

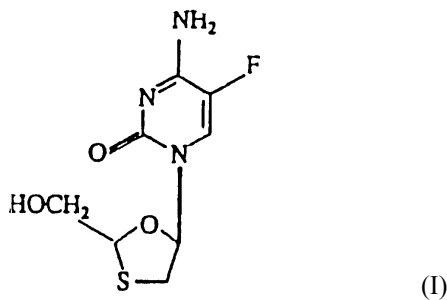
Invenția se referă la analogii nucleozidici ai 1,3-oxatiolanului și la utilizarea lor în tratamentul infecțiilor virale.

Este cunoscută o substanță cu activitate antivirotică - 3TC, care reprezintă (-)enantiomerul cis-2-hidroximetil-5-(citozin-1-il)-1,3-oxatiolanului. Această substanță, precum și compoziția cu conținut de substanță menționată și metodele de tratament al infecțiilor virale la mamifere cu utilizarea substanței și compoziției menționate sunt descrise în brevetul [1] și sunt cele mai apropiate după esență de obiectele prezentei invenții.

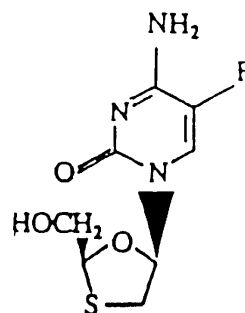
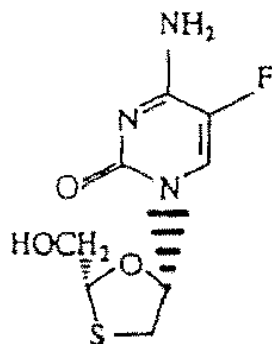
Însă persistă necesitatea imperioasă de elaborare a unor compuși care ar fi activi în cazurile de SIDA și ar poseda concomitent indici terapeutici favorabili.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este extinderea sortimentului de substanțe medicamentoase utile pentru tratamentul infecțiilor virale, provocate de virusul hepatitei B sau retrovirusul HIV.

Invenția soluționează această problemă asigurând compusul cu formula (I)



care reprezintă un amestec racemic din doi enantiomeri cu formulele (I-1) și (I-2):



S-a determinat inopinat că (-)-enantiomerul compusului (I) manifestă o activitate mult mai înaltă decât (+)-enantiomerul, cu toate că ambii enantiomeri au o toxicitate inopinat de joasă. Astfel, primul scop al prezentei invenții este (-)-(sau levogir) enantiomerul compusului cu formula (I) și derivații lui farmaceutic acceptabili.

(-)-Enantiomerul, din punct de vedere al structurii chimice, reprezintă (-)-4-amino-5-fluor-1-(2-hidroximetil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă (în continuare – compusul (A)). Acest enantiomer are o structură stereochemică absolută, reprezentată prin formula (I-1).

Compusul (A), de preferință, trebuie să fie liber de (+)-enantiomerul respectiv, adică trebuie să conțină o cantitate de (+)-enantiomer ce nu depășește circa 5% din greutate, mai potrivit, o cantitate de (+)-enantiomer ce nu depășește circa 2% și, cel mai potrivit, mai puțin de 1% din greutate.

Prin “derivat farmaceutic acceptabil” se subînțelege oricare sare, ester farmaceutic acceptabili, sau sarea unui așa ester cu compusul (A) sau oricare alt compus, care fiind administrat pacientului poate elimina (direct sau indirect) compusul (A), sau metabolitul care manifestă activitate antivirotică, sau radicalul acestuia.

Pentru un specialist în domeniu este evident că compusul (A) poate fi modificat în scopul obținerii derivaților farmaceutic acceptabili atât în cadrul grupelor funcționale, cum sunt fragmentele de bază, cât și în cadrul grupei hidroximetil- a ciclului oxatiolanic. Modificările din cadrul acestor grupe funcționale se includ în volumul revendicărilor prezentei invenții. Însă, un interes deosebit îl prezintă derivații farmaceutic acceptabili preparați prin modificarea grupei 2-hidroximetil- a ciclului oxatiolanic.

Esterii potriviți ai compusului (A) includ compuși, în care atomul de hidrogen al grupei 2-hidroximetil- este substituit cu grupa acil R-C(O)-, în care fragmentul necarbonil R al esterului se selectează din hidrogen, alchil cu catenă liniară sau ramificată (de exemplu, metil, etil, n-propil, terț-butil, n-butil), alcoxialchil (de exemplu, metoximetil), aralchil (de exemplu, benzil), ariloxialchil (de exemplu, fenoximetil), aril (de exemplu, fenil opțional substituit cu halogen, C₁₋₄ alchil sau C₁₋₄ alcoxi), esteri sulfonați, cum este alchil- sau aralchilsulfonil (de exemplu, metansulfonil), esteri ai aminoacizilor (de exemplu, L-valină sau L-izoleucină) și esteri mono-, di- sau trifosfați.

În cazul în care nu se specifică în prealabil, în esterii menționați anterior orice fragment alchil din ei, de preferință conține de la 1 la 16 atomi de carbon, în special, de la 1 la 4 atomi de carbon. Orice fragment aril prezent în astfel de esteri, de preferință, reprezintă o grupă fenil.

În general, esterii pot reprezenta esteri formați cu grupe C₁₋₁₆ alchil, esteri benzilici nesubstituiți sau esteri benzilici substituiți cu cel puțin un atom de halogen (brom, clor, fluor sau iod), cu o grupă C₁₋₆ alchil, C₁₋₆ alcoxi, cu o grupă nitro sau trifluormetil.

Sărurile farmaceutic acceptabile ale compusului (A) reprezintă săruri derivate de la acizi neorganici, organici și baze farmaceutic acceptabile. Exemplele de acizi potriviți includ acizii: clorhidric, bromhidric, sulfuric, azotic, percloric, fumaric, maleic, fosforic, glicolic, lactic, salicilic, succinic, toluen-p-sulfonic, tartric, acetic, citric, metansulfonic, formic, benzoic, malonic, naftalen-2-sulfonic și benzensulfonic. Alți acizi, cum este acidul oxalic, care singuri nu sunt farmaceutic acceptabili, se pot utiliza ca compuși intermediari în procesul de obținere a compușilor conform prezentei invenții, și a sărurilor lor acide de adiție farmaceutic acceptabile.

Sărurile, derivate de la bazele respective, includ săruri de metale alcaline (de exemplu, de sodiu), săruri de metale alcalino-pământoase (de exemplu, de magneziu), săruri de amoniu și săruri cuaternare de amoniu NR₄⁺ (în care R reprezintă grupa C₁₋₄ alchil).

Referințele din această descriere la compusul conform prezentei invenții includ atât compusul (A) propriu-zis, cât și derivații lui farmaceutic acceptabili.

Compusul conform prezentei invenții fie că singur posedă activitate antivirică, fie că formează astfel de compuși în procesele metabolice. În general, astfel de compuși sunt eficienți pentru inhibarea replicării retrovirusurilor, inclusiv a retrovirusurilor umane, cum este virusul imunodeficienței umane (HIV), care este agentul cauzal al SIDA.

Compușii conform prezentei invenții pot fi utilizați, de asemenea, și pentru tratamentul animalelor, inclusiv și al omului, infectați cu virusul hepatitei B (HBV).

Un alt aspect al prezentei invenții asigură utilizarea compusului (A) sau a derivatului acestuia, farmaceutic acceptabil, în calitate de substanță terapeutic activă, în special, ca remediu antiviral, de exemplu, pentru tratamentul infecțiilor retrovirale sau a infecțiilor provocate de virusul hepatitei B.

Un alt aspect de alternativă al prezentei invenții asigură metoda de tratament al infecției virale, în particular, al infecției provocate de virusul hepatitei B sau de retrovirusuri, cum este HIV, la mamifere, inclusiv la oameni, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente de compus (A) sau de derivat al acestuia farmaceutic acceptabil.

Încă un aspect de alternativă al prezentei invenții asigură utilizarea compusului (A) sau a derivatului lui farmaceutic acceptabil în prepararea remediilor pentru tratamentul infecțiilor virale.

Compușii conform prezentei invenții pot fi utilizați, de asemenea, în tratamentul stărilor cauzate de SIDA, cum este complexul determinat de SIDA, limfadenopatia generalizată progresivă, stările neurologice, cauzate de SIDA (cum este demența sau parapareză tropicală), stările cu anti-HIV-anticorp pozitiv și HIV-pozitiv, sarcomul Kapoși, purpura trombocitopenică și afecțiunile provocate de microorganisme condiționat-patogene, de exemplu, *Pneumocystis carinii*.

Compușii conform prezentei invenții sunt utili, de asemenea, pentru prevenirea evoluției formei clinice a bolii la pacienții cu anti-HIV-anticorp sau HIV-antigen pozitiv, și pentru profilaxia stărilor ce pot evolua după acțiunea HIV.

Compusul (A) sau derivații lui farmaceutic acceptabili se pot utiliza, de asemenea, pentru prevenirea contaminării virotice a lichidelor fiziologice, cum este sângele sau sperma, *in vitro*.

Compușii conform prezentei invenții se mai pot utiliza pentru tratamentul animalelor, inclusiv al omului, infectați cu virusul hepatitei B.

Pentru un specialist în domeniu este evident că referința din text la tratament se extinde și asupra profilaxiei afecțiunii și, de asemenea, asupra tratamentului infecțiilor de acum depistate sau al afecțiunilor cu simptome evidente.

Este necesar de subliniat că cantitatea de compus conform prezentei invenții necesară pentru tratament va varia în funcție nu numai de compusul concret selectat, dar și de modul de administrare, etiologia afecțiunii, vârsta și starea generală a pacientului, și se stabilește conform indicațiilor medicului curant sau veterinarului. Însă, în caz general, doza potrivită constituie de la circa 0,1 la 750 mg/kilocorp pe zi, mai potrivită fiind de la 0,5 la 60 mg/kg pe zi și deosebit de potrivită este doza de la 1 la 20 mg/kg pe zi.

Doza necesară poate reprezenta o singură doză sau poate fi împărțită în câteva doze, care se administrează la anumite intervale de timp, de exemplu, în două, trei, patru și mai multe prize pe zi.

Compusul conform prezentei invenții se administrează, opțional, sub formă de doză unică, ce conține, de exemplu, de la 10 la 1500 mg, de preferință de la 20 la 1000 mg, și mai potrivit de la 50 la 700 mg de ingredient activ pentru o doză unică.

În varianta ideală, cantitatea administrată de ingredient activ trebuie să fie astfel, ca concentrația lui maximă din plasmă să constituie de la circa 1 la 75 μM , mai potrivită fiind de la circa 2 la 50 μM , deosebit de potrivită - de la 3 la 30 μM . Aceasta se poate realiza, de exemplu, prin administrare intravenoasă, în particular, a 0,1 la 5% soluție de ingredient activ, opțional, salină, sau prin administrare per os a bolusurilor cu conținut de la circa 1 la 100 mg de ingredient activ. Nivelele dezirabile de medicament în sânge pot fi susținute prin infuzii continue a unor cantități de la circa 0,01 la 5 mg/kg pe oră sau prin infuzii intermitente a circa 0,4 la 15 mg/kg de ingredient activ.

Cu toate că în scopuri terapeutice compusul conform invenției poate fi administrat sub formă de substanță pură, este preferată administrarea ingredientului activ sub formă de compoziție farmaceutică.

Astfel, în continuare prezenta invenție asigură o compoziție farmaceutică, care include compusul (A) sau derivatul lui farmaceutic acceptabil împreună cu unul sau mai multe suporturi farmaceutic acceptabile și, de asemenea, opțional cu alte remedii terapeutice și/sau profilactice. Suportul (suporturile) trebuie să fie "acceptabil" ("acceptabile") în acel sens, ca el (ele) trebuie să fie compatibil (e) cu alte ingrediente ale compoziției și să nu exercite acțiune nocivă asupra pacientului, care primește această compoziție.

Compozițiile farmaceutice includ acele compoziții care sunt potrivite pentru administrare bucală, rectală, nazală, topică (inclusiv bucală și sublinguală), vaginală sau parenterală (inclusiv intramuscular, subcutanat și intravenos) sau în forme potrivite pentru administrare prin inhalatie și insuflare. Formulările, dacă este posibil, este convenabil să fie preparate în unități dozate discret și se pot obține prin procedee diverse bine cunoscute în farmaceutică. Toate procedeele prevăd fuzionarea compusului activ cu un suport lichid sau cu un solid fin triturat, sau cu ambele suporturi menționate și apoi, dacă este necesar, furnizarea produsului într-o formulare dezirabilă.

Formulările farmaceutice, potrivite pentru administrare pe cale bucală, pot fi disponibilizate în unități discrete, de exemplu, în capsule, cașete sau tablete, fiecare din ele conținând o anumită cantitate de ingredient activ; sub formă de prafuri sau granule; soluții, suspensii sau emulsii. Ingredientul activ poate fi sub formă de bolus, terci medicamentos sau pastă.

Tabletele și capsulele pentru administrare pe cale bucală mai pot conține excipienți potriviți, cum sunt substanțele liante, lubrefianții, dezintegranții sau substanțele umectante. Tabletele pot fi acoperite prin procedee bine cunoscute în acest domeniu al tehnicii.

Formulările lichide pentru administrare pe cale bucală pot fi, de exemplu, sub formă de suspensii în apă sau ulei, soluții, emulsii, siropuri sau elixire, sau pot să reprezinte produse solide, care trebuie amestecate cu apă sau cu alte suporturi lichide potrivite înainte de administrare. Astfel de formulări lichide mai pot conține aditivi potriviți, cum sunt agenții de suspendare, emulgatorii, suporturile lichide neapoase (care pot include uleiuri folosite în alimentație) sau conservanți.

Compușii conform prezentei invenții pot fi formulați pentru administrare parenterală (de exemplu, prin injecții sau infuzii continue) și prezentați în doză unică în fiole, seringi umplute, containere pentru infuzii a unor cantități nu prea mari de medicament sau containere cu doze multiple, în care se adaugă conservanți. Compozițiile se pot formula în suspensii, soluții sau emulsii în ulei sau vehicule apoase și pot conține compuși auxiliari, cum sunt agenții de suspendare, stabilizatorii și/sau dispersanții.

Ingredientul activ poate fi, de asemenea, prezent sub formă de praf, preparat prin izolare aseptică, sau solid - prin sterilizare sau liofilizare din soluție, pentru constituire cu un vehicul potrivit, în particular, cu apă sterilă apirogenă.

Pentru administrare topică pe epidermă, compusul conform prezentei invenții poate fi formulat în unguente, creme sau loțiuni, precum și în plăci transdermale. Unguentele și cremele pot fi preparate, de exemplu, pe bază de apă sau ulei prin adăugarea agenților de îngroșare și/sau gelifiere. Loțiunile pot fi preparate utilizând apă și ulei și pot conține, în caz general, unul sau mai mulți agenți de emulsionare, stabilizatori, dispersanți, agenți de suspendare, agenți de îngroșare și coloranți.

Formulările potrivite pentru administrare pe cale topică în gură includ tablete cu conținut de ingredient activ într-o masă aromatizantă, de obicei, din zaharoză, rășină naturală sau rășină tragacant; pastile, cu conținut de ingredient activ într-o bază inertă, cum este gelatina și glicerina sau zaharoza și rășina naturală; lichide pentru clătirea gurii, cu conținut de ingredient activ într-un suport lichid potrivit.

Formulările farmaceutice, potrivite pentru administrare rectală, în care suportul este un compus solid, de preferință, se prepară sub formă de supozitoare ce conțin o doză unică. Suporturile potrivite includ unt de cacao și alte substanțe, utilizate de obicei în astfel de scopuri, iar înseși supozitoarele este convenabil să fie preparate prin fuzionarea ingredientului activ cu suporturi înmuiate sau topite cu răcire ulterioară și turnare în forme.

Formulările potrivite pentru administrare vaginală pot fi prezentate ca supozitoare vaginale, tampoane, creme, geluri, paste, spume și aerosoli, care ca suplimente la ingredientul activ mai conțin suporturi cunoscute, utile în aceste scopuri.

Pentru administrare intranasală compușii, conform prezentei invenții, pot fi utilizați sub formă de aerosoli lichizi sau prafuri dispersabile, sau sub formă de picături.

Picăturile pot fi formulate cu o bază apoasă sau neapoasă cu unul sau câțiva dispersanți, solubilizatori sau agenți de suspendare. Aerosolii lichizi, de regulă, se livrează din balonașe sub presiune.

Pentru administrare în inhalație compușii conform prezentei invenții de obicei se livrează din aparate pentru insuflare, pulverizatoare sau din balonașe cu aerosol sau se livrează cu alte mijloace potrivite pentru administrarea aerosolilor. În ambalajele pentru aerosol se pot utiliza propelenți respectivi, cum sunt diclorodifluorometan, triclorfluorometan, diclorotetrafluoretan, dioxid de carbon sau alte gaze potrivite. În acest caz doza unică se stabilește cu o valvă, care eliberează numai o anumită cantitate de substanță.

Pentru administrare prin inhalație sau insuflare compușii conform prezentei invenții pot fi preparați sub formă de compoziție pulverulentă uscată, de exemplu, amestec de prafuri de compus și o bază, sub formă de praf, potrivită, cum este lactoza sau amidonul. Compoziția pulverulentă poate fi prezentată în formă dozată unic, de exemplu, în capsule sau cartușe, sau, de exemplu, în ambalaje de gelatină sau plastic, din care praful poate fi livrat cu un inhalator sau cu un aparat pentru insuflații.

În caz de necesitate, formulările descrise anterior pot fi adaptate pentru eliberarea ingredientului activ în porții într-o perioadă îndelungată de timp.

Compozițiile farmaceutice conform prezentei invenții pot conține, de asemenea, și alte ingrediente active, cum sunt remediile antimicrobiene și conservanții.

Compușii conform prezentei invenții pot fi utilizați în combinație cu alți agenți terapeutici, de exemplu, cu alte remedii antiinfecțioase. În particular, compușii conform prezentei invenții pot fi utilizați simultan cu remedii antivirolice cunoscute.

Astfel, prezenta invenție mai asigură, într-un alt aspect, o combinație cu conținut de compus (A) sau de derivat al acestuia, fiziologic acceptabil, împreună cu un alt agent terapeutic activ, în particular, cu un remediu antivirotic.

Combi-națiile, menționate anterior, pentru comodate mai pot fi prezentate pentru uz într-o formulare farmaceutică și aceste formulări farmaceutice conțin o combinație din cele definite anterior împreună cu un suport farmaceutic acceptabil.

Agenții terapeutici, potriviți pentru utilizare în aceste combinații, includ nucleozide aciclice, de exemplu, aciclovir sau ganciclovir, interferoni, de exemplu, alfa-, beta- sau gama-interferon, inhibitori ai excreției renale, de exemplu, probenecidă, inhibitori ai transportului nucleozidelor, de exemplu, dipiridamol, 2',3'-dideoxinucleozide, de exemplu AZT, 2',3'-dideoxicitidina, 2',3'-dideoxoadenozina, 2',3'-dideoxiinozina, 2',3'-dideoximidina, 2',3'-dideoxi-2',3'-didehidrotimidina și 2',3'-dideoxi-2',3'-didehidrocitidina, imunomodulatori, cum este interleucina-2 (IL-2) și factorul granulocitaro-macrofagal stimulator (GM-CSF), eritropoietină, ampligen, timomodulină, timopentin, foscarnet, ribavirină și inhibitori ai cuplării HIV la receptorii CD₄, de exemplu, CD₄ solubili, fragmente de CD₄, molecule hibride CD₄, inhibitori ai glicosilării, cum este 2-deoxi-D-glucoza, castanospermina și 1-deoxinoirimicina.

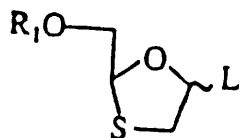
Componentele individuale ale acestor combinații pot fi administrate fiecare succesiv sau simultan, separat sau combinat în formulări farmaceutice.

În cazul în care compusul (A) sau derivatul lui farmaceutic acceptabil se utilizează în combinație cu un al doilea agent terapeutic, activ față de același virus, doza de fiecare compus poate fi aceeași sau să difere de doza administrată în cazul utilizării fiecărui compus aparte. Doza potrivită în fiecare caz este apreciată de un specialist în domeniu.

Compusul (A) și derivații lui farmaceutic acceptabili se pot obține prin orice procedeu, cunoscut specialiștilor în domeniu, pentru prepararea compușilor cu o structură similară, așa cum este descris, de exemplu, în [1].

Pentru un specialist în domeniu este evident că într-un șir de procedee, descrise în continuare, structura stereochimică necesară a compusului (A) poate fi obținută fie prin utilizarea unui compus inițial optic activ, fie prin scindarea amestecului racemic în una din etapele convenabile în cadrul sintezei. În toate procedeele, produsul dezirabil optic pur poate fi obținut prin scindarea produsului final al fiecărei reacții.

În unul din aceste procedee, 1,3-oxatiolanul cu formula (II):

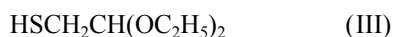


(II)

în care grupa anomică L reprezintă o grupă care părăsește molecula, interacționează cu o bază potrivită. Grupele potrivite L includ grupele -OR, în care R reprezintă grupa alchil, de exemplu, grupa C₁₋₆ alchil, cum este grupa metil sau R reprezintă grupa acil, de exemplu, grupa C₁₋₆ alchil, cum este acetil sau halogen, de exemplu, iod, brom sau clor.

Compusul cu formula (II) ușor interacționează cu 5-fluor-citozina sau cu precursorul potrivit al bazei pirimidinice a ei (în prealabil sililată cu un agent de sililare, cum este hexametildisilazan) într-un solvent compatibil, cum este clorura de metilen, utilizând acidul Lewis, cum este tetraclorura de titan, trimetilsililtriflat, trimetilsilil iodura (TMSI) sau compus de staniu (IV), de exemplu, SnCl₄.

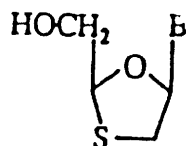
1,3-Oxatiolanii cu formula (II) pot fi obținuți, de exemplu, prin interacțiunea aldehidei cu formula (III) cu mercaptoacetatul cu formula (IV), într-un solvent organic compatibil, cum este toluenul, în prezența unui catalizator acid, de exemplu, acidul Lewis, cum este clorura de zinc.



Mercaptoacetalii cu formula (III) se obțin prin procedee cunoscute, de exemplu, G. Hesse și I. Jorder, Chem. Ber., 85, pp. 924-932 (1952).

Aldehidele cu formula (IV) se obțin prin procedee cunoscute, de exemplu, E.G. Halloquist și H. Hibbert, Can. J. Research, 8, pp. 129-136 (1933). Aldehida brută (VII) se purifică prin transformare până la un aduct cristalin cu bisulfid și se retransformă ulterior într-o aldehydă liberă.

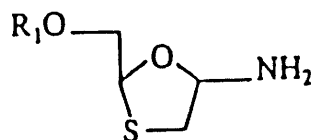
În al doilea procedeu, compusul (A) se obține prin interconversia bazei compusului cu formula (V):



(V)

în care B reprezintă baza convertibilă în 5-fluor-citozină. O astfel de intraconversie poate fi realizată fie printr-o transformare chimică simplă (de exemplu, transformarea bazei uracil în citozină), fie prin conversie enzimică, folosind deoxiriboziltransferaza. Procedeele menționate și condițiile de interconversie a bazei sunt bine cunoscute în chimia nucleozidelor.

În al treilea procedeu compusul cu formula (VI)



(VI)

poate fi transformat în compusul (A) prin conversia grupei NH_2 -anomere în baza de 5-fluor-citozină prin modalități bine cunoscute în chimia nucleozidelor.

Majoritatea din reacțiile descrise aici, în contextul sintezei nucleozidelor, sunt prezentate în sinteze de literatură, de exemplu, Nucleoside Analogs-Chemistry, Biology and Medical Applications, R.T. Walker et al., Eds., Plenum Press, New York (1979), p. 165-192 și T. Ueda, Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Vol. 1, L.B. Townsend ED., Plenum Press New York (1988), p. 165-192.

Evident, pentru a realiza reacțiile menționate anterior sunt necesare substanțe de lansare, care conțin grupe funcționale protejate, cu deprotejarea lor în etapele intermediare sau finale pentru separarea compusului dezirabil. Protecția și deprotecția grupelor funcționale se efectuează prin procedee obișnuite. De exemplu, grupa amino este protejată cu o grupă selectată din grupa aralchil (de exemplu, grupa benzil), acil, aril (de exemplu, 2,4-dinitrofenil) sau silil; eliminarea ulterioară a grupelor de protecție se efectuează, când este necesar, prin hidroliză sau hidrogenoliză în condiții standard. Grupele hidroxil se pot proteja cu grupe potrivite, utilizate în acest scop (Protective Groups in Organic Chemistry, J.F.W. McOmie, Ed., Plenum Press, New York (1973) sau T.W. Green, Protected Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, New York (1981)). Exemplele de grupe potrivite pentru protecția grupei hidroxil includ grupele selectate din alchil (de exemplu, metil, terț-butil sau metoximetil), aralchil (de exemplu, benzil, difenilmetil sau trifenilmetil), grupele heterociclice, cum este grupa tetrahidropirani, grupa acil (de exemplu, acetil sau benzoil) și grupa silil, cum este grupa trialkilsilil (de exemplu, terț-butildimetilsilil). Deprotecția grupelor hidroxil se efectuează prin procedee obișnuite. De exemplu, grupele alchil, acil și grupa heterociclică se elimină prin solvoliză, de exemplu, prin hidroliză într-un mediu acid sau bazic. Grupele aralchil, cum este grupa trifenilmetil, în mod similar se elimină prin solvoliză, de exemplu, prin hidroliză într-un mediu acid.

Grupele aralchil, cum este grupa benzil, pot fi scindate, de exemplu, prin tratare cu BF_3 / eterat și anhidridă acetică, urmată de eliminarea grupelor acetat formate astfel în etapa respectivă a sintezei. Grupele silil, de asemenea, se elimină utilizând surse de ioni de fluor, de exemplu, cu fluorura de tetra-n-butilamoniu.

În procedeele, menționate anterior, compusul (A) se obține, de obicei, sub formă de amestec de cis- și trans-izomeri, dintre care prezintă interes compusul care reprezintă cis- izomer.

Acești izomeri se separă prin procedee fizice, de exemplu prin cromatografie pe gel de siliciu sau prin recristalizare fracțională, fie direct sau sub formă de derivat potrivit, de exemplu, acetat (preparat, de exemplu, cu

anhidrida acetică), urmată, după separare, de conversie inversă până la produsul patern (de exemplu, cu amoniu metanolic).

Sărurile farmaceutic acceptabile ale compusului conform prezentei invenții se pot obține prin procedeul, descris în brevetul US 4383114. De exemplu, în cazul în care este necesar de a obține o sare acidă de adiție a compusului (A), produsul, obținut în oricare din procedeele menționate mai sus, se transformă în sare prin tratarea bazei libere obținute cu un acid potrivit, utilizând metode potrivite. Sarea acidă de adiție farmaceutic acceptabilă se prepară prin reacția unei baze libere cu un acid potrivit, opțional, în prezența unui solvent potrivit, cum este esterul (de exemplu, acetatul de etil) sau alcoolul (de exemplu, metanol, etanol sau izopropanol). Sărurile bazice neorganice se obțin prin interacțiunea compusului patern cu o bază potrivită, cum este alcoolul (de exemplu, metanol). Sărurile farmaceutic acceptabile se pot obține, de asemenea, și din alte săruri, inclusiv și din alte săruri farmaceutic acceptabile ale compusului (A), utilizând procedee obișnuite.

Compusul (A) poate fi transformat în fosfat farmaceutic acceptabil sau în alți esteri prin reacția cu un agent de fosforilare, cum este POCl_3 sau cu un agent potrivit de esterificare, cum este halogenura sau anhidrida unui acid. Esterul sau sarea compusului (A) pot fi transformați în compusul patern, de exemplu, prin hidroliză.

Scindarea produsului final, produsului intermediar sau materialului inițial poate fi efectuată prin orice procedee potrivite cunoscute în domeniu (E.L. Eliel. 'Stereochemistry of Carbon Compounds, McGraw Hill (1962) și S.H. Wilen, Tables of Resolving Agents).

De exemplu, compusul (A) poate fi obținut prin cromatografiachiralică de lichide de înaltă performanță (HPLC), utilizând faza staționară potrivită, de exemplu, cu β -ciclodextrină acetalată sau triacetat de celuloză și un solvent respectiv, de exemplu, alcool, cum este etanol sau soluție apoasă, de exemplu, acetat de trietilamoniu. Compusul poate fi scindat, de asemenea, prin catabolism enantioselectiv, mediat de o enzimă potrivită, cum este citidin-deaminaza sau prin degradare enzimatică selectivă a derivatului potrivit al 5'-nucleotidazei. În cazul în care se efectuează o scindare enzimatică, enzima se utilizează fie în formă de soluție, fie, ceea ce este mai comod, în formă imobilizată. Imobilizarea enzimelor se realizează prin procedee cunoscute în domeniu, de exemplu, prin adsorbție pe rășină, de exemplu, pe Eupergit S.

În continuare prezenta invenție este ilustrată prin exemple, care nici într-un caz nu limitează volumul invenției. Temperaturile sunt prezentate în grade Celsius.

EXAMPLE

Compusul intermediar 1.

(±)-Cis-2-hidroxiometil-5-(5'-fluorcitozin-1'-il)-1,3-oxatiolan

(i) 2-Benzoiloximetil-5-acetoxi-1,3-oxatiolan

Benzoiloxiacetaldehida (216,33 g, 1,32 mol) se dizolvă în piridină (373 ml, 4,61 mol) și la soluția obținută se adaugă 1,4-ditian-2,5-diol (100,31 g, 0,66 mol). Amestecul eterogen se agită într-o atmosferă de azot la temperatura de 60... 65°C pentru 1 oră. Spre sfârșitul acestei perioade de timp dizolvarea este completă. În amestecul de reacție se adaugă diclormetan (650 ml) și amestecul se răcește până la 0°C într-o baie cu gheață. La soluție se adaugă picătură cu picătură clorură de acetil (281 ml, 3,95 mol) la temperatura de 0...5°C timp de 1,5...2 ore. Amestecul de reacție se agită la 0...5°C pentru 30 minute, apoi cu precauție se toarnă într-o soluție saturată de bicarbonat de sodiu răcită (0°C). Se separă stratul organic. Stratul apos se extrage cu diclormetan (3x200 ml). Straturile organice combinate se spală cu soluție saturată de bicarbonat de sodiu (3x200 ml) și sărămură (200 ml). Soluția se usucă deasupra sulfatului de sodiu și se concentrează în vid. Reziduurile piridinei se elimină prin distilare azeotropă cu benzen. Se obțin 320,79 g de produs brut, care se purifică prin distilare Kugelrohr sau filtrare prin coloana scurtă cu silicagel (sistemul de solvent: hexan/acetat de etil, 3/1).

(ii) Cis- și trans-2-benzoiloximetil-5-(N₄-acetil-5'-fluor-citozin-1'-il) -1,3-oxatiolan

5-Fluorcitozină (4,30 g, 33,3 mmol), hexametildisilazan (25 ml) și sulfat de amoniu (120 mg) se încălzesc în reflux până la dizolvarea completă a citozinei (3 ore) și apoi se mai conduc în reflux pentru 2 ore. Hexametildisilazanul se evaporă în vid și la reziduu se adaugă toluen (100 ml) pentru evaporarea solventului. Soluția obținută de bis-(trimetilsilil)- fluorcitozină în diclormetan (40 ml) se adaugă, într-o atmosferă de argon, la soluția de 2-benzoiloximetil-5-acetoxi-1,3-oxatiolan (8,537 g, 30,3 mmol) în diclormetan uscat (100 ml) și site moleculare (4 Å , 2 g), preparate în prealabil într-o atmosferă de argon și răcite până la 0°C timp de 20 minute.

La acest amestec, la 0°C, se adaugă [(trifluormetan-sulfonil) oxi] trimetisilan (6 ml, 31 mmol) și soluția formată se agită la temperatura camerei pentru 2 ore. Filtratul se agită prin scuturare repetat cu 300 ml sărămură și o dată cu apă distilată. Stratul organic se usucă deasupra sulfatului de magneziu, se filtrează și se evaporă până la uscare. Se obține derivatul brut al 5-fluor-citozinei (10,1 g, $R_f=0,57$ (EtOAc:MeOH, 9:1)).

Acest reziduu se acetilează în etapa următoare fără purificare ulterioară. Materialul brut se dizolvă în diclormetan uscat (120 ml) într-un balon cu fund rotund cu o capacitate de 500 ml, într-o atmosferă de argon. La soluția formată se adaugă trietilamină (12,7 ml, 91,1 mmol) și dimetilaminopiridină (111 mg, 0,9 mmol). Balonul se cufundă apoi într-o baie cu gheață pentru 1 oră într-o atmosferă de argon. Anhidrida acetică (4,3 ml, 45 mmol), distilată deasupra acetatului de sodiu, se injectează în balonul răcit. Amestecul se agită peste noapte și cu precauție se decantează în balonul

Erlenmeyer, care conține soluție saturată de bicarbonat de sodiu. Produsul se spală cu apă distilată și apoi cu soluție saturată de sare. Porțiile de clorură de metilen se usucă și se evaporă până la uscare într-un vid înalt, se obține un α/β amestec acetalat sub formă de spumă incoloră, greutatea căruia după uscare constituia 9,6 g. Flash-cromatografia acestui material, utilizând acetat de etil:metanol (9:1), dă 3,1 g (7,8 mmol, 46%) de compus trans- pur și 3,5 g (8,9 mmol, 30%) de compus cis- pur din titlu.

Trans- izomerul: $R_f=0,65$ în acetat de etil:metanol, 9:1

Spectrul UV: (MeOH) λ max: 309 nm.

$^1\text{H-RMN } \delta$ (ppm în CDCl_3):

8,77 (b, 1H, $\text{C}'_4\text{-NH-Ac}$),
 8,06 (m, 2H, aromatic),
 7,70 (d, 1H, $\text{C}'_6\text{-H}$, $J_{\text{CF}}=6,3$ Hz),
 7,62 (m, 1H, aromatic),
 7,49 (m, 2H, aromatic),
 6,51 (dd, 1H, $\text{C}_5\text{-H}$),
 5,91 (dd, 1H, $\text{C}_2\text{-H}$),
 4,48 (dd, 2H, $\text{C}_2\text{-CH}_2\text{OCOC}_6\text{H}_5$),
 3,66 (dd, 1H, $\text{C}_4\text{-H}$),
 3,34 (dd, 1H, $\text{C}_4\text{-H}$),
 2,56 (s, 3H, NH-COCH_3).

cis-izomerul: $R_f=0,58$ în acetat de etil:metanol, 9:1

spectrul UV: (MeOH) λ max: 309 nm.

$^1\text{H RMN } \delta$ (ppm în CDCl_3):

8,72 (b, 1H, $\text{C}'_4\text{-NH-Ac}$),
 8,06 (m, 2H, aromatic),
 7,87 (d, 1H, $\text{C}'_6\text{-H}$, $J_{\text{CF}}=6,2$ Hz),
 7,60 (m, 1H, aromatic),
 7,49 (m, 2H, aromatic),
 6,32 (dd, 1H, $\text{C}_5\text{-H}$),
 5,47 (dd, 1H, $\text{C}_2\text{-H}$),
 4,73 (dd, 2H, $\text{C}_2\text{-CH}_2\text{OCOC}_6\text{H}_5$),
 3,62 (dd, 1H, $\text{C}_4\text{-H}$),
 3,19 (dd, 1H, $\text{C}_4\text{-H}$),
 2,55 (s, 3H, NH-COCH_3).

(iii) (\pm)-Cis-hidroxitetil-5-(5'-fluorcitozin-1'-il)-1,3-oxatiolan

1,2 g (3,05 mmol) de cis-2-benzoiloximetil-5-(N'_4 -acetil-5'-fluorcitozin-1'-il)-1,3-oxatiolan se agită în 30 ml de amoniu metanolic la 0°C pentru 1 oră și apoi peste noapte la temperatura camerei. Amestecul se evaporă sub presiune redusă. Reziduul se triturează dublu (2x30 ml) cu eter anhidru. Reziduul solid se recrystalizează în etanol absolut și se obțin 655 mg (2,64 mmol, 87%) de cis-compus pur din titlu: temperatura de topire $204\text{...}206^\circ\text{C}$; $R_f=0,21$ în acetat de etil:metanol (9:1). Compusul dezirabil se identifică prin spectrele ^1H , ^{13}C - RMN și UV λ max (H_2O) 280,9 nm.

Cis-izomerul:

$^1\text{H-RMN } \delta$ (ppm în DMSO-d_6):

8,22 (d, 1H, $\text{C}'_6\text{-H}$, $J_{\text{CF}}=7,26$ Hz),
 7,84 (d, 2H, $\text{C}'_4\text{-NH}_2$);
 6,16 (t, 1H, $\text{C}_5\text{-H}$);
 5,43 (t, 1H, $\text{C}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$);
 5,19 (t, 1H, $\text{C}_2\text{-H}$);
 3,77 (m, 2H, $\text{C}_2\text{-CH}_2\text{OH}$);
 3,35 (dd, 1H, $\text{C}_4\text{-H}$);

$^{13}\text{C-RNM}$ (DMSO-d_6)

C'_6	C'_2	C'_4	C'_5
153,46	158,14 ($^2J_{\text{CF}}=14,0$ Hz)	134,63 ($J_{\text{CF}}=24,1$ Hz)	126,32 ($J_{\text{CF}}=32,5$ Hz)
C_5	C_4	C_2	CH_2OH
86,82	36,80	86,77	62,32

EXEMPLUL 1

(-)-4-Amino-5-fluor-1-(2-hidroxitetil-1,3-oxatiolan-5-il)-(1H)-pirimidin-2-onă

(i) (±) Cis-2-hidroximetil-5-(5'-fluorcitozin-1'-il)-1,3-oxatiolan monofosfat

În amestecul agitat de compus intermediar 1 (500 mg, 2,024 mmol) în trimetilfosfat uscat (10 ml), răcit până la 0°C, se adaugă picătură cu picătură oxiklorură de fosfor (1,22 ml, 13,1 mmol). Amestecul de reacție se agită la temperatura menționată pentru 1 oră și reacția se stinge în apă cu gheață. Prin adăugarea 1N hidroxid de sodiu apos se ajustează pH-ul amestecului răcit până la 3, apoi se aplică pe coloana cu cărbune de lemn activat (5 g, DARCO) și se eluează inițial cu apă, apoi cu etanol și amoniu apos (în raport de 10:10:1). Frajeciile cu conținut de monofosfat brut se combină, se evaporă și succesiv se aplică pe coloana care conține 15 g DEAE Sephadex A 25 (forma-HCO₃). Se eluează cu gradient de apă (300 ml), 0,1 mol - NH₄HCO₃ (300 ml) și 0,2 mol - NH₄HCO₃ (100 ml). Evaporarea fracjeciilor respective, după diluare cu apă (30 ml), permite separarea (±) cis-2-hidroximetil-5-(5'-fluorcitozin-1'-il)-1,3-oxatiolan monofosfat sub formă de substanță solidă incoloră, R_f=0,5 (n.PrOH:NH₄OH, 6:4) cu un randament de 612 mg (1,77 mmol, 87,9%).

¹H- RMN δ (ppm în D₂O): 8,27 (d, 1H, C'₆-H, J_{H-F}=6,47 Hz); 6,33 (dd, 1H, C₅H); 5,47 (t, 1H, C₂-H); 4,84 (m, 2H, C₂-CH₂OH); 3,63 (dd, 1H, C₄-H); 3,30 (dd, 1H, C₄-H).

Puritatea conform HPLC >99%.

(ii) (+)-Cis-2-hidroximetil-5-(5'-fluorcitozin-1'-il)-1,3-oxatiolan

La soluția de (±)cis-2-hidroximetil-5-(5'-fluorcitozin-1'-il)-1,3-oxatiolan monofosfat (100 mg, 0,29 mmol) în 3 ml de soluție tampon de glicină (52,6 mg) și clorură de magneziu (19 mg) în apă (10 ml) se adaugă într-o singură porție 5'-nucleotidaza ("Sigma", 3,5 mg cu activitatea de 29 unit./mg). Amestecul format se incubează la 37°C cu agitare prin scuturare. Reacția se monitorizează prin HPLC (coloana chiralică cu conținut de α-acid-glicoproteină (AGP), utilizând 0,2 mol fosfat de sodiu, în calitate de eluant, pH 7, viteza fluxului - 0,15 ml/min) la diferite intervale de timp. Peste 2,5 ore se observă doar prezența (+)-enantiomerului. Se adaugă mai multă enzimă (2 mg) și incubarea se continuă pentru 3 ore. Analiza prin HPLC indică clar hidroliza selectivă și completă a (+)-enantiomerului. Amestecul obținut se aplică pe coloana DEAE Sephadex A 25 (forma-HCO₃). Eluția se efectuează cu apă (155 ml) și apoi cu 0,1 și 0,2 mol NH₄HCO₃ (câte 100 ml fiecare). Frajeciile potrivite ce conțin prima nucleozidă eluată se combină și se concentrează. Substanța solidă restantă se purifică pe coloana scurtă cu gel de siliciu, utilizând acetat de etil, metanol (4,5:0,5) ca eluant și apoi se separă prin HPLC (utilizând condițiile menționate anterior).

Se obține (+)-cis-2-hidroximetil-5-(5'-fluorcitozin-1'-il)-1,3-oxatiolan (23 mg, 0,093 mmol, 32%) sub formă de substanță solidă de culoare albă.

[α]_D²¹+123°C [c, 1,00, MeOH], p.t. 185°C.

RMN δ (ppm în DMSO): 8,26 (d, 1H, C'₆-H, J_{H-F}=5,22 Hz); 7,87 (s, 1H, NH₂, D₂O schimbabil); 7,63 (s, 1H, NH₂, D₂O schimbabil); 6,20 (dd, 1H, C₅-H); 5,48 (t, 1H, C₂-H); 5,24 (t, 1H, CH₂-OH, D₂O schimbabil); 3,84 (m, 2H, C₂-CH₂OH); 3,50 (dd, 1H, C₄H); 3,37 (dd, 1H, C₄H).

(iii) (-) Cis-2-hidroximetil-5-(5'-fluorcitozin-1'-il)-1,3-oxatiolan

Frajeciile potrivite de pe coloana Sephadex cu conținut de nucleozidă secundă eluată, preparată prin metoda descrisă în etapa (ii), se combină și se evaporă sub presiune redusă. Reziduul se dizolvă în 2 ml de apă și se tratează cu fosfatază alcalină ("Sigma", 1 ml cu activitatea de 60 unit./mg), apoi se incubează la temperatura de 37°C pentru 1,5 ore. Solventul se evaporă și reziduul se purifică prin cromatografiere pe coloana cu gel de siliciu, utilizând EtOAc:MeOH (4:1), ca eluant, urmată de CLÎR (separare cu utilizarea condițiilor identice celor descrise anterior). Astfel se obține (-) cis-2-hidroximetil-5-(5'-fluorcitozin-1'-il)-1,3-oxatiolan (20 mg, 0,081 mmol, 28%), temperatura de topire 190°C (cu descompunere): R_f=0,21, EtOAc:MeOH (4:1).

Spectrul UV: λ_{max} (H₂O): 279,1 nm.

¹H RMN δ (ppm în DMSO-d₆): 8,25 (d, 1H, C₆-H, J_{H-F}=7,26 Hz); 7,88 (b, 1H, C'₄-NH₂, D₂O - schimbabil); 7,85 (b, 1H, C'₄-NH₂ : D₂O - schimbabil); 5,24 (t, 1H, C₂-H); 3,83 (m, 2H, C₂-CH₂-OH); 3,19 (dd, 1H, C₄-H); 3,15 (dd, 1H, C₄-H).

Compusul intermediar 2 și Exemplul 2 prezintă descrierea procedurii alternativ de obținere a compusului cu formula (A).

Compusul intermediar 2**(1'R, 2'S, 5'R)-mentil-5R-(5'-fluorcitozin-1''-il)-1,3-oxatiolan-2S-carboxilat**

La suspensia de 5-fluorcitozină (155 mg, 1,2 mmol) în CH₂Cl₂ (1 ml), la temperatura camerei într-o atmosferă de argon, se adaugă succesiv 2,4,6-colidină (0,317 ml, 2,4 mmol) și terț-butildimetilsilil-trifluorometan-sulfonat (0,551 ml, 2,4 mmol). Amestecul obținut se agită timp de 15 minute până se obține o soluție transparentă. Se introduce soluția de (1'R, 2'S, 5'R)-mentil-5R-acetoxi-1,3-oxatiolan-2S-carboxilat (330 mg, 1 mmol) în CH₂Cl₂ (0,5 ml), iar apoi iodtrimetilsilan (0,156 ml, 1,1 mmol) și agitarea se continuă 3 ore. Amestecul se diluează cu CH₂Cl₂ (20 ml) și se spală succesiv cu NaHSO₃ apos saturat, cu apă, sărămură și apoi se concentrează. Reziduul se transferă într-un amestec eter-

hexan (1:1, 10 ml) și NaHCO₃ apos saturat (2 ml) și se agită la temperatura camerei pentru 15 minute. Stratul apos se elimină și faza organică se centrifughează, se obține o substanță solidă de culoare albă, care se spală cu hexan (3x5 ml) și apoi se usucă în vid. Produsul obținut (1'R, 2'S, 5'R)-mentil-5R-(5''-fluorcitozin-1''-il)-1,3-oxatiolan-2S-carboxilat (350 mg, 88%) conține circa 6% de (1'R, 2'S, 5'R)-mentil-5S-(5''-fluorcitozin-1''-il)-1,3-oxatiolan-2S-carboxilat (RMN). Acest material se recrystalizează din MeOH/CH₂Cl₂ /benzen și se obține un produs cristalin: $[\alpha]_D^{26} +22^0$ (c, 0,19, MeOH); p.t. 216...218⁰ C;

¹H-RMN (CDCl₃) δ : 0,78 (d,3H, J=7 Hz), 0,91 (t, 6H, J=7,3 Hz), 1,00 (m, 2H), 1,39-2,04 (m, 7H), 3,12 (dd, 1H, J=6,6 Hz, 6,1 Hz), 3,52 (dd, 1H, J=4,7 Hz, 6,1 Hz), 4,79 (dt, 1H, J=4,4 Hz, 4,3 Hz), 5,46 (s, 1H), 5,75 (bs, 1H, schimbabil), 6,42 (5t, 1H, J=5,0 Hz), 8,10 (br, 1H, schimbabil), 8,48 (d, 1H, J=6,6 Hz);

¹³C RMN (CDCl₃-DMSO-d₆) : δ 16,7, 21.2, 22.4, 2,7, 36.6, 31,8, 34,4, 36,6, 40.5, 47,2, 77,1, 79,1, 90,8, 126,3, (d, J=15 Hz), 170,1.

EXEMPLUL 2

2S-Hidroxitetil-5R-(5'-fluorcitozin-1'-il)-1,3-oxatiolan

La suspensia de alumohidruură de litiu (10 mg, 0,54 mmol) în THF (1 ml) la temperatura ambiantă într-o atmosferă de argon lent se adaugă soluția de (1'R, 2'S, 5'R)-mentil-5R-(5''-fluorcitozin-1''-il)-1,3-oxatiolan-2S-carboxilat (54 mg, 0,135 mmol) în THF (2 ml). Amestecul de reacție se agită pentru 30 minute, apoi se stinge cu un exces de metanol (2 ml) și se adaugă gel de siliciu (3 g). Suspensia care rezultă se expune cromatografierii pe coloană de silicgel (EtOAc-hexan-MeOH, 1:1:1) și se obține o substanță solidă rășinoasă, care se usucă prin distilare azeotropă cu toluen și se separă 20,7 mg (63%) de substanță solidă de culoare albă ca produs: $[\alpha]_D^{26} +114^0$ (c, 0,12, MeOH);

¹H-RMN (CDCl₃) δ : 3,14 (dd, 1H, J=4,3 Hz, 11,9 Hz), 3,42 (dd, 1H, J=5,3 Hz, 11,9 Hz), 3,76 (m, 2H), 5,18 (m, 1H), 5,42 (t, 1H, J=4,8 Hz), 6,14 (m, 1H), 7,59 (br, 1H, schimbabil), 7,83 (br, m, 1H, schimbabil), 8,20 (d, 1H, J=7,66 Hz).

EXEMPLUL 3

Activitatea biologică

(i) Activitatea antivirotică

Activitatea antivirotică a compusului din Exemplul 1 se determină contra HIV-1 în liniile celulare următoare.

Celulele C8166, linia de celule limfoblastice-T umane, infectate cu tulpina RF de HIV-1.

Celulele MT-4, linia de celule – T leucemice, infectate cu tulpina RF de HIV-1.

Activitatea antivirotică în celulele C8166 se determină prin inhibarea formării sincitiului (Tochikura et al., Virology, 164, 542-546) și în celulele MT-4 - prin inhibarea conversiei formazanului [Baba et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 142, pp. 128-134 (1987); Mossman, J. Immun. Meth., 65, pp. 55-57 (1983)].

Activitatea antivirotică se determină, de asemenea, prin analiza numărului de antigene HIV p24 sintetizate în prezența și în absența enantiomerilor.

Rezultatele sunt prezentate în tabelele 1 și 2, care urmează:

Tabelul 1

Testul	50% activitate antivirotică (μg/ml)		
	Formazan	Inhibarea formării	sincitiului
Celule	MT-4	C8166	
Virus (HIV-1)	HIV-1 RF	HIV-1 RF	
(+)-enantiomer	> 1	0,04	
(-)-enantiomer	0,14	0,0018	
Compus intermediar 1	0,065	0,013	
AZT		0,0038	

Tabelul 2

Celule	50% inhibare a sintezei HIV p24 (μg/ml)	
	C8166	RF
Virus (HIV-1)		RF
(+)-enantiomer		0,1
(-)-enantiomer		0,0022
Compus intermediar 1		0,011
AZT		0,017

(ii) Citotoxicitatea

Citotoxicitățile compușilor din Exemplul 1 și compusului racemic (Compusul intermediar 1) se determină în două linii de celule CD4: H9 și CEM.

Compușii pentru testare se diluează succesiv de la 100 μg/ml până la 0,3 μg/ml (concentrația finală) pe plăcuța de microtitrare cu 96 celule. În fiecare celulă de pe plăcuță se inoculează câte 3,6x10⁴ celule, inclusiv și în celulele-control, care nu conțin medicament. După incubare la 37⁰C pentru 5 zile numărul de celule viabile se determină prin separarea mostrelor cu suspensie de celule și numărarea albastrului de tripan, cu excepția celulelor din hemocitometru.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabelul 3

Compus	50% citotoxicitate ($\mu\text{g/mL}$)	
	Celule CEM	Celule H9
(+)-enantiomer	217	334
(-)-enantiomer	148	296
Compus intermediar 1	173	232