



Республика Таджикистан

(19)TJ (11)249

(51) 6 A61K 31/505, 31/70

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО
(12) **Описание изобретения**
К ПАТЕНТУ

(21) 94000150

(22) 03.01.92

(31) 9100039.8, 9109913.5

(32) 03.01.91, 07.05.91

(33) GB, GB

(46) 23.12.99, Бюл.4 (16)

(86) PCT/CA 92/00001, 03.01.92

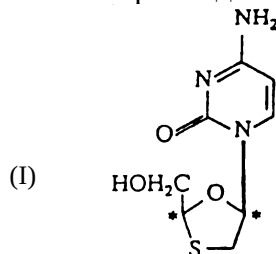
(72) Бернар Белло (СА) Нге Нгуен-Ба (СА)

(71)(73) Биокем Фарма Инк. (СА)

(56) EP 0382526, кл. А 61 К 31/505, 1990

(54) НУКЛЕОЗИДНЫЕ АНАЛОГИ 1,3-ОКСАТИОЛАНА, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Описывается применение соединения по формуле (I) или его фармацевтически приемлемой производной для изготовления лекарства для лечения вирусного гепатита В.



Настоящее изобретение относится к применению нуклеозидных аналогов при лечении вирусных инфекций. В частности, оно касается применения нуклеозидных аналогов 1,3-оксатиолана при лечении гепатита, в частности, гепатита В.

Гепатит В представляет собой вирусное заболевание, передаваемое орально или парентерально через зараженный материал, такой как кровь и кровепродукты, грязные иглы, половым путем и вертикально, от инфицированных или вирусоносительных матерей к плоду. В тех регионах мира, где это заболевание является обычным, вертикальное заражение на ранних стадиях определяет большую долю инфицированных лиц, становящихся хроническими носителями гепатита В. Во всем мире количество носителей гепатита В оценивается в 280,000,000 человек. В настоящее время отсутствуют эффективные химиотерапевтические средства лечения инфекционного гепатита В.

Описано, что некоторые нуклеозидные производные противодействуют вирусу гепатита В.

ЕРА 0206497 описывает некоторые 2', 3'-дидеокси пуриновые и пиримидиновые нуклеозиды, обладающие антивирусным действием, включая противодействие вирусу гепатита В.

ЕРА 0302760 описывает применение 2', 3'-дидеокси пуриновых нуклеозидов для лече-

ния инфекционного гепатита В.

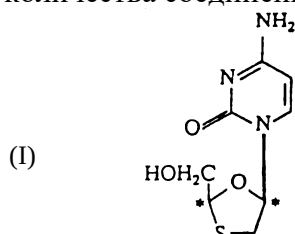
WO 90/14079 описывает лечение гепатита В путем назначения 2', 3'-дидеоксицитидина.

WO 90/14091 описывает лечение гепатита В путем назначения 2', 3'-дидеоксигуанозина, 2', 3'-дидеокси аденозина или 2', 3'-дидеоксиинозина.

В публикации европейской заявки на патент № 0 382 526 описывается ряд нуклеозидных аналогов 1,3-оксатиолана, проявляющих антивирусное действие, в частности, действие против HIV-возбудителя СПИДа.

В публикации РСТ заявки на патент № 91/17159 описывается соединение (2R, cis)-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-ил)-(1H)-пиримидин-2-он (известное также как ЗТС) и его применение при лечении HIV инфекций. ЗТС представляет собой (-)-энантиомер одного из соединений (ВСН-189), описанных в ЕРА 0382526. В настоящее время мы обнаружили, что ВСН-189 и его отдельные энантиомеры, включая ЗТС, противодействуют вирусу гепатита В как в условиях *in vitro* (в лабораторных условиях), так и в условиях *in vivo* (в живом организме).

Таким образом, изобретение прежде всего касается способа лечения животных, включая человека, инфицированных или чувствительных к заражению вирусом гепатита В, состоящего в назначении эффективного количества соединения по формуле (I)

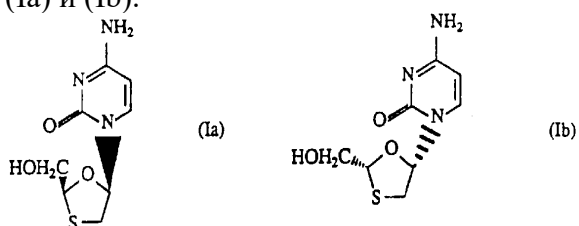


или его фармацевтически приемлемой производной.

Изобретение относится также к применению соединения по формуле (I), приведенной выше, или его фармацевтически приемлемой производной для изготовления лекарственного средства для лечения гепатита В.

Как заявляют специалисты, перечисленные в тексте, лечение распространяется на профилактику, а также на лечение выявленных инфекций или симптомов.

Как утверждают специалисты, соединение по формуле (I) представляет собой *cis* - соединение и содержит два хиральных центра (см. в формуле (I) знак *). Таким образом, соединение существует в виде двух энантиомеров, соответствующих соединениям по формуле (Ia) и (Ib).



Соединение по формуле (I) носит химическое название *cis*-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил) (1H)-пиримидин-2-он. Оно известно под названием ВСН-189. (-)-энантиомер имеет химическое название (-)-*cis*-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он и абсолютно совпадает по стереохимии с соединением по формуле (Ib), которое называется (2R, *cis*)-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он. Оно называется также ЗТС.

Рекомендуется, если используется (-)-энантиомер, чтобы он был существенно свободен от соответствующего (+) энантиомера, что означает присутствие (+)-энантиомера в количестве не выше примерно 5 масс. %, предпочтительно, не более примерно 2 масс. %, в частности, менее примерно 1 масс. %.

Термин “фармацевтически приемлемая производная” означает любую фармацевтически приемлемую соль, эфир или соль этого эфира, соединения по формуле (I) или любое другое соединение, которое при его назначении пациенту, позволяет получить (прямо или косвенно)

соединение по формуле (I) или антивирусно действующий метаболит или его радикал.

Специалистам известно, что соединения по формуле (I) могут модифицироваться в функциональных группах как на щелочном участке, так и на гидроксиметиловой группе оксатиолоанового кольца, давая в результате фармацевтически приемлемые производные. Модификация всех таких функциональных групп охватывается настоящим изобретением. Однако особый интерес представляют фармацевтически приемлемые производные (например, эфиры), получаемые модификацией 2-гидроксиметиловой группы оксатиолоанового кольца.

Рекомендуемые эфиры соединений по формуле (I) включают соединения, в которых ОН

замещена карбоксильной группой $\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}$, в которой

не-карбонильный участок R эфирной группы выбирается из водорода, алкила с прямой или разветвленной цепочкой (например, метила, этила, n-пропила, t-бутила, n-бутила), алкоксиалкила (например, метоксиметила), аралкила (например, бензила), арилоксиалкила (например, феноксиметила), арила (например, фенила, вариантно замещенного галогеном, C₁₋₄ алкилом или C₁₋₄ алкокси); замещенного дигидро пиридинила (например, N-метилдигидро пиридинила); эфиров сульфокислоты, таких как алкил- или аралкилсульфонил (например, метансульфонил); эфиров серной кислоты, эфиров аминокислот (например, L-валила или L-изолейцила) или эфиров моно-, ди- или три-фосфорных кислот.

Кроме того, в группу указанных эфиров попадают эфиры, получаемые из полифункциональных кислот, таких как карбоновые кислоты, содержащие больше одной карбоксильной группы, например, дикарбоновые кислоты HO₂C(CH₂)_nCO₂, где n - целое число от 1 до 10 (например, янтарная кислота, или фосфорные кислоты). Способы получения подобных эфиров широко известны. См. например, Hahn et al., "Nucleotide Dimmers as Anti Human Immunodeficiency Virus Agents", Nucleotide Analogues, pp. 156-159 (1989) and Busso et al., "Nucleotide Dimers Suppress HVI Expression in Vitro" AIDS Research and Human Retroviruses, 4(6), pp.449-455 (1988).

В отношении вышеописанных эфиров, если не предусматривается иного, то любой имеющийся алкильный участок должен преимущественно содержать от 1 до 16 атомов углерода, в частности, от 1 до 4 атомов углерода, и может содержать одну или больше двойных связей. Любой арильный участок, присутствующий в таких эфирах, предпочтительно содержит фенильную группу.

В частности, эфиры могут соответствовать C₁₋₁₆ алкильному эфиру, незамещенному эфиру бензойной кислоты или эфиру бензойной кислоты, с одним, по крайней мере, замещенным галогеном (бромом, хлором, фтором или иодом), C₁₋₆ алкилу, насыщенным или ненасыщенным C₁₋₆-алокси-, нитро- или трифторметил-группам.

Фармацевтически приемлемые соли соединений по формуле (I) включают соли, получаемые из фармацевтически приемлемых неорганических и органических кислот и оснований. Примерами подходящих кислот могут служить соляная, бромистоводородная, серная, азотная, перхлорная, фумаровая, малеиновая, фосфорная, гликолевая, молочная, салициловая, янтарная, толуол-p-сульфоновая, виннокаменная, уксусная, лимонная, метансульфоновая, муравьиная, бензойная, малоновая, нафталин-2-сульфоновая и бензинсульфоновая кислоты. Другие кислоты, такие как щавелевая, хотя и не является сама по себе фармацевтически приемлемой, может быть использована для получения солей, применяемых в качестве промежуточных продуктов для получения соединений по изобретению и их фармацевтически приемлемых кислых дополнительных солей.

Соли, полученные из соответствующих оснований, включают щелочной металл (напр., натрий), щелочноземельный металл (напр., магний), аммоний и соли NR₄⁺ (где R - является C₁₋₄ алкилом).

Нижеприведенные ссылки в отношении соединений по настоящему изобретению касаются как соединения по формуле (I), так и его фармацевтически приемлемых производных.

Соединение по формуле (I) и его собственные энантимеры могут быть получены любым способом, известным специалистам по получению соединений с аналогичной структурой,

например, способами, описанными в ЕРА 0 382 526 или WO 91/17159, на которые есть ссылки в данном описании.

Как оказалось, соединение по формуле (I), как в виде рацемической смеси, так и в виде собственных энантиомеров, подавляет вирус гепатита В и в условиях *in vitro*, и в условиях *in vivo*.

Замечательно то, что количество соединения по изобретению, требуемое при лечении, может меняться не только в зависимости от типа выбранного соединения, но и от схемы назначения, условий, при которых проводится лечение, и возраста и состояния пациента, и, в конечном счете, остается на усмотрение лечащего врача или ветеринара. Однако, в общем случае подходящей дозой будет примерно от 0.1 до 750 мг/кг веса тела в день, предпочтительно, от 0.5 до 60 мг/кг/день, при наиболее предпочтительном назначении от 1 до 20 мг/кг/день.

Требуемую дозу удобно представлять в однократной дозировке или делить назначение на удобные интервалы, например, на два, три, четыре или более раз в день.

Соединение удобно назначать в форме единой дозы, содержащей от 10 до 1500 мг, удобно от 20 до 1000 мг, предпочтительнее всего - от 50 до 700 мг активного ингредиента на одну дозу.

В идеале, активный ингредиент должен назначаться таким образом, чтобы пиковая концентрация в плазме активного соединения составляла примерно от 1 до 75 μM , предпочтительно, примерно от 2 до 50 μM , а наиболее предпочтительно, примерно от 3 до 30 μM . Этого можно достичь, например, путем внутривенной инъекции 0.1 - 5%-ного раствора активного ингредиента, можно на физрастворе, или орально, в виде капсулы, содержащей примерно 1 - 100 мг активного ингредиента. Желаемый уровень в крови может поддерживаться непрерывным вливанием, обеспечивающим примерно 0.01 - 5.0 мг/кг/час или путем отдельно проводимых вливаний, содержащих примерно 0.4 - 15 мг/кг активного ингредиента.

Хотя допускается, чтобы при терапевтическом лечении соединение по изобретению могло назначаться в виде чистого химического сырья, все же предпочтительно, чтобы активный ингредиент имел вид фармацевтического состава.

Фармацевтический состав должен включать соединение по формуле (I), или его приемлемую фармацевтическую производную, вместе с одним или больше применяемых в фармацевтике носителем и, по желанию, с другими терапевтическими и/или профилактическими ингредиентами. Носитель(и) должны быть "приемлемыми" в смысле их совместимости с другими ингредиентами состава, не ухудшая состояния реципиента.

Фармацевтические составы включают составы, подходящие для орального, ректального, назального, вагинального или парентерального (включая, внутримышечное, подкожное и внутривенное) назначения или в форме, соответствующей назначению через ингаляцию или инсуффляцию. Составы можно, если это допустимо, представить в дискретной дозировке и изготавливать любыми способами, известными специалисту-фармацевту. Все способы включают этап смешивания активного соединения с жидкими носителями или тонкое размельчение твердых носителей или оба этих этапа, с последующим, если это необходимо, формованием продукта в виде требуемого лекарственного средства.

Фармацевтические составы, подходящие для орального назначения удобно выполнять в виде дискретных единиц, таких как капсулы, крахмальные облатки или таблетки, каждая из которых содержит предусмотренное количество активного ингредиента; в виде порошков или гранул; в виде раствора, суспензии или эмульсии. Активный ингредиент можно выполнить также в виде болюса, электуария или мази. Таблетки и капсулы для орального назначения могут содержать обычные наполнители, такие как связующие вещества, наполнители, смазывающие вещества, дезинтеграторы или смачивающие вещества. Таблетки можно покрывать оболочкой по обычной технологии. Жидкие оральные препараты могут иметь форму, например, водных или масляных суспензий, растворов, эмульсий, сиропов или эликсиров, или же могут представлять собой сухое вещество, подлежащее перед принятием растворению в воде или другом подходящем носителе. Такие жидкие препараты могут содержать

обычные добавки, такие как суспендирующие вещества, эмульгирующие вещества, неводные носители (которые могут включать съедобные масла) или консерванты.

Соединения по настоящему изобретению могут также приготавливаться для парентерального назначения (напр., для инъекций, таких как болюсные инъекции или непрерывные вливания) и могут быть представлены в единичной дозировке в форме ампул, предварительно наполненных шприцов или емкостей для вливаний малого объема или многоразовых, куда добавлены консерванты. Составы могут быть представлены в виде суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных носителях и могут содержать формирующие вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В другом случае, активный ингредиент может быть в форме порошка, получаемого путем асептического выделения стерильного твердого материала или путем лиофилизации из раствора, с закреплением перед употреблением соответствующим носителем, напр., стерильной, свободной от пирогена, водой.

Фармацевтические составы, подходящие для ректального назначения, в которых носителем является твердое вещество, предпочтительнее всего представлять в виде суппозиториев одноразового применения. Соответствующие носители включают масло какао и другие вещества, известные специалистам, а также суппозитории удобно приготавливать путем смешивания активного компонента с размягчающим или расплавляющим носителем (носителями) с последующим охлаждением и формованием.

Составы, пригодные для вагинального назначения, могут быть представлены в виде пессариев (вагинальных суппозиториев), тампонов, мазей, кремов, вспенивающихся или разбрызгивающихся масс, содержащих, кроме активного ингредиента, подходящие носители, известные специалистам в этой области.

Для интра-назального (в нос) назначения соединения по настоящему изобретению могут применяться в виде жидкого разбрызгивателя или дисперсного порошка или в форме капель.

Капли могут приготавливаться на водной или не-водной основе, включая, кроме того, в свой состав одно или больше диспергирующих веществ, растворяющие вещества или суспендирующие вещества. Жидкие разбрызгиватели удобно поставлять в упаковке под давлением.

Для ингаляционных назначений соединения по настоящему изобретению удобно поставлять в виде инсуффляторов (вдуватель порошка), распылителей или упакованными под давлением или другими удобными средствами аэрозольного типа. Упаковки под давлением могут включать подходящий движитель, такой как дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, двуокись углерода или другие подходящие газы. Для аэрозоля, упакованного под давлением, однократную дозу можно выделить путем соответствующей градуировки баллончика.

В другом случае, для ингаляционного или инсуффляторного назначения соединение по настоящему изобретению может иметь форму сухой порошкообразной смеси, например, порошкообразной смеси из данного соединения и подходящего порошка-основы, такого как лактоза или крахмал. Порошкообразный состав может быть выполнен в однократной дозировке, например, в виде капсул или гильз или, напр., иметь желатиновую или пластыреобразную упаковку, из которой порошок можно принимать с помощью ингалятора или инсуффлятора.

При желании вышеописанные составы видоизменяются таким образом, чтобы можно было использовать высвобождаемый из них активный ингредиент.

Фармацевтические составы для применения по настоящему изобретению могут содержать также и другие активные ингредиенты, такие как антимикробные вещества или консерванты.

Подходящие составы для применения по изобретению описаны, например, в ЕРА 0382526 и WO 91/17159.

Соединения по изобретению можно использовать также в сочетании с другими терапевтическими средствами, например, с другими противомикробными средствами. В частно-

сти, соединения по изобретению можно применять вместе с известными антивирусными средствами.

Вышеуказанные сочетания удобно применять в форме фармацевтического состава и, таким образом, фармацевтические составы, содержащие вышеуказанное сочетание и фармацевтически приемлемый носитель, являются следующим аспектом настоящего изобретения.

Отдельные компоненты таких сочетаний могут назначаться либо поочередно, либо одновременно, в виде отдельных или сложных фармацевтических составов.

Когда соединение по формуле (I) или его фармацевтически приемлемое производное применяются в сочетании со вторым терапевтическим средством, действующим против того же самого вируса, доза каждого соединения может быть либо одинаковой, либо отличаться от той, когда это соединение используется само по себе. Соответствующие дозировки хорошо известны специалистам.

Изобретение иллюстрируется нижеприведенными примерами, которые нельзя толковать как ограничивающие область изобретения.

Пример 1

Биологическое действие

(А) Новорожденных утят заражали DHBV. Через 5-7 дней после заражения у утят брали пробы крови и исследовали ДНК на DBHV, способом точечной гидридизации с помощью специального ДНК зонда (Mason et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3997-4001 (1982)). У утят с положительной реакцией на точки-окрашивание удалялась печень и использовалась затем для получения первичных гепатоцитных культур, зараженных вышеупомянутым DBHV (Tuttleman et al., J. of Virology, 58, 17-25). Через два дня нахождения в культуре к культурной среде добавлялись антивирусные средства. Среда менялась каждые 2 дня и через определенные промежутки времени клетки забирались и выделялась вся ДНК.

ДНК наносилась на нитроцеллюлозную бумагу и исследовалась зондом, несущим ДНК DHBV, меченую радиоактивным изотопом ^{32}P , в соответствии с описанной далее процедурой. ДНК, взятая из гепатоцитов, зараженных DHBV, выделялась и наносилась на нитроцеллюлозный фильтр. Использовался вышеупомянутый зонд, наконечник которого переносил ДНК DHBV, меченую ^{32}P (pDH-010= DHBV). ДНК извлекалась из 6 см-овых лотков с клеточной культурой через различные промежутки времени после высеваания. В группе VC клетки собирались на 2,6,8,10,14,18 и 20 день. Дублирующие образцы окрашивались для 14,18 и 20-дневных образцов. В группах, где применялись лекарственные средства, клетки собирались на 14,18 и 20 день. Лекарственные средства добавлялись к культуре на 2-ой день после высеваания, и среда постоянно целиком заменялась каждые 2 дня. Вся внутриклеточная ДНК извлекалась из клеток стандартным методом фенольной экстракции. Клетки в 6 см-овой чашке Петри (приблизительно, 5 x 10 клеток) лизировались в лизисном буфере, содержащем 0.2% SDS (додецил сульфат натрия), 150 mM TrisHCl pH 8.0, 10 mM EDTA (ЭДТК-этилендиаминтетрауксусная кислота) и 150 mM NaCl. Клеточный лизат сжигался с 0.5 мг/мл проназы Е (поставляемой фирмой Sigma) при 37°C в течение 2 часов и протеинизировался путем экстрагирования равным объемом фенола, насыщенного 20 mM Tris HCl, pH 7.5, 0.5 mM ЭДТК и 0.1% 8-гидроксихинолином. Концентрированный ацетат аммония (pH 7.0 (2.5 M)) добавлялся к водной фазе для получения 0.25 M раствора ацетата аммония, а нуклеиновые кислоты осаждались 2-мя объемами 100%-ного этилового спирта. Капля нуклеиновой кислоты промывалась этиловым спиртом и высушивалась. ДНК растворялась в растворе, содержащем 12.5 mM Tris HCl, pH 7.5, 10 mM ЭДТК, 30%-ный глицерин и 0.01%-ный бромфенол голубой. Одна двенадцатая часть образца ДНК намазывалась на нитроцеллюлозу для проведения точно-окрашивающего анализа.

Проверяемые лекарства оценивались по шкале от 0 (отсутствие активности) до ++++ (высокая активность).

Тестируемые соединения представляли собой *cis*-2-амино-1-(2-гидрокси-метил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-один (Соединение по формуле (I) как рацемическое, так

и в виде (-)-энантиомера) и два известных ингибитора вируса гепатита В, а именно: 2',3'-дидеокси-гуанозин (ddG) и 2,6-диаминопурин-9-β-D-2',3'-дидеоксирибофуранозид (ddDAPR) (Публикация заявки на Европейский патент № 0 302 760).

Результаты тестирования приведены, в Таблице 1.

(В) Результаты тестирования в отношении гепатита В у человека.

(i) Монослои клеток Нер G2, зараженных вирусом человеческого гепатита В приготавливали в 6-ячеистых лабораторных чашках, заполненных MEM с добавлением 380 мг/мл геницитина (GIBCO по. 860 18111J, G418 Sulfate) и 10%-ной сыворотки, взятой из икры эмбриона, и такие монослои использовались после слияния 75% или более клеток.

Концентрированные растворы лекарств приготавливались в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) при уровне концентрации 1 мг/мл. Для лекарств, неспособных растворяться до такой концентрации, либо нагревали суспензию до 42°C с добавлением этилового спирта, либо лекарство растворяли до более низкой конечной концентрации.

Концентрированные растворы лекарств разбавлялись до получения окончательных концентраций порядка 10 мг/мл в MEM (с добавками, указанными выше).

Среда с клеточных монослоев удалялась и заменялась свежеприготовленной средой, содержащей лекарства. Для каждого анализа использовались тройные ячейки по 2 мл/ячейку.

Среда удалялась и заменялась свежей, содержащей лекарства, через день, в течение 14 дней (т.е., 7 перемен лекарственных растворов).

Среда удалялась с каждой ячейки и клетки промывались 1 мл PBS. Добавлялся по 2 мл/ячейку RIPA буфер* и клетки выскребались из ячеек каучуковой палочкой. Затем клетки переносились в контрольные пробирки.

1 мл хлороформа добавлялось в каждую пробирку и смешивалось с помощью вихревой мешалки. Затем 1 мл фенола (насыщенного 20 mM Tris, 1 mM ЭДТК и 0,1%-ным гидроксидом хинолином) добавлялся в каждую пробирку, пробирки центрифугировали и удаляли 1 мл водного слоя.

Ацетат аммония добавлялся до получения 0.2 М-концентрации, после чего проводили смешивание с 2,5 объемами этилового спирта, охлажденного на льду. Смесь выдерживали при -20°C всю ночь, чтобы осадилась ДНК. ДНК гранулировали методом центрифугирования, еще раз промывали в ледяном этиловом спирте и высушивали.

Гранула (таблетка) растворялась в 200 мл буферного раствора, содержащего Tris (10 mM) ЭДТК (1 mM), в течение ночи при 4°C, и быстро (в течение 20 секунд) обрабатывали ультразвуком. 20μл каждого образца наносилось в виде точки на нейлоновую мембрану, и точка гибридизировалась HBV ДНК зондом.

* - RIPA буферный раствор: 0,15 M NaCl, 1% деоксихолат натрия, 1% тритон X-100, 0.1% додецил сульфат натрия, 0.01 M Tris HCl, pH 7.4.

Результаты показаны в Таблице 2а.

(ii) Методика, использованная в проведении этого испытания, подробно описана в Korba et al., Antiviral Research 15, 217-228, 1992, и коротко говоря, заключается в следующем.

Клетки Нер G2, зараженные геномной ДНК человеческого вируса гепатита В (клетки 2.2.15), выращивались и сохранялись в культурной среде RPMI1640, содержащей 5% сыворотку из икры эмбриона, 2 mM глутамина и 50 мг/мл сульфата гентомицина, при этом регулярно проверялись на сопротивление G418. Культуры клеток 2.2.15 выращивались до тех пор, пока не происходило слияние в 24-ячеистых чашках для выращивания тканевой культуры, и оставались в этих условиях в течение 2-3 дней до начала проведения лекарственного лечения.

Лекарства растворялись в стерильной воде или 50% диметилсульфоксиде, стерилизованном в воде, до получения концентраций в 100 раз более высоких, чем наибольшая контрольная концентрация. Эти растворы разбавлялись при необходимости в культурной среде.

Культурная среда на слитых клетках менялась за 24 часа до взятия проб на испытание. В течение 10 дней лечения культурная среда менялась ежедневно. Через 10 дней лечения культурная среда собиралась и замораживалась при -70°C, чтобы проводить HBV ДНК анализ.

Чтобы проанализировать внутриклеточную HBV ДНК, 0.2 мл образцов культурной среды инкубировалось в течение 20 минут при 26°C в 1 М NaOH/10X SSC (1X SSC представляет собой 0.15 М NaCl/0.015 М цитрата натрия, pH 7.2), а затем наносились на нитроцеллюлозные мембраны, предварительно пропитанные 20X SSC, используя приспособление для намазывания. Образцы нейтрализовались путем двукратной промывки в 0.5 мл 1 М Tris, pH 7.2/2 М NaCl и однократной - в 0.5 мл 20X SSC. Затем фильтры промывались в 2X SSC и высушивались при 80°C в вакууме, в течение часа.

Очищенный HBV ДНК фрагмент 3,2 kb EcoRI метился [³²P]dCTP путем трансляции в разрез и использовался в качестве пробы для выявления HBV ДНК в точечно-окрашивающем анализе, проводимом путем гибридизации ДНК. После промывки гибридизированный пласт высушивался, и с помощью бета-сканера Ambis оценивалось наличие ³²P.

Результаты приведены в Таблице 2b.

Таблица 1

Антивирусная активность соединений против гепатита В уток *in vitro*

Соединение	Актив- ность IC50 мг/мл
Соединение по формуле (I) рацемического типа	++++ при 10 мг/мл
(-) энантиомер	<1 мг/мл
ddG	0.07 мг/мл
ddDAPR	0.07 мг/мл

Таблица 2A

Антивирусная активность соединений против человеческого гепатита В *in vitro*

	HBV актив- ность при 10 мг/мл
Соединение по формуле (I) рацемического типа	+++
ddG	+++
ddDAPR	+

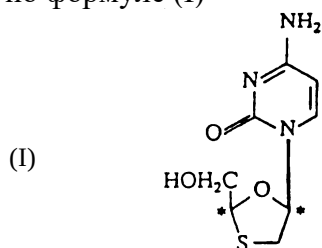
Таблица 2B

	IC50 μM
3TC	5.6
ddG	2.2
araAMP	2.9
cdG	0.034

ddG = 2',3'-дидеоксицитидин
cdG = карбоксильный дезоксигуанозин
araAMP = аденозиларабинозид-5'-монофосфат

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения по формуле (I)



или его фармацевтически приемлемой производной, **отличающееся тем, что** соединение используется для приготовления лекарства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита В.

2. Применение по п.1, **отличающееся тем**, что соединение используется для приготовления лекарства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита В, где инфекционный гепатит В представляет собой присущий человеку гепатит В.

3. Применение по п.1 или 2, где соединение формулы (I) представляет собой (±)-цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он или его фармацевтически приемлемую производную, **отличающееся тем, что** оно используется для приготовления лекарства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита В.

4. Применение по п.1 или 2, где соединение формулы (I) представляет собой (±)-цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он или его фармацевтически приемлемую соль, эфир или соль этого эфира, **отличающееся тем, что** оно используется для приготовления лекарства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита В.

5. Применение по п.1 или 2, где соединение формулы (I) представляет собой (±)-цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он, **отличающееся тем, что** оно используется для приготовления лекарства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита В.

6. Применение по п.1 или 2, где соединение формулы (I) представляет собой (-)-цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он или его фармацевтически приемлемую производную, **отличающееся тем, что** оно используется для приготовления лекарства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита В.

7. Применение по п.1 или 2, где соединение формулы (I) представляет собой (-)-цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он или его фармацевтически приемлемую соль, эфир или соль этого эфира, **отличающееся тем, что** оно используется для приготовления лекарства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита В.

8. Применение по п.1 или 2, где соединение формулы (I) представляет собой (-)-цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он, **отличающееся тем, что** оно используется для приготовления лекарства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита В.

9. Применение по любому из пп.6-8, где соединение формулы (I) существенно свободно от соответствующего (+)-энантиомера, **отличающееся тем, что** оно используется для приготовления лекарства, предназначенного для лечения инфекционного гепатита В.

10. Применение по любому из пп.1-9, **отличающееся тем, что** оно используется для приготовления лекарства, предназначенного для орального назначения.

11. Применение по любому из пп.1-9, **отличающееся тем, что** оно используется для приготовления лекарства, предназначенного для парентального назначения.

12. Применение по любому из пп.1-11, **отличающееся тем, что** оно используется для приготовления лекарства в однократной дозировке.

13. Применение по п.12, **отличающееся тем, что** оно используется для приготовления лекарства, содержащего от 10 до 1500 мг соединения.

14. Применение по п.12, **отличающееся тем, что** оно используется для приготовления лекарства, содержащего от 20 до 1000 мг соединения.

15. Применение по п.12, **отличающееся тем, что** оно используется для приготовления лекарства, содержащего от 50 до 700 мг соединения.