



MD 1224 C2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1224 (13) C2 (51) Int. Cl.⁶: A 61 K 31/505

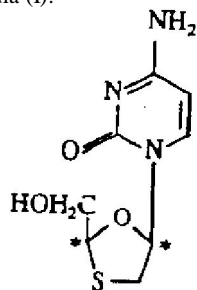
(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: 95-0086 (22) Data depozit: 03.01.1992 (31) Nr.: 9100039.8; 9109913.5 (32) Data: 03.01.1991; 07.05.1991 (33) Țara: GB	(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 31.05.1999, BOPI nr. 5/99 (85) 30.11.1994 (86) PCT/CA 92/00001, 03.01.1992 (87) WO 92/11852, 23.07.1992
(71) Solicitant: BIOCHEM PHARMA, INC., CA (72) Inventatori: BELLEAU, Bernard, CA; NGUYEN-BA, Nghe, CA (73) Titular: BIOCHEM PHARMA, INC., CA (74) Mandatar: Galina JENICICOVSCAIA, MD	

(54) Utilizare a analogilor nucleozidici cu 1,3-oxatiolan in tratamentul hepatitei
(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicină și poate fi aplicată în tratamentul infecțiilor virotice, în particular al hepatitei, în special al hepatitei B.

Esența invenției constă in utilizarea enantiomerilor izomerului cis al 2'-deoxi-3'-tiacitidinei cu formula (I):



2
sau a derivaților săi farmaceutic acceptabili pentru tratamentul hepatitei virotice B.
Revendicări: 9

5

10

15

MD 1224 C2

MD 1224 C2

3

Descriere:

Invenția prezentă se referă la medicină și poate fi utilizată în tratamentul infecțiilor virotice, în particular, ea ține de utilizarea analogilor nucleozidici ai 1,3-oxatiolanului în tratamentul hepatitei, în special, al hepatitei B.

Hepatita B reprezintă o afecțiune, transmisă oral sau parenteral prin materialul contaminat, cum ar fi sângele și produsele din sânge, acele murdare, pe cale sexuală și vertical, de la mamele infectate sau purtătoare de virusuri la făt. În acele regiuni ale lumii, unde afecțiunea este ceva obișnuit, contaminarea verticală în etapele precoce determină o cotă majoră de persoane infectate, care apoi devin purtători cronici ai hepatitei B. În toată lumea numărul purtătorilor de hepatită B se evaluează la 280 mln. de oameni. În prezent lipsesc remediile chimioterapeutice eficiente pentru tratamentul hepatitei B.

Se cunoaște că unii derivați nucleozidici acționează contra virusului hepatitei B. De exemplu, unele nucleozide 2',3'-dideoxi-purinice și pirimidinice posedă o activitate antivirotică, inclusiv și o acțiune contra virusului hepatitei B [1].

Se cunoaște și utilizarea nucleozidelor 2',3'-dideoxi-purinice în tratamentul hepatitei infecțioase B [2].

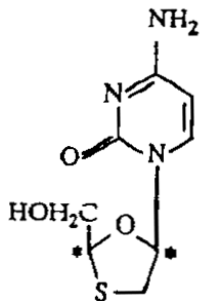
Mai este cunoscut tratamentul hepatitei B prin administrarea 2',3'-dideoxicitidinei [3], de asemenea este descris tratamentul hepatitei B prin administrarea 2',3'-dideoxi-guanozinei, 2',3'-dideoxiadenozinei, sau 2',3'-dideoxiinozinei [4].

Sunt cunoscuți un șir de analogi nucleozidici ai 1,3-oxatiolanului, care manifestă o acțiune antivirotică, în particular, acțiune contra HIV - agentului SIDA [5].

Compusul (2R,cis)-4-amino-1-(2-hidroximetil-1,3-oxatiolan-1-il)-1H-pirimidin-2-onă (cunoscut ca 3TC) utilizat în tratamentul infecțiilor HIV, a fost descris în [6]. 3TC reprezintă (-)-enantiomerul unuia din compușii (BCH-189) descriși anterior [5]. În prezent, s-a determinat că BCH-189 și unii enantiomeri, inclusiv 3TC, acționează contra virusului hepatitei B atât *in vivo*, cât și *in vitro*.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție o constituie extinderea asortimentului de remedii pentru tratamentul hepatitei B.

Invenția se referă la un procedeu de tratament al animalelor, inclusiv a omului, infectate sau sensibile la contaminarea cu virusul hepatitei B, care constă în administrarea unei cantități eficiente de compus cu formula (1)

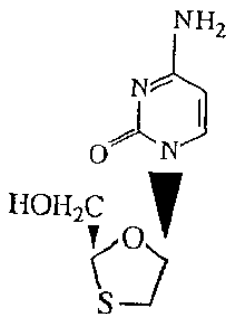


sau de derivat al lui farmaceutic acceptabil.

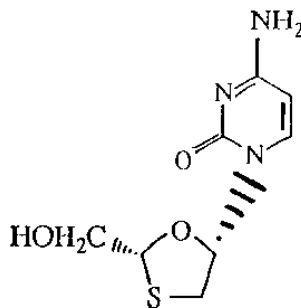
Problema se rezolvă prin utilizarea compusului cu formula (1), menționată mai sus, sau a derivatului lui farmaceutic acceptabil pentru prepararea remediei medicamentos pentru tratamentul hepatitei B.

După cum este descris în Stadiul tehnicii, tratamentul se extinde și asupra profilaxiei, precum și asupra tratamentului infecțiilor depistate sau simptomelor.

Compusul cu formula (1) reprezintă un cis-compus și conține două centre chirale (vezi în formula (1) asteriscul). Astfel, compusul există sub formă de doi enantiomeri, care corespund compușilor cu formula (1a) și (1b).



(1a)



(1b)

Compusul (1) poartă denumirea chimică cis-4-amino-1-(2-hidroximetil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă. El este cunoscut și sub denumirea de BCH-189. (-)-Enantiomerul are denumirea chimică (-)-cis-4-amino-1-(2-hidroximetil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă și coincide stereochimic absolut cu compusul cu formula (1b), care se numește (2R,cis)-4-amino-1-(2-hidroximetil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă și care se mai numește 3TC.

MD 1224 C2

Dacă se utilizează (-)-enantiomerul, se recomandă ca el să² fie esențial liber de (+)-enantiomerul corespunzător, ceea ce înseamnă prezența (+)-enantiomerului în cantitate nu mai mare de aproximativ 5% mas., de preferință, nu mai mare de 2% mas., în particular, mai puțin de circa 1% mas.

Termenul “derivatul farmaceutic acceptabil” înseamnă orice sare farmaceutic acceptabilă, un ester sau o sare a acestui ester, compusul cu formula (1) sau un alt compus oarecare care, fiind administrat pacientului, permite obținerea (direct sau indirect) a compusului cu formula (1) sau a metabolitului cu acțiune antivirotică sau a radicalului lui.

Specialiștilor le este cunoscut că compușii cu formula (1) pot fi modificați la grupele funcționale, atât în segmentul bazic, cât și în grupa hidroximetilică a ciclului oxatiolanic, formând în final derivați farmaceutic acceptabili. Invenția prezintă cuprinde modificările acestor grupe funcționale. Însă un deosebit interes prezintă derivații farmaceutic acceptabili (de exemplu, esterii), care se obțin prin modificarea grupei 2- hidroximetilice a ciclului oxatiolanic.

Esterii preferați ai compușilor cu formula (1) includ compușii, în care grupa OH este esterificată cu grupa carboxilică, având un radical selectat dintre hidrogen, alchil cu o catenă liniară sau ramificată (de exemplu, metil, etil, n-propil, tert-butil, n-butil), alcoialchil (de exemplu, metoximetil), aralchil (de exemplu, benzil), ariloxialchil (de exemplu, fenoximetil), aril (de exemplu, fenil, opțional substituit cu halogen, C_{1...4} alchil sau C_{1...4} alcoxi); dihidropiridinilul substituit (de exemplu, N-metilhidropiridinil); esterii acidului sulfonic, cum ar fi alchil- sau aralchilsulfonil (de exemplu, metansulfonilul); esterii acidului sulfuric, esterii aminoacizilor (de exemplu, L-valil sau L-izoleucil) sau esterii acizilor mono-, di-, sau tri-fosforici.

În afară de aceasta, în grupa esterilor menționați se includ și esterii, preparați din acizi polifuncționali, cum ar fi acizii carbonici, care conțin o grupă carboxil, de exemplu, acizii dicarbonici H₂OC(CH₂)_nCO₂, în care n reprezintă un număr întreg de la 1 până la 10 (de exemplu, acidul succinic) sau acizii fosforici. Procedeele de preparare a unor astfel de esteri sunt bine cunoscute. Vezi, de exemplu, Hahn et al. “Nucleotide Dimers as Anti Human Immunodeficiency Virus Agents”, Nucleotide Analogues, p.156-159 (1989) și Busso et al. “Nucleotide Dimers Suppress HVI Expression *in vitro*” AIDS Research and Human Retroviruses, 4(6), p. 449-455 (1988).

În ce privește esterii descriși mai sus, dacă nu se prevede altceva, atunci fiecare grupă alchil prezintă trebuie să conțină, preponderent, 1...16 atomi de carbon, în particular, 1...4 atomi de carbon, și poate conține una sau mai multe legături duble. Orice fragment aril, prezent în acești esteri, de preferință, conține grupa fenil.

În particular, esterii pot conține 1...16 atomi de carbon în radicalul carboxilic, un radical benzoic nesubstituit sau substituit cu cel puțin un halogen (brom, clor, fluor sau iod), cu un C_{1...6} alchil, cu o grupă C_{1...6} alcoxi saturată sau nesaturată, cu o grupă nitro- sau trifluorometil.

Sărurile farmaceutic acceptabile ale compușilor cu formula (1) includ sărurile, preparate din acizi organici sau anorganici, farmaceutic acceptabili, și baze. Drept exemple de acizi potriviți pot servi: acidul clorhidric, acidul bromhidric, acidul sulfuric, acidul azotic, acidul percloric, acidul fumaric, acidul maleinic, acidul fosforic, acidul glicolic, acidul lactic, acidul salicilic, acidul succinic, acidul toluen-n-sulfonic, acidul tartric, acidul acetic, acidul citric, acidul metansulfonic, acidul formic, acidul benzoic, acidul malonic, acidul naftal-2-sulfonic și acidul benzensulfonic. Alți acizi, așa ca acidul oxalic, cu toate că nu sunt farmaceutic acceptabili, pot fi folosiți pentru obținerea sărurilor, utilizate ca produse intermediare pentru prepararea compușilor, conform invenției, și a sărurilor acide suplimentare ale lor, farmaceutic acceptabile.

Sărurile, obținute din bazele corespunzătoare, includ un metal alcalin (de exemplu, sodiu), un metal alcalino-pământos (de exemplu, magneziu), amoniu și NR₄⁺ (în care R₄ reprezintă un alchil C_{1...4}).

Referințele ulterioare privind compușii, conform invenției prezente, se referă atât la compusul cu formula (1), cât și la derivații lui farmaceutic acceptabili.

Compusul (1) și enantiomerii lui proprii pot fi obținuți prin orice procedeu cunoscut de specialiști de obținere a compușilor cu o structură analogică, de exemplu, prin procedeele descrise în [5] sau [6].

După cum s-a apreciat, compusul (1), atât sub formă de amestec racemic, cât și sub formă de enantiomeri proprii, suprimă virusul hepatitei B și *in vitro* și *in vivo*.

Trebuie de menționat că cantitatea de compus, conform invenției, necesară pentru tratament poate varia nu numai în funcție de genul de compus selectat, dar și de schema de administrare, condițiile, în care se efectuează tratamentul, și de vârsta și starea pacientului și, în final, rămâne la aprecierea medicului curant sau a veterinarului. Însă, în cazuri generale, doza potrivită va fi de circa 0.1 până la 750 mg/kilocorp/zi, de preferință, de la 0.5 la 60 mg/kilocorp/zi, și mai preferabilă este administrarea a 1...20 mg/kilocorp/zi.

Doza necesară este comod să fie prezentată sub formă de doză unică sau de divizat administrarea la intervale comode de timp, de exemplu de două, trei, patru și mai multe ori pe zi.

Compusul este comod să fie administrat sub formă de doză unică, care conține 10...1500 mg, mai comod 20...1000 mg, de preferință 50...700 mg de ingredient activ într-o doză.

Ideal, ingredientul activ trebuie să fie administrat așa încât concentrația maximă de compus activ în plasmă să constituie 1...75 μM, de preferință, 2...50 μM, și mai preferabil, 3...30 μM. Această cantitate dezirabilă poate fi obținută prin injecții intravenoase de soluție 0,1...5% de ingredient activ cu soluție fiziologică, sau oral, sub formă de capsule, care conțin 1...100 mg de ingredient activ. Nivelul opțional din sânge poate fi menținut prin infuzii continue, care asigură circa 0,01...5,0 mg/kilocorp/pe oră sau prin infuzii efectuate aparte, care conțin circa 0,4...15 mg/kilocorp de ingredient activ.

Cu toate că se permite ca în cadrul tratamentului terapeutic compusul conform invenției să se administreze și sub formă chimic pură, totuși este de preferință ca ingredientul activ să fie formulat farmaceutic.

Compoziția farmaceutică trebuie să includă compusul (1) sau derivatul lui farmaceutic acceptabil, împreună cu unul sau mai mulți purtători convenționali în farmaceutică și opțional, cu alți ingrediente terapeutici și/sau profilactici. Purtătorii trebuie să fie “acceptabili” în sensul compatibilității lor cu alte ingrediente ale compoziției neostile recipientului.

Compozițiile farmaceutice includ compozițiile potrivite pentru administrare orală, rectală, nazală, vaginală sau parenterală (inclusiv, intramuscular, subcutanat, și intravenos) sau în forme, corespunzătoare administrării prin inhalatii sau insuflatii.

MD 1224 C2

Compozițiile pot fi prezentate, dacă aceasta este admisibil, în ³ doze discrete și pot fi preparate prin orice procedeu, cunoscut specialistului – farmacistului. Toate procedeele includ etapa de fuzionare a compusului activ cu purtători lichizi sau pulverizarea fină a suporturilor solide sau ambele aceste etape, cu formularea ulterioară a produsului, dacă aceasta este necesar, sub formă de substanță medicamentoasă necesară.

Compozițiile farmaceutice potrivite pentru administrare orală este comod de a fi formulate ca unități discrete, cum ar fi capsulele, capsulele din amidon sau tabletele. Fiecare din ele conține cantitatea prevăzută de ingredient activ; sub formă de prafuri sau granule; sub formă de soluții, suspensii sau emulsii. Ingredientul activ poate fi formulat de asemenea ca bolus, electuar sau paste.

Tabletele și capsulele pentru administrare orală pot conține excipienți obișnuiți, așa ca substanțele liante, filerele, lubrifianții, dezintegratorii sau substanțele umectante. Tabletele pot fi acoperite cu un înveliș conform tehnologiei obișnuite. Preparatele orale lichide pot fi sub formă de suspensii apoase sau uleioase, de soluții, emulsii, stropuri sau elixiruri, sau pot reprezenta o substanță uscată, care trebuie dizolvată, înainte de administrare, în apă sau în alt vehicul potrivit. Așa preparate lichide pot conține suplimente obișnuite, așa ca agenții de suspensionare, emulgatorii, vehicule neapoase (care pot include uleiuri comestibile) sau conservanți.

Compusul, conform invenției prezente, poate fi preparat de asemenea pentru administrare parenterală (de exemplu, injecții, așa ca capsulele de injecții sau infuziile continue) și poate fi administrat în doză unică sub formă de ampule, seringi umplute în prealabil sau capacități pentru infuzii de volum mic sau de volum mare cu multe doze, în care se adaugă conservanți. Compozițiile pot fi formulate ca suspensii, soluții sau emulsii în vehicule uleioase și apoase și pot conține agenți de formulare, cum ar fi agenții de suspensionare, de stabilizare și/sau dispersanți. În varianta alternativă, ingredientul activ poate fi sub formă de praf, preparat prin separarea aseptică a materialului solid steril sau prin liofilizare din soluție, cu constituire înainte de administrare cu un vehicul corespunzător, de exemplu, cu apă sterilă apirogenă.

Compozițiile farmaceutice, potrivite pentru administrare rectală, în care suportul este o substanță solidă, sunt de preferință prezentate sub formă de supozitoare de o singură doză. Purtătorii corespunzători includ unt de cacao și alte substanțe, cunoscute specialiștilor, de asemenea este convenabil de preparat supozitoare prin fuzionarea compusului activ cu un purtător (purtători) cu o răcire ulterioară și formularea lor.

Compozițiile, utile pentru administrare vaginală, pot fi formulate ca pesare (supozitoare vaginale), tamponi, unguente, creme, mase spumante sau pulverizante, care conțin în afară de ingredientul activ purtători potriviți, cunoscuți specialiștilor din domeniu.

Pentru administrare intranasală compușii, conform invenției prezente, pot fi utilizați sub formă de lichid pulverizat sau praf dispers sau sub formă de picături.

Picăturile se pot prepara pe bază apoasă sau neapoasă, incluzând în componența lor, în afară de aceasta, unul sau mai mulți agenți dispersanți, agenți de suspensionare și de solubilizare.

Substanțele lichide pulverizante este convenabil de le formulat în ambalaj presurizat.

Pentru administrare în inhalații, compușii conform invenției prezente este convenabil să fie eliberați în insufloare, nebulizatoare sau ambalate presurizat sau în alte mijloace de tip aerosol comode. Ambalajul presurizat poate include un propellant, așa ca diclormetanul, trifluorometanul, diclortetrafluorometanul, bioxidul de carbon sau alte gaze potrivite.

Pentru aerosol, ambalat sub presiune, doză unică poate fi eliberată prin gradarea corespunzătoare a balonașului.

În altă variantă, pentru administrare prin inhalație sau insuflație, compusul conform invenției prezente, poate fi formulat ca amestec pulverulent uscat, de exemplu, amestec pulverulent din compusul invenției și o bază – praf potrivit, așa ca lactoza sau amidonul. Amestecul pulverulent poate fi formulat într-o doză unică, de exemplu, sub formă de capsule sau tuburi sau, de exemplu, să aibă un înveliș din gelatină sau din emplastru, din care praful se poate inhala sau insufla.

Compozițiile sus-menționate, opțional, pot fi modificate așa încât să poată fi utilizat deplin ingredientul activ din componența lor.

Compozițiile farmaceutice pentru utilizare conform invenției prezente pot conține de asemenea și alte ingrediente active, așa ca substanțele antimicrobiene sau conservanți.

Componentele potrivite pentru utilizare conform invenției sunt descrise, de exemplu, în [5] și [6].

Compușii conform invenției pot fi utilizați în combinație cu alte remedii terapeutice, de exemplu, cu agenți antiinfecții. În particular, compușii conform invenției pot fi utilizați împreună cu substanțe antivirolice cunoscute.

Combinările sus-menționate, este convenabil să fie folosite sub formă de compoziții farmaceutice și, astfel, compozițiile farmaceutice, care conțin combinațiile sus-menționate și un purtător farmaceutic accesibil, prezintă următorul aspect al invenției prezente.

Unele componente ale acestor combinații pot fi administrate sau unul după altul, sau concomitent sub formă de compoziții farmaceutice compuse sau separat.

Atunci cand compusul (1) sau derivatul lui farmaceutic acceptabil se utilizează în combinație cu un alt remediu terapeutic, care este activ contra aceluiași virus, doză fiecărui compus poate fi similară, sau se poate deosebi de cea care se utilizează când se administrează un singur compus. Dozele corespunzătoare sunt bine cunoscute specialiștilor.

Exemplul 1

Activitatea biologică

(A) Rășuștele nou-născute se infectează cu DHBV (“duck hepatitis B virus”). Peste 5...7 zile după injectare, de la ele se recoltau probele de sânge și se examina prezența ADN din DHBV prin metoda de hidridizare cu o probă de ADN specifică (Mason et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 3997-4001 (1982). La rășuștele cu reacția pozitivă în punctele colorate se extirpa ficatul, care se utilizează ulterior pentru obținerea culturilor primare de hepatocite infectate cu DHBV sus-menționat (Tuttleman et al.J.of.Virology, 58, 17-25). Peste două zile de aflare în cultură, în mediul de cultură se adaugă remediile antivirale. Mediul se schimbă la fiecare două zile și după anumite intervale de timp celulele se colectează și se separă ADN total.

MD 1224 C2

ADN se aplică pe o hârtie de nitroceluloză și se probează⁴ cu o probă de ADN al DHBV, marcat cu un izotop radioactiv ³²P, conform procedurii descrise mai jos. ADN extras din hepatocitele infectate cu DHBV, se separă și se aplică pe un filtru de nitroceluloză. Se utilizează proba menționată mai sus, canula căreia transfera ADN DHBV, marcat cu ³²P (pDH-010=DHBV). ADN se extrăgea din cutii de 6 cm cu cultură celulară peste diferite intervale de timp după însămânțare. În lotul VC, celulele se recoltau în a 2, 6, 8, 10, 14, 18 și a 20 zi. Mostrele duplicate se aplicau în a 14, 18 și 20 zi.

În loturile, în care s-au utilizat substanțe medicamentoase, celulele se colectau la a 14, 18, și a 20 zi. Substanțele medicamentoase se adăugau în cultură în a 2 zi după însămânțare și mediul permanent se schimba complet la fiecare 2 zile. ADN intracelular total se extrăgea din celule prin metoda standard de extragere cu fenol. Celulele din cutia Petri cu diametrul de 6 cm (circa 5 x 10 celule) se lizau în tampon de lizis, care conținea 0,2% SDS (sulfat-dodecil de sodiu), 150 mM Tris-HCl cu pH 8,0, 10 mM EDTA, 5 mM EGTA și 150 mM NaCl. Lizatul celular se descompunea cu 0,5 mg/mL pronază E (furnizată de firma Sigma) la 37°C timp de două ore și se proteiniză prin extragere cu un volum egal de fenol, saturat cu 20 mM Tris-HCl cu pH 7,5, 0,5 mM EDTA și 8-hidroxicinolină de 0,1%. La faza apoasă se adăuga acetatul de amoniu concentrat (pH 7,0 (2,5M)) pentru a obține soluția 0,25 M acetat de amoniu, iar acizii nucleici se sedimentau cu două volume de alcool etilic de 100%. Granula de acid nucleic se spală cu alcool etilic și se usucă.

ADN se dizolvă într-o soluție, care conține 12,5 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA, glicerină de 30% și albastru de bromfenol de 0,01%.

A 12-a parte din mostra de ADN se ungea pe nitroceluloză pentru efectuarea analizei cu colorare punctiformă.

Medicamentele testate se apreciau pe scara de la 0 (lipsa activității) până la ++++ (activitate înaltă).

Compușii testați reprezentau cis-2-amino-1-(2-hidroxi-metil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă (compusul cu formula (1) atât racemic, cât și sub formă de (-)-enantiomer) și doi inhibitori cunoscuți ai virusului hepatitei B, și anume:

2',3'-dideoxi-guanozină (ddG) și 2,6-diaminopurin-9-β-D-2',3'-dideoxiribofuranozidă (dd DAPR) (EP 0303760 A).

Rezultatele testării sunt prezentate în Tabelul 1.

(B) Rezultatele testării cu hepatită B umană.

(i) Se prepara monostratul de celule Hep.G2, infectate cu virusul de hepatită B umană, în planșă cu 6 godee, umplute cu MEM și suplimentate cu 380 mg/mL genicitină (GIBCO nr. 860 18111J, G 418 sulfat) și cu ser fetal de 10% și astfel de monostraturi se utilizau după fuzionarea a 75% și mai mult de celule.

Soluțiile concentrate de medicamente se preparau în soluție-tampon fosfat - sare (PBS) la o concentrație de 1 mg/mL.

Medicamentele, care nu se dizolvă până la așa o concentrație, se încălzeau în suspensie până la 42°C cu adăugarea alcoolului etilic, sau medicamentul se dizolva până se atinge o concentrație finală mai joasă.

Soluțiile concentrate de medicamente se dizolvau până la obținerea concentrațiilor finale de circa 10 mg/mL în MEM (cu suplimentele menționate mai sus).

De pe planșă cu godee se elimina mediul și se înlocuia cu un mediu proaspăt preparat, care conținea medicamente. Pentru fiecare analiză se foloseau godee triple, câte 2 mL/celulă.

Mediul se îndepărta și se înlocuia cu mediu proaspăt, care conținea medicamente, peste o zi timp de 14 zile (adică 7 schimbări de soluții de medicamente).

Mediul se îndepărta din fiecare godee și godeele se spălau cu 1 mL PBS. Se adăuga câte 2 mL/godee de tampon RIPA (soluție-tampon: 0,15 M NaCl, dioxicolat de sodiu de 1%, triton 1% x 100, dodecil sulfat de sodiu de 0,1%, 0,01M Tris-HCl, pH 7,4) și celulele se rad din godee cu un bastonaș de cauciuc. Apoi celulele se transferau în eprubete.

Se adăuga 1 mL cloroform în fiecare eprubetă și se amesteca cu un malaxor cu turbion. Apoi se adăuga câte 1 mL fenol (saturat cu 20 mM Tris, 1 mM EDTA și hidroxichinolină de 0,1%) în fiecare eprubetă, eprubetele se centrifugau și se elimina 1 mL de strat apos.

Acetatul de amoniu se adăuga până rezulta o concentrație 0,2 M, după ce se amesteca cu 2,5 volume de alcool etilic, răcit pe gheață. Amestecul se expunea pe noapte la -20°C, pentru a se sedimenta ADN. ADN se granula prin centrifugare, se mai spăla o dată cu alcool etilic rece și se usca.

Granula se dizolva în 200 mL soluție tampon Tris (10 mM), EDTA (1 mM), se lăsa peste noapte la 4°C și apoi rapid se sonifica pentru 20 secunde. Se aplicau cate 20 μL din fiecare mostră sub formă de punct pe membrana de nylon, și punctul se hibridiza cu proba de ADN VHB.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.

(ii) Metoda utilizată pentru a efectua această experiență este descrisă amănunțit în literatură (Korba et al., Antiviral Research 15, 217-228, 1992) și se utilizează după cum urmează:

Celulele Hep G2, infectate cu ADN genomic al virusului uman al hepatitei B (celulele 2.2.15), se cultivau și se păstrau în mediul cultural RPM 11640, care conține 5% ser fetal de bovine, 2 mM glutamină și 50 μg/mL sulfat de gentomicină, totodată regulat se controla rezistența la G 418. Culturile de celule se cultivau până la fuzionarea în planșele cu 24 godee pentru cultivarea culturii de celule și se lăsau în aceste condiții timp de 2...3 zile până la începerea tratamentului medicamentos.

Medicamentele se dizolvau în apă sterilă sau dimetilsulfoxid de 50%, sterilizat în apă, până se obțineau concentrații de 100 de ori mai înalte decât concentrația maximă de control. Aceste soluții se diluau, în caz de necesitate, în mediul de cultură.

Mediul de cultură pe celulele separate se schimba cu 24 ore înainte de expunere la compușii testați. Timp de 10 zile de tratament, mediul de cultură se schimba zilnic. Peste zece zile de tratament mediul de cultură se colecta și se congela la -70°C, pentru a efectua analiza ADN VHB.

Pentru a analiza ADN intracelular VHB, 0,2 mL de mostre de mediu de cultură se incubau timp de 20 minute la 25°C în 1 M de NaOH /10X SSC (1X SSC reprezintă 0,15 M NaCl/0,015 M citrat de sodiu, pH 7,2), iar apoi se aplicau pe membranele de

MD 1224 C2

nitroceluloză, în prealabil îmbibate cu 20X SSC, folosind⁵ dispozitivul de ungere. Mostrele se neutralizau prin spălare dublă în 0,5 mL 1 M Tris, pH 7,2/2 M NaCl și o dată – în 0,5 mL 20X SSC. Apoi filtrele se spălau cu 2X SSC și se uscau la 80°C sub vid timp de 1 oră.

Fragmentul purificat de 3,2 Kb EcoR₁ al ADN VHB se marchează cu ³²P dCTP prin “nick - translation” și se utilizează ca probă pentru determinarea ADN VHB în analiza colorantă punctiformă, realizată prin hibridizarea ADN. După spălare, stratul hibridizat se usca și se determină ³²P cu beta-scanerul Ambis.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2b.

Tabelul 1

ACTIVITATEA ANTIVIRALĂ *IN VITRO* A COMPUȘILOR FAȚĂ DE VIRUSUL HEPATITEI B LA RĂTUȘTE

Compusul testat	ACTIVITATEA IC 50 μg/mL
Racematul compusului cu formula (1)	++++ (la 10 μg/mL)
(-) enantiomerul	<1 μg/mL
ddG	0,07 μg/mL
ddDARP	0,07 μg/mL

Tabelul 2a

ACTIVITATEA ANTIVIRALĂ *IN VITRO* A COMPUȘILOR FAȚĂ DE VIRUSUL HEPATITEI UMANE B

Compusul testat	ACTIVITATEA VHB LA 10 μg/mL
Racematul compusului cu formula (1)	+++
ddG	+++
ddDAPR	+

Tabelul 2b

3TC	1C50 μM 5,6
ddC	2,2
araAMP	2,9
cdG	0,034

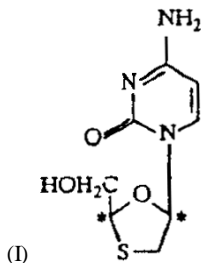
ddC = 2',3'-dideoxicitidină

cdG = oxiguanozină carbociclică

araAMP = adenzilarabinozid-5'-monofosfat.

(57) Revendicări:

1. Utilizarea compusului cu formula (I)



sau a derivatului său farmaceutic acceptabil în scopul preparării medicamentului pentru tratamentul hepatitei virotice B.

2. Utilizare conform revendicării 1, în care hepatita B reprezintă hepatita B specific umană.
3. Utilizare conform revendicării 1 sau 2, în care compusul cu formula (I) include (±)-cis-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă sau derivatul ei farmaceutic acceptabil.
4. Utilizare conform revendicării 1 sau 2, în care compusul cu formula (I) include (-)-cis-4-amino-1-(2-hidroxiometil-1,3-oxatolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă sau derivatul ei farmaceutic acceptabil.
5. Utilizare conform revendicării 4, în care compusul cu formula (I) este esențial pur de (+)-enantiomerul corespunzător.
6. Utilizare conform oricărei din revendicările 1 - 5, în care medicamentul se formulează pentru administrare orală.
7. Utilizare conform oricărei din revendicările 1 - 5, în care medicamentul se formulează pentru administrare parenterală.
8. Utilizare conform oricărei din revendicările 1 - 7, în care medicamentul se formulează în doză unică.

MD 1224 C2

9. Utilizare conform revendicării 8, în care compusul⁶ se conține în cantitate 10...1500 mg.

56) Referințe bibliografice:

1. EP 0206497 A
2. EP 0302760 A
3. WO 90/14079 A
4. WO 90/14091 A
5. EP 0382526 A
6. WO 91/17159 A

Șef secție: CRECETOV Veaceslav

Examinator: JOVMIR Tudor

Redactor: CANȚER Svetlana

MD C2

7

5