



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 239 638** ⁽¹³⁾ **C2**
 (51) МПК⁷ **C 07 F 9/141, 9/40, A 61 K 31/661, 31/662, A 61 P 31/22**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
 ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

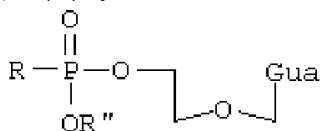
(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2003100038/04, 05.01.2003
 (24) Дата начала действия патента: 05.01.2003
 (45) Дата публикации: 10.11.2004
 (56) Ссылки: SU 1594953 А1, 15.05.1991.
 Bauer.D.I, Collinz P. -
 9-(Hydroxyetoxymetyl)guanine activity
 seganainst viruses of herpes graup, Nature,
 1978, 272, p.p.583-585.
 (98) Адрес для переписки:
 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16, ГУ НИИ
 вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН,
 патентно-лицензионная группа

(72) Изобретатель: Галегов Г.А. (RU),
 Андропова В.Л. (RU), Скоблов Ю.С.
 (RU), Ясько М.В. (RU), Куханова М.К.
 (RU), Карпенко И.Л. (RU), Иванов А.В. (RU)
 (73) Патентообладатель:
 Государственное учреждение
 Научно-исследовательский институт
 вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (RU),
 Институт молекулярной биологии им. В.А.
 Энгельгардта РАН (RU)

(54) ФОСФОНАТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АЦИКЛОВИРА И СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Изобретение относится к новым биологически активным фосфонатным производным ацикловира. Описываются фосфонатные производные 9-[(2-гидроксиэтилокси)метил]гуанина (АЦВ) общей формулы:



(I) R=H,
 (II) =R' OOC

где R' и R'' представляют собой алкил, арил или аралкил. Также описывается способ получения фосфонатных производных ацикловира. Технический результат - получены новые соединения, обладающие избирательной антигерпетической активностью с эффективностью, превышающей эффективность действия АЦВ, и действующие на штаммы вируса простого герпеса, резистентные к действию АЦВ, кроме того, заявленные соединения могут входить в эффективной терапевтической дозе в качестве действующего вещества в фармацевтическую композицию для использования в виде лекарственного средства, обладающего антигерпетической противовирусной активностью. 2 н. и 2 з.п. ф-лы, 3 табл.

RU 2 239 638 C2

RU 2 239 638 C2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 239 638** ⁽¹³⁾ **C2**
 (51) Int. Cl.⁷ **C 07 F 9/141, 9/40, A 61 K**
31/661, 31/662, A 61 P 31/22

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2003100038/04, 05.01.2003

(24) Effective date for property rights: 05.01.2003

(45) Date of publication: 10.11.2004

(98) Mail address:
123098, Moskva, ul. Gamalei, 16, GU NII
virusologii im. D.I. Ivanovskogo RAMN,
patentno-litsenzzionnaja gruppa

(72) Inventor: Galegov G.A. (RU),
Andronova V.L. (RU), Skoblov Ju.S. (RU), Jas'ko
M.V. (RU), Kukhanova M.K. (RU), Karpenko I.L.
(RU), Ivanov A.V. (RU)

(73) Proprietor:
Gosudarstvennoe uchrezhdenie
Nauchno-issledovatel'skij institut
virusologii im. D.I. Ivanovskogo RAMN (RU),
Institut molekularnoj biologii im. V.A.
Ehngel'gardta RAN (RU)

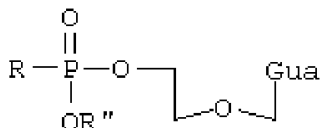
(54) **PHOSPHONATE DERIVATIVES OF ACICLOVIR AND METHOD FOR THEIR PREPARING**

(57) Abstract:

FIELD: organic chemistry, chemical technology, pharmacy.

SUBSTANCE: invention relates to new biologically active phosphonate derivatives of aciclovir and describes phosphonate derivatives of

9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]guanine (ACV) of the general formula:



(I) R=H,

(II) =R' OOC

wherein R' and R'' represent alkyl, aryl or aralkyl. Also, invention describes a method for preparing phosphonate derivatives of aciclovir. Invention provides preparing new compounds eliciting the selective antiherpetic activity with effectiveness that exceeds effectiveness of ACV and effecting on strains of herpes simplex virus that are resistant to effect of ACV. Except for, the claimed compounds can be components of active substance in the pharmaceutical composition taken in the effective therapeutic dose for it using as a medicinal agent eliciting antiherpetic antiviral activity.

EFFECT: improved preparing method, valuable medicinal properties of compounds.

4 cl, 3 tbl, 6 ex

RU 2 239 638 C2

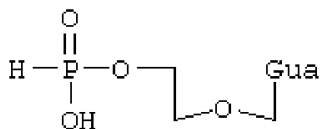
RU 2 239 638 C2

Изобретение относится к новым биологически активным фосфонатным производным 9-[(2-гидроксиэтилокси)метил]гуанина, (ацикловир, АЦВ), способу их получения и фармацевтическим композициям на основе этих соединений, которые могут найти применение в медицине.

Предлагаемые соединения обладают противовирусным действием, в первую очередь против вируса герпеса простого, тип 1 (ВПГ-1).

Известно, что ингибировать репродукцию ВПГ можно на разных стадиях его жизненного цикла, но очевидно, что наиболее целесообразно использовать ингибиторы биосинтеза ДНК вируса герпеса. ДНК-полимераза вируса герпеса является ключевым ферментом в цикле репликации вируса и, соответственно, является наиболее привлекательной мишенью для подавления размножения вируса. В настоящее время основную группу лекарств, используемых для лечения ВПГ, представляют нуклеозидные аналоги - предшественники ингибиторов ДНК-полимеразы вируса герпеса. К ним относятся в первую очередь ациклические нуклеозидные аналоги: АЦВ, валацикловир (валиновый эфир ацикловира), а также ганцикловир, пенцикловир и фамцикловир.

Ранее был запатентован фосфит АЦВ (А.с. 1594953 СССР, 1990), как соединение, демонстрирующее существенную противогерпетическую активность на штамме, резистентном к действию АЦВ.

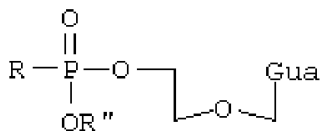


фосфит АЦТ

Однако его действие недостаточно выражено, что может быть связано с его анионной природой.

Сущность изобретения заключается в получении новых неионных фосфорсодержащих производных АЦВ в качестве соединений, высокоселективно подавляющих репродукцию ВПГ-1 и эффективных против штаммов, резистентных к действию АЦВ, с целью их применения в противовирусных фармацевтических композициях.

В соответствии с настоящим изобретением предлагаются неионогенные эфиры фосфита и алкоксикарбонилфосфоната АЦВ (формула I и II):



I - R = H,
II - R = R' OOC

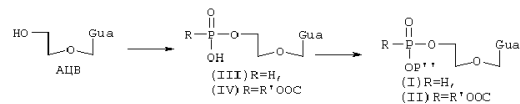
где R' и R'' = алкил, арил или аралкил

Эти фосфонатные эфиры представляют собой не заряженные соединения, способные эффективно проникать через клеточные мембраны и выступать в качестве депо-формы АЦВ с пролонгированным

действием.

Механизм превращения соединений формулы I и II в активную форму внутри клетки на сегодняшний день не ясен. Основной предполагаемый механизм заключается в том, что происходит прямое или поэтапное химическое или ферментативное отщепление фосфонатной группы с образованием АЦВ и его последующим фосфорилированием до трифосфата. Эти соединения могут быть актуальны для химиотерапии герпетических инфекций и могут быть использованы в качестве лекарственных средств. Для получения фармацевтических композиций на основе соединений формул I и II возможно применение различных вспомогательных средств (наполнителей) органической или неорганической природы, которые используют в процессе производства готовых лекарственных форм для придания им необходимых свойств. Содержание композиций в таких лекарственных формах может составлять до 80% массы. Эти фармацевтические композиции могут быть приготовлены по известным технологиям.

Для получения соединений формулы I и II может быть использован следующий синтетический подход:



где R' и R'' = Alk-, Ar-, Ar-(CH₂)_n-

Он заключается в конденсации АЦВ с фосфористой или алкоксикарбонил-фосфоновыми кислотами с последующей этерификацией заряженных фосфонатов III и IV соответствующим спиртом. Получающиеся соединения формул I и II могут быть выделены и очищены рутинными способами, например, осаждением, хроматографией и т.д.

Настоящее изобретение проиллюстрировано нижеследующими примерами.

Пример 1. Синтез P-(изо-пропилового эфира) фосфита ацикловира (I, R'' = iPr) и его выделение.

К охлажденному до 0°С раствору фосфита АЦВ (III) (71 мг, 0.23 ммоль) в смеси 5 мл пиридина и 0.5 мл изо-пропанола прибавляли PivCl (100 мкл, 0.8 ммоль), выдерживали 18 ч при 5°С. Разбавляли реакционную массу 10 мл воды, упаривали в вакууме, соупаривали с водой (3×5 мл), остаток растворяли в 2 мл воды и наносили на колонку (2×18 см) с LiChroprep RP-8 (Merck, 25-40 мкм), элюировали в линейном градиенте MeOH в воде (0→20%, V 0.5 л). Фракции, содержащие фосфонат I, упаривали, перерастворяли в воде и лиофильно высушивали. Выход 43 мг (56%). ¹H-NMR (DMSO-d₆, δ, ppm, J, Hz): 10.62c (1H, NH), 7.82c (1H, H-8), 6.79d (1H, J_{H,P} 698, H-P), 6.51c (1H, NH₂), 5.37c (2H, CH₂Gua), 4.55 м (1H, CH-iPr), 4.05 м (2H, CH₂OP). 3.66т (2H, J 4.4, CH₂OC), 1.23 т (6H, J_{CH₃, CH} 6.2, CH₃-iPr). ³¹P-NMR (DMSO-d₆): 8.16 ддг (¹J_{H,P} 698, ³J_P, CH₂ ~ ³J_P, CH 9.2). UV (метанол): λ_{max} 254 нм.

Пример 2. Синтез P-(изо-пропилового эфира) этоксикарбонилфосфоната

ацикловира (II, R'=Et, R''=iPr.) и его выделение.

К охлажденному до 5°C раствору этоксикарбонилфосфоната АЦВ (IV, R'=Et) (76 мг, 0.2 ммоль) в смеси 5 мл пиридина и 0.5 мл изопропанола прибавляли при перемешивании двумя порциями с интервалом в 3 ч 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид (120 мг, 0.4 ммоль), затем выдерживали 18 ч при 5°C. Разбавляли реакционную массу 10 мл воды, упаривали в вакууме, соупаривали с водой (3x5 мл), остаток растворяли в 3 мл воды и наносили на колонку (2x18 см) с LiChroprep RP-8, элюировали в линейном градиенте MeOH в воде (0→30%, V 0.5 л). Фракции, содержащие фосфонат II, упаривали, переупаривали с этанолом, растворяли в смеси хлороформа и метанола (95:5), и наносили на колонку (2.5x25 см) с силикагелем, продукт элюировали системой хлороформ - метанол (9:1). Растворители упаривали в вакууме, остаток растворяли в воде и лиофильно высушивали. Выход 43 мг (56%). ¹H-NMR (CD₃OD): 7.87с (1H, H-8), 5.49с (2H, CH₂Gua), 4.79 м (1H, CH-iPr), 4.31 м (4H, CH₂OP, CH₂-Et), 3.83 дд (2H, J 3.7, 4.7, CH₂OC), 1.30-1.36 м (9H, CH₃-iPr, CH₃-Et). ³¹P-NMR (CD₃OD): - 4.87 д (³J_{P,CH2} ~ ³J_{P,CH}7.1).

UV (MeOH): λ_{max} 254 нм.

Пример 3. Таблетированная форма.

Для приготовления таблетки используют следующий состав: соединение I (R''=iPr) - 200 мг, кальций карбонат осажденный - 110 мг, целлюлоза микрокристаллическая - 40 мг, аэросил - 13 мг, кальция стеарат- 12 мг.

Соединение I (R''=iPr) смешивают с аэросилом и микрокристаллической целлюлозой, и добавляют карбонат кальция. Полученную смесь опудривают стеаратом кальция и перемешивают до получения однородной массы. Эту таблеточную смесь прессуют в брикеты на таблеточном прессе. Полученные брикеты измельчают на грануляторе. Гранулы прессуют на таблеточном прессе до получения таблеток массой 375 мг.

Была изучена стабильность синтезированных соединений формулы I и II в водных растворах и в сыворотке крови человека.

Пример 4. Химический гидролиз соединений формулы I и II.

К 10 mM раствору соединений I и II в воде (5 мкл) добавляют 95 мкл буфера PBS (pH 7.2) (8.0 г NaCl, 0.2 г KH₂PO₄, 0.2 г KCl и 2.16 г Na₂HPO₄ x7 H₂O на 1 л воды) и инкубируют при 37°C. Через определенные промежутки времени отбирают алиquotы и исследуют их методом ТСХ и ВЭЖХ. Условия ВЭЖХ: колонка (4x150 мм) Lichrosorb RP-18 (Merck) (7 мкм); градиент буфера Б в буфере А. Буфер А: 5 mM натрий-фосфатный буфер (pH 4.8), буфер Б: - 66% MeOH. 0-5 мин - Буфер А; 5-10 мин 0→10% буфер Б; 10-25 мин 10→25% буфер Б; 25-30 мин 25→80% буфер Б; 30-35 мин 80→100% буфер Б; 35-40 мин 100% буфер Б. Данные приведены в таблице 1.

Пример 5. Гидролиз соединений формулы I и II в сыворотке крови человека.

К 10 mM раствору соединений I и II в воде (5 мкл) добавляют сыворотку крови человека (100%, 95 мкл) и инкубируют при 37°C. Через определенные промежутки времени к алиquotам (15 мкл) прибавляют MeOH (45 мкл), выдерживают 20 мин при -20°C и центрифугируют. Супернатант упаривают. К остатку прибавляют 10 мкл 5 mM натрий-фосфатного буфера (pH 4.8) и анализируют ВЭЖХ в условиях, описанных выше. Результаты приведены в Таблице 1.

Таблица 1
Стабильность соединений формул I и II

Соединение	Время полужизни в буфере, мин	Начальная концентрация в сыворотке, моль	Время полужизни в сыворотке, мин	Время удерживания, мин*
I	90	5x10 ⁻⁴	35	42
II	45	5x10 ⁻⁴	8	43

Пример 6. Исследование противовирусной активности фосфонатов АЦВ в отношении ВПГ-1.

Культуру клеток Vero (клетки почек африканских зеленых мартышек), поддерживают в среде Игла, содержащей 5% эмбриональной сыворотки теллят.

Эталонный штамм вируса герпеса простого ВПТ-1/L₂ получен из Государственной коллекции вирусов ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. Клинический изолят ВПГ-1 резистентный к АЦВ (Авд), получен путем инфицирования культуры клеток Vero вирусосодержащим материалом от больных ВПГ-1. В качестве контроля используют АЦВ. Вирусы поддерживают путем пассирования в средах Игла и 199 в соотношении 1:1, с добавлением 2% эмбриональной теллячьей сыворотки. Культивирование клеток и их последующее инфицирование проводят в 96-луночных пластиковых планшетах.

Антивирусное действие оценивают по способности изучаемых соединений ингибировать развитие вирусиндуцированного цитопатогенного действия (ЦПД) на 50% (ID₅₀) и 95% (ID₉₅) по сравнению с ЦПД в контрольных инфицированных культурах. Множественность инфекции составляет 0.1 БОЕ/клетку. Результаты учитывают через 48 ч.

Цитотоксичность соединений количественно определяют по окрашиванию клеток трипановым синим. За величину CD₅₀ принимают ту концентрацию соединения, при которой выживаемость клеток через 72 ч контакта с изучаемыми соединениями составляет 50%. Индекс селективности (IS) вычисляют как отношение CD₅₀ к ID₅₀.

Таблица 2

Противовирусная активность фосфонатов АЦВ против ВПГ-1/L₂

Соединения	CD ₅₀ , мкМ	ID ₅₀ , мкМ	ID ₉₅ , мкМ	IS
I (R'' = iPr)	>3021	0.45	1.89	>6713
II (R' = Et, R'' = iPr)	>2481	0.37	0.77	>6705
АЦВ	>2226	1.82	2.27	>1223

Таблица 3

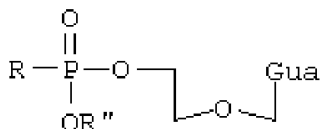
Противовирусная активность фосфонатов АЦВ против клинического изолята ВПГ-1 (Авд)

Соединение	CD ₅₀ , мкМ	ID ₅₀ , мкМ	ID ₉₅ , мкМ	IS
I (R'' = iPr)	>3021	1.9	3.8	>1590
II (R' = Et, R'' = iPr)	>2481	0.77	3.1	>3222
АЦВ	>2226	6.3	101	353

Таким образом, показано, что испытанные соединения формулы I и II обладают способностью ингибировать репродукцию вируса простого герпеса, тип 1 в культуре клеток Vero, причем эффективность этих препаратов превышает эффективность используемого в клинической практике препарата АЦВ (таблица 2) и действуют на штаммы вируса простого герпеса, резистентные к действию АЦВ (таблица 3). Фармацевтические композиции на основе этих соединений могут быть перспективны для создания новых лекарственных средств, необходимых для лечения герпесвирусных инфекций.

Формула изобретения:

1. Фосфонатные производные 9-[(2-гидроксиэтилокси)метил]гуанина (АЦВ) общей формулы



(I) R=H,

(II) R'=OOC

где R' и R'' представляют собой алкил, арил или аралкил.

2. Способ получения соединений по п.1, предусматривающий конденсацию АЦВ с фосфористой или алкоксикарбонилфосфоновыми кислотами, этерификацию заряженных фосфонатов соответствующими спиртами, с последующим выделением и очисткой рутинными способами, например осаждением, хроматографией и т.д.

3. Соединения по п.1, обладающие избирательной антигерпетической активностью с эффективностью, превышающей эффективность действия АЦВ, и действующие на штаммы вируса простого герпеса, резистентные к действию АЦВ.

4. Соединения по п.3, входящие в эффективной терапевтической дозе в качестве действующего вещества в фармацевтическую композицию для использования в виде лекарственного средства, обладающего антигерпетической противовирусной активностью.

RU 2 2 3 9 6 3 8 C 2

RU ? 2 3 9 6 3 8 C 2