



УКРАЇНА

(19) UA (11) 37251 (13) C2

(51) 7 A61K31/4164, 31/495,
C07D239/22, 411/04, A61P1/16МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ АБО ПРОФІЛАКТИКИ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ГЕПАТИТУ В
І СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ГЕПАТИТУ В

(21) 93004171

(22) 01.05.1992

(24) 15.05.2001

(31) 9109506.7

(32) 02.05.1991

(33) GB

(86) PCT/GB92/00803, 01.05.1992

(46) 15.05.2001, Бюл. № 4, 2001 р.

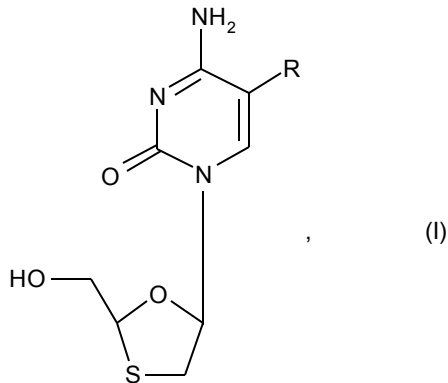
(72) Фурман Філіп Аллен (US), Пеінтер Джордж
Роберт (US)

(73) ДЗЕ ВЕЛЛКАМ ФАУНДЕЙШН ЛІМІТЕД (GB)

(56) WO, патент 89/01776, кл. A61K31/70, 1989.

WO, патент 90/14091, кл. A61K31/70, 1990.

(57) 1. Применение производных 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)цитозина общей формулы (I)



в которой R - водород или C₁-C₃-алкил, или их физиологически функциональных производных для получения лекарственного средства для лечения или профилактики вирусной инфекции гепатита В.

2. Применение по пункту 1, **отличающееся** тем, что соединением формулы (I) является 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)цитозин.

3. Применение по пункту 1, **отличающееся** тем, что соединением формулы (I) является (-)-цис-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)цитозин.

4. Применение по пункту 1, **отличающееся** тем, что соединением формулы (I) является 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-5-метилцитозин.

5. Применение по пункту 1, **отличающееся** тем, что соединение формулы (I) представлено в форме цис-изомера.

6. Применение по пункту 1, **отличающееся** тем, что соединение формулы (I) представлено в форме (-)-цис-изомера.

7. Применение по пункту 1, **отличающееся** тем, что физиологически функциональными производными являются фармацевтически приемлемые соли или сложные эфиры соединения формулы (I).

8. Применение по любому из предыдущих пунктов, **отличающееся** тем, что лекарственный препарат находится в дозированной форме.

9. Применение по пункту 8, **отличающееся** тем, что дозированная форма содержит 10 - 1500 мг соединения формулы (I) или его физиологически функционального производного.

10. Применение по пункту 8 или 9, **отличающееся** тем, что дозированная форма является таблеткой или капсулой.

11. Способ лечения вирусной инфекции гепатита В, **отличающийся** тем, что инфицированным вводят эффективное количество производных 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)цитозина общей формулы (I) или их физиологически функциональных производных.

12. Способ по пункту 11, **отличающийся** тем, что в качестве соединения формулы (I) используют 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-5-метилцитозин.

13. Способ по пункту 11, **отличающийся** тем, что в качестве соединения формулы (I) используют 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-5-цитозин.

Настоящее изобретение относится к применению производных 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)цитозина и их физиологически функциональных производных для лечения инфекций вируса гепатита В.

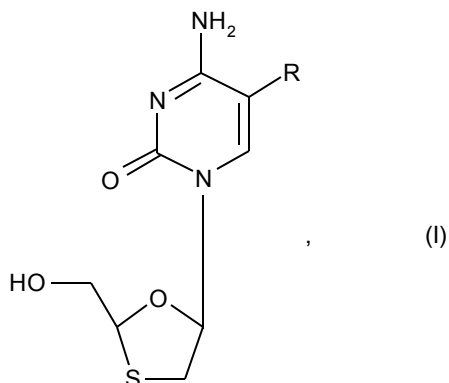
Вирус гепатита В (ВГВ) является всемирно известным вирусным патогенным микроорганизмом. ВГВ наиболее широко распространен в азиатских странах и в африканских странах южнее Сахары. Вирус этиологически связан со злокаче-

венной гепатомой и, как полагают, вызывает 80% случаев рака печени в мире. В США каждый год госпитализируют больше 10 000 людей в связи с инфекцией ВГВ, в среднем 250 человек умирают в связи с быстрым развитием болезни. В США имеется около 500 000 - 1 млн носителей инфекции. Хронический активный гепатит развивается у более чем 25% носителей и часто переходит в цирроз. Согласно оценке около 5000 людей умирает от цирроза, связанного с ВГВ, каждый год в США и возможно 1000 умирает от рака печени, связанного с ВГВ. Даже в случае универсальной ВГВ вакцины, будет оставаться необходимость в эффективных анти-ВГВ соединениях. Большое количество постоянно инфицированных носителей, оцениваемое в 220 млн. человек во всем мире, не получит пользы от вакцинации и будет пребывать в состоянии высокого риска заболеть болезнями печени, вызываемыми ВГВ. Популяция носителей служит источником инфекции восприимчивых индивидов, сохраняющих случаи заболеваний, особенно в эндемических областях и группах высокого риска, таких как злоупотребляющие лекарствами и гомосексуалисты. Таким образом, существует необходимость в эффективных анти-вирусных средствах как для борьбы с хроническими инфекциями, так и для снижения роста злокачественной гепатомы.

Клинические проявления инфекции вирусом ВГВ включают головную боль, лихорадку, недомогание, тошноту, рвоту и боли в животе. Репликация вируса обычно регулируется иммунным ответом с продолжительностью периода выздоровления в недели или месяцы у людей, но инфекция может быть более серьезной, приводя к постоянной хронической болезни печени. В книге: Вирусные Инфекции Человека, (второе издание, ред. А.С.Эванс, 1982, Пленум Паблшинг Корп., Нью-Йорк), глава 12 описывает этиологию инфекции вирусным гепатитом.

Европейский патент N 0382526 описывает некоторые 1,3-оксатиолоновые аналоги нуклеозидов, ингибирующие репликацию вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

Мы нашли, что производные 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил) цитозина формулы I



(в которой R - водород или C₁-C₃-алкил) и их физиологически функциональные производные, имеющие высокую активность против ВГВ.

Предпочтительным соединением формулы I является соединение, где R - водород, т.е. 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-цитозин.

Следует заметить, что соединения формулы I содержат два хиральных центра, и, следовательно, существуют в форме двух пар оптических изомеров, например энантиомеров, и их смесей, включая рацемические смеси. Таким образом, соединения формулы I могут быть либо цис- или транс-изомером, либо их смесью. Каждый цис- и транс-изомер может существовать в качестве одного из двух энантиомеров или их смеси, включая рацемические смеси. Все такие изомеры и их смеси, включая рацемические смеси, входят в предмет изобретения. Предпочтительным является цис-изомер соединения формулы I. Изобретение включает оптические и геометрические изомеры и все таутомерные формы соединений формулы I: из цис-изомеров (-)-изомер, т.е. (-)-цис-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил) - цитозин, особенно предпочтителен.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения мы предлагаем использовать соединения формулы I или их физиологически функциональные производные для лечения или профилактики инфекций вируса гепатита В. Согласно другому аспекту изобретения мы предлагаем использовать соединения формулы I или их физиологически функциональные производные для приготовления лекарственных препаратов для лечения или профилактики инфекций вируса гепатита В. Дополнительные аспекты настоящего изобретения включают способ лечения или профилактики инфекций вируса гепатита В у хозяина, например, млекопитающего, такого как человек, который предусматривает введение хозяину терапевтически эффективного количества соединения формулы I или его физиологически функционального производного.

"Физиологически функциональное производное" означает фармацевтически приемлемую соль, сложный эфир или соль эфира соединения формулы I или любое другое соединение, которое после введения реципиенту, способно превращаться (прямо или непрямо) в соединения формулы I или их активный метаболит или остаток.

Предпочтительные сложные эфиры в соответствии с изобретением включают эфиры карбоновых кислот, в которых некарбонильный остаток кислотной части эфира выбирают из нормального алкила или изоалкила, например, н-пропила, трет-бутила, н-бутила, алкоксиалкила (метоксиметил), арилалкила (бензил), арилоксиалкила (феноксиметил) и арила (фенил); эфиры сульфокислот, такие как алкил- или арилсульфонил (метаносульфони́л); эфиры аминокислот, например, L-валил или L-изолейцил; эфиры дикарбоновых кислот, например, гемисукцинат; 5¹-моно-, ди- или трифосфатные эфиры, причем фосфатные эфиры могут быть этерифицированы, например, C₁-C₂₀-спиртом или его реакционноспособным производным или 2,3-ди-C₆-C₂₄-ацилглицерином.

Алкильный остаток сложного эфира содержит 1-18 атомов углерода, предпочтительно 1-4 атома углерода. Арильный остаток такого сложного эфира предпочтительно представляет собой фенил, возможно замещенный галогеном, C₁-C₄-алкилом, C₁-C₄-алкокси- или нитрогруппой.

В описанных выше сложных эфирах аминогруппа цитозина может присутствовать в амидной форме, например, NHCOR, где R - C₁-C₆-алкил

или арил, например, фенил, возможно замещенный галогеном, C_1 - C_4 -алкилом, C_1 - C_4 -алкокси-, нитро- или гидроксигруппой.

Примеры фармацевтически приемлемых солей в соответствии с изобретением включают соли с основаниями, например, производные соответствующих оснований, такие как щелочнометаллические (натриевые), щелочноземельные (магнитные), аммониевые или четвертичные аммониевые соли NX_4 , где X - C_1 - C_4 -алкил. Фармацевтически приемлемые аддитивные соли с кислотами включают соли органических карбоновых кислот, например, уксусной, молочной, винной, яблочной, изетионовой, лактобиеновой и янтарной кислот; соли сульфокислот, например, метансульфоновой, этансульфоновой, бензолсульфоновой и п-толуолсульфоновой кислоты; и соли неорганических кислот, например, соляной, серной, фосфорной и сульфаминовой кислот.

Количество соединения формулы I (далее называемого также "активный компонент") или его физиологически функционального производного, которое необходимо для достижения желаемого эффекта, зависит от многих факторов, в особенности от специфического применения, природы отдельного соединения, способа введения и состояния пациента. В общем подходящая доза составляет 3,0 - 120 мг на кг массы тела реципиента в день, предпочтительно 6-90 мг на кг массы тела в день и наиболее предпочтительно 15 - 60 мг на кг массы тела в день. Нужную дозу предпочтительно разбивают на 2 - 6 или больше поддоз, вводимых через соответствующие интервалы времени в течение дня. Эти поддозы можно вводить в единых дозировочных формах, например, содержащих 10 - 1500 мг, предпочтительно 20 - 1000 мг и наиболее предпочтительно 50 - 700 мг активного компонента на единую дозировочную форму.

В идеальном случае активный компонент должен быть введен для достижения пиковой концентрации в плазме активного компонента 1 - 75 мкМ, предпочтительно 2-50 мкМ, наиболее предпочтительно 3-30 мкМ. Это можно достичь, например, внутривенной инъекцией 0,1 - 5% раствора активного компонента, возможно в физиологическом растворе, или пероральным введением болюса, содержащего 1-100 мг/кг активного компонента. Желательный уровень в крови можно поддерживать непрерывным вливанием для обеспечения 0,01 - 5,0 мг/кг/ч или прерывными вливаниями, содержащими 0,4 - 15 мг/кг активного компонента.

В технологии производства лекарственного препарата, далее также называемого "препарат" соединения формулы I или их физиологически функциональные производные, "активный компонент", смешивают с одним или больше фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем и, возможно, другими терапевтическими средствами.

Применяют препараты, подходящие для перорального, ректального, назального, местного (включая чрезкожное, транбукальное и подъязычное), вагинального или парентерального (включая подкожное, внутримышечное, внутривенное и внутрикожное) введения. Составы обычно могут иметь единую дозировочную форму и могут быть

получены любыми способами, хорошо известными в фармацевции. Такие способы включают стадию смешивания активного компонента с носителем, который состоит из одного или больше дополнительных компонентов. В общем составы получают однородным и тщательным смешиванием активного компонента с жидкими носителями или тонко измельченными твердыми носителями или с теми и другими и затем, если необходимо, формованием продукта.

Препараты настоящего изобретения, подходящие для перорального введения могут иметь форму отдельных единиц, такую как капсулы, пакетики или таблетки, содержащие определенное количество активного компонента; порошки и гранулы; растворы или суспензии в водной или неводной жидкости; или жидкие эмульсии "масло в воде" или "вода в масле". Активный компонент также может быть помещен в болюс, кашку или пасту.

Таблетки делают прессованием или формованием, возможно вместе с одним или больше вспомогательными компонентами. Прессованные таблетки делают прессованием в соответствующем аппарате активного компонента в свободно-текучей форме, например, в форме порошка или гранул, возможно смешанного со связующим (повидон, желатин, гидроксипропилметилцеллюлоза), смазочным средством, инертным разбавителем, консервантом, дезинтегрантом (натрийгликолат крахмала, сшитый повидон, сшитая карбоксиметилцеллюлоза), поверхностно-активным или диспергирующим средством. Формованные таблетки делают формованием в соответствующем аппарате смеси порошковых соединений, увлажненных инертным жидким разбавителем. Таблетки можно покрыть, можно приготовить состав таким образом, чтобы обеспечить медленное или регулируемое выделение активного компонента, используя, например, гидроксиметилцеллюлозу в различных пропорциях для достижения желаемого профиля освобождения активного компонента. Таблетки можно покрыть антеросолюбильной оболочкой для выделения активного компонента вне желудка.

Пероральные препараты могут включать буферные средства, предназначенные для нейтрализации желудочной кислотности. Такие буферы выбирают из различных органических или неорганических средств, таких как слабые кислоты или основания, смешанные с их сопряженными солями.

Препараты для местного введения во рту включают лепешки, содержащие активный компонент на вкусовой основе, обычно в сахарозе и акации или астрагале; пастилки, содержащие активный компонент в инертной основе, такой как желатин или глицерин, или сахароза и акация; жидкость для полоскания рта, содержащую активный компонент в подходящем жидком носителе.

Препараты для ректального введения могут быть представлены суппозиториями с подходящей основой, состоящей, например, из масла какао или салицилата.

Препараты для вагинального введения могут быть представлены pessaries, тампонами, кремами, гелями, пастами, пенами или разбрызги-

вающимися препаратами, содержащими вместе с активным компонентом известный носитель.

Препараты для парентерального введения включают водные и неводные изотонические стерильные инъекционные растворы, возможно содержащие антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства и растворенные вещества, делающие препараты изотоническими по отношению к крови предполагаемого реципиента; водные или неводные стерильные суспензии, возможно включающие суспендирующие средства и загустители, а также липосомы или другие системы микрочастиц, нацеливающие соединения на компоненты крови одного или нескольких органов.

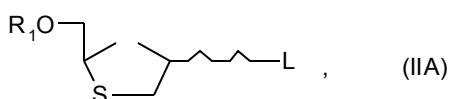
Препараты предполагаются в однократных или многократных сосудах, например, ампулах и пробирках, и могут храниться в лиофилизированном состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед использованием. Инъекционные растворы для немедленного применения могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанных ранее.

Предпочтительными препаратами являются те, которые содержат дневную дозу, дневную дозу или соответствующую часть дозы активного компонента. Следует понимать, что в дополнение к отдельно упомянутым компонентам препараты этого изобретения могут включать другие средства, имеющие отношение к типу препарата, например, пероральные препараты могут включать такие дополнительные средства, как подслащающие средства, загустители и вкусовые вещества.

Соединения формулы I можно получать, например, по способу, описанному в EP 0382526 или по аналогичному способу.

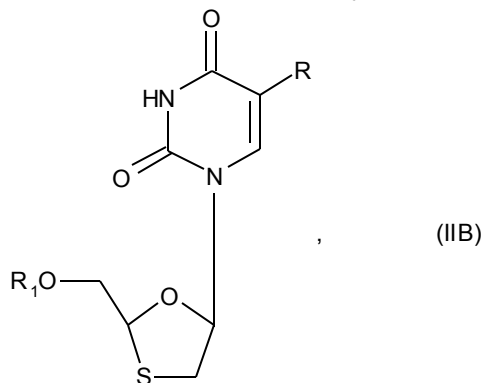
Таким образом соединения формулы I можно получать, например:

а) реакцией необязательно замещенного 5-R-цитозина, где R определен выше, с производными 1,3-оксатиолана формулы IIA



где R₁ - водород или защитный радикал для гидроксигруппы и L-уходящая группа, или

б) реакцией соединений формулы IIB



где R и R₁ определены выше, с реагентом, превращающим оксогруппу в положение 4 кольца

урацила в аминогруппу, любые оставшиеся защитные группы удаляют, например, кислотным или щелочным гидролизом.

В способе (а) защитные радикалы для гидроксигруппы выбирают из ацила (например, ацетила), арилацила (например, бензоила или замещенного бензоила), тритила или монометокситритила, бензила или замещенного бензила, триалкилсилила (например, диметил-трет-бутилсилила) или дифенилметилсилила. 5-R-Цитозин может быть защищен силилом, например, триметилсилилом. Такие группы можно удалять обычными способами. Уходящая группа L - это типичная в нуклеозидной химии уходящая группа, например, галоген (хлор или бром), алкоксигруппа (метокси- или этоксигруппа) или ацил (ацетил или бензоил).

Реакцию в способе (а) можно проводить в органическом растворителе, например, 1,2-дихлорэтаноле или ацетонитриле, в присутствии кислоты Льюиса, например, хлорида олова (IV) или триметилсилилтрифлата.

Соединения формулы IIA можно получать из защищенного 2-гидроксиацетальдегида формулы R₁OCH₂CHO (III), где R₁ определен выше, как описано в Can. J. Research, 8, 129 (1933) и EP 0382526. Реакция соединений формулы III с известным (Chem. Ber 85, 924 - 932 (1952)) меркаптоацеталем HSCH₂(OR)₂, где R - C₁-C₄-алкил, например, HSCH₂CH(OC₂H₅)₂, приводит к соединениям формулы IIA, где L-группа OR, например, метокси- или этокси-группа. Альтернативно, соединения формулы IIA, где L-алкоксигруппа, можно превратить в соединения формулы IIA, где L-галоген или ацил, известными методами химии углеводов. Соединения формулы III можно получать из 1,2-O-изопропилиденглицерина введением R₁, например, тризамещенного силила, бензила или тритила, и удалением изопропилидена мягкой кислотой, например, водными муравьиной или уксусной кислотами, или бромидом цинка в ацетонитриле с последующим окислением спиртовой группы водным периодатом.

В способе (б) соединения формулы IIB преимущественно обрабатывают 1,2,4-триазолом вместе с 4-хлорфенилдихлорфосфатом. Образующееся 4-(1,2,4-триазилол)-ное производное превращают в 4-аминоцитидин по реакции с, например, метанолом. Исходные соединения формулы IIB получают, например, реакцией соответствующего (возможно защищенного) основания с соединениями формулы IIA, способом аналогичным описанному в способе (а).

Разделение (±)-цис и (±)-транс-изомеров, например, в защищенной форме, может быть выполнено хроматографически на силикагеле смеси органических растворителей, таких как этилацетат/метанол, этилацетат/гексан или дихлорметан/метанол. Любые защитные группы затем можно удалить, используя соответствующий реагент для каждой группы.

Расщепление (±)-энантиомеров может быть выполнено ферментативным способом с применением эстеразы, такой как эстераза печени свиньи (Сигма Кемикал Ко, Сент Луис, МО 63178), причем один энантиомер 5'-ацилпроизводного соедине-

ния формулы I диэтерифицируется. После разделения оставшееся этерифицированное соединение формулы I может быть подвергнуто реакции в основных условиях, например, NH_3 в метаноле или NaOMe в метаноле, с получением индивидуальных (+)- и (-)-энантиомеров. Альтернативно, (+)-цис или (+)-транс-изомеры соединений формулы I можно ввести в реакцию с фосфорилирующим реагентом, например, оксихлоридом фосфора, в инертном растворителе, таком как триэтилфосфат, ацетонитрил или 1,3-диметил-3,4,5,6-тетрагидро-2(1H)-пиримидин-5-монофосфатного производного или его соли. Обработка 5'-монофосфатного производного ферментом, таким как 5'-нуклеотидаза яда змеи, приводит предпочтительно к гидролизу одного из энантиомеров. Отделение и последующее дефосфорилирование другого 5'-монофосфатного энантиомера приводит к индивидуальному (+)- или (-)-энантиомерам соединений формулы I. Соединения формулы I можно превратить в фармацевтически приемлемые эфиры реакцией с соответствующим этерифицирующим реагентом, например, ацилгалогенидом или ангидридом. Соединения формулы I можно превратить в фармацевтически приемлемые соли обычным способом, например, в результате обработки основанием. Эфиры и соли соединений формулы I можно превратить в исходное соединение, например, гидролизом.

Для лучшего понимания изобретения приведены следующие примеры.

Пример 1. 1-(2-Гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил) цитозин.

Способ А: (+)-цис и (+)-транс-2-бензоилоксиметил-5-(N₄-этилцитозин-1-ил)-1,3-оксатиолан получают и разделяют на (+)-цис- и (+)-транс-изомеры как описано в EP 0382526. N₄-ацетил и 2-бензоил удаляют диметиламином в этаноле и продукт, (+)-цис-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил) цитозин, выделяют.

Способ Б: (+)-цис- и (+)-транс-2-бензоилоксиметил-5-(урацил-1-ил)-1,3-оксатиолан и получают как описано в EP 0382526. После удаления защиты 2-гидроксигруппы насыщенным раствором аммиака в метаноле изомеры разделяют на силиканеле с применением смеси этилацетат/метанол в качестве элюента (EP 0382526). (+)-цис-Изомер вводят в реакцию с уксусным ангидридом в пиридине при комнатной температуре с образованием 2-ацетата. Растворитель удаляют в вакууме при < 30°C. 2-Ацетат затем растворяют в CHCl_3 и промывают водным бикарбонатом натрия. Отделенный органический слой высушивают и CHCl_3 выпаривают в вакууме. Превращение урацильного основания в цитозиновое основание выполняют через стадию получения 4-(1,2,4-триазол-1-ил)льного производного по методу К.В.Риса, J. Chem. Soc. PerkinsI, 1171 (1984) и В.Л.Санга, Nucleic Acids Res 9, 6139 (1981), используя 1,2,4-триазол и 2 эквивалента 4-хлорфенилди-хлорфосфата в сухом пиридине при комнатной температуре. 2-Ацетат гидролизуют насыщенным раствором аммиака в метаноле при 0°C и получают (+)-цис-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)цитозин.

Пример 2. 1-(2-Гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил) -5-метил-цитозин.

(±)-цис и (±)-транс-2-бензоилоксиметил-5-(тимин-N-ил)-1,3-оксатиолан получают и разделяют на (±)-цис- и (±)-транс-изомеры как описано в EP 0382526. (+)-цис-изомер вводят в реакцию с уксусным ангидридом в пиридине при комнатной температуре с образованием 2-ацетата. Растворитель удаляют в вакууме при < 30°C. 2-Ацетат растворяют в CHCl_3 , промывают водным бикарбонатом, отделенный органический слой сушат в CHCl_3 удаляют в вакууме. Превращение тиминового основания в 5-метилцитозинового основание выполняют через стадию получения 4-(1,2,4-триазол-1-ил)льного производного по методу К.В.Риса и В.Л.Санга (см. ссылки в предыдущей методике), используя 1,2,4-триазол и 2 эквивалента 4-хлорфенилди-хлорфосфата в сухом пиридине при комнатной температуре. Гидролиз 2-ацетата выполняют насыщенным раствором аммиака в метаноле при 0°C и получают (±)-цис-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-5-метилцитозин.

Фармацевтические препараты.

В последующих примерах препаратов "активный компонент" - это 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-цитозин.

Пример 3. Таблетированные препараты.

Следующие препараты А, В и С получают мокрым гранулированием компонентов с раствором повидона, последующим добавлением стеарата магния и прессованием (см. табл. 1).

Следующие препараты D и E получают прямым прессованием смеси компонентов. Лактоза в препарате E - это лактоза типа прямого прессования (Дэйри Крэст - "Зепа-рокс").

Препарат D	мг/таблетка
Активный компонент	250
Предварительно желатинизированный крахмал	150
Всего	400
Препарат E	мг/таблетка
Активный компонент	250
Лактоза	150
Ависель	100
Всего	500

Препарат F (Препарат с контролируемым выделением активного компонента).

Препарат получают мокрым гранулированием компонентов (ниже) с раствором повидона, последующим добавлением стеарата магния и прессованием.

Препарат F	мг/таблетка
(a) Активный компонент	500
(b) Гидроксипропилметил-целлюлоза	112
(c) Лактоза	53
(d) Повидон	28
(e) Стеарат магния	7
Всего	700

Выделение активного компонента происходит в течение 6 - 8 ч и завершается после 12 ч.

Пример 4. Капсулированные препараты.

Препарат А

Капсулированный препарат получают смешиванием компонентов препарата D в примере 3 и заполнением смесью твердой желатиновой капсулы из двух частей. Препарат В получают подобным образом.

Препарат В	мг/капсула
(а) Активный компонент	250
(b) Лактоза	143
(с) Натрий крахмалгликолат	25
(d) Стеарат магния	2
Всего	420
Препарат С	мг/капсула
(а) Активный компонент	250
(b) Макрогол 4000	350
	600
Препарат	мг/капсула
Активный компонент	250
Лецитин	100
Арахисовое масло	100
Всего	450

Капсулы препарата D получают диспергированием активного компонента в лецитине и арахисовом масле и заполнением дисперсией мягких, эластичных желатиновых капсул.

Препарат Е (капсулы с контролируемым выделением активного компонента).

Следующие капсулированные препараты с контролируемым выделением активного компонента получают экструдированием компонентов а, b и с, последующей сфероидизацией экструдата и сушкой. Высушенные гранулы покрывают мембраной d, регулирующей выделение активного компонента, и помещают в твердые желатиновые капсулы из двух частей.

Препарат Е	мг/капсула
(а) Активный компонент	250
(b) Микrokристаллическая целлюлоза	125
(с) Лактоза	125
(d) Этилцеллюлоза	13
Всего	513

Пример 5. Инъекционные препараты.

Препарат А.	
Активный компонент	0,200 г
Раствор хлористоводородной кислоты	0,1 М
Раствор гидроксида натрия 0,1 М	Сколько понадобится до рН 4,0 -7,0
Стерильная вода	Сколько понадобится до 10 мл

Активный компонент растворяют в воде (35 - 40°C) и устанавливают рН 4,0 - 7,0 соляной кислотой или гидроксидом натрия. Раствор разбавляют водой и фильтруют через стерильный микропористый фильтр в 10 мл стеклянный сосуд (тип 1) и закрывают стерильной пробкой и дополнительным запирающим устройством.

Препарат В	
Активный компонент	0,125
Стерильный, апиrogenный фосфатный буфер с рН 7	Сколько понадобится до 25 мл

Пример 6. Внутримышечная инъекция.

Активный компонент	0,25 г
Бензиловый спирт	0,10 г
Гликофурол 75	1,45 г

Бензиловый спирт	Сколько понадобится до 3,00 мл
------------------	--------------------------------

Активный компонент растворяют в гликофуроле. Добавляют бензиловый спирт, затем воду до 3 мл. Смесь затем фильтруют через стерильный микропористый фильтр и закрывают в стерильных 3 мл стеклянных сосудах (тип 1).

Пример 7. Сироп.

Активный компонент	0,25 г
Раствор сорбита	1,50 г
Глицерин	2,00 г
Бензоат натрия	0,005 г
Корригент, Персин	
17.42.316 9	Сколько понадобится до 5,00 мл

Активный компонент растворяют в смеси глицерина и очищенной воды. К раствору добавляют бензоат натрия, затем раствор сорбита и наконец вкусовое вещество. Добавляют очищающую воду и хорошо перемешивают.

Пример 8

Суппозиторий	мг/суппозиторий
Активный компонент	250
Твердые жиры (Вайтэпсол Н 15-Динамит Нобель)	1770
Всего	2020

Одну пятую часть Вайтэпсола Н15 расплавляют в обогреваемом паром чане при $\leq 45^\circ$. Активный компонент просеивают через сито 200 меш и добавляют к расплавленной основе при перемешивании до достижения однородной дисперсии. Поддерживая температуру 45°C , к суспензии добавляют оставшийся Вайтэпсол Н15 и перемешивают до получения гомогенной смеси. Всю суспензию пропускают через сито 250 меш из нержавеющей стали, и, при непрерывном перемешивании, дают охладиться до 40°C . При температуре $38 - 40^\circ\text{C}$ 2,02 г смеси заливают в 2 мл пластмассовые формы и дают суппозиториям охладиться до комнатной температуры.

Пример 9

Пессарии	мг/пессарий
Активный компонент	250
Безводная декстроза	380
Картофельный крахмал	363
Стеарат магния	7
Всего	1000

Пример 10. Антивирусная активность против вируса гепатита В (ВГВ).

Соединения 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-цитозин и 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-5-метилцитозин испытывались как описано ниже.

Клеточная линия HepG₂ 2.2.15, проводящая ВГВ человека, описанная и охарактеризованная Селом и др., PNAS 84, 1005 (1987) и J. Virol 62, 2836 (1988), как было показано, обладает многими характеристиками гепатоцита, хронически инфицированного ВГВ.

Эта клеточная линия была использована in vitro для обнаружения соединений с анти-ВГВ активностью.

При испытании соединений на антивирусную активность монослойные культуры обрабатывали соединением с концентрацией 50 - 200 мкМ в

течение 10 дней. Надосадочную среду, содержащую внеклеточный вирион ДНК (частицы Дэйна), собирали на третий, шестой и десятый дни, обрабатывали протеиназом К (1 мг/мл) и додецилсульфатом натрия (1%) и культивировали при 50°C 1 ч. ДНК экстрагировали равными объемами фенола, затем хлороформом и осаждали ацетатом аммония и пропанолом. Осадок ДНК растворяли и собирали на нитроцеллюлозе по способу Шляйхера и Шуэля (S & S, 10 Optical Ave., Keene, NH 03431, Публикация N 700, 1987), затем обрабатывали как описано Саузерном, J. Mol. Biol., 98, 503 (1975). Клетки собирали и получали внутриклеточную ДНК после лизиса клеток гуанидизотиоциатом. Внутриклеточную ДНК обрабатывали также как и внеклеточную ДНК. После осаждения ацетатом аммония и пропанолом, осадок внутриклеточной ДНК растворяли, разрезали рестрикционной эндонуклеазой Hind III, наносили на гель агарозы и затем обрабатывали как описано Саузерном для определения количества репликационных промежуточных форм. Анти-вирусный эффект соединения определяли, регистрируя по меньшей мере 100-кратное уменьшение количества частиц Дэйна, выпесненных в культуральную среду, и подобное же уменьшение внутриклеточных репликационных интермедиатов.

Результаты приведены в табл. 2.

Влияние 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)цитозина (соединение А) и 1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил) 5-метилцитозина (соединение В) на выработку ВГВ в клеточных культурах 2.2.15.

Исследование действия (-)-цис-1-(2-(2-гидроксиметил)-1,3-оксатиолан-5-ил) цитозина (ламивудина) против хронического гепатита В.

В двойном-слепом испытании рандомизировали 32 пациента с хроническим гепатитом В для получения ими оральных доз в 25, 100 или 300 мг в день в течение 12 недель и наблюдения в течение следующих 24 недель для оценки отделенных последствий. Подходящие для проведения испытания пациенты должны иметь поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) в сыворотке в течение > 6 месяцев, HBV DNA 10 пг/мл (Abbot

assay), антиген вируса гепатита В (HBeAg) в течение > 3 мес и ALT < 300 ед/д; 17 пациентов (53%) в прошлом не реагировали на интерферон (IFN), а 15 - никогда ранее не подвергались противовирусному лечению (см. табл. 3)

У всех пациентов HBV DNA снижался (включая пациентов с HBV DNA 200 пг/мл или с нормальной ALT) и становился невыявляемым в соотношениях, указанных в таблице. После прекращения лечения HBV DNA обнаруживали снова у большинства пациентов, однако у 5 из 32 (16%) возврата к HBV DNA не наблюдалось (ALT возвращалась к норме у всех пациентов), а 3 из 32 (9%) теряли HBe Ag, включая 2 пациентов, устойчивых к интерферону. Более чем 2-кратное повышение ALT встречалось (в период уменьшения HBV DNA у 8 из 11) у 50%, 36% и 18% пациентов, которые получали соответственно по 25, 100 и 300 мг. Были выявлены только незначительные, но не серьезные, независимые от доз, неспецифичные отрицательные результаты. У одного пациента из группы, получавшей по 25 мг, наблюдалось увеличение ALT от 198 при базовом значении до 548 на 4 неделе и повышение амилазы от 71 до 156 на 10 неделе. На 6 неделе лечение прекращали; биопсия печени показала стеатоз, неотличимый от стеатоза, который был обнаружен при биопсии до лечения. Не обнаружено молочного ацидоза и анионных разрывов. Временные, бессимптомные повышения амилазы наблюдались у 2 пациентов, а повышения СРК встречалось у 4 пациентов во время лечения и у 2 после лечения. Был сделан вывод, что 3-месячное лечение ламивудином является хорошо переносимым, а при дозах ≥ 100 мг/день дает 100%-ное подавление HBV DNA включая пациентов, устойчивых к интерферону. Даже при отсутствии известных иммуномодуляторных эффектов, повышение АТ, обусловленное лечением, встречалось у трети пациентов. Благодаря своей толерантности и наличия доказанных эффектов у части пациентов, которых лечили в течение 3 мес, Ламивудин заслуживает проведения 3-го этапа испытаний на большем контингенте в течение более 3 мес.

Таблица 1

Препарат А	мг/таблетка	мг/таблетка
(a) Активный компонент	250	250
(b) Лактоза	210	26
(c) Повидон	15	9
(d) Натрий крахмалгликолат	20	1
(e) Стеарат магния	5	2
	500	300
Препарат В	мг/таблетка	мг/таблетка
(a) Активный компонент	250	250
(b) Лактоза	150	-
(c) Ависель РН 101	60	26
(d) Повидон	15	9
(e) Натрий крахмалгликолат	20	12
(f) Стеарат магния	5	3
	500	300

Таблица 2

Внутриклеточная ДНК ВГВ (пг/мкг клеточной ДНК)

Испытываемое соединение (мкМ)	Объединенная	Мономерная	Репликационный интермедиат	ДНК ВГВ в культуральной среде (пг/мл)			
				день 0	день 3	день 6	день 10
А. Необработанные клетки	1,1	2,2	88	88	29	46	110
	1,1	2,0	67	67	32	52	51
	25(A)	1,0	1	50	10	1	0
	1,0	0,4	0,3	65	28	3	0
	25(B)	1,1	3	76	12	0	0
	1,3	0,0	1	68	8	0	0
2. Необработанные клетки	1,0	2,1	92	71	33	120	150
	1,0	1,8	63	64	130	43	120
	25(A)	1,2	1	150	36	10	0
	1,1	0,7	1	120	64	6	0
	25(B)	1,0	1	46	41	13	0
	1,0	1,1	2	58	42	24	1

* Анализ внутриклеточной ДНК ВГВ (частиц Дэйна) был сделан в 24 ч следующие за 10-м днем обработки.

± "Нуль" указывает на необнаруживаемый уровень ДНК ВГВ, порог чувствительности был 0,1 пг/мл.

Таблица 3

(Среднее значение ± среднеквадратическая ошибка)

Группа по дозам (n)	25мг (I0)	100мг (II)	300мг (II)
Базовая ALT	95±15	127±18	104±13
Базовая ДНК	261±92	136±27	185±48
ДНК, 12 недель	9,6±5,0	1,1±0,2	3,2±1,9
Потери ДНК	70%	100%	100%(p=0,005)
Время до ДНК-отриц. в 50%	8 недель	4 недели	2 недели
>2-кратное повышение ALT	50%	36%	18%

Тираж 50 экз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»

Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03

