

### Предпосылки изобретения

Настоящее изобретение относится к области синтеза нуклеозидов и конкретно направлено на 1,3-оксаселеноланнуклеозиды и их фармацевтически приемлемые производные.

В 1981 году синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) был определен как заболевание, которое в значительной степени нарушает иммунную систему человека и которое практически без исключений приводит к смерти. В 1983 году была определена этиология СПИДа, в основе которой находится вирус иммунодефицита человека - ВИЧ.

В 1985 году было сообщено, что синтетический нуклеозид 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZT) подавляет репликацию вируса иммунодефицита человека. Затем была подтверждена эффективность в отношении ВИЧ ряда других синтетических нуклеозидов, включая 2',3'-дидезоксиинозин (DDI), 2',3'-дидезоксицитидин (DDC), 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин (D4T) и (1S,4R)-4-[2-амино-6-циклопропиламино)-9Н-пурин-9-ил]-2-циклопентен-1-метанол-сукцинат ("159U89"). В целом, после внутриклеточного фосфорилирования с участием клеточных киназ с образованием 5'-трифосфата эти синтетические нуклеозиды инкорпорируются в виде необычных нуклеотидов в растущую цепь вирусной ДНК, обуславливая тем самым терминацию цепи из-за отсутствия 3'-гидроксильной группы. Также они могут либо ингибировать активность вирусной обратной транскриптазы, либо активность ДНК-полимеразы.

Успешность подавления репликации ВИЧ *in vivo* или *in vitro* различными синтетическими нуклеозидами позволила ряду исследователей сконструировать и протестировать нуклеозиды, которые замещают гетероатом на атом углерода в положении 3' в составе нуклеозида. Норбек с соавт. (Norbeck et al., 1989, *Tetrahedron Lett.*, 30 [46], 6246) представил, что ( $\pm$ )-1-[(2 $\beta$ ,4 $\beta$ -2-(гидроксиметил)-4-диоксоланил]тимин (обозначенный как [ $\pm$ ]-диоксолан-Т) проявляет активность средней степени в отношении ВИЧ ( $EC_{50}$ =20 мкМ в клетках АТН8) и не является токсичным для незараженных контрольных клеток в концентрации 200 мкМ. Заявка на европейский патент № 0337713 и патент США № 5041449, представленный фирмой BioChem Pharma Inc., представляет рацемические 2-замещенные-4-замещенные 1,3-диоксоланы, которые обладают противовирусной активностью. Опубликованные заявки PCT/US 91/09124 и PCT/US 93/08044 представляют очищенные  $\beta$ -D-1,3-диоксоланилнуклеозиды, предназначенные для лечения ВИЧ-инфекции. PCT представляет применение очищенных  $\beta$ -D-1,3-диоксоланилнуклеозидов для лечения ВИЧ-инфекции.

Заявка PCT/US 95/11464 представляет, что (-)-(2S,4S)-1-(2-гидроксиметил-1,3-диоксолан-4-ил)цитозин применим для лечения опухолей и

других случаев аномальной пролиферации клеток.

Патент США № 5047407 и заявка на европейский патент № 0382526 (в обоих случаях выполнены BioChem Inc.) представляют наличие противовирусной активности у ряда рацемических 2-замещенных-5-замещенных 1,3-оксатиоланнуклеозидов, а также сообщают в конкретном варианте, что рацемическая смесь 2-гидроксиметил-5-(цитозин-1-ил)-1,3-оксатиолана (обозначаемого далее как ВСН-189) обладает примерно равной активностью в отношении ВИЧ, что и AZT, характеризуясь при этом меньшим уровнем токсичности. Патент США № 5539116, авторы Liotta et al., представляет (-)-энантиомер ВСН-189, известный как ЗТС, который в настоящее время используется в практике лечения ВИЧ-инфекции у человека в Соединенных Штатах Америки.

Также было представлено, что *cis*-2-гидроксиметил-5-(5-фторцитозин-1-ил)-1,3-оксатиолан ("FTC") обладает активностью против ВИЧ: Schinazi et al., November 1992, "Selective inhibition of human immunodeficiency viruses by racemates and enantiomers of *cis*-5-fluoro-1-[2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolane-5-yl]cytosine". In "Antimicrobial Agents and Chemotherapy", pp. 2423-2431; также см. патент США № 5210085, патент США № 5204466, заявки на международный патент WO 91/11186 и WO 92/14743.

Другой вирус, который вызывает серьезную проблему со здоровьем человека, - это вирус гепатита-В (далее обозначаемый как ВГБ). ВГБ уступает только курительному табаку как причина рака у человека. Механизм, определяющий индукцию рака при заражении ВГБ, пока не выяснен. Предполагается, что он может напрямую опосредовать развитие опухоли или же косвенно вызывать развитие опухоли через механизмы индукции хронических воспалений, цирроза и регенерации клеток, ассоциированных с заражением этим вирусом.

После двух-шести месяцев инкубационного периода, в течение которых пораженный субъект не подозревает о заражении, ВГБ-инфекция может приводить к острому гепатиту и поражению печени, которые обуславливают боли в области брюшной полости, желтуху и повышение уровня некоторых ферментов в крови. ВГБ может обуславливать молниеносное развитие быстро прогрессирующего гепатита, часто фатальную форму заболевания, при которой разрушаются массивные области печени.

Обычно от острого гепатита пациентов вылечивают. Однако в некоторых случаях высокие уровни вирусного антигена персистируют в крови в течение протяженного или даже неопределенного периода времени, обуславливая тем самым хроническую инфекцию. Хронические инфекции могут приводить к хроническому персистирующему гепатиту. Наиболее часто пациенты, у которых имеется хроническая пер-

систерирующая ВГБ-инфекция, отмечаются в развивающихся странах. По состоянию на середину 1991 года только в Азии насчитывалось 225 миллионов носителей хронической ВГБ-инфекции, а в мире в целом число носителей оценивалось в 300 миллионов человек. Хронический персистирующий гепатит может обуславливать утомляемость, цирроз печени и гепатоклеточную карциному, являющуюся первичным раком печени.

В индустриальных западных странах к группе повышенного риска по ВГБ-инфекции относятся те лица, которые контактируют с ВГБ-носителями или соответствующими пробами крови. Эпидемиология ВГБ в значительной степени сходна с таковой у синдрома приобретенного иммунодефицита, что объясняет, в частности, то, почему ВГБ-инфекция часто встречается у пациентов со СПИДом или СПИД-подобными комплексами. Однако, ВГБ более заразен в сравнении с ВИЧ.

И FТС, и 3ТС проявляют активность против ВГБ: см. Furman et al., December 1992, "The anti-hepatitis B virus activities, cytotoxicities, and anabolic profiles of the (-) and (+) enantiomers of cis-5-fluoro-1-[2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolane-5-yl]cytosine". In "Antimicrobial Agents and Chemotherapy", pp. 2686-2692; и Cheng et al., 1992, J. Biol. Chem., 267(20), 13938-13942.

Полученная на основе сыворотки крови человека вакцина была создана для иммунизации пациентов против ВГБ. Однако позднее вакцины также были созданы с применением технологий генной инженерии, которые в настоящее время нашли широкое применение. К сожалению, вакцины не в состоянии помочь тем, кто уже инфицирован вирусом ВГБ. Ежедневное введение  $\alpha$ -интерферона, полученного в виде генно-инженерного белка, является многообещающим, однако такое лечение оказывается успешным только примерно в одном случае из трех. Кроме того, интерферон не может применяться перорально.

С учетом того, что 1,3-диоксолан- и 1,3-оксатиоланнуклеозиды обладают перспективной антивирусной и противоопухолевой активностью, представлялось интересным синтезировать класс изостерических соединений - 1,3-оксаселеноланнуклеозидов - с точки зрения поиска нуклеозидов, представляющих биологический интерес. Несмотря на свое структурное сходство с замещенными по 3'-гетероатому нуклеозидами, синтез 1,3-оксаселеноланнуклеозидов был трудным из-за проблем с конструированием оксаселеноланового кольца. Скорее всего, именно этим объясняется то, что, по видимому, об 1,3-оксаселеноланнуклеозидах никогда ранее не сообщалось.

В свете того факта, что синдром приобретенного иммунодефицита, СПИД-родственный комплекс и вирусный гепатит В достигли уровня эпидемий во всем мире и обладают трагиче-

ским эффектом для зараженного пациента, сохраняется насущная необходимость в разработке новых эффективных лекарственных средств для лечения этих заболеваний.

Соответственно, объектом настоящего изобретения является представление соединенного ряда 1,3-оксаселенола.

Другим объектом настоящего изобретения является представление способа и композиции для лечения пациентов или каких-либо животных, инфицированных ВГБ.

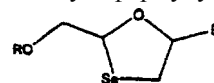
Другим объектом настоящего изобретения является представление способа синтеза 1,3-оксаселеноланнуклеозидов.

Еще одним вариантом настоящего изобретения является представление 1,3-оксаселеноланнуклеозидов и фармацевтических композиций, включающих 1,3-оксаселеноланнуклеозиды.

### Резюме изобретения

Представляются оксаселеноланы, эффективные при лечении ВИЧ- и ВГБ-инфекций у человека и различных животных.

В одном из вариантов 1,3-оксаселеноланнуклеозид имеет такую формулу



где В - пуриновое или пиримидиновое основание, а R - водород, ацил или эфиры фосфорной кислоты, включая фосфорные моно-, ди- и триэфиры. В другом варианте 1,3-оксаселеноланнуклеозид представляется в виде липофильного или гидрофильного пролекарства, что более подробно рассматривается ниже. В другом варианте атом селена в составе молекулы окислен. Предпочтительными 1,3-оксаселеноланнуклеозидами являются те, которые проявляют активность против ВИЧ или ВГБ в концентрации, которая не превышает 5 мкмоль, а наиболее предпочтительно - приблизительно 1 мкмоль или менее в тесте *in vitro*, таком, которые подробно описаны в настоящей заявке. Для лечения ВИЧ и ВГБ также предпочтительно, чтобы 1,3-оксаселеноланнуклеозид характеризовался показателем токсичности  $IC_{50}$  в тесте *in vitro*, таком, которые описаны в данном тексте, на уровне выше 50 мкмоль, а более предпочтительно на уровне приблизительно 100 ммоль или более.

1,3-оксаселеноланнуклеозид является преимущественно либо  $\beta$ -L-нуклеозидом, либо  $\beta$ -D-нуклеозидом в виде выделенного энантиомера. В одном из вариантов нуклеозидом являются ( $\beta$ -L- или  $\beta$ -D-нуклеозид в существенно очищенной форме, т.е. обеспечивается существенное отсутствие соответствующих  $\beta$ -L- или  $\beta$ -D-нуклеозидов.

Предпочтительными соединениями являются 2-гидроксиметил-4-(N-5'-цитозин-1'-ил)-1,3-оксаселенолан и 2-гидроксиметил-4-(N-5'-

фторцитозин-1'-ил)-1,3-оксаселенолан. Было установлено, что отдельный (-)-β-L-энантиомер этих нуклеозидов оказывается более активным в сравнении с его β-D-вариантами. Однако (+)-энантиомеры этих соединений нетоксичны в отношении клеток СЕМ.

Активное соединение, или его производные, или соли могут быть введены в сочетании или в чередовании с другим противовирусным средством, таким как иное анти-ВИЧ средство или анти-ВГБ средство, в соответствии с описанным в разделе IV. В целом, в ходе альтернативной терапии эффективные дозировки каждого средства вводят серийно, в то время как в комбинирующей терапии эффективные дозировки двух или большего числа средств вводят вместе. Дозировки зависят от уровня поглощения, темпа инактивации и уровня экскреции лекарственного средства в организме, равно как и от других факторов, известных специалистам в данной области техники. Необходимо отметить, что величины дозровок могут также варьироваться в зависимости от тяжести состояния, подвергаемого лечению. Также должно быть понятным, что в отношении конкретного пациента специфические дозировки и рекомендации могут быть скорректированы во времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным уровнем специалиста, проводящего лечение с применением данных композиций.

Соединения также могут быть использованы для лечения заболеваний, вызываемых вирусом инфекционной анемии лошадей (EIAV), вирусом иммунодефицита кошачьих и вируса иммунодефицита обезьян (Wang S., Montelaro R., Schinazi R.R., Jagerski B., Mellors J.W., December, 12-13, 1993, "Activity of nucleoside and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) against equine infectious anemia virus (EIAV)", First National Conference on Human Retroviruses & Related Infections, Washington, DC; Sellon D.C., 1993, "Equine Infectious Anemia", Vet. Clin. North Amer. Equine Pract. US, 9, 321-336; Philpott M.S., Ebner J.P., Hoover E.A., 1992, "Evaluation of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine therapy for feline immunodeficiency virus using a quantitative polymerase chain reaction". Vet. Immunol. Immunopathol, 35, 155-166).

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1 показывает процесс получения 1,3-оксаселеноланилнуклеозида в соответствии с настоящим изобретением, так как это описано в примере 1.

Фиг. 2 показывает процесс получения (β-D- и β-L-форм 1,3-оксаселеноланилнуклеозидов в соответствии с настоящим изобретением, как описано в примере 3.

Фиг. 3 представляет рентгенографию кристаллической структуры [2-(1'R,2'S,5'R)-метил-(5-он-1,3-оксаселенолан)]-L-карбоксилата.

Фиг. 4 показывает структуры энантиомеров (+)-β-Se-ddC, (-)-β-Se-ddC, (+)-β-Se-FddC и (-)-β-Se-FddC.

#### **Подробное описание изобретения**

По использованию в данном тексте понятие "выделенный энантиомер" обозначает нуклеозидную композицию, которая включает по крайней мере приблизительно 95-100%, а более предпочтительно - свыше 97% отдельного энантиомера данного нуклеозида.

Термин "существенно очищенная форма" обозначает нуклеозидную композицию одного энантиомера, которая включает не более чем примерно 5% (вес. проценты) другого энантиомера, более предпочтительно не более примерно 2%, а наиболее предпочтительно - менее чем примерно 1% (вес. проценты).

Термин "пуриновое или пиримидиновое основание" включает, тем самым не ограничиваясь, N<sup>6</sup>-аллилпурины, N<sup>6</sup>-ацилпурины, N<sup>6</sup>-бензилпурин, N<sup>6</sup>-галопурин, N<sup>6</sup>-винилпурин, N<sup>6</sup>-ацетиленпурин, N<sup>6</sup>-ацилпурин, N<sup>6</sup>-гидроксиалкилпурин, N<sup>6</sup>-тиоалкилпурин, N<sup>2</sup>-алкилпурины, N<sup>4</sup>-алкилпиримидины, N<sup>4</sup>-ацилпиримидины, N<sup>4</sup>-бензилпурин, N<sup>4</sup>-галопиримидины, N<sup>4</sup>-винилпиримидины, N<sup>4</sup>-ацетиленпиримидины, N<sup>4</sup>-ацилпиримидины, N<sup>4</sup>-гидроксиалкилпиримидины, N<sup>6</sup>-тиоалкилпиримидины, тимин, цитозин, 6-азапиримидин, включая 6-азацитозин, 2-й (или) 4-меркаптопиримидин, урацил, C<sup>5</sup>-алкилпиримидины, C<sup>5</sup>-бензилпиримидины, C<sup>5</sup>-галопиримидины, C<sup>5</sup>-винилпиримидин, C<sup>5</sup>-ацетиленпиримидин, C<sup>5</sup>-ацилпиримидин, C<sup>5</sup>-гидроксиалкилпурин, C<sup>5</sup>-амидопиримидин, C<sup>5</sup>-цианопиримидин, C<sup>5</sup>-нитропиримидин, C<sup>5</sup>-аминопиримидин, N<sup>2</sup>-алкилпурины, N<sup>2</sup>-алкил-6-тиопурины, 5-азацитидинил, 5-азаурацилил, тразолопиридинил, имидазолопиридинил, пирролопиримидинил и пиразолопиримидинил. Активные группы кислорода и азота в основании могут быть защищены, если это является необходимым или желательным. Подходящие защитные группы хорошо известны специалистам в данной области техники: они включают триметилсилил, диметилгексилсилил, t-бутилдиметилсилил и t-бутилдифенилсилил, тритил, алкильные группы, ацильные группы, такие как ацетил и пропионил, метансульфонил и p-толуолсульфонил. Предпочтительными основаниями являются цитозин, 5-фторцитозин, урацил, тимин, аденин, гуанин, ксантин, 2,6-диаминопурин, 6-аминопурин и 6-хлорпурин.

По использованию в данном тексте термин "алкил", за исключением специально оговариваемых случаев, обозначает насыщенную прямую, разветвленную или циклическую первичную, вторичную или третичную цепочку атомов углерода, обычно от C<sub>1</sub> до C<sub>18</sub>, и конкретно включает метил, этил, пропил, изопропил, бутыл, изобутыл, t-бутил, пентил, циклопентил, изопентил, неопентил, гексил, изогексил, цик-

логексил, циклогексилметил, 3-метилпентил, 2,2-диметилбутил и 2,3-диметилбутил. Произвольно алкильная группа может быть замещена одной или большим числом составляющих, выбираемых из группы, включающей гидроксил, аминогруппу, алкиламин, ариламин, алкокси, арилокси, нитрогруппу, цианогруппу, сульфокислоту, сульфат, фосфокислоту, фосфат или фосфонат, как незащищенную, так и, если необходимо, защищенную в соответствии с хорошо известным в данной области техники, так, как, например, описано у Greene et al., 1991, "Protective Groups in Organic Synthesis", J. Wiley & Sons, 2d ed. (включено в виде библиографической ссылки).

Термин "низший алкил" по использованию в данном тексте, если это не оговаривается отдельно, обозначает насыщенные прямые или разветвленные углеродные цепи C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.

Термин "защищенный" по использованию в данном тексте, если это не оговаривается специально, обозначает группу, присоединенную к атому кислорода, азота или фосфора с целью предотвращения их участия в других реакциях или для иных целей. Значительное число разнообразных защитных групп для атомов кислорода и азота хорошо известно специалистам в данной области техники - органическом синтезе.

Термин "арил" по использованию в данном тексте, если это дополнительно не оговаривается, обозначает фенил, бифенил или нафтил, а предпочтительно - фенил. Арильная группа может быть произвольно замещена одной или большим числом составляющих, выбираемых из группы, включающей гидроксил, галоген, алкил, алкенил, алкинил, алкарил, аралкил, аминогруппу, алкиламин, алкокси, арилокси, нитрогруппу, цианогруппу, сульфокислоту, сульфат, фосфокислоту, фосфат или фосфонат, как незащищенную, так и, если необходимо, защищенную в соответствии с хорошо известным в данной области техники, так, как, например, описано у Greene et al., 1991, "Protective Groups in Organic Synthesis", J. Wiley & Sons, 2d ed.

Термин "алкарил" или "алкиларил" обозначает алкильную группу, включающую арильную составляющую.

Термин "аралкил" или "арилалкил" обозначает арильную группу, включающую алкильную составляющую.

Термин "галоген" по использованию в данном тексте включает хлор, бром, йод или фтор.

Термин "ацил" обозначает составляющую, имеющую формулу -C(O)R', где R' - алкил, арил, алкарил, аралкил, гетероароматическая группа, алкоксиалкил, включая метоксиметил; арилалкил, включая бензил; арилоксиалкил, такой как феноксиметил; арил, включая фенил, произвольно замещенный галогеном, C<sub>1-4</sub>-алкилом или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкокси группой, или остатком аминокислоты.

По использованию в данном тексте термин "отщепляемая группа" обозначает функциональную группу, которая отщепляется от молекулы, к которой она была присоединена при создании подходящих условий.

Термин "аминокислота" включает естественно встречающиеся и синтетические аминокислоты и включает, не исчерпываясь этим, аланил, валинил, лейцинил, изолейцинил, пролинил, фенилаланинил, триптофанил, метионинил, глицинил, серинил, треонинил, цистеинил, тирозинил, аспарагинил, глутаминил, аспартоил, глутароил, лизинил, аргининил и гистидинил.

Термин "гетероарил" или "гетероароматическая группа" по использованию в данном тексте обозначает ароматическую составляющую, включая по крайней мере один атом серы, кислорода или азота в составе ароматического кольца. Не ограничивающими примерами к ним относятся фурил, пиридил, пиримидил, тиенил, изотиазолил, имидазолил, тетразолил, пиазинил, бензофуранил, бензотиофенил, хинолил, изохинолил, бензотиенил, изобензофурил, пиазолил, индолил, изоиндолил, бензимидазолил, пуринил, карбазолил, оксазолил, тиазолил, изотиазолил, 1,2,4-тиадиазолил, изооксазолил, пирролил, хиназолинил, пиридазинил, пиазинил, циннолинил, фталазинил, хиноксалинил, ксантинил, гипоксантинил и птеридинил. Функциональные группы кислорода и азота в составе гетероциклического основания могут быть защищены в случае, если это является необходимым или желательным. Подходящие защитные группы хорошо известны специалистам в данной области техники и включают триметилсилил, диметилгексилсилил, t-бутилдифенилсилил и t-бутилдифенилсилил, тритил или замещенный тритил, алкильные группы, ацильные группы, такие как ацетил и пропионил, метансульфонил и p-толуолсульфонил.

Термин "липофильное пролекарство" обозначает 1,3-оксаселеноланилнуклеозид, который включает ковалентно присоединенную составляющую, которая может быть отщеплена по 5'-гидроксильному положению, в результате чего нуклеозид становится более липофильным по сравнению с исходным нуклеозидом, имеющим 5'-гидроксильную группу.

Термин "гидрофильное пролекарство" обозначает 1,3-оксаселеноланилнуклеозид, который включает ковалентно присоединенную составляющую по 5'-гидроксильному положению, в результате чего нуклеозид становится более гидрофильным по сравнению с исходным нуклеозидом, имеющим 5'-гидроксильную группу.

Настоящее изобретение в соответствии с описанным обеспечивает реализацию способа и создание композиции для лечения заболеваний человека и различных животных, вызываемых ВИЧ- и ВГБ-инфекциями и другими болезнетворными вирусами, воспроизводимыми по

тому же типу, включающий введение эффективного количества 1,3-оксаселеноланилнуклеозидов, его фармацевтически приемлемого производного, включая 1,3-оксаселеноланилнуклеозид с 5'-отщепляемой группой, включая ацилированное и фосфорилированное производное или его фармацевтически приемлемую соль, произвольно в составе фармацевтически приемлемого носителя. Соединения по настоящему изобретению либо сами проявляют антивирусную активность, такую как активность против ВИЧ-1, против ВИЧ-2, против ВГБ или против вируса иммунодефицита обезьян (ВИО), либо могут метаболизироваться в соединение, которое проявит такую антивирусную активность.

Представляемые соединения, или их фармацевтически приемлемые производные, или соли, или фармацевтически приемлемые препараты, включающие эти соединения, применимы для профилактики и лечения заболеваний, вызываемых ВИЧ-инфекцией, и других родственных состояний, таких как СПИД-подобный комплекс (ARC), персистентная генерализованная лимфаденопатия (PGL), СПИД-связанное неврологическое состояние, позитивные по антителам к ВИЧ и ВИЧ-позитивные состояния, саркома Капоши, пурпурная тромбоцитопения и условно-патогенные инфекции. Кроме того, данные соединения или препараты могут быть применены профилактически с целью предотвращения или замедления развития клинических симптомов у пациентов, у которых отмечаются антитела к ВИЧ или они позитивны по присутствию антигена ВИЧ, или у тех, кто имел контакт с ВИЧ.

Данное соединение или его фармацевтически приемлемое производное, или соль, или фармацевтически приемлемые препараты, включающие соединение или производные, или соли, также применимы для предотвращения и лечения заболеваний, обуславливаемых ВГБ-инфекцией, и других родственных состояний, таких как позитивность по антителам к ВГБ и позитивность по ВГБ, обуславливаемое ВГБ хроническое воспаление печени, цирроз, острый гепатит, фульминантный гепатит, хронический персистентный гепатит и утомляемость. Эти соединения или препараты также могут быть использованы профилактически с целью предотвращения или замедления развития клинических симптомов у пациентов, у которых отмечаются антитела к ВГБ или они позитивны по присутствию антигена ВГБ, или у тех, кто имел контакт с ВГБ.

Соединение может быть конвертировано в фармацевтически приемлемый эфир путем реакции с подходящим этерифицирующим агентом, например галогенангидридами или ангидридами. Соединение или его фармацевтически приемлемое производное могут быть конвертированы в фармацевтически приемлемую соль стандартными путями, например путем обра-

ботки подходящей щелочью. Эфир или соль данного соединения могут быть конвертированы в исходное соединение, например, путем гидролиза.

Суммируя сказанное, настоящее изобретение включает следующие элементы:

(a) 1,3-оксаселеноланилнуклеозиды, определенные выше, и их фармацевтически приемлемые производные и соли;

(b) 1,3-оксаселеноланилнуклеозиды и их фармацевтически приемлемые производные и соли для применения в медицинской практике, например, для лечения или профилактики заболеваний, вызываемых ВИЧ- и ВГБ-инфекциями;

(c) применение 1,3-оксаселеноланилнуклеозидов и фармацевтически приемлемых производных и солей в производстве медикаментов, предназначенных для лечения заболеваний, вызываемых ВИЧ- и ВГБ-инфекциями;

(d) фармацевтические препараты, включающие 1,3-оксаселеноланилнуклеозиды или их фармацевтически приемлемые производные или соли вместе с фармацевтически приемлемым носителем или растворителем;

(e) способы получения 1,3-оксаселеноланилнуклеозидов и

(f) применение 1,3-оксаселеноланилнуклеозидов для лечения вирусных инфекций путем введения в сочетании или чередовании с другим антивирусным агентом.

I. Активное соединение и его физиологически приемлемые производные и соли

Активными соединениями, представляемыми настоящим изобретением, являются 1,3-оксаселеноланилнуклеозиды, находящиеся в форме ацетата или отдельных энантиомеров.

Активное соединение может быть введено в виде любого производного, которое по введению реципиенту способно прямо или косвенно обеспечивать появление исходного вещества или же обладает его активностью. Не служащими ограничением примерами являются фармацевтически приемлемые соли (также обозначаемые как "физиологически приемлемые соли") и 5'- и N<sup>4</sup>-пиримидин- или N<sup>6</sup>-пуринацетилированные или алкилированные производные активного соединения (также обозначаемые как "физиологически активные производные"). В одном из вариантов ацильная группа - это эфир карбоновой кислоты, в котором некарбонильная составляющая эфирной группы выбирается из группы, включающей прямой, разветвленный или циклический алкил или низший алкил, алкоксиалкил, включая метоксиметил, аралкил, включая бензил, арилоксиалкил, такой как феноксиметил, арил, включая фенил, произвольно замещенный галогеном, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилом или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкоксигруппой, сульфатный эфир, такой как алкил- или аралкилсульфонил, включая метансульфонил, фосфат, включая, но не тем самым не ограничиваясь, моно-, ди- или трифосфат, три- или монометокситригидрат, замещенный бен-

зил, триалкилсилил (например, диметил-5-бутилсилил) или дифенилметилсилил. Арильные группы эфиров произвольно могут включать фенильную группу.

Модификации активного соединения и особенно по N<sup>4</sup>-пиримидину или N<sup>6</sup>-пурину и 5'-О-положениям могут влиять на биологическую доступность и скорость метаболизма активного соединения, что тем самым дает возможность контролировать доставку организму активного соединения. Кроме того, модификации могут влиять на антивирусную активность соединения, в ряде случаев повышая эту активность по сравнению с исходным соединением. Этот эффект может быть легко протестирован путем получения производного и анализа его антивирусной активности в соответствии с описанными в данном тексте методами или другими методами, известными в данной области техники.

#### Нуклеотидные пролекарства

Любой из описанных в данном тексте нуклеотидов может быть введен в качестве нуклеотидного пролекарства с целью повышения активности, биологической доступности, стабильности или какого-либо иного изменения свойств конкретного нуклеозида. Известен ряд лигандов нуклеотидных пролекарств. В целом, алкилирование, ацилирование или иные липофильные модификации моно-, ди- или трифосфата в составе нуклеозида обуславливают повышение стабильности нуклеотида. Примерами замещающих групп, которые могут заменять один или большее число атомов водорода в фосфатной составляющей, являются алкил, арил, стероиды, углеводы, включая сахара, 1,2-диацилглицерин и спирты. Многие из них описаны: R. Jones & N. Bischofberger, 1995, *Antiviral Res.*, 27, 1-17. Любые из них могут быть использованы в сочетании с представляемыми нуклеозидами с целью достижения желаемого эффекта.

В одном из вариантов 1,3-оксаселеноланилнуклеозид представляется в виде 5'-гидроксильного липофильного пролекарства. Не служащими ограничением примерами патентов США, которые представляют подходящие липофильные замещающие группы, которые могут быть ковалентно встроены в состав нуклеозида, предпочтительно по положению 5'-ОН в составе этого нуклеозида, или липофильные препараты, являются патенты США №№ 5149794 (22 сентября 1992 г.: Yatvin et al.), 5194 654 (16 марта 1993 г.: Hostetler et al.), 5223263 (29 июня 1993 г.: Hostetler et al.), 5256641 (26 октября 1993 г.: Yatvin et al.), 5411947 (2 мая 1995 г.: Hostetler et al.), 5463092 (31 октября 1995 г.: Hostetler et al.), 5543389 (6 августа 1996 г.: Yatvin et al.), 5543390 (6 августа 1996 г.: Yatvin et al.), 5543391 (6 августа 1996 г.: Yatvin et al.) и 5554728 (10 сентября 1996 г.: Basava et al.); все они включены в данный текст в виде библиографических ссылок.

Зарубежные патентные заявки, в которых представляются липофильные замещающие группы, которые могут быть присоединены к 1,3-оксаселеноланилнуклеозидам по настоящему изобретению, или липофильные препараты, включают WO 89/02733, WO 90/00555, WO 91/16920, WO 91/18914, WO 93/00910, WO 94/26273, WO 96/15132, европейские патенты 0350287 и 93917054.4 и WO 91/19721.

Дополнительными, не служащими ограничением примерами производных 1,3-оксаселеноланилнуклеозидов являются те, которые содержат замещающие группы в соответствии с нижеследующими публикациями. Эти измененные 1,3-оксаселеноланилнуклеозиды могут быть использованы для анализа в соответствии с описанным здесь или другими методами антивирусной активности, включая активность против ВИЧ или ВГБ. Ho D.H.W., 1973, "Distribution of kinase and deaminase of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine in tissues of man and mouse". *Cancer Res.*, 33, 2816-2820; Holy A., 1993, "Isopolar phosphorous-modified nucleotide analogues". In "Advances in Antiviral Drug Design", De Clercq (ed.), Vol. I, JAI Press, pp. 179-231; Hong C.I., Nechaev A., West C.R., 1979a, "Synthesis and antitumor activity of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine conjugates of cortisol and cortisone", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 88, 1223-1229; Hong C.I., Nechaev A., Kirisits A.J., Buchheit D.J., West C.R., 1980, "Nucleoside conjugates as potential antitumor agents. 3. Synthesis and antitumor activity of 1-(β-D-arabinofuranosyl)cytosine conjugates of corticosteroids and selected lipophilic alcohols", *J. Med. Chem.*, 28, 171-177; Hostetler K.Y., Stuhmiller L.M., Lenting H.B.M., van den Bosch H., Richman D.D., 1990, "Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides", *J. Biol. Chem.*, 266, 11714-11717; Hostetler K.Y., Korba B., Sridhar C., Gardener M., 1994a, "Antiviral activity of phosphatidyl-dideoxycytidine in hepatitis B-infected cells and enhanced hepatic uptake in mice". *Antiviral Res.*, 24, 59-67; Hostetler K.Y., Richman D.D., Sridhar C.N., Felgner P.L., Felgner J., Ricci J., Gerdener M.F., Selleseth D.W., Ellis M.N., 1994b, "Phosphatidylazidothymidine and phosphatidyl-ddC: Assessment of uptake in mouse lymphoid tissues and antiviral activities in human immunodeficiency virus-infected cells and in rauscher leukemia virus-infected mice", *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 38, 2792-2797; Hunston R.N., Jones A.A., McGuigan C., Walker R.T., Balzarini J., De Clercq E., 1984, "Synthesis and biological properties of some cyclic phosphotriesters derived from 2'-deoxy-5-fluorouridine", *J. Med. Chem.*, 27, 440-444; Ji Y.H., Moog C., Schmitt G., Bischoff P., Luu B., 1990, "Monophosphoric acid diesters of 7β-hydroxycholesterol and of pyrimidine nucleosides as potential antitumor agents; synthesis and pre-

liminary evaluation of antitumor activity", *J. Med. Chem.*, 33, 2264-2270; Jones A.S., McGuigan C, Walter R.T., Balzarini J., De Clercq E., 1984, "Synthesis, properties, and biological activity of some nucleoside cyclic phosphoramidates", *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, I, 1471-1474; Juodka B.A., Smart J., 1974, "Synthesis of diribonucleoside a (P->N) amino acid derivatives". *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 39, 363-368; Kataoka S., Imai J., Yamaji N., Kato M., Saito M., Kawada T., Imai S., 1989, "Alkylated cAMP derivatives; selective synthesis and biological activities", *Nucl. Acids Res. Sym. Ser.*, 21, 1-2; Kataoka S., Uchida R., Yamaji N. 1991, "A convenient synthesis of adenosine 3',5'-cyclic phosphate (cAMP) benzyl and methyl triesters", *Heterocycles*, 32, 1351-1356; Kinchington D., Harvey J.J., O'Connor T.J., Jones B.C.N.M., Devine K.G., Taylor-Robinson D., Jeffries D.J., McGuigan C, 1992, "Comparison of antiviral effects of zidovudine phosphoramidate and phosphorodiamidate derivatives against HIV and ULV in vitro". *Antiviral Chem. Chemotherapy*, 3, 107-112; Kodama K., Morozumi M., Saitoh K.I., Kuninaka H., Yoshino H., Saneyoshi M., 1989, "Antitumor activity and pharmacology of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine-5'-stearylphosphate; an orally active derivative of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine", *Jap. J. Cancer Res.*, 80, 679-685; Korty M., Engels J., 1979, "The effects of adenosine- and guanosine 3',5'-phosphoric and acid benzyl esters on guinea-pig ventricular myocardium", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 310, 103-111; Kumar A., Goe P.L., Jones A.S., Walker R.T., Balzarini J., De Clercq E., 1990, "Synthesis and biological evaluation of some cyclic phosphoramidate nucleoside derivatives", *J. Med. Chem.*, 33, 2368-2375; LeBec C, Huynhdinh T., 1991, "Synthesis of lipophilic phosphate triester derivatives of 5-fluorouridine and arabinocytidine as anticancer prodrugs". *Tetrahedron Lett.*, 32, 6553-6556; Lichtenstein J., Barner H.D., Cohen S.S., 1960, "The metabolism of exogenously supplied nucleotides by *Escherichia coli*", *J. Biol. Chem.*, 235, 457-465; Luchty J., von Daeniken A., Friederich J., Manthey B., Zweifel J., Schlatter C, Benn M.H., 1981, "Synthesis and toxicological properties of three naturally occurring cyanoepithioalkanes". *Mitt. Geg. Lebensmittelunters. Hyg.*, 72, 131-133 (*Chem. Abstr.* 95, 127093); McGuigan C, Tollertield S.M., Riley P.A., 1989, "Synthesis and biological evaluation of some phosphate triester derivatives of the antiviral drug Ara", *Nucleic Acids Res.*, 17, 6065-6075; McGuigan C, Devine K.G., O'Connor T.J., Galpin S.A., Jeffries D.J., Kinchington D., 1990a, "Synthesis and evaluation of some novel phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) as anti-HIV compounds". *Antiviral Chem. Chemotherapy*, 1, 107-113; McGuigan C, O'Connor T.J., Nicholls S.R., Nickson C, Kinchington C, 1990b, "Synthesis and anti-HIV activity of some novel substituted dialkyl

phosphate derivatives of AZT and ddCyd", *Antiviral Chem. Chemotherapy*, 1, 355-360; McGuigan C, Nicholls S.R., O'Connor T.J., Kinchington D., 1990c, "Synthesis of some novel dialkyl phosphate derivative of 3'-modified nucleosides as potential anti-AIDS drugs". *Antiviral Chem. Chemotherapy*, 1, 25-33; McGuigan C, Devine K.G., O'Connor T.J., Kinchington D., 1991, "Synthesis and anti-HIV activity of some haloalkyl phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): potent activity of the trichloroethyl methoxyalanyl compound", *Antiviral Res.*, 15, 255-263; McGuigan C, Pathirana R.N., Mahmood N., Devine K.G., Hay A.J., 1992, "Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV1 in cell lines which are resistant to the action of AZT", *Antiviral Res.*, 17, 311-321; McGuigan C, Pathirana R.N., Choi S.M., Kinchington D., O'Connor T.J., 1993a, "Phosphoramidate derivatives of AZT as inhibitors of HIV: studies on the carboxyl terminus". *Antiviral Chem. Chemotherapy*, 4, 97-101; McGuigan C, Pathirana R.N., Balzarini J., De Clercq E., 1993b, "Intracellular delivery of bioactive AZT nucleotides by aryl phosphate derivatives of AZT", *J. Med. Chem.*, 36, 1048-1052.

"Alkyl hydrogen phosphonate derivatives of the anti-HIV agent AZT may be less toxic than the parent nucleoside analogue", *Antiviral Chem. Chemotherapy*, 5, 271-277; Meyer R.B., Jr., Shuman D.A., Robins R.K., 1973, "Synthesis of purine nucleoside 3',5'-cyclic phosphoramidates". *Tetrahedron Lett.*, 269-272; Nagyvary J., Gohil R.N., Kirchner C.R., Stevens J.D., 1973, "Studies on neutral esters of cyclic AMP", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 55, 1072-1077; Namane A., Goyette C, Fillion M.P., Fillion G., Huynh-Dinh T., 1992, "Improved brain delivery of AZT using a glycosyl phosphotriester prodrug", *J. Med. Chem.*, 35, 3939-3944; Nargeot J., Nerbonne J.M., Engels J., Leser H.A., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2395-2399; Nelson K.A., Benrude W.G., Stser W.N., Hutchinson J.P., 1987, "The question of chair-twist equilibria for the phosphate rings of nucleoside cyclic 3',5'-monophosphates:  $^1\text{H}$  NMR and x-ray crystallographic study of the diastereomers of thymidine phenyl cyclic 3',5'-monophosphate", *J. Amer. Chem. Soc.*, 109, 4058-4064; Nerbonne J.M., Richard S., Nargeot J., Lester H.A., 1984, "New photoactivatable cyclic nucleotides produce intracellular jumps in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations". *Nature*, 301, 74-76; Neumann J.M., Herve M., Debouzy J.C., Guerra F.I., Gouyette C, Dupraz B., Huynh-Dinh T., 1989, "Synthesis and transmembrane transport studies by NMR of a glucosyl phospholipid of thymidine", *J. Amer. Chem. Soc.*, 111, 4270-4277; Ohno R., Tatsumi N., Hirano M., Imai K., Mizoguchi H., Nakamura T., Kosaka M., Takatuski K., Yamaya T., Toyama K., Yoshida T., Masaoka T., Hashimoto S., Ohshima T., Kimura I., Yamada K., Kimura J., 1991, "Treatment of myelodysplastic syndromes with orally administered 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine-5'-stearyl-

phosphate". *Oncology*, 48, 451-455; Palomino E., Kessle D., Horwitz J.P., 1989, "A dihydropyridine carrier system for sustained delivery of 2',3'-dideoxynucleosides to the brain", *J. Med. Chem.*, 32, 622-625; Perkins P.M., Barney S., Wittrock R., Clark P.H., Levin R., Lambert D.M., Patteway S.R., Serafinowska H.T., Bailey S.M., Jackson S., Harnden M.R., Ashton R., Sutton D., Harvey J.J., Brown A.G., 1993, "Activity of BRL47923 and its oral prodrug, SB203657A against a rauscher murine leukemia virus infection in mice". *Antiviral Res.*, 20, suppl. N 1, 84; Piantadosi C., Marasco C.J., Jr., Morris-Natschke S.L., Meyer K.L., Gumus F., Surles J.R., Ishaq K.S., Kucera L.S., Iyer N., Wallen C.A., Piantadosi S., Modest E.J., 1991, "Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV-1 activity", *J. Med. Chem.*, 34, 1408-1414; Pompon A., Lefebvre I., Imbach J.L., Kahn S., Farquhar D., 1994, "Decomposition pathways of the mono- and bis(pivaloyloxymethyl) esters of azidothymidine-5'-monophosphate in cell extract and in tissue culture medium; an application of the on-line ISRP-cleaning' HPLC technique", *Antiviral Chem. Chemotherapy*, 5, 91-98; Postemark T., 1974, "Cyclic AMP and cyclic GMP", *Annu. Rev. Pharmacol.*, 14, 23-33; Prisbe E.J., Martin J.C.M., McGee D.P.C., Barker M.F., Smee D.F., Duke A.E., Matthews T.R., Verheyden J.P.J., 1986, "Synthesis and antiherpes virus activity of phosphate and phosphonate derivatives of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine", *J. Med. Chem.*, 29, 671-675; Pucch F., Gosselin G., Lefebvre I., Pompon A., Aubertin A.M., Dirn A., Imbach J.L., 1993, "Intracellular delivery of nucleoside monophosphate through a reductase-mediated activation process". *Antiviral Res.*, 22, 155-174; Pugaeva V.P., Kochkeva S.I., Mashbits F.D., Eizengart R.S., 1969, "Toxicological assessment and health standard ratings for ethylene sulfide in the industrial atmosphere". *Gig. Trf. Prof. Zabol*, 13, 47-48 (*Chem. Abstr.* 72, 212); Robins R.K., 1984, "The potential of nucleotide analogs as inhibitors of retroviruses and tumors", *Pharm. Res.*, 11-18; Rosowsky A., Kim S.H., Ross J., Wick M.M., 1982, "Lipophilic 5<sup>1</sup>-(alkylphosphate) esters of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine and its N<sup>4</sup>-acyl and 2,2'-anhydro-3'0-acyl derivatives as potential prodrugs", *J. Med. Chem.*, 25, 171-178; Ross W., 1961, "Increased sensitivity of the walker turnout towards aromatic nitrogen mustards carrying basic side chains following glucose pretreatment", *Biochem. Pharm.*, 8, 235-240; Ryu E.K., Ross R.J., Matsushita T., MacCoss M., Hong C.I., West C.R., 1982, "Phospholipid-nucleoside conjugates 3. Synthesis and preliminary biological evaluation of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine 5'-diphosphate[-], 2-diacylglycerols", *J. Med. Chem.*, 25, 1322-1329; Saffhill R., Hume W.J., 1986, "The degradation of 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine by serum from different sources and its consequences

for the use of these compounds for incorporation into DNA", *Chem. Biol. Interact.*, 57, 347-355; Saneyoshi M., Morozumi M., Kodama K., Machida J., Kuninaka A., Yoshino H., 1980, "Synthetic nucleosides and nucleotides XVI. Synthesis and biological evaluations of a 9 series of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine 5'-alkyl or arylphosphates", *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 2915-2923; Sastry J.K., Nehete P.N., Khan S., Nowak B.J., Plunkett W., Arlinghaus R.B., Farquhar D., 1992, "Membrane-permeable dideoxyuridine 5'-monophosphate analogue inhibits human immunodeficiency virus infection", *Mol. Pharmacol.*, 41, 441-445; Shaw J.P., Jones R.J., Arimilli M.N., Louie M.S., Lee W.A., Cundy K.C., 1994, "Oral bioavailability of PMEAs from PMEAs prodrugs in male Sprague-Dawley rats". Abstract 9th Annual AAPS Meeting, San Diego, CA; Shuto S., Ueda S., Imamura S., Fukukuawa K., Matsuda A., Ueda T., 1987, "A facile one-step synthesis of 5'-phosphatidyl nucleosides by an enzymatic two-phase reaction", *Tetrahedron Lett.*, 28, 199-202; Shuto S., Itoh H., Ueda S., Imamura S., Kukukawa K., Tsujino M., Matsuda A., Ueda T., 1988, "A facile enzymatic synthesis of 5'-(3-sn-phosphatidyl) nucleosides and their antileukemic activities", *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 209-217. Одной из предпочтительных фосфатных групп в пролекарствах является S-ацил-S-тиозтиловая группа, также обозначаемая как "SATE".

## II. Получение активных соединений

Получение 1,3-оксаселеноланилнуклеозидов до настоящего времени не удавалось из-за трудностей, обусловливаемых конструированием 1,3-оксаселеноланового кольца. Процесс получения такого кольца представляется в настоящем изобретении. Один из вариантов этого процесса проиллюстрирован на фиг. 1. Также представляется процесс получения выделенных β-D- (т.е. 2S,5R) и β-L-1,3-оксаселеноланиловых (т.е. 2R, 5S) нуклеозидов. Один из примеров такого процесса проиллюстрирован на фиг. 2. На фиг. 1 показана схема нумерации соединений, применяемая в примерах.

Пример 1. Получение 1,3-оксаселеноланового кольца.

Селеноцианат был получен по методу Кирби. На первом этапе проводили реакцию этилбромацетата (BrCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et) с селениацетатом калия в спирте с образованием селеноцианата 2.

С целью конструирования лактона 5 изначально была предпринята попытка восстановить селеноцианат 2 с использованием NaBH<sub>4</sub> и гидролизовать полученный в результате эфир водным раствором едкого натра с образованием селенолуксусной кислоты, которая может быть использована для конструирования системы оксаселеноланового кольца 5. Однако селенолуксусная кислота разлагается в ходе подкисления соляной кислотой при pH=2. Было сообще-



но о том, что селенолы могут быть легко окислены кислородом воздуха с образованием стабильных димеров, которые можно снова восстановить в селенолы с помощью  $\text{H}_3\text{PO}_2$ . Было установлено, что восстановление бис(селеноуксусной кислоты) в селенол, равно как и циклизация могут иметь место в одноэтапной реакции без образования промежуточных соединений. Соответственно, димер 3 был получен с выходом на уровне 81% путем нагревания 1 с обратным холодильником с  $\text{KSeCN}$  в этиловом спирте в течение 1 ч с последующим восстановлением  $\text{NaBH}_4$  при  $0^\circ\text{C}$  в течение 20-30 мин. Проводя сравнение с недавно опубликованными данными по процедуре получения диселенидов, становится ясно, что данный метод имеет преимущества, связанные с более мягкими условиями реакции, более высоким выходом и большей простотой работы. Лактон 5 был затем получен с 33%-ным выходом путем гидролиза 3 с обратным холодильником с водным раствором уксусной кислоты (50%) в течение 24 ч с последующим восстановлением селенолуксусной кислоты с помощью  $\text{H}_3\text{PO}_2$ , которую конденсировали *in situ* с 2-бензоилоксицетальдегидом в присутствии  $\text{H}_3\text{PO}_2$  в атмосфере азота. В связи с необходимостью восстановления лактона 5 было установлено, что DIBAL-H может избирательно восстанавливать лактон по отношению к эфиру в ТГФ, в то время как в толуоле такая избирательность не проявляется. Соответственно, ацетат сахара 7 был получен восстановлением 5 с помощью DIBAL-H в ТГФ с последующим ацетилированием *in situ* с помощью уксусного ангидрида. Конденсирование ацетата 7 без этапа очистки с силилированными основаниями в присутствии хлорида олова или TMSOTf позволило получить неразделимую смесь  $\alpha$ - и  $\beta$ -изомеров 8а и 8б. Удаление защитной бензоильной группы из состава 8а и 8б метиламином или аммиаком в метаноле приводит к получению конечных нуклеозидов в виде  $\alpha/\beta$ -смеси.  $\alpha$ -Цитозин был получен путем повторяющейся рекристаллизации  $\alpha/\beta$ -смеси из  $\text{MeOH}/\text{Et}_2\text{O}$  и затем метанола, в то время как  $\beta$ -цитозин 9а был получен с помощью ВЭЖХ-разделения материнского раствора ( $\text{C}_{18}$ -колонка, 20%-ный метанол в воде). Нуклеозиды  $\beta$ - и  $\alpha$ -5-фторцитозина были получены путем хроматографического разделения  $\alpha/\beta$ -смеси в силикагеле. Структура синтезированных селеноланнуклеозидов была подтверждена с применением элементного анализа,  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ -NMR (ЯМР - ядерно-магнитного резонанса). Стереохимический анализ был осуществлен на основании экспериментов 2D-NOESY, в которых была выявлена корреляция между 2'-Н и 5'-Н  $\beta$ -изомера 9б, в то время как у  $\alpha$ -изомера 10б такая корреляция отсутствовала. Также стереохимические оценки были подтверждены на основании сильнополюсного химического сдвига (в ЯМР) 2'-Н в составе 9а и 9б в

сравнении с таковыми у 10а и 10б вследствие дезэкранирования гетероциклическими основаниями.

#### Стереохимия

Благодаря хиральности атомов углерода 1' и 4' в составе 1,3-оксаселеноланиловой составляющей нуклеозида, их неводородные замещающие группы (соответственно пуриновые/пиримидиновые основания и группы  $\text{CHOR}$ ) могут иметь либо цис-положение (с той же стороны), либо транс-положение (по другую сторону) по отношению к кольцу сахара. Таким образом, четыре оптических изомера представлены следующими конфигурациями (принимая ориентацию сахарной составляющей в горизонтальной плоскости с расположением атома кислорода позади ее): "цис" (обе группы находятся "сверху", что соответствует конфигурации естественно встречающихся нуклеозидов), "цис" (обе группы расположены "снизу": такая конфигурация является "неестественной"), "транс" (замещающая группа  $\text{C}2'$  находится "сверху", а замещающая группа  $\text{C}4'$  - "снизу") и "транс" (замещающая группа  $\text{C}2'$  находится "снизу", а замещающая группа  $\text{C}4'$  - "сверху"). "D-нуклеозиды" - это цис-нуклеозиды в их естественной конфигурации, а "L-нуклеозиды" - это цис-нуклеозиды в их "неестественной" конфигурации.

Энантиомеры 1,3-оксаселеноланилнуклеозида были получены двумя путями: разделение с помощью хиральной (стереоселективной) хроматографии нуклеозида в соответствии с описанным в примере 2 и путем фракционированной кристаллизации L-ментоловых диастереомеров 1,3-оксаселенолана с последующей конденсацией растворенного 1,3-оксаселеноланилнуклеозида с желатальным основанием в присутствии кислоты Льюиса, которая не способна рацемизовать оксаселенолановое кольцо.

Пример 2. Разделение  $\beta$ -D- и  $\beta$ -L-энантиомеров 2-гидроксиметил-4-(N-5'-цитозин-1'-ил)-1,3-оксаселенолана и 2-гидроксиметил-4-(N-5'-фторцитозин-1'-ил)-1,3-оксаселенолана с помощью хиральной хроматографии.

2-гидроксиметил-4-(N-5'-цитозин-1'-ил)-1,3-оксаселенолан и 2-гидроксиметил-4-(N-5'-фторцитозин-1'-ил)-1,3-оксаселенолан разделяли с помощью хиральной хроматографии. Соединение в форме рацемата ( $\approx 2$  мг) растворили в минимальном количестве ( $\approx 400$  мкл) метанола (ВЭЖХ-чистоты). Для разделения были использованы следующие условия: водная ВЭЖХ-система; колонка -Chiralpak AS 4,6x250 мм; подвижная фаза - 2-пропанол; скорость потока - 0,80 мл/мин; детектор - УФ-260 нм; барботажный газ - гелий; скорость барботажа - 25 мл/мин на сольвентную емкость; инжецируемое количество 20 мкл раствора за один раз; время удерживания - 5,50 мин для (-)-(2S,5R)- $\beta$ -L-2',3'-дидезокси-3'-селеноцитидина; 6,92 мин для (+)-

(2R,5S)- $\beta$ -D-2',3'-дидезокси-3'-селеноцитидина; 5,97 мин для (-)-(2S,5R)- $\beta$ -L-2',3'-дидезокси-5-фтор-3'-селеноцитидина; 9,62 мин для (+)-(2R,5S)- $\beta$ -D-2', 3'-дидезокси-5-фтор-3'-селеноцитидина. Оптическая чистота разделенных соединений превышала 95%.

Пример 3. Разделение  $\beta$ -D- и  $\beta$ -L-энантиомеров 1,3-оксаселеноланиловых промежуточных продуктов конверсии диастереомеров с последующим разделением диастереомеров с помощью фракционированной кристаллизации.

(-)-L-ментолкарбоксияль. К смеси (-)-L-ментола (30 г, 0,2 моль) и глиоксиловой кислоты (36,8 г, 0,4 моль) в толуоле (1 л) добавляли *p*-TsOH (5 г) и реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 3 ч. По окончании реакции *p*-TsOH нейтрализовали Et<sub>3</sub>N и выпаривали досуха. Остаток растворили с хлороформом (500 мл), промывали водой (3 раза по 500 мл), собирали органический слой, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и выпаривали. Масляную фракцию кристаллизовали из петролейного эфира с получением (-)-L-ментолкарбоксияля в виде белых кристаллов - 20 г (выход 50%) : точка плавления - 82°C; <sup>1</sup>H-ЯМР (хлороформ)  $\delta$  (м.д.) 9,40 (с, 1H, CHO), 4,78 (дт, J=4,45, 11 Гц, 1H, 1-H), 0,75-2,03 (ср, 19H), <sup>13</sup>C-ЯМР (хлороформ)  $\delta$  (м.д.) 184,41, 170,22, 87,13, 46,79, 40,40, 34,00, 31,42, 26,11, 23,28, 21,94, 20,68, 16,15; аналитический расчет для C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>: C - 67,89; H - 9,50; найдено: C - 67,65; H - 9,67. Мол. масса: *m/e* 212,3 (M+).

[2-(1'R,2'S,5'R)-ментил-(5-он-1,3-оксаселенолан)]-L-карбоксияль 11 и [2-(1'R,2'S,5'R)-ментил-(5-он-1,3-оксаселенолан)]-D-карбоксияль.

К раствору (-)-L-ментолкарбоксияля (6,4 г, 30 ммоль) в толуоле (100 мл) добавляли (SeCH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub> (4,15 г, 15 ммоль) и реакционную смесь аккуратно нагревали до 100°C в атмосфере аргона при перемешивании. В течение 1 ч по каплям добавляли фосфорноватистую кислоту (50%-ный водный раствор, 2,7 мл). Затем реакционную смесь подвергали нагреванию с обратным холодильником еще в течение 1 ч при мощном перемешивании в атмосфере аргона. Реакционную смесь выпаривали до 20 мл, растворили в EtOAc (250 мл) и промывали водой (трижды по 500 мл). Отбирали органический слой, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и выпаривали. Остаток очищали хроматографически на силикагелевых колонках с использованием смеси EtOAc/Hex (1:10, объемное соотношение) в качестве элюента с получением 11 в качестве твердого вещества - 3,9 г (77,6%). В результате кристаллизации реакционной смеси из гексана при комнатной температуре позволило получить 11 соединение в виде бесцветных игольчатых кристаллов: точка плавления 106,5°C;  $[\alpha]_D^{25}=59,86^\circ$  (конц. 0,5, хлороформ); <sup>1</sup>H ЯМР (хлороформ)  $\delta$  (м.д.) 5,83 (с, 1H, 2'-H), 4,77 (дт, J=4,45, 12 Гц, 1H, 1-H), 3,97 (д, J=15,34 Гц, 1H,

4'-H<sub>b</sub>), 3,67 (дт, J=15,35 Гц, <sup>4</sup>J=21,17 Гц, 1H, 4'-H<sub>a</sub>), 0,75-2,03 (ср., 19H); <sup>13</sup>C ЯМР (хлороформ)  $\delta$  (м.д.) 173,97, 168,67, 76,88, 63,84, 47,07, 40,46, 34,02, 31,38, 26,07, 23,23, 22,65, 21,93, 20,71, 16,11. Аналитический расчет для C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>Se: C - 50,45; H - 6,65; найдено: C - 50,65; H - 6,62; Мол. масса: *m/e* 333 (M+). Материнский кристаллизующий раствор при -5°C;  $[\alpha]_D^{25}=111,71^\circ$  (с 0,5, хлороформ); <sup>1</sup>H ЯМР (хлороформ)  $\delta$  (м.д.) 5,83 (с, 1H, 2'-H), 4,78 (дт, J=4,45, 12 Гц, 1H, 1-H), 3,95 (д, J=15,41 Гц, 1H, 4'-H<sub>a</sub>), 3,68 (дт, J=15,45 Гц, <sup>4</sup>J=19,35 Гц, 1H, 4'-H<sub>a</sub>), 0,75-2,03 (ср., 19H); <sup>13</sup>C ЯМР (хлороформ)  $\delta$  (м.д.) 173,98, 168,63, 76,15, 63,76, 46,95, 39,88, 34,01, 31,32, 26,22, 23,24, 22,98, 21,94, 20,74, 16,14; аналитический расчет для C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>Se: C - 50,45; H - 6,65; найдено: C - 50,47; H - 6,63; Мол. масса: *m/e* 333 (M+).

1- $\beta$ -L-(2'-гидроксиметил-1',3'-оксаселенолан-5'-ил)-5-фторцитозин 15 и 1- $\alpha$ -L-(2'-гидроксиметил-1',3'-оксаселенолан-5'-ил)-5-фторцитозин 16.

К раствору три-трет-бутоксалиюмогидрида лития (6 ммоль, 6 мл 1M раствора в ТГФ) раствор лактона 11 (1 г, 3,33 ммоль) в 5 мл ТГФ добавляли по каплям при 10°C в течение одного часа при перемешивании в атмосфере аргона. Затем медленно добавляли уксусный ангидрид (2 г, 20 ммоль) при перемешивании при -5-0°C. Реакционную смесь дополнительно перемешивали в течение 1 ч, растворили в EtOAc (100 мл), промывали водой (3x100 мл), высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и выпаривали досуха с получением неочищенного 5'-ацетата 13. Ацетат сахара 13 растворили в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 мл) и медленно добавляли к силилированному 5-фторцитозину, полученному путем перемешивания смеси 5-фторцитозина (0,34 г, 2,63 ммоль), 2,4,6-коллина (0,8 мл, 6,61 ммоль) и трет-бутилдиметилсилилтрифторметансульфоната (1,32 г, 5,08 ммоль) в течение 1 ч в атмосфере аргона. К полученной в результате смеси добавляли йодтриметилсилан (0,35 г, 1,75 ммоль), перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч, растворили в хлороформе (100 мл), вливали в водный раствор Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (100 мл), промывали водой, высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и выпаривали досуха. Полученный остаток очищали с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле с использованием хлороформа в качестве элюента с получением неочищенного твердого вещества 13 (0,15 г, выход 11,2%). <sup>1</sup>H ЯМР CDCl<sub>3</sub>  $\delta$  (м.д.) 8,35 (д, J=6,3 Гц, 1H, 6-H), 7,55, 7,53 (2x шир. с, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,45 (ср., 1H, 5'-H), 6,14 (ср., 1H, 2'-H), 4,79 (ср., 1H, 1-H), 3,66 (ср., 2H, 6'-H<sub>ab</sub>). Раствор вещества 14 (0,15 г, 0,33 ммоль) в ТГФ (10 мл) при комнатной температуре выдерживали в атмосфере аргона в течение 1 ч. Реакционную смесь перемешивали дополнительно в течение 1 ч, добавляли MeOH (5 мл) и полученную в результате смесь направ-

ляли в короткую колонку с силикагелем. Колонку элюировали смесью EtOAc/Hex/MeOH (1:1:1; объемное соотношение, 100 мл). Элюент упаривали досуха и полученное твердое вещество очищали на силикагеле с использованием смеси хлороформа/этанола (20:1; объемное соотношение) в качестве элюента с получением смеси  $\beta$ -L-15 и  $\alpha$ -L-нуклеозидов 16 в виде белого твердого вещества - 0,033 г (выход 34%). Смесь повторно разделяли на колонке с силикагелем, с использованием для элюции смеси четырех растворителей EtOAc/Hex/CHCl<sub>3</sub>/EtOH (5:5:2:1; объемное соотношение).

1- $\beta$ -L-(2'-гидроксиметил-1',3'-оксаселенолан-5'-ил)-5-фторцитозин 15/

Белое твердое вещество (0,01 г, выход 10,2%); точка плавления 186-189°C (из метанола);  $[\alpha]_D^{25} = -55,69^\circ$  (конц. 0,35 метанол); УФ (H<sub>2</sub>O):  $\lambda_{max} = 280,0$  нм ( $\epsilon$  10646, pH=2), 280,0 нм ( $\epsilon$  7764, pH=11). <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (м.д.) 8,07 (д, J=7,1 Гц, 1H, 6-H), 7,92, 7,67 (2x шир.с, 2H, NH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O, обмениваемые), 6,06 (т, J=2,96 Гц, 1H, 5'-H), 5,42 (т, J=4,82 Гц, 1H, 2'-H), 5,34 (т, J=5,68 Гц, 1H, OH, D<sub>2</sub>O, обмениваемый), 3,81 (ср., 1H, 6'-H<sub>a</sub>), 3,68 (ср., 1H, 6'-H<sub>b</sub>), 3,39 (дд, J=4,84 Гц, 1H, 4'-H<sub>b</sub>), 3,08 (дд, J=8,11 Гц, 1H, 4'-H<sub>a</sub>); <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (м.д.) 157,7 (C=O), 153,3 (4-C), 137,6 (6-C), 135,2 (5-C), 88,3 (5'-C), 78,2 (2'-C), 64,0 (6'-C), 28,9 (4'-C). Аналитический расчет для C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>FSe: C - 32,67; H - 3,43; N - 14,29; найдено: C - 32,62; H - 3,51; N - 14,41; Мол. масса: m/e 295 (M+).

1- $\alpha$ -L-(2'-гидроксиметил-1',3'-оксаселенолан-5'-ил)-5-фторцитозин 16/

Белое твердое вещество (0,013 г, выход 13,2%); точка плавления 193-195°C (из метанола);  $[\alpha]_D^{25} = +84,20^\circ$  (конц. 0,26, метанол); УФ (H<sub>2</sub>O):  $\lambda_{max} = 279,5$  нм ( $\epsilon$  7638, pH=7), 287,5 нм ( $\epsilon$  9015, pH=2); 281,0 нм ( $\epsilon$  6929, pH=11). <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (м.д.) 7,91 (д, J=7,1 Гц, 1H, 6-H), 7,88, 7,63 (2x шир.с, 2H, NH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O, обмениваемые), 6,35 (т, J=4,95 Гц, 1H, 5'-H), 5,63 (дд, J=4,83 Гц, 1H, 2'-H), 5,28 (т, J=5,67 Гц, 1H, OH, D<sub>2</sub>O, обмениваемый), 3,70 (ср., 1H, 6'-H<sub>2</sub>), 3,53 (ср., 1H, 6'-H<sub>b</sub>), 3,47 (дд, J=4,82 Гц, 1H, 4'-H<sub>a</sub>), 3,24 (дд, J=7,88 Гц, 1H, 4'-H<sub>b</sub>); <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (м.д.) 157,8 (C=O), 153,2 (4-C), 137,3 (6-C), 134,9 (5-C), 88,6 (5'-C), 80,9 (2'-C), 65,5 (6'-C), 29,4 (4'-C). Аналитический расчет для C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>FSe: C - 32,67; H - 3,43; N - 14,29; найдено: C - 32,59; H - 3,49; N - 14,20; Мол. масса: m/e 295 (M+). Синтез нуклеозидов 8 и 9 проводится тем же путем из лактона 3 (1 г, 3,33 ммоль) с получением 1- $\beta$ -D-(2'-гидроксиметил-1',3'-оксаселенолан-5'-ил)-5-фторцитозин 8. Белое твердое вещество (0,007 г, выход 8,5%); точка плавления 186-189°C (из метанола);  $[\alpha]_D^{25} = +56,21^\circ$  (конц. 0,33, метанол); УФ (H<sub>2</sub>O):  $\lambda_{max} = 280,0$  нм ( $\epsilon$  8576, pH=7) 289,0 нм ( $\epsilon$  10456, pH=2); 280,0 нм ( $\epsilon$  7795, pH=11). <sup>1</sup>H ЯМР

(DMCO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (м.д.) 8,07 (д, J=7,1 Гц, 1H, 6-H), 7,92, 7,67 (2x шир.с, 2H, NH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O, обмениваемые), 6,06 (т, J=2,96 Гц, 1H, 5'-H), 5,42 (т, J=4,82 Гц, 1H, 2'-H), 5,34 (т, J=5,68 Гц, 1H, OH, D<sub>2</sub>O, обмениваемый), 3,81 (ср., 1H, 6'-H<sub>a</sub>), 3,68 (ср., 1H, 6'-H<sub>b</sub>), 3,39 (дд, J=4,84 Гц, 1H, 4'-H<sub>b</sub>), 3,08 (дд, J=8,11 Гц, 1H, 4'-H<sub>a</sub>); <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (м.д.) 157,7 (C=O), 153,3 (4-C), 137,6 (6-C), 135,2 (5-C), 88,3 (5'-C), 78,2 (2'-C), 64,0 (6'-C), 28,9 (4'-C).

Аналитический расчет для C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>FSe: C - 32,67; H - 3,43; N - 14,29; найдено: C - 32,57; H - 3,39; N - 14,35; Мол. масса: m/e 295 (M+).

1- $\alpha$ -D-(2'-гидроксиметил-1',3'-оксаселенолан-5'-ил)-5-фторцитозин 9/

Белое твердое вещество (0,01 г, выход 10%); точка плавления - 193-195°C (из метанола);  $[\epsilon]_D^{25} = -85,49^\circ$  (конц. 0,31, метанол); УФ (H<sub>2</sub>O):  $\lambda_{max} = 279,5$  нм ( $\epsilon$  7644, pH=7), 287,5 нм ( $\epsilon$  9067, pH=2); 281,0 нм ( $\epsilon$  6983, pH=11). <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (м.д.) 7,91 (д, J=7,1 Гц, 1H, 6-H), 7,88, 7,63 (2x шир.с, SH, NH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O, обмениваемые), 6,35 (т, J=4,95 Гц, 1H, 5'-H), 5,63 (дд, J=4,83 Гц, 1H, 2'-H), 5,28 (т, J=5,67 Гц, 1H, OH, D<sub>2</sub>O, обмениваемый), 3,70 (ср., 1H, 6'-H<sub>a</sub>); <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (м.д.) 157,8 (C=O), 153,2 (4-C), 137,3 (6-C), 134,9 (5-C), 88,6 (5'-C), 80,9 (2'-C), 65,5 (6'-C), 29,4 (4'-C). Аналитический расчет для C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>FSe: C - 32,67; H - 3,43; N - 14,29; найдено: C - 32,67; H - 3,48; N - 14,47; Мол. масса: m/e 295 (M+).

Табл. 1 представляет данные по разделению (+)- $\beta$ -Se-FddC, (-)- $\beta$ -Se-FddC, (+)- $\alpha$ -Se-FddC, (-)- $\alpha$ -Se-FddC и (-)- $\beta$ -Se-ddC и проводит сравнение времени удерживания и длины волн поглощения этих соединений и (-)- $\beta$ -FTC и (+)- $\beta$ -FTC.

Таблица 1. Результаты разделения

Соединение	Время удерживания (мин)	Длина волн поглощения (нм)	Оптическое вращение (градусы)	Чистота
(-)- $\beta$ -Se-FddC	4,8	247,3; 285,1	-103,2 (с0,5; метанол)	100
(+)- $\beta$ -Se-FddC	7,7	247,3; 285,1	+96,8 (с0,5; метанол)	100
(-)- $\alpha$ -Se-FddC	4,8	247,3; 285,1	н/о	100
(+)- $\alpha$ -Se-FddC	6,6	247,3; 285,1	н/о	90
(-)- $\beta$ -FTC	4,7	242,6; 285,1	---	---
(+)- $\beta$ -FTC	6,9	242,6; 285,1	---	---
(-)- $\beta$ -Se-ddC	9,5	242,6; 270,9	-72,4 (с1; ДМСО)	100
(+)- $\beta$ -Se-ddC	11,9	242,6; 270,9	+56,4 (с1; ДМСО)	96
(-)- $\alpha$ -Se-ddC	н/о	242,6; 270,9	-46,7 (с1; ДМСО)	100
(+)- $\alpha$ -Se-ddC	н/о	242,6; 270,9	+26,1 (с1; ДМСО)	94

Табл. 2 представляет индексы разрешения и разделения соединений в хроматографической колонке ChiralPak AS. Индекс разделения определен как время удерживания второго элюированного изомера за вычетом латентного времени в расчете на разницу между временем удерживания первого элюированного изомера и латентным временем. Индекс разрешения определен как удвоенная разница времени удерживания изомер-

ров (+) и (-) в расчете на ширину бэнда в двух пиках.

Таблица 2. Сравнение разделений на ChiralPak AS. Условия проведения хроматографии:

подвижная фаза - 2-пропанол: вводили 100 мкл в 10 мкл метанола; УФ-выявление при 254 нм; скорость потока - в мл/мин

Соединение	Индекс разделения $\alpha^a$	Разрешение $R_s^b$
рацемат $\alpha$ -Se-FddC	2,34	1,91
рацемат $\beta$ -Se-FddC	3,14	3,28
рацемат $\beta$ -FTC	2,84	2,87

<sup>a</sup>Индекс разделения = (время удержания второго элюированного изомера - латентное время)/(время удержания первого элюированного изомера - латентное время).

<sup>b</sup>Индекс разрешения =  $2 \times$  [разница времени удержания изомеров (+) и (-)]/(ширина бэнда в двух пиках).

Табл. 3 показывает влияние различных соотношений растворителей и скорости потока на хиральные пары в рацематах  $\beta$ -Se-ddC.

Таблица 3. Влияние различных соотношений растворителей и скоростей потока на хиральные пары в рацематах  $\beta$ -Se-ddC

Соотношение этанол/гексан	Скорость потока (мл/мин)	Разрешение $R_s$	Площадь первого элюированного пика (мкБ·сек $\times 10^7$ )	Время удержания первого пика (мин)
100:0	0,8	1,25	1,25	4,65
50:50	0,8	1,48	1,13	6,06
40:60	0,8	1,76	1,11	7,21
30:70	0,8	2,05	1,08	9,71
30:70	1,0	1,98	0,88	7,83
30:70	1,4	1,90	0,64	5,59
20:80	1,4	2,12	0,61	9,78
40:60	0,6	1,75	1,46	9,53

Моно-, ди- и трифосфатные производные активных нуклеозидов могут быть получены в соответствии с описанными методами. Монофосфат может быть получен в соответствии с процедурой Imai et al., 1969, J. Org. Chem., 34 (6), 1547-1550. Дифосфат может быть получен в соответствии с процедурой Davisson et al., 1987, J. Org. Chem., 52 (9), 1794-1801. Трифосфат может быть получен в соответствии с процедурой Hoard et al., 1965, J. Amer. Chem. Soc., 87 (8), 1785-1788.

### III. Комбинированная и чередовательная терапия

Было установлено, что после продолжительного применения для лечения антивирусного средства могут появляться резистентные к лекарствам варианты ВИЧ и ВГБ. Резистентность к лекарствам обычно происходит в результате мутаций в гене, который кодирует фермент, участвующий в жизненном цикле вируса: наиболее типично для ВИЧ - в гене обратной транскриптазы, протеазы или ДНК-

полимеразы, а в случае ВГБ - ДНК-полимеразы. Недавно было продемонстрировано, что эффективность применения лекарственного средства против ВИЧ-инфекции может быть удлинена, обеспечена или восстановлена введением соединения в сочетании или в чередовании со вторым, а возможно и третьим антивирусным соединением, что индуцирует другую мутацию по сравнению с той, которую индуцирует исходное лекарственное средство. С другой стороны, фармакокинетические, биодистрибутивные и иные параметры лекарства могут быть изменены с помощью такой комбинированной или чередовательной (альтернативной) терапии. В целом, комбинированная терапия обычно имеет преимущества перед чередовательной терапией благодаря тому, что она индуцирует множественные одновременные стрессовые воздействия на конкретный вирус.

В одном из вариантов второе антивирусное средство для лечения ВИЧ-инфекции может быть ингибитором обратной транскриптазы (ИОТ), который может являться либо синтетическим нуклеозидом (Н-ИОТ) или не являющимся нуклеозидом соединением (НН-ИОТ). В другом варианте в случае с ВИЧ второе (или третье) антивирусное средство может быть протеазным ингибитором. В других вариантах второе (или третье) соединение может быть пирофосфатным аналогом или химерным связывающим ингибитором. Сводные данные по резистентности *in vitro* и *in vivo* для ряда антивирусных соединений можно найти у Шинази с соавт. (Schinazi et al., 1996, "Mutations in retroviral genes associated with drug resistance". International Antiviral News, Volume 1(4), International Medical Press).

Предпочтительные соединения для комбинированной или чередовательной терапии для лечения ВИЧ-инфекции включают FTC ((-)-энантиомер или рацемат), L-FMAU, интерферон,  $\beta$ -D-диоксоланилгуанин (DXG),  $\beta$ -D-диоксоланил-2,6-диаминопурин (DAPD) и  $\beta$ -D-диоксоланил-6-хлорпурин (ACP), фамцикловир, пенцикловир, BMS-200475, bis-bom-PMEA (адельфовир, дипивоксил), лобукавир, ганцикловир и рибаварин.

Предпочтительными примерами антивирусных средств, которые могут быть использованы в сочетании или для чередования с соединениями, которые представляются в настоящем изобретении для лечения ВИЧ-инфекции, включают 2-гидроксиметил-5-(5-фторцитозин-1-ил)-1,3-оксатиолан (FTC), (-)-энантиомер 2-гидроксиметил-5-(цитозин-1-ил)-1,3-оксатиолан (ЗТС), карбовир, ацикловир, интерферон, AZT, DDI, DDC, D4T, CS-92 (3'-азидо-2',3'-дидезокси-5-метилцитидин) и  $\beta$ -D-диоксоланнуклеозиды, такие как  $\beta$ -D-диоксоланилгуанин (DXG),  $\beta$ -D-диоксоланил-6-хлорпурин (ACP) и МКС-442 (6-бензил-1-(этоксиметил)-5-изопропилаурацил).

Предпочтительные протеазные ингибиторы включают криксован (Merck), нельфиновир (Agouon), ритонавир (Abbot), сакинавир (Roche) и DMP-450 (DuPont Merck).

Не служащими ограничением примерами соединений, которые могут быть введены в сочетании или в чередовании с одним из любых 1,3-оксаселеноленилнуклеозидов, являются (1S, 4R)-4-[2-амино-6-циклопропиламино)-9Н-пурин-9-ил]-2-циклопентен-1-метанолсукцинат ("1592" - аналог карбовира: Glaxo Wellcome); 3ТС - (-)-β-L-2',3'-дидезокси-3'-трицитидин (Glaxo Wellcome); а-АРА R18893 - а-нитроанилинфенилацетамид; А-77003 - ингибитор протеазы, различающий C<sub>2</sub> (зеркальную) симметрию (Abbott); А-75925 - ингибитор протеазы, различающий C<sub>2</sub>-симметрию (Abbott); ААР-ВНАР - аналог бисгетероарилпиперазина (Upjohn); АВТ-538 - ингибитор протеазы, различающей C<sub>2</sub>-симметрию (Abbott); AzddU - 3'-азидо-2',3'-дидезоксиуридин; AZT - 3'-азидо-3'-дезокситимидин (Glaxo Wellcome); AZT-p-ddI - 3'-азидо-3'-деокситимидил-(-5',5')-2',3'-дидезок-сиинозиновая кислота (Ivax); ВНАР - бис-гетероарилпиперазин; ВІLА - 1906-N-{{3-[2S-{{(1,1-диметилэтил)амино}карбонил]-4R(3-пиримидинилметил)тио-1-пиперидинил]-2R-гидрокси-1S-(фенилэтил)пропил}амино} карбонил-2-метилпропил-2-хиолинкарбоксамид (BioMega/Boehringer-Ingelheim); ВІLА-2185 - N-(1,1-диметилэтил)-1-[2S-[[2-2,6-диметилфеноксид]-1-оксоэтил]амино]2-R-гидрокси-4-фенилбутил]4R-пиридинилтио-2-пиперидинкарбоксамид (BioMega/Boehringer-Ingelheim); ВМ+51.0836 - тиазолизоиндолиноновое производное; ВMS-186318 - аминокдиоловое производное ингибитора протеазы вируса ВИЧ-1 (Bristol-Myers-Squibb); d4API-9-[2,5-дигидро-5-(фосфонотокси)-2-фуран]аденин (Gilead); d4C - 2',3'-дидегидро-2',3'-диде-зокситидин; d4T - 2',3'-дидегидро-3'-диде-зокситимидин (Bristol-Myers-Squibb); ddC - 2',3'-дидезоксицитидин (Roche); ddI - 2',3'-дидезоксиинозин (Bristol-Myers-Squibb); DMP-266 - 1,4-дигидро-2Н-3,1-бензоксазин-2-он; DMP-450 - {{4R-(4-а,5-а,6-б,7-б)}}-гексагидро-5,6-бис(гидрокси)-1,3-бис(3-амино)фенил]метил-4,7-бис(фенилметил)-2Н-1,3-дiazепин-2-он}-бисмезилат (Avid); DXG - (-)-β-D-диоксолангуанозин (Triangle); EBU-dM - 5-этил-1-этоксиметил-6-(3,5-диметилбензил)урацил; E-EBU - 5-этил-1-этоксиметил-6-бензилурацил; DS - декстрансульфат; E-EPSeU - 1-(этоксиметил)-(6-фенилселенил)-5-этилурацил; E-EPU - 1-(этоксиметил)-(6-фенилтио)-5-этилурацил; FTC - β-2',3'-дидезокси-5-фтор-3'-тиацитидин (Triangle); НВУ097 - S-4-изопропоксикарбонил-6-метокси-3-(метилтиометил)-3,4-дигидрохиноксалин-2(1H)-тион; НЕРТ - 1-[2-(гидроксиэтокси)метил]-6-(фенилтио)тимин; ВИЧ-1 - вирус иммунодефицита человека 1-го типа; JM2763 - 1,1'-(1, 3-пропандиол)-бис-1,4,8,11-

тетраазациклотетрадекан (Johnson Matthey); JM3100 - 1,1'-[1,4-фенилен-бис(метилен)]-бис-1, 4, 8, 11-тетраазациклотетрадекан (Johnson Matthey); KNI-272 - трипептид, включающий (2S,3S)-3-амино-2-гидрокси-4-фенилбутировую кислоту; L-697593 - 5-этил-6-метил-3-(2-фталидидоэтил)пиридин-2(1H)-он; L-735524 - гидроксиаминопентанамид ингибитора протеазы ВИЧ-1 (Merck); L-697661 - 3-{{(-4,7-дихлор-1,3-бензоксазол-2-ил)метил}амино}-5-этил-6-метилпиридин-2(1H)-он; L-FDDC - (0)-β-L-5-фтор-2',3'-дидезоксицитидин; L-FDOC - (-)-β-L-5-фтордиоксоланцитозин; МКС-442 - 6-бензил-1-этоксиметил-5-изопропилаурацил (I-EBU: Triangle/Mitsubishi); невирапин - 11-циклопропил-5,11-дигидро-4-метил-6Н-дипиридол[3,2-б:2',3'-е]дiazепин-6-он (Boehringer-Ingelheim); NSC648400 - 1-бензилоксиметил-5-этил-6-(α-пиридилтио)урацил (E-BPTU); P9941 - [2-пиридилацетилизолейцинфенилаланиналанин-(СНОН)]<sub>2</sub> (Dupont Merck); PFA - фосфоноформат (фоскарнет: Astra); РМЕА - 9-(2-фосфонилметоксиэтил)аденин (Gilead); РМРА - (R)-9-(2-фосфонилметоксипропил)аденин (Gilead); Ro 31-8959 - гидроксизетиламиновое производное ингибитора протеазы ВИЧ-1 (Roche); RPI-312 - ингибитор пептидилпротеазы, 1-[[3(S)-3-(n-α-бензилоксикарбонил)-1-аспаргинил]-амино-2-гидрокси-4-фенилбутирил]-n-трет-бутил-1-пролинамид; 2720 - 6-хлор-3,3-диметил-4-(изопропенилоксикарбонил)-3,4-дигидрохиноксалин-2(1H)-тион; SC-52151 - ингибитор изостерической протеазы гидроксизетилмочевины (Searle); SC-55389A - ингибитор изостерической протеазы гидроксизетилмочевины (Searle); TIBO R82150 - (+)-5S)-4,5,6,7-тетрагидро-5-метил-6-(3-метил-2-бутинил)имидазо[4,5,1-jk]-[1,4]-бензодiazепин-2(1H)-тион (Janssen); TIBO 82913 - (+)-5S)-4,5,6,7-тетрагидро-9-хлор-5-метил-6-(3-метил-2-бутинил)имидазо[4,5,1-jk]-[1,4]-бензодiazепин-2(1H)-тион (Janssen); TSAO-m3T - [2',5'-бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)-3'-спиро-5'-(4'-амино-1',2'-оксатиол-2',2'-диоксид)]-b-D-пентофуранозил-N3-метилтимин; U90152 - 1-[3-[1-(метилэтил)амино]-2-пиридинил]-4-[[5-[(метилсульфонил)амино]-1H-индол-2-ил]карбонил]пиперазин; UC тиокарбоксамидные производные (Uniroyal); UC-781 - N-[4-хлор-3-(3-метил-2-бутилокси)фенил]-2-метил-3-фуранкарботиоамид; UC-82 - N-[4-хлор-3-(3-метил-2-бутилокси)фенил]-2-метил-3-тиофенкарботиоамид; VB 11328 - гидроксизетилсульфонамид ингибитора протеазы (Vertex); VS-478 - гидроксизетилсульфонамид ингибитора протеазы (Vertex); ХМ-323 - цикломочевой ингибитор протеазы (Dupont Merck).

#### IV. Способность 1,3-оксаселеноланилнуклеозидов подавлять репликацию ВИЧ и ВГБ

Способность нуклеозидов подавлять ВИЧ может быть определена с помощью различных экспериментальных методик. Используемая в

данном случае методика, подробно описанная ниже, позволяет измерять уровень подавления репликации вирусов в стимулированных фитогемагглютинином (ФГА) моноядерных клетках периферической крови человека (РВМ), зараженных вирусом ВИЧ-1 штамма LAV. Количество образующегося вируса определяется с помощью измерения уровня кодируемой вирусным геномом обратной транскриптазы. Количество вырабатываемого фермента пропорционально количеству образующегося вируса.

Пример 4. Анти-ВИЧ активность 1,3-оксаселеноланилнуклеозидов.

По анти-ВИЧ активности были протестированы 2-гидроксиметил-4-(N-5'-цитозин-1'-ил)-1,3-оксаселенолан и 2-гидроксиметил-4-(N-5'-фторцитозин-1'-ил)-1,3-оксаселенолан.

Трехдневные стимулированные фитогемагглютинином клетки РВМ (1 млн. клеток на 1 мл), выделенные у доноров, которые при серологическом анализе были негативны по вирусам ВИЧ-1 и гепатита-В, инфицировали ВИЧ-1 (штамм LAV) в концентрации приблизительно в 100 раз превышающей 50% инфекционную дозу в тканевой культуре (TICD<sub>50</sub>) на 1 мл и культивировали в присутствии или отсутствии антивирусных соединений с различными концентрациями.

Примерно через 1 ч после инфицирования среду с тестируемым соединением (двукратно по отношению к конечной концентрации в среде) или не содержащую соединение, добавляли в колбы (5 мл; конечный объем - 10 мл). В качестве позитивного контроля использовали AZT.

Клетки подвергали заражению вирусом (примерно  $2 \times 10^5$  ед/мл, по данным теста на обратную транскриптазу) и затем помещали в углекислотный инкубатор. Вирус ВИЧ-1 (штамм LAV) был получен из Центра по контролю за заболеваемостью Атланты, штат Джорджия (США). Методы, использовавшиеся для культивирования клеток РВМС, сбора вируса и определения активности обратной транскриптазы соответствовали тем, которые описаны у McDougal et al., 1985, J. Immunol. Methods, 76, 171-183 и Spira et al., 1987, J. Clin. Methods, 25, 97-99, за исключением того, что в среду не включали фунгизон (см. Schinazi et al., 1988, Antimicrob. Agents Chemotherapy, 32, 1784-1787; то же, 34, 1061-1067 (1990)).

На 6-й день клетки и надосадочную фракцию переносили в 15 мл пробирку и центрифугировали при 900g в течение 10 мин. Пять мл надосадочной фракции удаляли и вирус концентрировали центрифугированием при 40000 об/мин в течение 30 мин (центрифуга Beckman 70,1-Ti). Солюбилизованный вирусный осадок тестировали для определения уровня обратной транскриптазы. Полученные результаты выражали в ед. на мл тестируемого супернатанта. Вирусы из меньших

объемов надосадочных фракций (1 мл) также могут быть концентрированы центрифугированием до солюбилизации и определения уровня обратной транскриптазы.

Среднюю эффективную концентрацию (EC<sub>50</sub>) определяли по методу "среднего эффекта" (Antimicrob. Agents Chemotherapy, 30, 491-498, 1986). Вкратце, процент подавления вируса, определяемый путем измерения уровня обратной транскриптазы, соотносили с микромолярными концентрациями тестируемого соединения. Величина EC<sub>50</sub> - концентрация соединения, при которой имело место 50%-ное подавление роста вирусов.

Стимулированные митогеном неинфицированные клетки РВМ человека ( $3,8 \times 10^5$  клеток/мл) культивировали в присутствии или отсутствие лекарственного средства при тех же условиях, которые были использованы в тестировании антивирусной активности, описанном выше. Клетки подсчитывали через 6 дней с использованием гемоцитометра и методом исключения с трипановым синим в соответствии с описанным у Schinazi et al., 1982, Antimicrobial Agents Chemotherapy, 22(3), 499. Величина IC<sub>50</sub> - концентрация соединения, которая подавляет нормальный рост клеток на 50%.

Табл. 4 показывает значения EC<sub>50</sub> (концентрации нуклеозида, которые подавляют репликацию вируса на 50% в клетках РВМ, определенные с учетом 10%-ной ошибки) и величины IC<sub>50</sub> (концентрации нуклеозида, которые подавляют на 50% рост стимулированных митогеном неинфицированных клеток РВМ человека, клеток СЕМ и клеток Vero) для 2-гидроксиметил-4-(N-5'-цитозин-1'-ил)-1,3-оксаселенолана и 2-гидроксиметил-4-(N-5'-фторцитозин-1'-ил)-1,3-оксаселенолана.

Таблица 4. Анти-ВИЧ активность оксаселеноланилнуклеозидов

Основание	Анти-ВИЧ активность в клетках РВМ (EC <sub>50</sub> , мкМ)	Токсичность (IC <sub>50</sub> , мкМ) для клеток		
		РВМ	СЕМ	Vero
Цитозин	0,88	> 100	> 100	> 100
5-фторцитозин	0,07	> 100	> 100	> 100

Табл. 5 показывает уровень чистоты, величины EC<sub>50</sub> (мкМ), величины EC<sub>90</sub> (мкМ) и величины IC<sub>50</sub> в клетках РВМС для рацемата β-Se-FddC, его отдельных изомеров (+) и (-), рацемата β-Se-FddC и его отдельных изомеров (+) и (-).

Таблица 5. Анти-ВИЧ активность и цитотоксичность рацематов и энантиомеров оксаселеноланцитозинового нуклеозидов

Соединение	Энантиомер	Чистота, %	ЕС <sub>50</sub> , мкМ	ЕС <sub>90</sub> , мкМ	ТС <sub>50</sub> РЕМ
$\beta$ -Se-ddC	$\pm$	50	2,69	209	> 100
$\beta$ -Se-ddC	-	$\approx$ 100	0,88	5,42	> 100
$\beta$ -Se-ddC	+	$\approx$ 96	3,39	677	> 100
$\beta$ -Se-FddC	$\pm$	50	5,55	16,41	> 100
$\beta$ -Se-FddC	-	$\approx$ 100	0,21	1,05	> 100
$\beta$ -Se-FddC	+	$\approx$ 100	41,9	164	> 100

Анти-ВИЧ активность  $\beta$ -Se-ddC, его отдельных изомеров (+) и (-), а также  $\beta$ -Se-FddC и его отдельных изомеров (+) и (-) была также протестирована в клетках РВМ, инфицированных вирусом ВИЧ, который характеризуется мутацией в 184-м кодоне гена обратной транскриптазы. Результаты этого теста приведены в табл. 6. Как видно из нее, рацемат и изомер (-)- $\beta$ -Se-ddC проявляют существенную активность по отношению к мутантному вирусу.

Таблица 6. Влияние оксаселеноланцитозинового нуклеозидов на клонированный М184 ВИЧ-1

Соединение	Энантиомер	Чистота, %	Вirus	ЕС <sub>50</sub> , мкМ	ЕС <sub>90</sub> , мкМ	FI	FI
						ЕС <sub>50</sub>	ЕС <sub>90</sub>
$\beta$ -Se-ddC	$\pm$	50	xxBRU	1,84	6,90	-	-
$\beta$ -Se-ddC	-	$\approx$ 100	xxBRU	0,11	0,95	-	-
$\beta$ -Se-ddC	+	$\approx$ 96	xxBRU	8,62	35,1	-	-
$\beta$ -Se-FddC	$\pm$	50	M184V	108	337	59	49
$\beta$ -Se-FddC	-	$\approx$ 100	M184V	> 50	> 50	> 455	> 53
$\beta$ -Se-FddC	+	$\approx$ 96	M184V	> 50	> 50	> 6	> 1

Примечание: FI (степень увеличения)  $ES_{90} =$  отношение  $ES_{50}$  для клонированного вируса к  $ES_{50}$  для вируса xxBRU

Пример 5. Анти-ВИЧ активность 1,3-оксаселеноланцилнуклеозидов.

Способность активных соединений подавлять рост вируса в культивируемых клетках 2.2.15 (клетки HepG2, трансформированные вирионами гепатита) может быть оценена так, как это подробно описано ниже.

Принцип и описание такого теста для выявления антивирусных проявлений в данной культуральной системе и анализ ДНК ВГБ был описан (Korba & Milman, 1991, Antiviral Res., 15, 217). Оценки антивирусного влияния проводят в двух отдельных клеточных пассажах. Все лунки на всех планшетах засевают при одинаковой плотности и в одно и то же время.

Из-за врожденной изменчивости уровней внутриклеточной и внеклеточной ДНК гепатита-В, лишь величины подавления, превышающие в 3,5 раз (для ДНК вирусного вириона) или в 3 раза (для репликационных интермедиатов ДНК ВГБ) по отношению к средним уровням этих ДНК-форм вируса в неподвергавшихся дополнительному воздействию клетках будут статистически достоверными ( $P < 0,05$ ). Уровни интеграции ДНК ВГБ в каждом клеточном препарате ДНК (которые остаются постоянными в расчете на 1 клетку благодаря выбранной схеме эксперимента) используют для расчета внутри-

клеточных форм ДНК ВГБ, что тем самым обеспечивает уверенность в одинаковом количестве клеточной ДНК, сравниваемой при сопоставлении отдельных образцов.

Типичные значения внеклеточной вирионной ДНК ВГБ в неподвергавшихся воздействию клетках варьируются от 50 до 150 пкг/мл культуральной среды (в среднем приблизительно 76 пкг/мл). Внутриклеточные репликационные интермедиаты ДНК ВГБ в неподвергавшихся воздействию клетках варьируются от 50 до 100 пкг/мкг клеточной ДНК (в среднем 74 пкг/мкг клеточной ДНК). В целом, подавление уровней внутриклеточной ДНК ВГБ в результате обработки клеток антивирусными соединениями менее выражено и происходит с меньшей скоростью по сравнению с подавлением уровней вирионной ДНК ВГБ (Korba & Milman, 1991, Antiviral Res., 15, 217).

Подход, с помощью которого в данном эксперименте проводился гибридизационный анализ, который показал эквивалентность приблизительно 1,0 пкг внутриклеточной ДНК ВГБ двум-трем копиям вирусного генома на 1 клетку, а 1,0 пкг/мл внеклеточной ДНК ВГБ - 300 тысячам вирусных частиц на 1 мл.

Анализ токсичности может быть проведен с целью выяснения того, обусловлено ли любое из наблюдаемых антивирусных проявлений принципиальным влиянием на жизнеспособность клеток. Одним из методов, который может быть в данном случае применен, является измерение поглощения нейтрального красного красителя, являющегося стандартным и широко применяемым в тестах на клеточную жизнеспособность в различных системах "вирус-хозяин", включая вирусы ВГБ и ВИЧ. Анализ токсичности проводят на 96-луночных плоскодонных планшетах для тканевого культивирования. Клетки для анализа токсичности культивируют и обрабатывают тестируемыми соединениями таким же образом, как это подробно описано ниже для оценок антивирусной активности. Каждое соединение тестировали в четырех концентрациях, в каждом случае - в трех повторностях (лунки "А", "В" и "С"). Уровень поглощения нейтрального красного красителя использовали в качестве меры относительного уровня токсичности. Для количественного анализа использовали показатели поглощения внедрившегося в клетки красителя при 510 нм ( $A_{510}$ ). Значения для тестируемых соединений представлены в виде процентных долей от величины  $A_{510}$  в 9 отдельных культурах, не подвергавшихся воздействию клеток, выращиваемых на одном и том же 96-луночном планшете.

Пример 6. Применение 1,3-оксаселеноланцилнуклеозидов для лечения аномальной пролиферации клеток.

Некоторые из описанных в данном тексте 1,3-оксаселеноланцилнуклеозидов могут быть применены для лечения аномальной пролифе-

рации клеток, включая опухоли вообще и раковые опухоли в частности. Уровень антипролиферационной активности может быть легко оценен путем тестирования соединения в соответствии с процедурой, описанной ниже для клеток СЕМ, или с использованием тестов на других опухолевых или пролиферативных клеточных линиях. Клетки СЕМ являются лимфоидными клетками человека (Т-лимфобластная клеточная линия, которая доступна из Американской коллекции типовых культур в Роквилле, штат Мэриленд, США). Токсичность соединения в отношении клеток СЕМ дает информацию, отражающую активность соединения в отношении опухолей. Токсичность определяют как индекс  $IC_{50}$ , выраженный в микромолях. Индекс  $IC_{50}$  обозначает ту концентрацию тестируемого соединения, которая подавляет рост опухолевых клеток в культуре на 50%. Чем ниже величина  $IC_{50}$ , тем более активно конкретное соединение в качестве противоопухолевого агента. В целом, 1,3-оксаселеноланилнуклеозид проявляет противоопухолевую активность и может быть применен для лечения аномальной пролиферации клеток, если он проявляет токсичность в отношении клеток СЕМ или других иммортализованных опухолевых клеточных линий на уровне менее 10 микромолей, более предпочтительно менее приблизительно 5 микромолей, а наиболее предпочтительно на уровне менее 1 микромоля.

Растворы лекарственного средства, включая циклогексимид, взятый в качестве позитивного контроля, используют в трех повторностях в 50 мкл питательной среды в удвоенной конечной концентрации с последующим уравновешиванием при 37°C в углекислотном (5%) инкубаторе. Клетки, находящиеся на логарифмической фазе роста, добавляют в 50 мкл культуральной среды до конечной концентрации 2500 клеток на лунку (СЕМ и SK-MEL-28), 5000 клеток на лунку (MNAN, MDA-MB-435S, SKMES-1, DU-145, LNCaP) или 10000 клеток на лунку (PC-3, MCF-7) и инкубируют в течение 3 дней (DU-145, PC-3, MNAN), 4 дней (MCF-7, SK-MEL-28, СЕМ) или 5 дней (SKMES-1, MDA-MB-435S, LNCaP) при 37°C в условиях атмосферы воздуха с 5% углекислого газа. Контрольные лунки включают только культуральную среду ("чистые") и клетки в культуральной среде без лекарственного агента. После периода роста в каждую лунку добавляют по 15 мкл раствора красителя из набора реактивов для титрования клеток Cell Titer 96 kit (Promega, Madison, WI) и планшеты инкубируют в течение 8 ч при 37°C в углекислотном (5%) инкубаторе. Затем добавляют останавливающий раствор из того же набора реактивов (Cell Titer 96 kit: Promega) и инкубируют в течение 4-8 ч в том же инкубаторе. Величины поглощения определяют при 570 нм с пропусками лунок, содержащих только культуральную среду, с использованием план-

шета-ридера Biotek Biokinetics (Biotek, Winooski, VT). Подсчитывают средний уровень подавления роста в сравнении с не подвергавшимся обработке контролем. С использованием метода Чоу-Талалаи определяют величины  $IC_{50}$ ,  $IC_{90}$ , коэффициент регрессии и угловой коэффициент (Chou T. C. & Talalay, P. 1984, "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors", *Adv. Enzyme Regul.*, 22, 27-55).

#### IV. Приготовление фармацевтических композиций

Пациенты, страдающие от любого из описанных в настоящем тексте заболеваний, включая ВИЧ- и ВГБ-инфекции, или характеризующиеся аномальной пролиферацией клеток, могут быть подвергнуты лечению путем введения эффективного количества 1,3-оксаселеноланилнуклеозида, произвольно в фармацевтически приемлемом носителе или растворителе. Активные компоненты могут быть введены любым подходящим способом, например перорально, парентерально, внутривенно, внутрикожно, подкожно или местно, в жидкой или твердой форме.

Активное соединение включают в фармацевтически приемлемый носитель или растворитель в количестве, достаточном для доставки пациенту терапевтически эффективного количества соединения, предназначенного для подавления репликации вирусов *in vivo*, в первую очередь, репликации вирусов ВИЧ и ВГБ, без проявления серьезных токсических последствий у таких пациентов. Понятие "ингибирующее количество" обозначает такое количество активного компонента, которого достаточно для достижения ингибирующего эффекта, который может быть оценен, например, методом как один из описанных здесь тестов.

Предпочтительная доза соединения для применения в обозначенных выше условиях должна находиться в пределах от 1 до 50 мг на 1 кг веса тела пациента, предпочтительно от 1 до 20 мг/кг в день, а в более общем плане - от 0,1 до примерно 100 мг на 1 кг веса тела пациента в день. Эффективные дозировки для фармацевтически приемлемых производных препаратов могут быть определены, исходя из веса предназначенного для введения исходного нуклеозида в этом препарате. Если производный препарат характеризуется собственной активностью, то эффективные дозировки могут быть определены так, как это описано выше для производного препарата, или с помощью других подходов, известных специалистам в данной области техники.

Соединение вводят стандартными дозами или любыми другими подходящими формами дозировки, включая, но не тем самым не ограничиваясь, дозировочные единицы (стандартные дозы), содержащие от 7 до 3000 мг, предпочтительно от 70 до 1400 мг активного компонента.



Обычно стандартным для перорального введения является использование единичных дозировок по 50-1000 мг.

В идеале активный компонент должен вводиться таким образом, чтобы достигался пик концентрации в плазме крови примерно от 0,2 до 70 мкМ, предпочтительно примерно от 1,0 до 10 мкМ. Этого можно добиться, например, путем внутривенных инъекций 0,1-5%-ного раствора активного компонента, произвольно в солевом растворе, или путем введения активного компонента в виде болуса.

Концентрация активного компонента в лекарственной композиции должна зависеть от уровня поглощения, инактивации в организме и экскреции лекарственного средства, а также от других факторов, известных специалистам в данной области техники. Необходимо отметить, что величины дозировок также будут варьироваться в зависимости от тяжести состояния. Также должно быть понятно, что для конкретного пациента может быть разработан индивидуальный режим дозировок в течение того периода времени, когда требуется учет индивидуальных потребностей, и исходя из профессиональных оценок врача, назначающего введение данных композиций, а также должно быть понятно, что приведенный в данном тексте диапазон концентраций является лишь примером и, соответственно, не претендует на ограничение масштаба или практики применения композиций, представляемых настоящим изобретением. Активный компонент может быть введен однократно или может быть разделен на серию меньших доз, которые вводят на протяжении какого-либо периода времени.

Предпочтительным путем введения активного соединения является пероральный путь. Композиции для перорального введения в принципе должны содержать инертный растворитель либо съедобный носитель. Они могут быть упакованы в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. Для целей перорального терапевтического применения активное соединение может быть соединено с наполнителем и применено в форме таблеток, капсул или пастилок. Как компоненты композиций, могут быть включены фармацевтически совместимые агенты и (или) адъюванты.

Таблетки, драже, капсулы, пастилки и подобное могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений сходной природы: связывающий компонент, такой как микрокристаллическая целлюлоза, смола трагаканта или желатин; наполнитель, такой как крахмал или лактоза; дезинтегрирующий компонент, такой как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; лубрикант, такой как стеарат магния или стеротес; скользящее вещество, такое как коллоидный раствор двуокиси кремния; подслащивающий компонент, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор,

такой как перечная мята, метилсалицилат или экстракт цитрусовых. В случае, когда единицей дозирования является капсула, она может, в дополнение к обозначенным выше компонентам, содержать жидкий носитель, такой как масло. Кроме того, стандартные дозы могут содержать различные иные материалы, которые бы модифицировали ее физическое состояние, например, покрытие сахаром, шеллаком или другими съедобными ингредиентами.

Соединение может быть введено в виде компонента бальзама, суспензии, сиропа, облатки, жевательной резины и подобного. Сироп в дополнение к активным компонентам может включать сахарозу (как подслащивающий компонент) и некоторые консерванты, красители и ароматизаторы.

Соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемые производные или соли также могут быть смешаны с другими активными компонентами, которые не нарушают их желательную активность, или с компонентами, усиливающими желательную функцию, такими как антибиотики, противогрибковые препараты, противовоспалительные средства, протеазные ингибиторы или другие нуклеозидные или не являющиеся нуклеозидами антивирусные агенты, которые более подробно обсуждались в данном тексте выше. Растворы или суспензии, применяемые для парентерального, внутривенного, подкожного или местного введения, могут включать следующие компоненты: стерильный растворитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, стойкие масла, полиэтиленгликоль, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; противобактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиокислители, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; деминерализующий компонент, такой как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетатный, цитратный или фосфатный; и изотонические компоненты, такие как хлорид натрия или декстроза. Исходный препарат может быть помещен в ампулы, одноразовые шприцы или ампулы с серийными дозами, изготовленные из стекла или пластика.

При внутривенном введении предпочтительными носителями являются физиологический раствор или фосфатный буфер.

В предпочтительном варианте активные соединения объединяют с носителями, которые бы защищали данное соединение от быстрого удаления из организма, например в форме, обеспечивающей регулируемый выход препарата, включая имплантаты и микрокапсульные системы. Могут быть использованы биологически разрушаемые, биологически совместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полианигриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимеризованная молочная

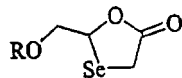
кислота. Способы приготовления таких препаратов хорошо известны специалистам в данной области техники. Материалы также могут быть приобретены в Alza Corporation на коммерческой основе.

Липосомные суспензии (включая липосомы, с моноклональными антителами к вирусным антигенам), нацеленные на инфицированные клетки также являются целесообразными в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть приготовлены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например в соответствии с описанным в патенте США № 4522811 (включен в данный текст путем цитирования). Например, липосомные препараты могут быть приготовлены путем растворения подходящих липидов, таких как стеарилфосфатидилэтноламин, стеарилфосфатидилхолин, арахидилфосфатидилхолин и холестерин, в неорганическом растворителе, который затем упаривают до получения тонкой пленки высушенного липида на поверхности контейнера. Водный раствор активного компонента или его монофосфатного, дифосфатного и(или) трифосфатного производного затем вносят в этот контейнер. Затем контейнер вручную вращают для освобождения липидного материала от стенок контейнера и диспергирования липидных агрегатов, тем самым образуя липосомную суспензию.

Настоящее изобретение было описано со ссылками на его предпочтительные варианты. Изменения и модификации настоящего изобретения могут быть очевидны для специалистов в данной области техники, исходя из предшествующего подробного описания настоящего изобретения. Подразумевается, что все такие изменения и модификации должны быть включены в объем настоящего изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

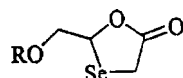
##### 1. 1,3-Оксаселеноланлактон формулы



где R обозначает водород, ацил, моно-, ди- или триэфир фосфорной кислоты, стабилизированный фосфат или остаток липида,

или его фармацевтически приемлемая соль.

##### 2. Способ получения 1,3-оксаселеноланлактона формулы



где R обозначает водород, ацил, моно-, ди- или триэфир фосфорной кислоты, стабилизированный фосфат или остаток липида,

или его фармацевтически приемлемой соли, включающий

а) получение димера селенола формулы (SeCH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub>;

б) восстановление указанного димера и

с) взаимодействие восстановленного продукта с ROCH<sub>2</sub>CHO с образованием 1,3-оксаселеноланлактона.

3. Способ по п.2, где ROCH<sub>2</sub>CHO обозначает VzOCH<sub>2</sub>CHO.

4. Способ по п.2, где восстановление и взаимодействие осуществляют без выделения каких-либо промежуточных соединений.

5. Способ по пп.2-4, где восстановление осуществляется с использованием H<sub>3</sub>PO<sub>2</sub>.

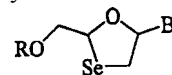
6. Способ по п.2, где димер селенола получают из селенилцианида, включающий

а) взаимодействие селенилцианида формулы K-SeCN с Br-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et с образованием NCS<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et;

б) димеризацию NCS<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et с образованием (SeCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub> и, при необходимости,

с) активирование (SeCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub> с образованием (SeCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>.

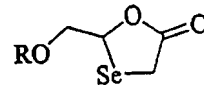
7. Способ получения 1,3-оксаселеноланнуклеозида формулы



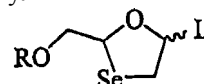
где B обозначает пуриновое или пиримидиновое основание, а R обозначает водород, ацил, моно-, ди- или триэфир фосфорной кислоты, стабилизированный фосфат или остаток липида,

или его фармацевтически приемлемой соли, включающий

а) получение 1,3-оксаселеноланлактона формулы



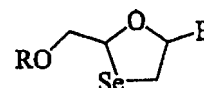
б) активирование указанного лактона в соединение формулы



где L обозначает соответствующую удаляемую группу, галоген или ацил, такой как OAc;

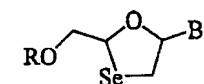
с) взаимодействие активированного лактона с необязательно силилированным основанием с образованием 1,3-оксаселеноланнуклеозида; и, при необходимости

д) депротектирование указанного нуклеозида с образованием 1,3-оксаселеноланнуклеозида формулы



где B обозначает пуриновое или пиримидиновое основание, а R обозначает водород; и, необязательно

е) активирование указанного нуклеозида с образованием 1,3-оксаселеноланнуклеозида формулы



где B обозначает пуриновое или пиримидиновое основание, а R обозначает ацил, моно-, ди- или

триэфир фосфорной кислоты, стабилизированный фосфат или остаток липида,

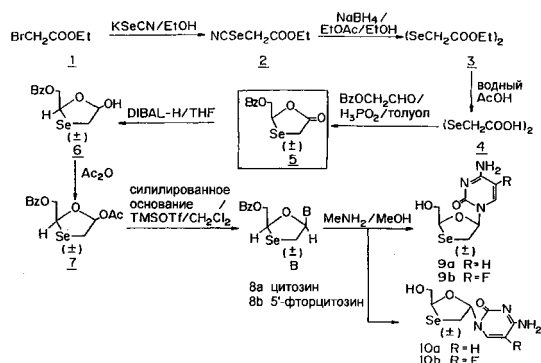
или его фармацевтически приемлемой соли.

8. Способ по п.7, где взаимодействие осуществляется в присутствии триметилсилилтрифлата.

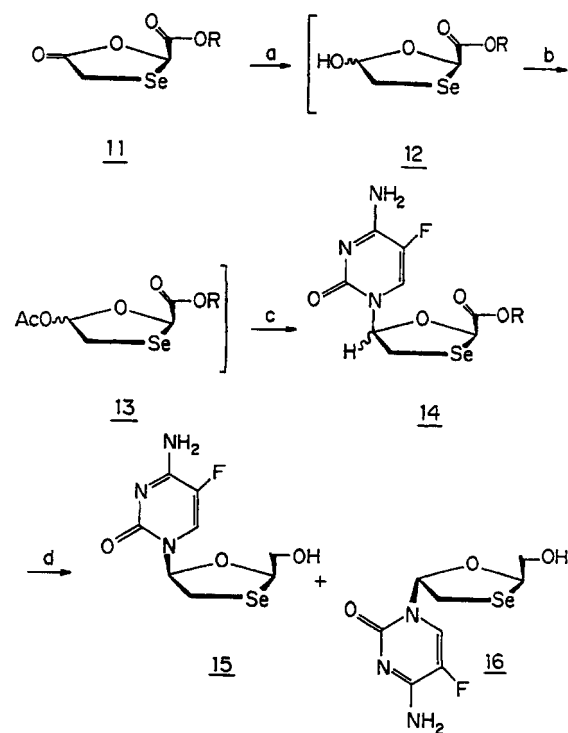
9. Способ по п.7, где L обозначает ацил.

10. Способ по п.7, где L обозначает ОАс.

11. Способ по п.9 или 10, где активирование лактона осуществляют действием на лактон восстанавливающим агентом с образованием спирта формулы

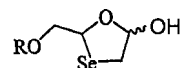


Фиг. 1

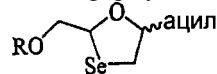


<sup>a</sup>R=(-)-L-ментил; (a) LiAl[OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]<sub>3</sub>H, THF, -10°C; (b) Ac<sub>2</sub>O; (c) (i) 2,4,6-коллидин, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, 5FCyт, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (ii) (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSiH, 20°C; (d): LiAlH<sub>4</sub>, THF, 20°C

Фиг. 2

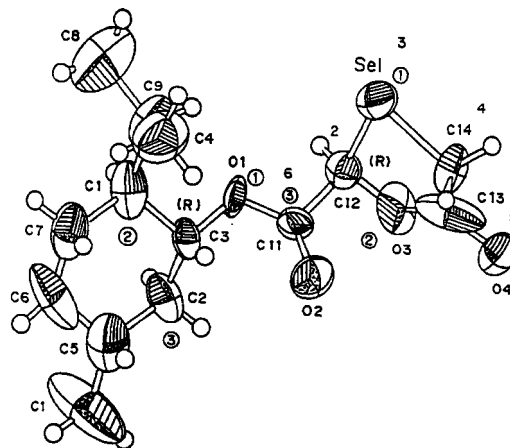


с последующим активированием спирта с образованием соединения формулы

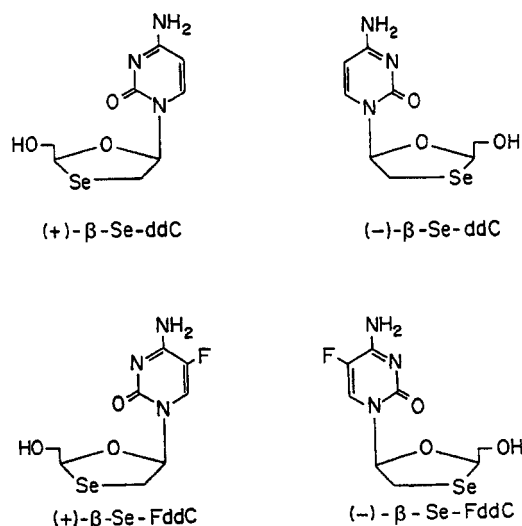


12. Способ по п.10, где восстанавливающим агентом является диизобутилалюминийгидрид (DIBAL-H).

13. Способ по п.11, где активирование спирта осуществляется уксусным ангидридом.



Фиг. 3



Фиг. 4

