнеспособность клеток. Подсчитывали количество бляшек на одно разведение вируса для получения показателя количества бляшкообразующих единиц на долю легкого (БОЕ/долю).

Для этих исследований использовалось эквивалентное количество самцов и самок SPF C57BL/6J в возрасте 20-25 недель (Stock 000664 Jackson Labs). Мыши были случайным образом распределены в каждую группу лечения. Группы, инфицированные SARS-CoV, состояли из 10 мышей (5 самцов/5 самок). Чтобы контролировать потенциальные эффекты, связанные с пероральным введением дозы на вес животного или функцию легких, а также влияние тестируемого соединения, также были включены две меньшие группы, инфицированные "плацебо" ( $n=6$ , 3 самца и 3 самки в каждой группе). EIDD-2801 или контроль носителя вводили через желудочный зонд (перорально) два раза в день. Первую дозу вводили за 2 ч перед заражением вирусом; вторую дозу через 12 ч после инфицирования, а затем каждые 12 ч в течение 5 дней; всего было 10 доз. Мышей перед интраназальным заражением дозой  $1 \times 10^4$  бляшкообразующих единиц (БОЕ) штамма SARS-CoV MA15 в 0,05 мл, разведенного в PBS, анестезировали смесью кетамин/ксилазин в момент заражения. Всех мышей ежедневно взвешивали, а подгруппы мышей в течение 5 дней после заражения ежедневно анализировали при помощи плетизмографии всего тела (4 мыши, 2 самца и 2 самки на группу лечения) для определения легочной функции. После умерщвления на 5-й день после заражения легкие оценивали по шкале кровоизлияния в легкие. Затем ткань удаляли для определения титра вируса в легких и патологических исследований. Большую левую долю собирали для определения титра вируса, а нижнюю правую долю собирали для патологических исследований. Плетизмография всего тела. Легочную функцию контролировали один раз в день с помощью плетизмографии всего тела (Buxco Respiratory Solutions, DSI Inc.). Мыши, предназначенные для этого анализа, были отобраны до заражения. Вкратце, после 30-минутного времени акклиматизации в плетизмографе записывали данные по 11 параметрам каждые 2 с в течение 5 мин.

Статистический анализ. Весь статистический анализ данных был выполнен в Graphpad Prism 7. Статистическую значимость для каждой конечной точки определяли с помощью специальных статистических тестов. Для каждого теста считалось значимым значение  $p < 0,05$ . Для начального веса в процентах и плетизмографии всего тела проводили двусторонний тест ANOVA и множественный сравнительный тест Даннета. Для кровоизлияния в легкие и титра вируса в легких проводили одностороннюю ANOVA с множественным сравнительным тестом Крускалла-Уоллеса.

Пример 61. Результаты профилактического дозирования EIDD-2801 на модели инфекции SARS у мышей.

Мышей, инфицированных SARS, лечили профилактически при помощи EIDD-2801. Влияние лечения на титры вируса в легких показано на фиг. 20.

Пример 62. Протокол для оценки времени лечения при помощи EIDD-2801 на модели инфекции SARS у мышей.

Самок и самцов мышей C57BL/6J в возрасте 25-29 недель использовали после периода акклиматизации в течение пяти дней или более в BSL3. Для каждого пола животных случайным образом распределяли по группам лечения и индивидуально маркировали перфорацией ушей. Исходный вирусный материал, использованный для этих исследований, был получен из инфекционного клона адаптированного к мышам штамма SARS-CoV MA15 (MA15), который был создан в Baric Laboratory. После электропорации клеток Vero E6 вирусной геномной РНК из SARS MA15 супернатант собирали, когда на монослое регистрировалось больше 80% ЦПД. Полученный исходный материал дважды пассировали на клетках Vero E6 для получения рабочего исходного материала с титром  $6,3 \times 10^7$  БОЕ/мл. Нижнюю долю правого легкого каждой мыши отбирали в пробирку с винтовой крышкой объемом 2 мл, содержащую стеклянные шарики и 1 мл PBS. Этот образец замораживали при минус 80°C до проведения анализа на бляшки. За 24 ч до проведения анализа на бляшки засеивали 6-луночные планшеты клетками Vero E6 при 500000 клеток/луноку/2 мл. Клетки инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. В день анализа легкие гомогенизировали, используя Roche Magnalyzer, гомогенаты легких осветляли центрифугированием при более 10000 × g, серийно разводили в PBS, добавляли к монослоям клеток Vero E6 и инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение часа, после чего клетки покрывали средой, содержащей 0,8% агарозы. Через два дня для визуализации бляшек монослой окрашивали красителем нейтральный красный, определяющим жизнеспособность клеток. Подсчитывали количество бляшек на одно разведение вируса для получения показателя количества бляшкообразующих единиц на долю легкого (БОЕ/долю). Для этих исследований использовалось эквивалентное количество самцов и самок SPF C57BL/6J в возрасте 25-29 недель. Мыши были случайным образом распределены в каждую группу лечения. Группы, инфицированные SARS-CoV, состояли из 10 мышей (5 самцов/5 самок). EIDD-2801 или контроль носителя вводили через желудочный зонд (перорально) два раза в день. Дозирование начинали в часовые точки минус 2 ч, 12 ч, 24 ч или 48 ч по отношению ко времени заражения вирусом. Мышей перед интраназальным заражением дозой  $1 \times 10^4$  бляшкообразующих единиц (БОЕ) штамма SARS-CoV MA15 в 0,05 мл, разведенного в PBS, анестезировали смесью кетамин/ксилазин в момент заражения. Всех мышей ежедневно взвешивали, а подгруппу мышей ежедневно анализировали при помощи плетизмографии всего тела (4 самки на группу лечения) для определения легочной функции. После умерщвления на 5-й день после заражения легкие оценивали по шкале кровоизлияния в легкие. Затем ткань удаляли для определения титра вируса в легких и патологических исследований. Большую левую долю собирали для патологических исследований, а нижнюю левую долю собирали для определения титра вируса. Легочную функцию контролировали один раз в день с помощью плетизмографии всего тела (Vuxco Respiratory Solutions, DSI Inc.)

Мыши, предназначенные для этого анализа, были отобраны до заражения. Вкратце, после 30-минутного времени акклиматизации в плетизмографе данные по 11 параметрам записывались каждые 2 с в течение 5 мин. Весь статистический анализ данных был выполнен в Graphpad Prism 7. Статистическую значимость для каждой конечной точки определяли с помощью специальных статистических тестов. Для каждого теста считалось значимым значение  $p < 0,05$ . Для начального веса и плетизмографии всего тела проводили двусторонний тест ANOVA и множественный сравнительный тест Даннета. Для кровоизлияния в легкие и вирусного титра в легких проводили односторонний анализ ANOVA с множественным сравнительным тестом Крускал-Уоллеса.

Пример 63. Результаты терапевтического дозирования EIDD-2801 на модели инфекции SARS у мышей.

Мышей, инфицированных SARS, лечили при помощи EIDD-2801. Влияние лечения на показатели кровоизлияния в легких и титры вируса в легких показано на фиг., соответственно, 21 и 22.

Пример 64. Протокол для оценки терапевтического лечения при помощи EIDD-2801 на модели инфекции MERS у мышей.

Самок и самцов мышей C57BL/6J 288/330 DPP4 в возрасте 10-11 недель, которые были выведены и выращены в Baric Laboratory, использовали после периода акклиматизации в течение пяти дней или более в BSL3. Для каждого пола животных случайным образом распределяли по группам лечения и индивидуально маркировали перфорацией ушей. Исходный вирусный материал, использованный для этих исследований, был получен из инфекционного клона очищенного из бляшки изолята, адаптированного к мышам штамма MERS-CoV r35C4 (MERS), который был создан в Baric Laboratory. После выделения бляшек вирус пассировали дважды на клетках Vero CC81. Исходный титр составил  $1, 1 \times 10^8$  БОЕ/мл. Нижнюю долю правого легкого каждой мыши отбирали в пробирку с винтовой крышкой объемом 2 мл, содержащую стеклянные шарики и 1 мл PBS. Этот образец замораживали при минус 80°C до проведения анализа на бляшки. За 24 ч до проведения анализа на бляшки засеивали 6-луночные планшеты клетками

Vero CC81 при 500000 клеток/лунку/2 мл. Клетки инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. В день анализа легкие гомогенизировали, используя Roche Magnalyzer, гомогенаты легких осветляли центрифугированием при более 10000 × g, серийно разводили в PBS, добавляли к монослоям клеток Vero CC81 и инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение часа, после чего клетки покрывали средой, содержащей 0,8% агарозы. Через три дня для визуализации бляшек монослои окрашивали красителем нейтральный красный, определяющим жизнеспособность клеток. Подсчитывали количество бляшек на одно разведение вируса для получения показателя количества бляшкообразующих единиц на долю легкого (БОЕ/долю). Для этих исследований эквивалентное количество самцов и самок мышей C57BL/6J 288/330 DPP4 в возрасте 10-11 недель случайным образом распределяли в каждую группу лечения. Каждая группа состояла из 10 мышей (5 самцов/5 самок). EIDD-2801 или контроль носителя вводили через желудочный зонд (перорально) два раза в день, начиная в часовые точки минус 2 ч и затем каждые 12 ч. Мышей перед интраназальным заражением дозой 5×10<sup>4</sup> бляшкообразующих единиц (БОЕ) штамма MERS в 0,05 мл, разведенного в PBS, анестезировали смесью кетамин/ксилазин в момент заражения. Всех мышей ежедневно взвешивали, а подгруппу мышей ежедневно анализировали при помощи плетизмографии всего тела (4 самки на группу лечения) для определения легочной функции. После умерщвления на 5-й день после заражения легкие оценивали по шкале кровоизлияния в легкие. Затем ткань удаляли для определения титра вируса в легких и патологических исследований. Большую левую долю собирали для определения титра вируса. Легочную функцию контролировали один раз в день с помощью плетизмографии всего тела (Vuxco Respiratory Solutions, DSI Inc.). Мыши, предназначенные для этого анализа, были отобраны до заражения. Вкратце, после 30-минутного времени акклиматизации в плетизмографе данные по 11 параметрам записывались каждые 2 секунды в течение 5 мин.

Весь статистический анализ данных был выполнен в Graphpad Prism 7. Статистическую значимость для каждой конечной точки определяли с помощью специальных статистических тестов. Для каждого теста считалось значимым значение  $p < 0,05$ . Для начального веса в процентах и плетизмографии всего тела проводили двусторонний тест ANOVA и множественный сравнительный тест Даннета. Для кровоизлияния в легкие проводили односторонний анализ ANOVA с множественным сравнительным тестом Крускал-Уоллеса.

Пример 65. Результаты терапевтического дозирования EIDD-2801 на модели инфекции MERS у мышей.

Мышей, зараженных MERS, лечили при помощи EIDD-2801. Влияние лечения на показатели кровоизлияния в легкие описаны на фиг. 23.

Пример 66. Способ оценки включения клеткой и метаболизма EIDD-2801 в клетках Vero.

На три 24-луночных планшета высевали первичные клетки Vero при плотности посева 0,350×10<sup>6</sup>/мл жизнеспособных клеток на лунку. Планшеты инкубировали при 37°/5% CO<sub>2</sub> в течение ночи для прикрепления клеток. Готовили 40 мМ раствор EIDD-2801 в 100% ДМСО. Из 40 мМ исходного раствора готовили 20 мкМ раствор EIDD-2801 в 25 мл полной среды DMEM. Для планшетов с обработкой соединением среду удаляли, и в соответствующие лунки добавляли по 1,0 мл 20 мкМ EIDD-2801 в полной среде DMEM. Готовили отдельный планшет с клетками без добавления соединения. Затем планшеты инкубировали при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в следующие временные точки: 1, 2, 3, 4, 6, 16 и 24 часа. Необработанный планшет брали для исследования в точке 0 ч. После инкубации в выбранные моменты времени клетки промывали 2 раза 1,0 мл DPBS. Клетки экстрагировали путем добавления 500 мкл 70% ацетонитрила/30% воды с добавлением внутреннего стандарта в каждую лунку, обработанную EIDD-2801. Необработанный контрольный планшет экстрагировали 500 мкл 70% ацетонитрила/30% воды на лунку. Образцы несколько раз перемешивали путем пипетирования. Образцы переносили в помеченные микроцентрифужные пробирки. Образцы центрифугировали при 16000 × g в течение 10 мин при 4°C. 300 мкл супернатанта переносили в меченые ВЭЖХ флаконы и образцы хранили при минус 80°C или отправляли в группу VCDMPK для анализа методом ЖХ-МС/МС.

Пример 67. Результаты включения клеткой и метаболизма EIDD-2801 в клетках Vero.

Исследуемое соединение	C <sub>max</sub>	t <sub>max</sub>	AUC <sub>0-1</sub>
Исследуемое соединение	(пмоль/М клеток)	(час)	(пмоль-час/М клеток)
EIDD-1931 (нуклеозид)	13,5	24	228,6
EIDD-2061 (трифосфат)	872,0	16	13850
EIDD-2801 (исходное вещество)	121,2	3	1724

Пример 68. Способ оценки включения клеткой и метаболизма EIDD-2801 в клетках Huh-7.

На четыре 24-луночных планшета высевали клетки Huh-7 при плотности посева 0,35 ×10<sup>6</sup>/мл жизнеспособных клеток на лунку. Планшеты инкубировали при 37°/5% CO<sub>2</sub> в течение ночи для прикрепления клеток. Готовили 40 мМ исходный раствор EIDD-2801 в 100% ДМСО. Из 40 мМ раствора готовили

20 мкМ раствор EIDD-2801 в 25 мл полной среды DMEM путем внесения в среду 12,5 мкл EIDD-2801. Для планшетов с обработкой соединением среду удаляли, и в соответствующие лунки добавляли по 1,0 мл 20 мкМ раствора EIDD-2801 в полной среде DMEM. Готовили отдельный планшет с клетками без добавления соединения, аспирацию и добавление среды проводили без добавления соединения. Затем планшеты инкубировали при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в следующие временные точки: 1, 2, 3, 4, 6, 16 и 24 ч. Необработанный планшет брали для исследования в точке 0 ч. После инкубации в выбранные моменты времени клетки промывали 2 раза 1,0 мл DPBS. Клетки экстрагировали путем добавления 500 мкл 70% ацетонитрила/30% воды с добавлением внутреннего стандарта в каждую лунку, обработанную EIDD-2801. Необработанный контрольный планшет экстрагировали 500 мкл 70% ацетонитрила/30% воды на лунку без внутреннего стандарта. Образцы несколько раз перемешивали путем пипетирования. Образцы переносили в помеченные микроцентрифужные пробирки. Образцы центрифугировали при 16000 × g в течение 10 мин при 4°C. 350 мкл супернатанта переносили в меченые 5-мл пробирки или, если образцы не были полностью высушены, в меченые ВЭЖХ флаконы. Образцы хранили при минус 80°C или отправляли в группу VCDMPK для анализа методом ЖХ-МС/МС.

Пример 69. Результаты включения клеткой и метаболизма EIDD-2801 в клетках Huh-7.

Исследуемое соединение	C <sub>max</sub>	t <sub>max</sub>	AUC <sub>0-∞</sub> t
Исследуемое соединение	(пмоль/М клеток)	(час)	(пмоль-час/М клеток)
EIDD-1931 (нуклеозид)	29,0	24	449,2
EIDD-2061 (трифосфат)	1113,3	24	14640
EIDD-2801 (исходное вещество)	77,5	2	1025

Пример 70. Способ оценки включения клеткой и метаболизма EIDD-2801 в клетках HepG2.

На три 24-луночных планшета высевали первичные клетки Vero при плотности посева 0,350×10<sup>6</sup>/мл жизнеспособных клеток на лунку. Планшеты инкубировали при 37°/5% CO<sub>2</sub> в течение ночи для прикрепления клеток. Готовили 40 мМ исходный раствор EIDD-2801 в 100% ДМСО. Из 40 мМ раствора готовили 20 мкМ раствор EIDD-2801 в 25 мл полной среды RPMI. Для планшетов с обработкой соединением среду удаляли, и в соответствующие лунки добавляли по 1,0 мл 20 мкМ EIDD-2801 в полной среде RPMI. Готовили отдельный планшет с клетками без добавления соединения. Затем планшеты инкубировали при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в следующие временные точки: 1, 2, 3, 4, 6, 16 и 24 ч. Необработанный планшет брали для исследования в точке 0 ч. После инкубации в выбранные моменты времени клетки промывали 2 раза 1,0 мл DPBS. Клетки экстрагировали путем добавления 500 мкл 70% ацетонитрила/30% воды с добавлением внутреннего стандарта в каждую лунку, обработанную EIDD-2801. Необработанный контрольный планшет экстрагировали 500 мкл 70% ацетонитрила/30% воды на лунку. Образцы несколько раз перемешивали путем пипетирования. Образцы переносили в помеченные микроцентрифужные пробирки. Образцы центрифугировали при 16000 × g в течение 10 мин при 4°C. 300 мкл супернатанта переносили в меченые ВЭЖХ флаконы и образцы хранили при минус 80°C или отправляли в группу VCDMPK для анализа методом ЖХ-МС/МС.

Пример 71. Результаты включения клеткой и метаболизма EIDD-2801 в клетках HepG2.

Исследуемое соединение	C <sub>max</sub>	t <sub>max</sub>	AUC <sub>0-∞</sub> t
Исследуемое соединение	(пмоль/М клеток)	(час)	(пмоль-час/М клеток)
EIDD-1931 (нуклеозид)	13,4	16	249,8
EIDD-2061 (трифосфат)	470,3	16	299,8
EIDD-2801 (исходное вещество)	18,9	3	360,3

Пример 72. Способ оценки включения клеткой и метаболизма EIDD-2801 в клетках CEM.

На три 24-луночных планшета высевали первичные клетки Vero при плотности посева 2×10<sup>6</sup>/мл жизнеспособных клеток на лунку. Планшеты инкубировали при 37°/5% CO<sub>2</sub> в течение ночи для прикрепления клеток. Готовили 40 мМ исходный раствор EIDD-2801 в 100% ДМСО. Из 40 мМ раствора готовили 40 мкМ раствор EIDD-2801 в 25 мл полной среды RPMI. Для планшетов с обработкой соединением среду удаляли, и в соответствующие лунки добавляли по 1,0 мл 40 мкМ EIDD-2801 в полной среде RPMI. Готовили отдельный планшет с клетками без добавления соединения. Затем планшеты инкубировали при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в следующие временные точки: 1, 2, 3, 4, 6, 16 и 24 ч. Необработанный планшет брали для исследования в точке 0 ч. После инкубации в выбранные моменты времени клетки промывали 2 раза 1,0 мл DPBS. Клетки экстрагировали путем добавления 500 мкл 70% ацетонитрила/30% воды с добавлением внутреннего стандарта в каждую лунку, обработанную EIDD-2801. Необработанный контрольный планшет экстрагировали 500 мкл 70% ацетонитрила/30% воды на лунку. Образцы несколько раз перемешивали путем пипетирования. Образцы переносили в помеченные микроцентрифужные про-

бирки. Образцы центрифугировали при  $16000 \times g$  в течение 10 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . 300 мкл супернатанта переносили в меченые ВЭЖХ флаконы и образцы хранили при минус  $80^{\circ}\text{C}$  или отправляли в группу ВCDMPK для анализа методом ЖХ-МС/МС.

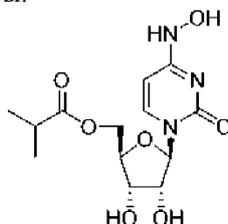
Пример 73. Результаты включения клеткой и метаболизма EIDD-2801 в клетках СЕМ.

Исследуемое соединение	$C_{\max}$	$t_{\max}$	$AUC_{0 \rightarrow t}$
Исследуемое соединение	(пмоль/М клеток)	(час)	(пмоль-час/М клеток)
EIDD-1931 (нуклеозид)	0,3	3	5,8
EIDD-2061 (трифосфат)	171,3	24	2355
EIDD-2801 (исходное вещество)	5,4	4	85,3

Специалистам в данной области техники будет очевидно, что различные модификации и изменения могут быть сделаны в настоящем изобретении без отклонения от объема или сущности изобретения. Другие варианты воплощения изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники из рассмотрения описания и практического применения изобретения, раскрытого в данном документе. Предполагается, что описание и примеры будут рассматриваться только как иллюстративные, с истинным объемом и духом изобретения, указанными в нижеизложенной Формуле изобретения.

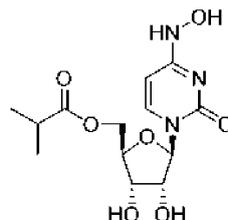
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и соединение следующей структуры:



или его фармацевтически приемлемую или физиологически приемлемую соль.

2. Способ лечения или предупреждения заболевания, вызываемого коронавирусом человека, коронавирусом SARS, коронавирусом MERS, вирусом восточного лошадиного энцефалита, вирусом западного лошадиного энцефалита, вирусом венесуэльского энцефалита лошадей, вирусом чикунгунья, инфекцией Росс-ривер, вирусом Orthomyxoviridae, вирусом Paramyxoviridae, вирусом RSV, вирусом гриппа А и вирусом гриппа В, вирусом Filoviridae или инфекцией вируса Эбола у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения структуры



или его фармацевтически приемлемой или физиологически приемлемой соли.

3. Способ по п.2, где указанное заболевание вызвано коронавирусом человека, коронавирусом SARS или коронавирусом MERS.

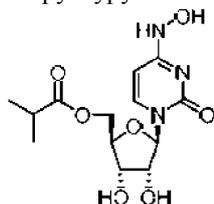
4. Способ по п.2, где указанное заболевание вызвано коронавирусом человека.

5. Способ по п.2, где указанное заболевание вызвано коронавирусом SARS.

6. Способ по п.2, где указанное заболевание вызвано коронавирусом MERS.

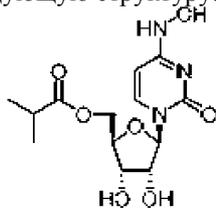
7. Способ по п.2, где указанным пациентом, нуждающимся в этом, является человек.

8. Соединение, имеющее следующую структуру:

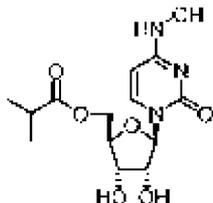


или его фармацевтически приемлемая или физиологически приемлемая соль.

9. Соединение по п.8, имеющее следующую структуру:



10. Соединение по п.8, где соединение представляет собой фармацевтически приемлемую или физиологически приемлемую соль



11. Соединение по п.8, где фармацевтически приемлемая или физиологически приемлемая соль образуется путем переноса атома водорода от гетероатома, отдающего водород, к основному атому внутри соединения.

12. Соединение 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин, полученное способом, включающим:

а) взаимодействие гидроксильных групп в положениях 2', 3' и 5' уридина с ацетоном для защиты гидроксильных групп в положениях 2' и 3' уридина с образованием первого промежуточного соединения;

б) этерификацию гидроксильной группы в положении 5' первого промежуточного соединения, используя 2-метилпропаноил-2-метилпропаноат, с образованием изобутилового сложного эфира в качестве второго промежуточного соединения;

в) взаимодействие второго промежуточного соединения с соединением 1,2,4-триазол с последующей реакцией с гидроксиламином в положении 4, получая таким образом 4-гидроксиламин-5'-сложный эфир нуклеозида; и

г) снятие защиты с 4-гидроксиламин-5'-сложного эфира нуклеозида в положениях 2' и 3' с образованием соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый эксципиент и соединение 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин по п.12.

14. Способ лечения или предупреждения заболевания, вызываемого коронавирусом человека, коронавирусом SARS, коронавирусом MERS, вирусом восточного лошадиного энцефалита, вирусом западного лошадиного энцефалита, вирусом венесуэльского энцефалита лошадей, вирусом чикунгунья, инфекцией Росс-ривер, вирусом Orthomyxoviridae, вирусом Paramyxoviridae, вирусом RSV, вирусом гриппа А и вирусом гриппа В, вирусом Filoviridae или инфекцией вируса Эбола у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения по п.12.

15. Способ по п.14, где указанное заболевание вызвано коронавирусом человека, коронавирусом SARS или коронавирусом MERS.

16. Способ по п.14, где указанное заболевание вызвано коронавирусом человека.

17. Способ по п.14, где указанное заболевание вызвано коронавирусом SARS.

18. Способ по п.14, где указанное заболевание вызвано коронавирусом MERS.

19. Способ по п.14, где указанным пациентом, нуждающимся в этом, является человек.

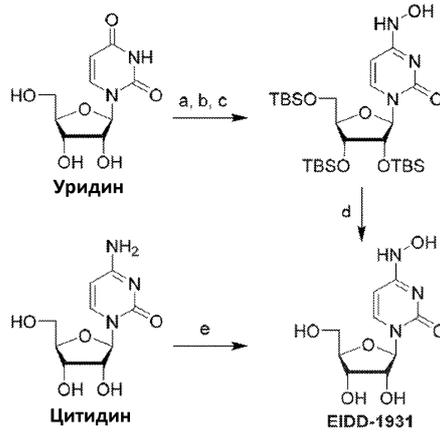
20. Способ получения соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин, включающий:

а) взаимодействие гидроксильных групп в положениях 2', 3' и 5' уридина с ацетоном для защиты гидроксильных групп в положениях 2' и 3' уридина с образованием первого промежуточного соединения;

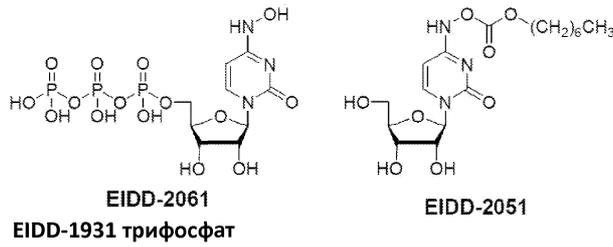
б) этерификацию гидроксильной группы в положении 5' первого промежуточного соединения, используя 2-метилпропаноил-2-метилпропаноат, с образованием изобутилового сложного эфира в качестве второго промежуточного соединения;

в) взаимодействие второго промежуточного соединения с соединением 1,2,4-триазол с последующей реакцией с гидроксиламином в положении 4, получая таким образом 4-гидроксиламин-5'-сложный эфир нуклеозида; и

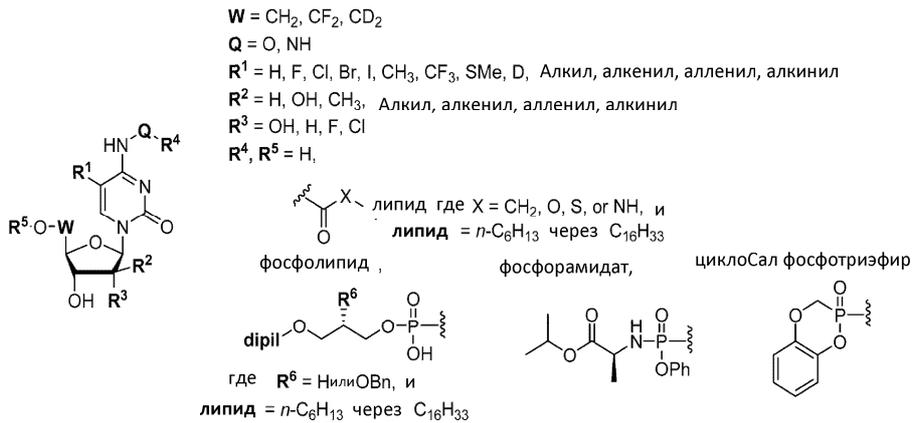
г) снятие защиты с 4-гидроксиламин-5'-сложного эфира нуклеозида в положениях 2' и 3' с образованием соединения 4-гидроксиламин-5'-(2-метилпропаноат)уридин.



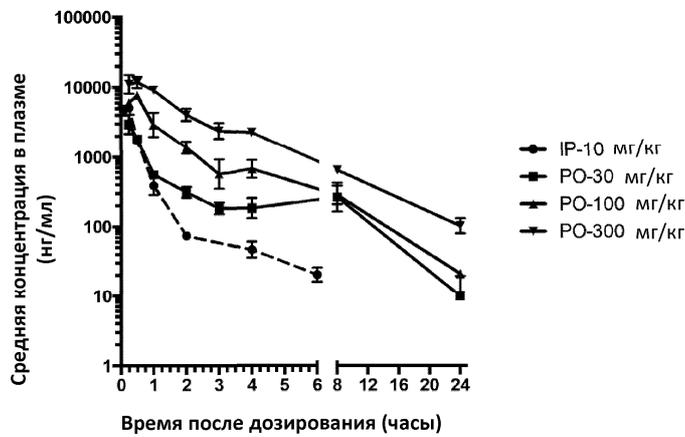
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



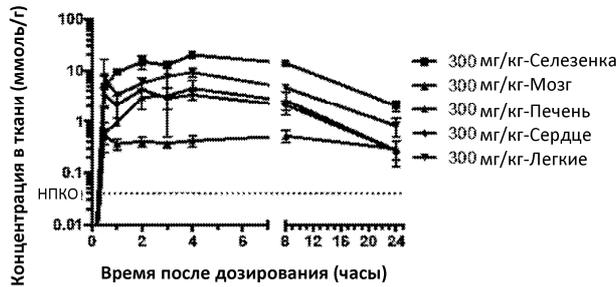
Фиг. 4

**Накопление нуклеозида в органах мышей после перорального дозирования 300 мг/кг EIDD-01931**

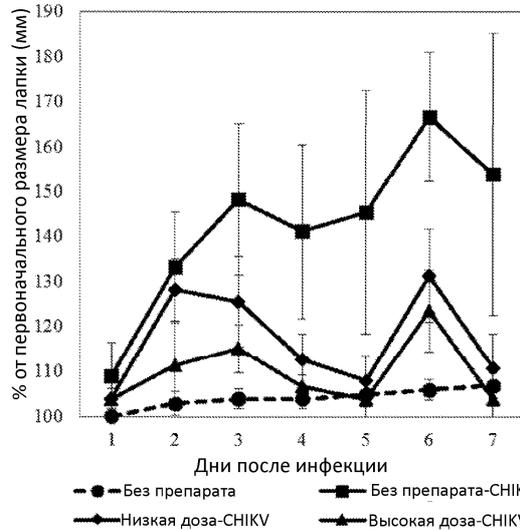


Фиг. 5

**Накопление трифосфата в органах мышей после перорального дозирования 300 мг/кг EIDD-01931**

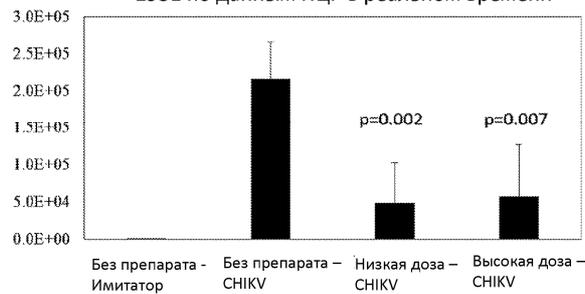


Фиг. 6

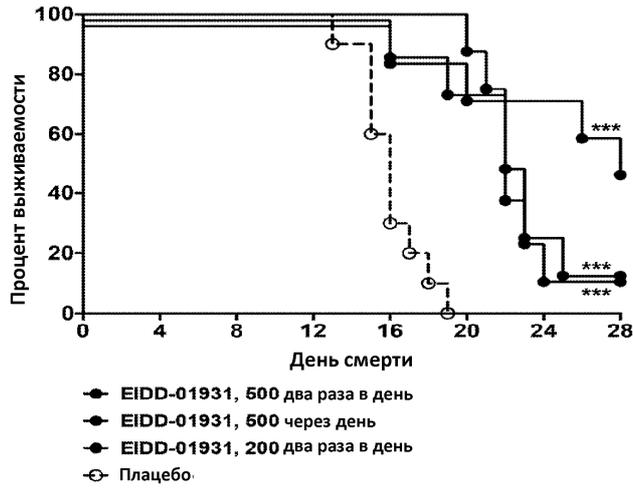


Фиг. 7

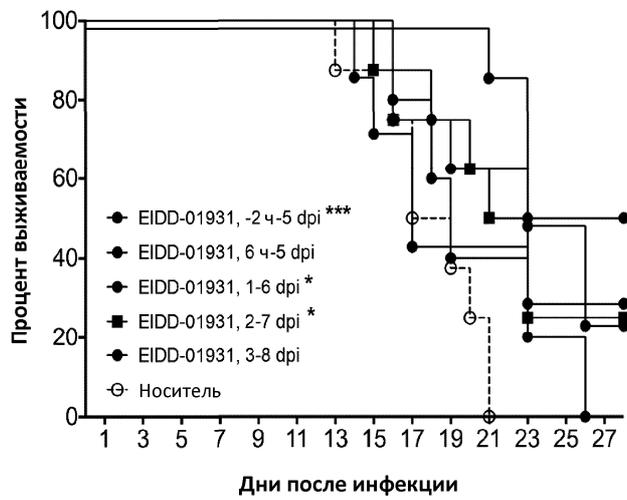
**Копии CHIKV после лечения при помощи EIDD-1931 по данным ПЦР в реальном времени**



Фиг. 8

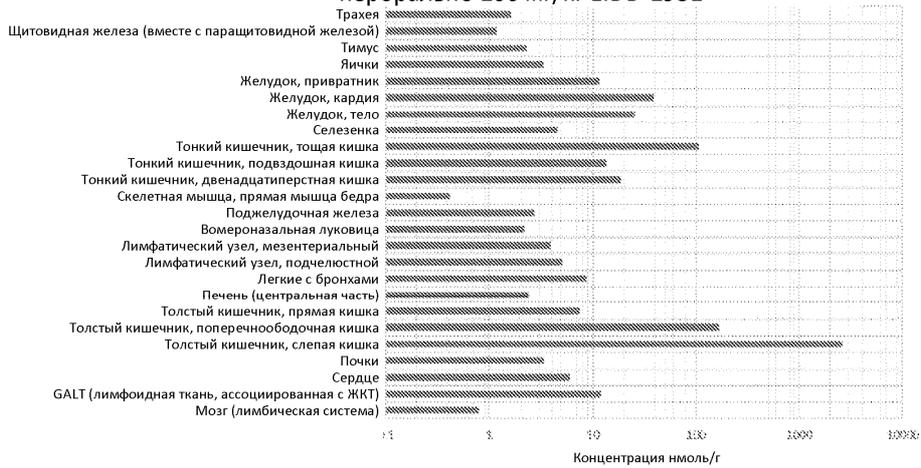


Фиг. 9



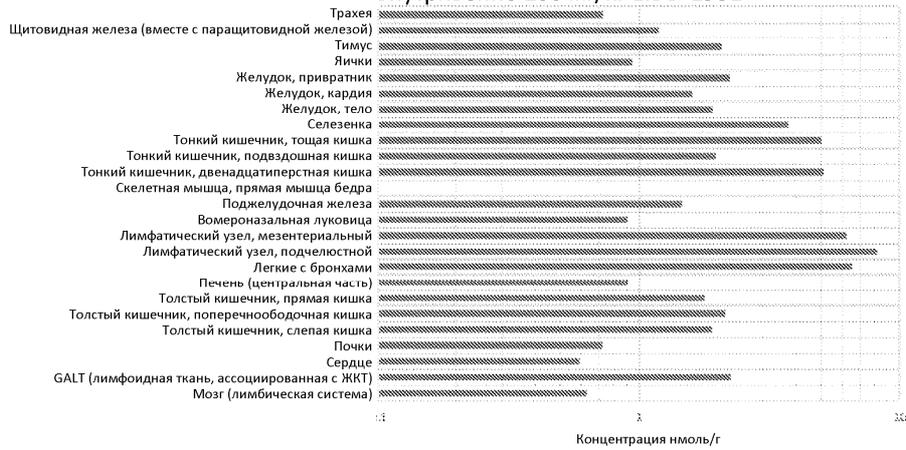
Фиг. 10

Концентрация нуклеозида в тканях обезьяны, получавшей перорально 100 мг/кг EIDD-1931

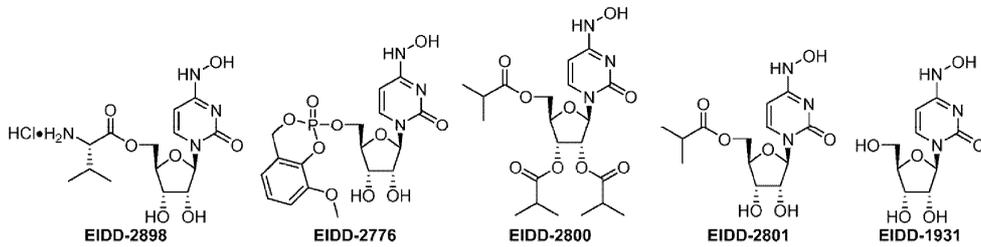


Фиг. 11

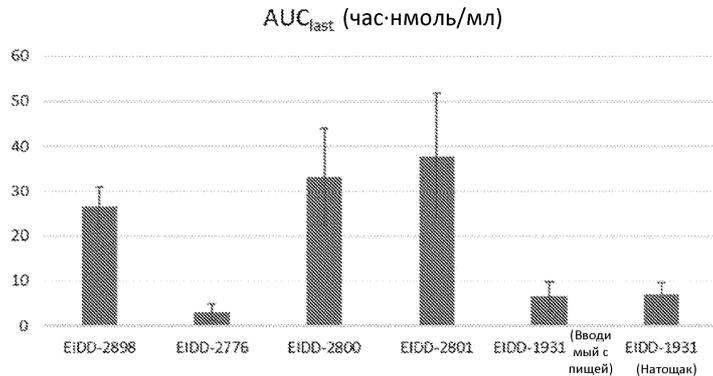
Концентрация нуклеозида в тканях обезьяны, получавшей  
внутривенно 100 мг/кг EIDD-1931



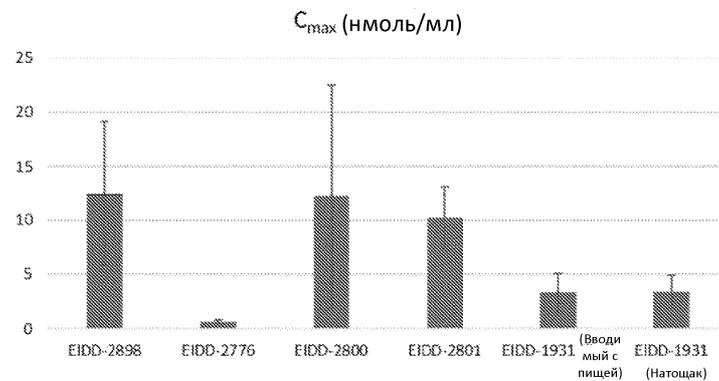
Фиг. 12



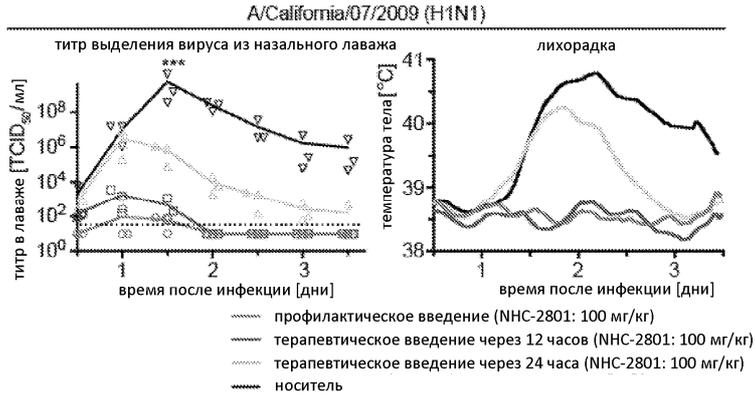
Фиг. 13



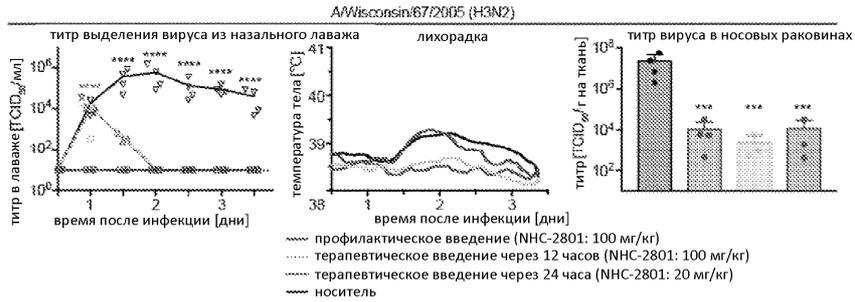
Фиг. 14



Фиг. 15

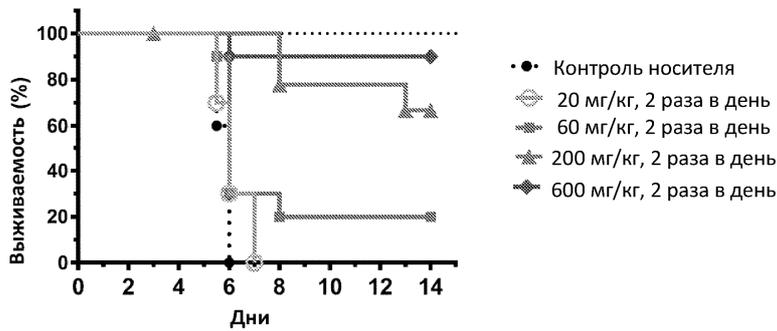


Фиг. 16

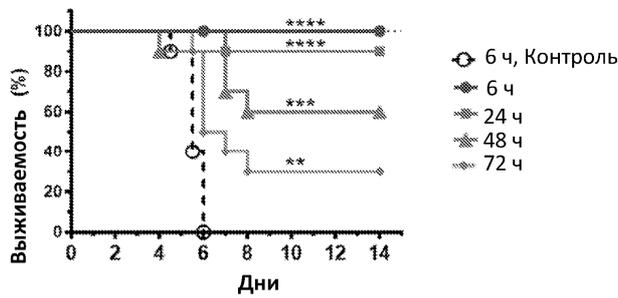


Фиг. 17

Контроль носителя

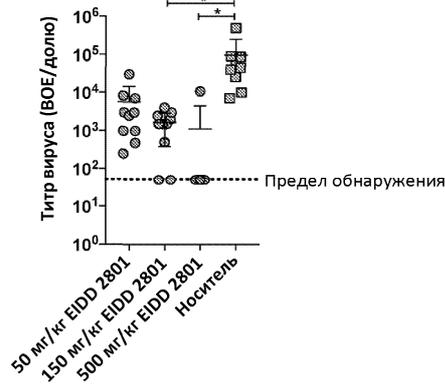


Фиг. 18



Фиг. 19

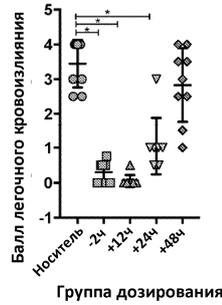
Титр вируса в легких через 5 дней  
после инфекции



\* P<0.05 по данным односторонней ANOVA и множественного сравнительного теста Крускала-Уоллеса

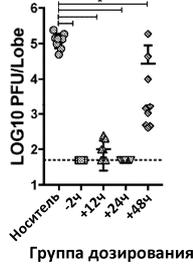
Фиг. 20

Терапевтическое введение EIDD 2801 при заражении  
SARS-CoV: легочное кровоизлияние



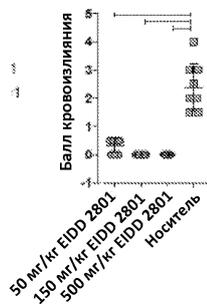
Фиг. 21

Титр вируса SARS MA 15 в легких при  
лечении при помощи EIDD 2801



Фиг. 22

Балл легочного кровоизлияния



Фиг. 23

