

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048175**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.10.31**

(21) Номер заявки  
**202490586**

(22) Дата подачи заявки  
**2024.03.26**

(51) Int. Cl. **A61K 31/7072** (2006.01)  
**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61P 31/18** (2006.01)

---



---

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ 2',3'-О-ИЗОПРОПИЛИДЕН-5-ЙОДУРИДИНА ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ВИЧ-1**

---

(43) **2024.10.29**

(96) **2024000063 (RU) 2024.03.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ  
МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ  
ИМ. В.А. ЭНГЕЛЬГАРДТА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ИМБ РАН) (RU)**

(72) Изобретатель:  
**Спирин Павел Владимирович,  
Прасолов Владимир Сергеевич,  
Лебедев Тимофей Дмитриевич,  
Глумакова Ксения Андреевна,  
Ведерникова Валерия Олеговна,  
Иванов Георгий Анатольевич,  
Зенченко Анастасия Андреевна,  
Ословский Владимир Евгеньевич,  
Дреничев Михаил Сергеевич (RU)**

(74) Представитель:  
**Закирова Н.Ф. (RU)**

(56) **US-A-3928319**

**US-A1-20100087388**

KATAEV Vladimir E. et al.: Antiviral nucleoside analogs. Chemistry of Heterocyclic Compounds. 2021, 57(4), 326-341

PAULS Eduardo et al.: Palbociclib, a selective inhibitor of cyclin-dependent kinase4/6, blocks HIV-1 reverse transcription through the control of sterile a motif and HD domain-containing protein-1 (SAMHD1) activity. AIDS, 2014, vol. 28, No 15, pp. 2213-2222

AUGUST E. Michael et al.: Metabolism and mode of selective inhibition of human immunodeficiency virus replication by 3'-azido-2',3'-dideoxy-5-iodouridine and 3'-azido-2',3'-dideoxy-5-bromouridine. Biochemical Pharmacology, 1993, vol. 45, No. 1, pp. 223-230

---

(57) Изобретение относится к применению 2',3'-О-изопропилиден-5-йодоуридина для ингибирования ВИЧ-1 в нетоксичных концентрациях и к способу ингибирования репликации ВИЧ-1 с помощью этого соединения. 2',3'-О-Изопропилиден-5-йодоуридин обладает преимущественным противовирусным действием по сравнению с азидотимидином при применении в высоких, но нетоксичных концентрациях. Изобретение также относится к применению 2',3'-О-изопропилиден-5-йодоуридина в комбинации с палбоциклибом для ингибирования репликации ВИЧ-1 и к способу ингибирования репликации ВИЧ-1 с использованием этой комбинации. Заявка на изобретение создана в рамках Соглашения с Министерством науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1660 от 31 октября 2019 года на осуществление государственной поддержки создания и развития центра геномных исследований мирового уровня "Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины" ИМБ РАН.

---

**B1****048175****048175 B1**

Изобретение относится к области молекулярной биологии и может быть использовано для ингибирования жизненного цикла ВИЧ-1.

#### **Предпосылки к созданию изобретения**

Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, такие как азидотимидин, ламивудин, диданозин, ставудин, абакавир, тенофовир алафенамид, относятся к классу препаратов против ВИЧ-1 (вируса иммунодефицита человека-1), которые обычно используют в составе комбинированной антиретровирусной терапии. Однако, несмотря на прогресс в лечении СПИДа, вызываемого вирусом ВИЧ-1, лекарственными препаратами на основе нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы, которые являются первым классом препаратов, одобренных для борьбы с ВИЧ-1, по-прежнему существует необходимость в разработке новых эффективных противовирусных препаратов. Такие препараты должны обладать высокой ингибиторной эффективностью в отношении ВИЧ-1, и не должны быть токсичными в отношении Т-клеток.

Для лечения пациентов с ВИЧ-1 в настоящее время применяют курсы комбинированной антиретровирусной терапии, которые не приводят к полной элиминации ВИЧ-1, что ведёт к необходимости применять такой курс терапии на протяжении всей жизни пациента. Кроме того, большинство нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы, используемых для лечения ВИЧ-1, являются цитотоксичными, и многие пациенты сталкиваются с побочными эффектами, в том числе, с токсическим воздействием на печень, почки и клетки головного мозга. Сравнительно быстро возникающие новые мутантные формы ВИЧ-1, устойчивые к ранее одобренным противовирусным препаратам (ингибиторам обратной транскриптазы вируса), значительно снижают эффективность применяемой комбинированной антиретровирусной терапии.

В связи с этим задачей настоящего изобретения является выявление новых эффективных нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1, обладающих улучшенными характеристиками, повышенной активностью и меньшей цитотоксичностью, которые в дальнейшем могут быть использованы в клинической практике для лечения пациентов с ВИЧ-1.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

Соединение 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридин известно в области химии нуклеиновых кислот, в частности, в качестве исходного вещества, используемого для синтеза 5'-О-мезильных производных (US 3928319 A, SINTEX INC, 23.12.1975).

Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридин, в отличие от других аналогичных соединений, представляющих собой 5-замещенные производные уридина, обладает ингибиторной активностью в отношении ВИЧ-1. Кроме того, оказалось, что данное соединение значительно эффективнее ингибирует ВИЧ-1 по сравнению с азидотимидином в диапазоне высоких, но нетоксичных концентраций.

Для изучения эффективности ингибирования ВИЧ-1 рядом соединений, представляющих собой 5-замещенные производные уридина, противовирусное действие которых ранее не было изучено, использовали модельные репликационно-некомпетентные лентивирусные частицы на основе вируса ВИЧ-1, способные переносить и экспрессировать маркерные гены в заражённых клетках. С помощью указанных лентивирусных частиц было установлено, что среди исследованных соединений 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридин обладает ингибиторной активностью в отношении ВИЧ-1. Важно отметить, что не было обнаружено токсического действия этого соединения на клетки Т-клеточного происхождения.

#### **Подробное изложение сущности изобретения**

Азидотимидин, ингибитор РНК-направленного синтеза ДНК вируса иммунодефицита человека, был первым препаратом, широко используемым в медицинской практике для лечения ВИЧ-1. В клетках этот нуклеозид постепенно фосфорилируется с образованием 5'-трифосфата, который встраивается в ДНК и блокирует удлинение цепи вирусной ДНК из-за отсутствия 3'-гидроксильного конца.

Для лентивирусов, в том числе и для ВИЧ-1, характерна высокая частота постоянного возникновения новых мутантных форм вируса, обусловленная особенностями активности вирусной обратной транскриптазы. Поэтому в организме больного СПИДом постоянно происходит образование лекарственно устойчивых форм (штаммов) ВИЧ-1, том числе и к азидотимидину. Это вызывает необходимость в создании новых противовирусных терапевтических средств и изучении их комбинированного действия с применяемыми в настоящее время лекарственными средствами с целью повышения эффективности противовирусной терапии и снижения ее токсичности.

Была протестирована серия 5-замещенных производных 2',3'-О-изопропилиденуридина и 2',3'-О-изопропилидентимидина в качестве соединений для изучения ингибирования основных этапов жизненного цикла ВИЧ в клетках. Для оценки их действия на ВИЧ-1 было проведено несколько экспериментов с азидотимидином в качестве эталонного соединения.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 представлен пример сравнительного анализа противовирусного и цитотоксического действия азидотимидина и 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридина. По оси Х приведены концентрации препаратов в наномолярном диапазоне (нМ), по оси Y - нормализованное количество клеток в % относительно контрольного образца, к которому были добавлены только вирусные частицы. Чёрной линией представ-

лено цитотоксическое действие, пунктирной - относительная доля трансдуцированных клеток. Пунктирными линиями обозначена эффективность заражения клеток (в процентах заражённых клеток (%) от общей популяции).

На фиг. 2 представлен сравнительный анализ эффективности действия 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридина и азидотимидина в комбинации с палбоциклибом. (А) Схема эксперимента по изучению действия 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридина и азидотимидина в комбинации с палбоциклибом. (В, С) Матрицы доза/эффект представляют эффективность ингибиторного действия препаратов (выраженного в процентах) в отношении вируса ВИЧ-1 (eGFP-позитивных клеток) после обработки исследуемыми соединениями в комбинации с палбоциклибом. Тепловые карты (представлены ниже) демонстрируют области синергетического эффекта и антагонистического эффекта. Анализ синергетического эффекта был проведён с помощью вычислительного алгоритма SynergyFinder v3.0. Значение балла синергизма больше 10 обозначает наличие выраженного синергетического эффекта.

### Примеры

Для тестирования противовирусного действия исследуемых соединений были использованы репликационно-некомпетентные лентивирусные частицы, сконструированные на основе ВИЧ-1. Такие частицы позволяют осуществлять эффективный перенос рекомбинантного вирусного генома, синтез ДНК-провируса и интеграцию в геном клетки-хозяина, что моделирует события, происходящие с полноценным репликационно-компетентным ВИЧ-1 на соответствующих этапах жизненного цикла. Для сборки вирусных частиц была использована плазида, направляющая синтез обратной транскриптазы (ОТ) дикого типа ВИЧ-1. Геном рекомбинантных лентивирусных частиц включал последовательность, направляющую синтез маркерного зелёного флуоресцирующего белка eGFP, что обеспечивало детекцию заражённых клеток.

В качестве белка-оболочки такие лентивирусные частицы несут белок оболочки вируса везикулярного стоматита (VSV-G).

Для тестирования противовирусной активности клетки линии Jurkat, высевали в 96-луночный планшет в количестве 5000 клеток на лунку. Для заражения использовали 10 мкл вирус-содержащей среды на лунку 96-луночного планшета, что позволяло получить не более 40% трансдуцированных клеток в образцах, не обработанных исследуемым соединением. Определение количества трансдуцированных клеток в образцах осуществляли с помощью проточного цитофлуориметра. Параллельно с анализом эффективности трансдукции оценивали цитотоксический эффект соединений. Для этого с помощью гемцитометра считали количество живых клеток в образцах, куда было добавлено исследуемое соединение и вирусные частицы. Выявление мёртвых клеток осуществляли с помощью окраски красителем - трипановым синим.

Было показано, что азидотимидин и 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридин обладают противовирусной активностью на фоне полного отсутствия цитотоксического действия при инкубации в течении 72 ч в концентрациях до 10 мкМ. Сам по себе 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридин действует менее эффективно, чем азидотимидин; однако увеличение его концентрации до 10 мкМ приводит к существенному увеличению эффективности ингибирования ВИЧ-1 (70%) для обоих ингибиторов (фиг. 1). Дальнейшее увеличение концентрации препарата азидотимидина до 30 мкМ к росту эффективности не приводило, однако в случае с 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридином рост эффективности ингибирования увеличивался и достигал более чем 90% без видимого проявления цитотоксичности.

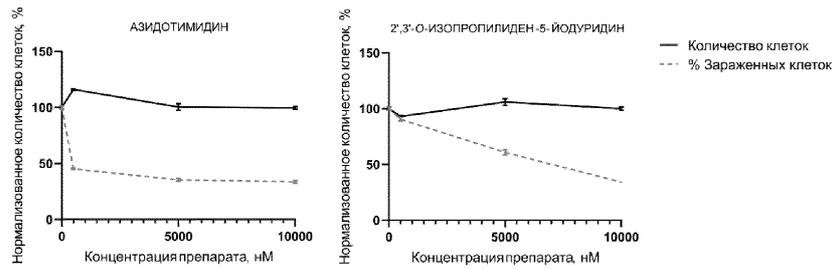
Далее было проведено исследование эффективности применения 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридина в комбинации с азидотимидином. Для этого азидотимидин и 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридин отдельно и в различных комбинациях были добавлены в широком диапазоне концентраций к клеткам линии Jurkat, посеянными за сутки до эксперимента в 96-луночные планшеты в количестве 5000 клеток на лунку. Через 2 ч к клеткам, обработанным препаратами, добавляли по 10 мкл вирус-содержащей среды. Через 72 ч проводили анализ с помощью проточного цитофлуориметра. Полученные значения эффективности действия препаратов (соответствующие снижению флуоресценции трансдуцированных клеток) использовали для построения концентрационной матрицы, в которой отражены эффективности действия исследуемых соединений по отдельности и в комбинации. Данные были обработаны с помощью интернет-ресурса Synergyfinder 2.0, в результате чего были получены значения ZIP-score, отражающие наличие или отсутствие синергического эффекта при использовании исследуемых соединений в комбинации друг с другом. Значения ZIP-score ниже 0 свидетельствуют в пользу наличия антагонистического эффекта: от 0 до 10 - о наличии выраженного аддитивного эффекта; значения 10 и более - о наличии синергического эффекта от применения комбинации препаратов. В результате нескольких экспериментов было установлено, что ZIP-score для комбинации препаратов 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридина и азидотимидина меньше 10, что свидетельствует об отсутствии синергического ингибирующего действия данных соединений в отношении репликационно-дефектных лентивирусных частиц, сконструированных на основе ВИЧ-1.

Далее были проведены аналогичные работы по изучению противовирусного действия 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридина в комбинации с палбоциклибом. Известно, что палбоциклиб может оказывать противовирусное действие за счёт снижения эффективности включения dNTP при репликации виру-

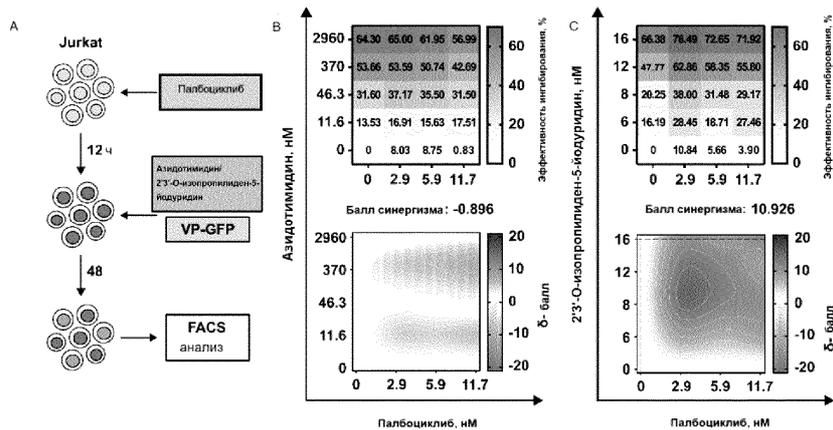
са в клетке. Было установлено, что 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридин обладает синергетическим действием в отношении ВИЧ-1 в комбинации с палбоциклибом (фиг. 2).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридина в качестве ингибитора жизненного цикла ВИЧ-1.
2. Способ ингибирования жизненного цикла ВИЧ-1 путем воздействия на клетки эффективным количеством 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридина.
3. Применение 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридина в комбинации с палбоциклибом для ингибирования жизненного цикла ВИЧ-1.
4. Способ ингибирования жизненного цикла ВИЧ-1 путем воздействия на клетки эффективным количеством 2',3'-О-изопропилиден-5-йодуридина в комбинации с палбоциклибом.



Фиг. 1



Фиг. 2

