

2494/95

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

72490

5751

61.147/BE

KIVONAT

1-[[4-[(2,6-Diklór-fenoxi)-metil]-fenil]-metoxi]-2-klór-4-
-metoxi-benzol alkalmazása emberek enterovirális fertőzéseinek

szelektív kezelésére *gyógyszerkészítmény előállítására történő alkalmazás*

SCHERING CORPORATION, KENILWORTH, New Jersey, US

A bejelentés napja: 1994. 02. 23.

Elsőbbsége: 1993. 02. 26. (08/023,527) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/01605

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/18960

A találmány az (I)-képletű 1-[[4-[(2,6-diklór-fenoxi)-metil]-fenil]-metoxi]-2-klór-4-metoxi-benzol emberek enterovirális fertőzéseinek szelektív kezelésére és/vagy megelőzésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására történő alkalmazására vonatkozik.

A találmány magában foglalja az emberek enterovirális fertőzéseinek szelektív kezelésére és/vagy megelőzésére szolgáló gyógyszerkészítményt is, amely növényi olajban szuszpendálva az (I) képletű vegyület enterovirális fertőzéssel szemben hatásos mennyiségét, és adott esetben a vegyületnek egy gyógyszerészetiileg elfogadható vivőanyagát tartalmazza.

for. J. J. J.

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

5751

A

2494/95

61.147/BE

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

1-[[4-[(2,6-Diklór-fenoxi)-metil]-fenil]-metoxi]-2-klór-4-
-metoxi-benzol alkalmazása emberek enterovirális fertőzéseinek

szelektív kezelésére *alkalmazás* *gyógyászati készítmény*
származéka

SCHERING CORPORATION, KENILWORTH, New Jersey, US

Feltalálók:

RHOZON Edward J., EL GRANADA, CA, US

O'CONNEL John F., MONTCLAIR, NJ, US

BOUNTEMPO Peter, WESTFIELD, NJ, US

COX Stuart A., ROSELLE PARK, NJ, US

DEMARTINO Jason L., VERONA, NJ, US

WRIGHT Jacquelyn M., KENILWORTH, NJ, US

A bejelentés napja: 1994. 02. 23.

Elsőbbsége: 1993. 02. 26. (08/023,527) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/01605

A nemzetközi közzététel száma: WO 94/18960

A találmány tárgya 1-[[4-[(2,6-diklór-fenoxi)-metil]-fenil]-metoxi]-2-klór-4-metoxi-benzol alkalmazása emberek enterovirális fertőzéseinek szelektív kezelésére és/vagy megelőzésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására. A találmány magában foglalja az emberek enterovirális fertőzéseinek szelektív kezelésére és/vagy megelőzésére szolgáló gyógyszerkészítményt is.

Az enterovírusok az 1. táblázatban felsorolt, RNS-tartalmú Picorna-víruscsalád tagjai, amelyekről ismert, hogy emberekben sokféle beteséget, illetve halált okoznak. Az enterovírusokkal szemben *in vitro* és *in vivo* fejtheti ki egy hatóanyag a hatását. Ugyanakkor a klinikai felhasználás esetén egy ilyen hatóanyagnak az adott enterovírus genuson belül széles hatásspektrummal kell rendelkeznie, mivel ugyanazt a betegséget különféle, egymástól eltérő enterovírusok is okozhatják (lásd a 2. táblázatot). Jóllehet az enterovírusoknak körülbelül 70 immun-típusa ismert, a Centers for Disease Control (CDC) által a non-polio-enterovírusokról 1970 és 1983 között gyűjtött adatok azt mutatják, hogy az Amerikai Egyesült Államokban egy adott évben az izolátumok 65-89 %-át a következő 15 leggyakoribb immunológiai csoportba tartozó enterovírusok teszik ki: ECHO-vírus (ECHO) 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 24 és 30; Coxsackie-vírus A (CVA) 9; valamint Coxsackie-vírus B (CVB) 1, 2, 3, 4 és 5. A közelmúltból származó adatok azt jelzik, hogy az 1988-ban nyert összes enterovírus-izolátum 64 %-át az előbbieken felsorolt 15 leggyakoribb enterovirális immun-típus közül a következő 6 immun-típus teszi ki: ECHO 11 (18,6 %), ECHO 9 (14,1 %), CVB4 (10,6 %), CVB2 (9,2 %), ECHO 6 (6,2 %), valamint CVB5 (5,1 %).

A CDC 1991 nyarán beszámolt egy, az Amerikai Egyesült Államok keleti részén lezajlott, ECHO 30 enterovírushoz kapcsolódó aszeptikus meningitis-járványról; a betegből izolált ECHO 30 gyakorisága tizennégyszer nagyobb volt, mint a normál esetekben. Az enterovírus által okozott betegségek kezelésére és/vagy megelőzésére jelenleg még nincs kereskedelmi forgalomban lévő gyógyszer. Így érthető, hogy jelentős igény van olyan gyógyszerekre, amelyek alkalmasak az emberekben előforduló enterovírus-fertőzések kezelésére, még inkább megelőzésére.

A jelen találmány egyik tárgya (I) képletű 1-[(4-[(2,6-diklór-fenoxi)-metil]-fenil)-metoxi]-2-klór-4-metoxi-benzol felhasználása emberek enterovirális fertőzéseinek szelektív kezelésére és/vagy megelőzésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

A találmány magában foglal egy olyan, emberek enterovirális fertőzéseinek szelektív kezelésére és/vagy megelőzésére szolgáló gyógyszerkészítményt is, amely (I) képletű 1-[(4-[(2,6-diklór-fenoxi)-metil]-fenil)-metoxi]-2-klór-4-metoxi-benzol enterovírus-ellenesen hatásos mennyiségét növényi olajban szuszpendált formában tartalmazza, és amely gyógyszerkészítmény adott esetben legalább egy gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyagot tartalmaz.

A találmány részét képezi továbbá egy eljárás emberekben valamely enterovírus, például Cocksackie-vírus A és B, ECHO-vírusok, enterovírusok és Polio-vírusok által okozott enterovirális fertőzések szelektív kezelésére és/vagy megelőzésére, amely eljárás során egy ilyen kezelésre és/vagy megelőzésre rászoruló

személynek az (I) képletű 1-[(4-[(2,6-diklór-fenoxi)-metil]-fenil)-metoxi]-2-klór-4-metoxi-benzolnak vagy egy gyógyszerkészítményének enterovírus-ellenesen hatásos mennyiségét adjuk be.

Ugyancsak a találmány részét képezi továbbá egy eljárás emberekben egy enterovirális fertőzés, például enterovirális légzőszervi megbetegedések, enterovirális aszeptikus meningitis, enterovirális meningoencephalitis, agammaglobulinaemiában előforduló krónikus enterovirális fertőzések, valamint enterovírus-70 által okozott akut haemorrhagiás conjunctivitis szelektív kezelésére és/vagy megelőzésére, amely eljárás során egy ilyen kezelésre és/vagy megelőzésre rászoruló személynek az (I) képletű 1-[(4-[(2,6-diklór-fenoxi)-metil]-fenil)-metoxi]-2-klór-4-metoxi-benzol enterovírus-ellenesen hatásos mennyiségét adjuk be.

Az (I) képletű vegyület enterovirális spektrumának tanulmányozása céljából a fentiekben felsorolt 15 leggyakoribb enterovirális immuntípusba tartozó enterovírusok újonnan nyert humán izolátumait a plakk-vizsgálat alkalmazásával teszteltük az érzékenységre nézve. Régebbi laboratóriumi enterovírusterzeteket, kevésbé gyakran izolált enterovírusokat is vizsgáltunk, illetve a hepatitis A vírust is tanulmányoztuk. Az (I) képletű vegyületnek a 15 leggyakoribb enterovirális immuntípusba tartozó 154 enterovírussal szembeni vírusellenes aktivitását a 3. táblázatban mutatjuk be. Az (I) képletű vegyület a 154 enterovírus 80 %-ánál (azaz a 154-ből 123 enterovírusnál) mutatott 0,90 µg/ml (2,12 µM) vagy ennél kisebb IC₅₀ értéket (EC₈₀ =

0,90 $\mu\text{g/ml}$). Az (I) képletű vegyületnek a 154 enterovirális immuntípussal szembeni átlagos (számtani közép) IC_{50} értéke 1 $\mu\text{g/ml}$ -nél kisebb volt; két enterovirális immuntípus (ECHO 9 és ECHO 24) esetén a tesztelt izolátumok száma túlságosan alacsony volt (2 izolátum) ahhoz, hogy értékelhető IC_{50} átlagértékeket lehetett volna számítani.

A különféle, releváns sejttenyésztéseken alapuló tesztrendszerekben nyert eredmények alapján megállapítható, hogy az (I) képletű vegyület hatásos, széles spektrumú, orálisan aktív enterovírus-ellenes szer, amely jelentős aktivitást mutat az Amerikai Egyesült Államokban előforduló szimptomatikus enterovírus-fertőzések legtöbbször felelősnek tartott enterovírusokkal szemben. Az (I) képletű vegyületnek várhatóan hasonló hatása van a más országokban talált enterovirális fertőzésekkel szemben is.

A 3. táblázatban felsorolt, a 15 leggyakoribb immuntípus-hoz tartozó enterovírusokat a izolálás idején diagnosztizált enterovirális betegségek szerint kategorizáltuk. Az izolátumok nagyobb részét (71 %-át, azaz a 154-ből 110 izolátumot) aszeptikus meningitis-szel és/vagy meningoencephalitis-szel diagnosztizált betegekből izoláltuk; ennek a csoportnak az esetén az (I) képletű vegyület átlagos IC_{50} értéke 0,98 $\mu\text{g/ml}$ (2,31 μM) volt. A következő legnagyobb kategóriába a nemdiagnosztizált egyedekből izolált enterovírusok tartoztak, míg a további virális izolátumokat olyan betegekből nyertük, akiknek enterovirális betegségei nem álltak összefüggésben a központi idegrendszerrel (CNS). Az utóbbi csoportban az (I) képletű vegyület át-

lagos IC_{50} értékei az értékelhető megállapításokhoz nem elégséges számú víruson alapultak.

Az aszeptikus meningitis/meningoencephalitis 39 izolátuma kizárólag olyan betegekhez kapcsolódott, akiket aszeptikus meningitis-szel diagnosztizáltak. Ennek a 93 izolátumnak a 47 %-a (azaz a 93-ból 44 izolátum) a cerebrospinalis folyadékból nyert izolátum volt, míg a többi izolátum torokból, végbélből, székletből vagy vizeletből származott. Mivel az aszimptómás egyedek enterovírus-izolációjának gyakorisága 3 % volt ebben a vizsgálatban, azt a következtetést vontuk le, hogy az aszeptikus meningitis-szel diagnosztizált betegek nem-CNS helyeiről izolált vírusok valószínűleg a központi idegrendszeri betegségekért felelős vírust reprezentálták.

Az (I) képletű vegyület antivirális aktivitását meghatároztuk laboratóriumi enterovírustörzsekkel kevésbé gyakran izolált enterovírusokkal, valamint hepatitis A vírussal (HAV) szemben is (az utóbbi vírust a saját genusán belül osztályoztuk). Az (I) képletű vegyület átlagos IC_{50} értéke 30 enterovírussal (köztük polio 1 és polio 2 vírussal) szemben $0,97 \mu\text{g/ml}$ ($2,29 \mu\text{M}$) volt, ugyanakkor ezeknél a vírusoknál $0,8 \text{ mg/ml}$ ($1,89 \mu\text{M}$) EC_{80} értéket nyertünk. Jóllehet ezek közül a vírusok közül néhányat csak viszonylag ritkán izolálnak az Amerikai Egyesült Államokban, más országokban, különösen a trópusi országokban igen jelentősek ezek a vírusok. Például a poliomyelitis ma is az egyik legnagyobb egészségügyi problémát jelenti azokban a populációkban, amelyek nem kapnak poliovírus vakcinát. Egy másik példa az enterovírus 70 lehet, ami az akut haemorrhagiás

conjunctivitisnek a fő okozója. A polio 1, a polio 2 és az enterovírus (entero) 70 esetén az (I) képletű vegyület a következő gátlást mutatta: öt polio 1 törzsnél (köztük az utóbbi időben izolált humán izolátumoknál) az IC_{50} értékek 0,009 mg/ml és 0,04 mg/ml közé estek (0,021-0,094 μM); polio 2_{MEF1} törzsnél HeLa sejtekben az átlagos IC_{50} 0,02 $\mu g/ml$ (0,047 μM) értékű volt; míg az entero 70 négy törzse 0,1-0,4 $\mu g/ml$ (0,24-0,9 μM) tartományban volt gátolt. A leggyakoribb izolátumoktól eltérően, amelyekben az (I) képletű vegyület csak a vizsgált vírusok 2 %-ával szemben (azaz 158-ból csak 3 vírussal szemben) volt inaktív (azaz amelyekben az IC_{50} 10 $\mu g/ml$ -nél nagyobb értékű volt), az (I) képletű vegyület a vizsgált maximális koncentráció mellett a kevésbé gyakori izolátumok és a laboratóriumi törzsek 19 %-ával szemben (azaz 37-ből 7 izolátummal szemben) inaktívnak bizonyult. Ez az eredmény leginkább az (I) képletű vegyületnek a Cocksackie-vírus A izolátumaival szembeni inaktivitásából eredt. További Cocksackie-vírus A immuntípusok vizsgálata nélkül nem lehet eldönteni, hogy az (I) képletű vegyületnek az ezekkel a vírusokkal szembeni inaktivitása más, ilyen immuntípusú vírusokra is vonatkozik-e. A 15 leggyakoribb és a kevésbé gyakori enterovírus-izolátumokkal szembeni vírusellenes aktivitások, valamint a laboratóriumi enterovírustörzsekkel szembeni aktivitások alapján megállapítható, hogy az (I) képletű vegyület a klinikai gyakorlatban előforduló enterovírusok legtöbbszörrel szemben aktív.

Az (I) képletű vegyület esetén a tesztelt enterovírusokkal szembeni aktivitás meghatározásához HeLa (humán) sejteket, RD

(humán rhabdosarcoma) sejteket vagy BGMK (buffalo green monkey) sejteket alkalmaztunk. Az (I) képletű vegyületnek az egyes vírusokkal szembeni terápiás indexét ("TI") úgy számítottuk ki, hogy a CPE-alapú MTT vizsgálat alkalmazásával megmértük ezekben a sejtvonalakban az (I) képletű vegyület káros hatásait. A "terápiás index" kifejezést a jelen leírásban a citotoxicitási IC_{50} érték és az antivirális IC_{50} érték hányadosaként (citotoxicitási IC_{50} érték/antivirális IC_{50} érték) definiáljuk. A plakk-vizsgálatban mérhető aktivitást mutató 184 enterovírusból csak 8,7 % rendelkezett $TI \leq 10$ értékkel, 5,4 % esetén a $TI \geq 11$ és ≤ 25 értékű volt, míg 75,1 %-nak $TI \geq 51$ értéke volt. Ily módon tehát a tesztelt enterovírusok nagyobb részénél az (I) képletű vegyület vírusellenes hatása független az (I) képletű vegyületnek a sejtekre gyakorolt esetleges hátrányos hatásaitól, és a citotoxicitás nem járul hozzá az (I) képletű vegyület antivirális hatásához.

Amennyiben az (I) képletű vegyületet egereknek a fertőzés után 3,5 óra elteltével (+3,5 óra) kezdve 20 mg/kg/nap össz-mennyiségben (négyszer 5 mg/kg-os dózisokban) orálisan beadjuk, a vegyület mind az ECHO-vírus 4-gyel ("ECHO 4"), mind pedig a Coxsackie-vírus A9-cel ("CVA9") szemben hatásos. Az (I) képletű vegyületet az előbbi terápiás előírások alkalmazása mellett orálisan olyan egereknek beadva, amelyeket előzetesen 980 PFU (PFU: plakkformáló egység) mennyiségű ECHO 4 vírussal intracranialis úton megfertőztünk, a 21. napon az (I) képletű vegyület 75,2 % értékű görbe alatti területnek (AUC) megfelelő aktivitást mutatott.

Az (I) képletű vegyülettel a terápiás előírások alkalmazása mellett olyan egereket kezeltünk, amelyeket előzetesen 1200 PFU mennyiségű CVA 9 vírussal intracranialis úton megfertőztünk, és ebben az esetben 71,7 % értékű görbe alatti területnek (AUC) megfelelő aktivitást tapasztaltunk. Amennyiben a fertőző anyag mennyiségét 980 PFU-ról három nagyságrenddel megnöveltük 980 000 PFU-ra, az ECHO 4-gyel fertőzött egerekben az AUC aktivitás 75,2 %-ról 34,4 %-ra csökkent. Hasonlóképpen ha a fertőző anyag mennyiségét 1200 PFU-ról három nagyságrenddel megnöveltük 1 200 000 PFU-ra, a CVA 9-cel fertőzött egerekben az AUC aktivitás 71,7 %-ról 35,8 %-ra csökkent.

Egy kezelési eljárás során az egér/patkány (murine) modellben alkalmazva az (I) képletű vegyület hatásosnak bizonyult a polio-2 vírusfertőzéssel szemben is, amikor az (I) képletű vegyületet polio-2 vírussal intracranialis fertőzött egereknek a fertőzést követően 3,5, 6 és 24 óra elteltével orális úton beadtuk.

A fentiekben ismertetett terápiás eljárások során kapott eredményekhez hasonló eredményeket nyertünk az egerek oly módon végzett profilaktikus kezelése során is, amikor az (I) képletű vegyületet az ECHO 4-gyel, a CVA 9-cel és a poliovírus 2-vel végzett megfertőzés előtt 24 órával adtuk be orális úton az egereknek. Két profilaktikus kísérletben a fertőzés előtt 24 órával (-24 óra) kezdve orális úton az (I) képletű vegyület két, egyenként 30 mg/kg nagyságú adagját (60 mpk/nap) adtuk be egereknek, majd az állatokat 98 000 PFU ECHO 4-gyel, illetve 1 200 000 PFU CVA9-cel megfertőztük; az AUC aktivitás — az

előbbi sorrendnek megfelelően – 59,0 % és 50 % volt.

Az (I) képletű vegyülettel végzett kezelést 24 órával azt megelőzően (-24 óránál) kezdtük, hogy egereket 520 000 PFU poliovírus-2-vel intracranialis úton megfertőztük; amennyiben a vegyületet orális úton két részletben [BID, 2×20 mg/kg (40 mpk/nap)], három részletben [TID, $3 \times 6,7$ mg/kg (20 mpk/nap)] és négy részletben [QID, $4 \times 5,0$ mg/kg (20 pmk/nap)] adtuk be, az előbbiekhöz hasonló hatékonyságot tapasztaltunk (BID: AUC = 46,4 %; TID: AUC = 29,2 %; és QID: AUC = 37,2 %).

Az (I) képletű vegyületet kukoricaolajban 1, 5, 20 és 30 mg/kg dózisban orálisan beadtuk egereknek, patkányoknak, kutyáknak és majmoknak, majd mértük az állatokban a szérumkoncentrációkat. Az AUC-ben valamennyi állatfaj dóziszfüggő növekedést mutatott, bár az AUC nagyobb dózisnál nem növekedett. Az említett négy állatfaj közül a vadászkopókban fordult elő az (I) képletű vegyület legnagyobb szérumkoncentrációja. Az (I) képletű vegyületnek a szérum felezési ideje 4,7 óra volt az egerekben, de a magasabb rendű fajokban ennek értéke lényegesen nagyobb volt, vadászkopók esetén ennek értéke 26 óra, míg majmokban a szérum felezési idő 24 óránál nagyobb értékűnek bizonyult. A CMAX idő (azaz a TMAX) egerekben, patkányokban és kutyákban hasonló értékkel rendelkezett (2-4 óra), majmokban viszont ez az idő lényegesen hosszabb volt (8-12 óra). A kutyák esetén tapasztalt rövidebb TMAX arra utal, hogy ebben a fajban a szérumbeli 26 órás időtartam független az abszorpciótól. A kutyák esetén tapasztalt ezen farmakokinetikai eredmények alapján valószínűsíthető, hogy ha az (I) képletű vegyületet egyet-

len 10 mg/kg nagyságú dózisban orálisan beadjuk embereknek, az (I) képletű vegyület koncentrációja 24 órán keresztül eléri az antivirális koncentrációt (1 mg/ml).

Az (I) képletű vegyülettel kétételes orális kísérlet útján toxicitási vizsgálatot hajtottunk végre patkányokban és kutyákban. A kétételes orális beadást követően a patkányokban 1000 mg/kg/napnál nagyobb volt az LD₅₀ értéke, míg a kutyáknál az LD₅₀ meghaladta a 750 mg/kg/nap értéket.

Anyagok és módszerek

Az Amerikai Egyesült Államokban leggyakrabban izolált 15 immuntípust reprezentáló enterovírusokat a következő helyről kaptuk: Centers for Disease Control (CDC), Atlanta, Georgia, Amerikai Egyesült Államok. Általában mindegyik immuntípusból öt vírust kaptunk. A kevésbé gyakran izolált egyéb vírusok, valamint a rhinovírusok beszerzési forrása az American Type Culture Collection (ATCC, Rocjville, Maryland, Amerikai Egyesült Államok) volt. Az enterovírusokat és a rhinovírusokat egy megfelelő sejtvonalban, például HeLa (humán) sejtekben, BGMK (buffalo green monkey) sejtekben vagy RD (humán rhabdosarcoma) sejtekben tenyésztettük, és a kísérleti mintákat celluláris lizátumokként állítottuk elő. Az alábbiakban az (I) képletű vegyület *in vitro* és *in vivo* antivirális aktivitásának mennyiségi meghatározásához alkalmazott standard eljárásokat ismertetjük.

Előkeveréses plakk-vizsgálat

150 plakkformáló egységet (PFU; fertőző részecskét) Eagle-féle módosított minimális esszenciális közegben (Eagle's modi-

fied minimal essential medium; EMEM) 45 percen keresztül összekevertük a tesztvegyülettel (0,0001-50 mg/ml), majd a keveréket hozzáadtuk a megfelelő sejtek monorétegéhez. Az így nyert anyagot 45 percen keresztül 33 °C hőmérsékleten tartottuk, ezt követően az oltóanyagot (inokulumot) leszívattuk, a sejteket mostuk, majd a Trousdale, illetve Rueckert által ismertetett eljárásoknak megfelelően plakk-analízist végeztünk [Trousdale, M. D., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 76, 368-375 (1977); Rueckert, R. R., et al., Methods in Enzymology, 78, 315-325 (1981)]. Valamennyi koncentrációnál meghatároztuk a PFU számot, amit ezt követően a kontroll PFU százalékaként Cricket Graph[®] vagy Wingz[®] grafikus program alkalmazásával grafikusán ábrázoltunk, majd az egyedi értékeket összekötöttük. Az IC₅₀ meghatározása érdekében a PFU görbe és az 50 %-os gátlásnak megfelelő vízszintes egyenes metszéspontját egy függőleges egyenessel összekötöttük az abszcisszával. Az abszcisszán lévő, a függőleges egyenest metsző érték jelenti az IC₅₀ értékét. Az ordinátán a százalékos gátlást jelentő értékeket lineárisan vettük fel, míg az abszcisszán a tesztmolekula koncentrációját logaritmikusan ábrázoltuk.

A citopátiás hatás (CPE) előkeveréses vizsgálata

Ez a virális cytopathológián alapuló vizsgálat egy, az MTT-formazán [MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid; Sigma Chemical Co.] fényabszorpciójától függő kolorimetriás végpontmeghatározást jelent. A tesztvegyületet és a vírust 45 percen keresztül 22 °C hőmérsékleten előkevertük, majd ezt a keveréket használtuk a sejtek 96 lyukú mikroelisa

lemezeken történő fertőzésére [infekciós sokszorozás (multiply of infection; MOI) = 1,0]. A tenyészetet 45 percen keresztül 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk, a tenyésztőközeget leszívtuk, ezt követően a monoréteget foszfát-pufferelt nátrium-klorid-oldattal (PBS) mostuk, majd 1 % magzati borjúsérumot (FCS) tartalmazó EMEM-et adtunk hozzá, az inkubálást 18-24 órán keresztül folytattuk, és ezt követően az előkeveréses plakk-vizsgálatnál ismertetettek szerint elvégeztük a méréseket (a grafikus ábrázoláshoz ebben az esetben cellu[®] grafikus programot alkalmaztunk).

CPE citotoxicitási vizsgálat MTT alkalmazásával

Az 50 %-os gátlási koncentráció (IC_{50}), azaz a citotoxikus IC_{50} meghatározását a következők szerint végeztük. A 96 lyukú mikroelisa lemezeken lévő nemfertőzött sejtek monorétegeit előre meghatározott időtartamban az (I) képletű vegyülettel (0,025-50 mg/ml) kezeltük, majd a monoréteget lizáltuk és MTT-vel kezeltük. Az IC_{50} értékeket az előkeveréses plakk-vizsgálatnál ismertetettek szerint határoztuk meg.

Terápiás index

Az (I) képletű vegyületnek a tesztelt enterovírustól, valamint a teszt végrehajtása során alkalmazott sejttípustól függő terápiás indexét ("TI") két eljárás útján határoztuk meg. (i) Az antivirális IC_{50} értékét előkeveréses plakk-vizsgálattal, míg a citotoxikus IC_{50} értékét MTT vizsgálattal határoztuk meg. Az utóbbi esetben a tesztmolekula 45 percen keresztül volt jelen a leszívattással végzett eltávolítás előtt, és az MTT kezelést megelőző inkubáció időtartama megegyezett a sejtek inkub-

bálásához a plakk-vizsgálatban alkalmazott időtartammal. (ii) Az antivirális IC_{50} és a citoxikus IC_{50} értékét olyan CPE vizsgálattal határoztuk meg, amelynek során a végpontok meghatározásához MTT-t alkalmaztunk. Mivel az enterovírusok szokásosan negatív hatást gyakorolnak a celluláris metabolikus folyamatokra, és ennek eredményeként a replikációjuk során citopátiás hatást fejtenek ki, a celluláris metabolikus funkciók közvetett értékelése útján az MTT vizsgálat alkalmas egy tesztvegyület vírusellenes hatásának mennyiségi meghatározására. Az MTT vizsgálattal mérve azoknál a koncentrációknál, amelyeknél egy vírusellenes szer gátolja a vírusreplikációt, viszonylag több sejt marad életképes; ha összehasonlítást végzünk egy kevésbé hatásos vírusellenes szerrel, megállapítható, hogy az utóbbi esetben viszonylag nagyobb értékű a virális replikáció, és ebből következően gyakoribb a sejtelhalás. Az MTT vizsgálat különösen előnyös a TI meghatározására, mivel a vírust és a vírusellenes molekulát azonos körülmények között, ekvivalens végpont-metodológia szerint teszteljük.

Az állatokban mért aktivitás

Az egerekkel (és egyéb állatokkal) végzett vizsgálatokat a vonatkozó előírások [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications, 85-23)] szigorú betartásával hajtottuk végre. Hím, 16-20 gram testtömegű Harland Sprague Dawley egerek 15-25 egyedből álló csoportjait a McKinlay és Steinberg által ismerttetetteknek megfelelően intracranialis úton poliovírus 2-vel, ECHO-vírus 4-gyel és Coxsackie-vírus A9-cel fertőztük meg [McKinlay and Steinberg, Antimicrob. Agents Chemother.,

29, 30-32 (1986)]. Az (I) képletű vegyülettel történő kezelést orális szondán keresztül végeztük, amelynek során a hatóanyagot 0,3 ml kukoricaolajban adtuk be (erre a célra kukoricaolaj helyett más olajos anyagokat, például mogyoróolajat is alkalmazhatunk). Huszonegy napon keresztül naponta megfigyeltük a túlélést. Az eredményeket a statisztikai szignifikanciára nézve Chi négyzetanalízis alkalmazásával értékeltük; a védelmet akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a placebóval kezelt csoporthoz viszonyítva a valószínűség (p) értéke a vizsgálat ideje alatt legalább öt napon keresztül $p < 5$ volt.

A hatékonyság kifejezésére alkalmazhatjuk az úgynevezett görbe alatti terület aktivitást (area under the curve activity; "AUC aktivitás") is. Az AUC aktivitás értékét a következő egyenlet alapján számíthatjuk ki:

$$\text{AUC aktivitás} = \frac{(\text{kísérleti AUC}) - (\text{placebo AUC})}{(\text{maximum AUC}) - (\text{placebo AUC})} \times 100$$

Adagolási készítmény

Az olyan vizsgálatok számára, amelyekben az (I) képletű vegyületet orálisan adjuk be, egy előnyös találmány szerinti megoldás értelmében kukoricaolajos szuszpenzió formájában elkészítjük az (I) képletű vegyület 2 mg/ml koncentrációjú "törzsoldatát". A vizsgálat minden napján szükséges mennyiségű kukoricaolaj hozzáadásával ebből a törzsoldatból állítjuk elő hígítással az egerek átlagos testtömegének megfelelő dózisokat (mg/kg).

Egy másik előnyös találmány szerinti megoldás szerint az

(I) képletű vegyület megfelelő mennyiségét egy milliliter kucoricaolajban vagy mogyoróolajban szuszpendáljuk, és így egy olyan gyógyszerkészítményt állíthatunk elő, amely körülbelül 100 mg és körülbelül 1 g közötti mennyiségben tartalmazza az (I) képletű vegyületet. A találmány szerinti gyógyszerkészítmények gyógyszerészetileg elfogadható jellegzetes vivőanyagokat, például stabilizálószereket, felületaktív szerket és antioxidánsokat is tartalmazhatnak. A jellegzetes antioxidánsok közé tartozik – egyebek mellett – például a butilezett hidroxianizol ("BHA") és a butilezett hidroxitoluol ("BHT"); ezeket az anyagokat a növényi olajok megavasodásának megelőzése érdekében alkalmazzuk. Stabilizálószerként például lecitint és felületaktív anyagként például poliszorbát 60-at vagy Arlacel 186-ot (gliceril-oleát és propilénglikol keveréke; gyártó: ICI Americas, Inc., Wilmington, Delaware, Amerikai Egyesült Államok) adhatunk a készítményekhez.

Egy másik vizsgálatban, ahol az orális dózis vivőanyagaként metil-cellulózt (0,4 % metil-cellulóz, 0,9 % benzil-alkohol, 0,9 % nátrium-klorid és 0,5 % poliszorbát 80), 1 % trágantmézgát vagy 1 % lecitint alkalmaztunk, az (I) képletű vegyületet por formájában hozzáadtuk a vivőanyaghoz, a keveréket egy percen keresztül homogenizáltuk, majd az így nyert szuszpenziót orális úton adtuk be az állatoknak.

Tápanyagkészítményt állítottunk elő oly módon, hogy az (I) képletű vegyületet bekevertük 1 %-os lecitinbe, majd ezt a keveréket hozzáadtuk 2x Jello[®] cseresznye ízesítésű zselatin (vagy bármilyen zselatin) és őrölt, szitált állateledel (Puri-

na[®] egéreledel) forró oldatához. A készítményben lévő, az (I) képletű vegyület 10 mg/kg dózisához szükséges koncentrációt abból kiindulva számítottuk ki, hogy egerek egyedenként és naponként 10 gramm tápanyagkészítményt fogyasztanak el (azaz a tápanyagkészítmény minden grammjában 1 mg/kg dózisnak megfelelő hatóanyag-mennyiség volt jelen). A hatékonysági vizsgálatok során minden négy órában elkészítettük a tápanyagkészítményt, amelyet a csoportokban fellépő testtömegváltozásoknak megfelelően folyamatosan korrigáltunk. Az elfogyasztáshoz az eledelt a ketrecek aljában lévő tálcákra helyeztük.

Az (I) képletű vegyületet az alábbiakban részletezett Williamson-féle éterszintézissel állítottuk elő, annak megfelelően, ahogyan az a WO 92/22520. számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentés 15a. példájában ismertetésre került.

A. 2,5 g 50:50 tömegarányú nátrium-hidroxid/víz keverék és 50 ml N,N-dimetil-formamid elegyéhez kevertetés közben hozzáadtunk 17 g 1,4-bisz(bróm-metil)-benzolt, majd 5 g 2-klór-4-metoxi-fenolt. Az így nyert keveréket 4 órán keresztül kevertettük. A reakciókeveréket megosztottuk metilén-diklorid és víz között. A szerves fázist elkülönítettük, majd az oldószert rotációs vákuumbepárlón eltávolítottuk, amelynek eredményeként szilárd maradékot nyertünk. A maradékot szilikagél kromatográfiás oszlopon tisztítottuk, amelynek során eluensként előbb tiszta hexánt, majd tiszta metilén-dikloridot alkalmaztunk. Ennek eredményeként 8 g 4-[(2-klór-4-metoxi-fenoxi)-metil]-benzil-bromidot nyertünk.

B. 0,50 g 2,6-diklór-fenolnak 0,12 g nátrium-hidroxid és 5

ml *N,N*-dimetil-formamid keverékével készített oldatához hozzáadtuk az A. lépésben nyert termék 0,50 g-ját, majd a reakciókeveréket 4 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük. 50 ml vizet adtunk a reakciókeverékhez, majd az így képződött nyers csapadékot kiszűrtük. A kiszűrt anyagot metilén-dikloridból kristályosítottuk, és így tiszta, szilárd anyag formájában és 350 mg mennyiségben nyertük az 1-[[4-[(2,6-diklór-fenoxi)-metil]-fenil]-metoxi]-2-klór-4-metoxi-benzolt.

Az (I) képletű vegyületet bármely szokásos beadási módon beadhatjuk. Ennek során az (I) képletű vegyületet enterovirális fertőzés ellen hatásos mennyiségben alkalmazzuk. A hatóanyag dózisának nagysága függ a betegnek a kezelést végző orvos által megállapított igényétől, a kezelendő állapot súlyosságától, valamint az adott konkrét esetben alkalmazott beadási módtól. Az adott helyzetben megfelelő dózis meghatározása a szakember feladata. A kezelést a vegyület optimális dózisánál kisebb adagokkal kezdhethetjük. Ezt követően a dózis fokozatosan növelhető addig, amíg az adott körülmények között az optimális hatást elérjük. Kívánt esetben a napi összmennyiség részekre osztható, majd ezeket a részleteket a nap folyamán több alkalommal adhatjuk be.

Az (I) képletű vegyületet beadhatjuk például orális, intravénás, intraventricularis, szubkután, intramuszkuláris vagy rectalis úton; az intravénás dózisok előnyösen folyamatos cseppinfúzióból állnak.

A találmány szerinti gyógyszerkészítmény az (I) képletű vegyület enterovirális fertőzéssel szemben hatásos mennyiségét

egy növényi olajban, például kukoricaolajban vagy moggyoróolajban szuszpendálva tartalmazza, és a készítmény adott esetben egy gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyagot is tartalmaz. A gyógyszerkészítmények előállítása, illetve a gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyagok kiválasztása az ezen a területen jártas szakember számára jól ismert [lásd például: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mark Publishing Co., Easton, Pa., US, 15th edition (1975); vagy a WO 92/2250. számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentés]. Az előnyös hordozó a kukoricaolaj, amelyet alkalmazhatunk önmagában, vagy pedig stabilizálószerekkel, például lecitinnel vagy felületaktív anyagokkal, például poliszorbát 60-nal vagy Arlacel 186-tal kombinálva.

Az (I) képletű vegyület enterovirális fertőzésekkel szemben hatásos mennyisége körülbelül 1 mg/testtömeg-kg/nap és körülbelül 90 mg/testtömeg-kg/nap közötti értékű. Egy körülbelül 10-15 mg/kg nagyságú napi összdózist a nap folyamán 1-6 részletben adhatunk a betegnek; a napi összmennyiséget előnyösen több részletben adjuk be. Még előnyösebb a 10 mg/kg/nap dózis alkalmazása.

A találmány szerinti vegyületnek a kezelést végző orvos által meghatározandó pontos adagját többféle tényező befolyásolja, például a kezelendő egyed kora és testtömege, a beadás módja, a beadandó vegyület hatékonysága, az indikáció, valamint a kezelendő betegség súlyossága.

Az (I) képletű vegyület széles enterovírus-ellenes aktivitása, a molekula enterovírusokkal szembeni nagy hatékonysága, az enterovírussal fertőzött egerek esetén a molekula orális be-

adását követően elért eredmények, valamint a kutya- és főemlősökben a molekula orális beadását követő mérhető vérkoncentrációk alapján úgy véljük, hogy az (I) képletű vegyület felhasználást nyerhet a humán enterovirális fertőzések, köztük a 2. táblázatban felsorolt betegségek kezelésében és/vagy megelőzésében.

Az egyik előnyös találmány szerinti megoldás értelmében az (I) képletű vegyületnek vagy egy gyógyszerkészítményének az alkalmazásával várhatóan a következő, emberekben előforduló enterovirális betegségek hatásos terápiás és/vagy profilaktikus kezelése hajtható végre: enterovirális légzőszervi betegségek (például nyári megfázás, grippe), enterovirális aszeptikus meningitis, enterovirális meningoencephalitis, agammaglobulinaemiában előforduló krónikus enterovirális fertőzés, valamint enterovírus-70 által okozott akut haemorrhagiás conjunctivitis.

Betegpopuláció

Az enterovirális betegségen átesett betegeket a következő szempontok alapján választottuk ki: (i) bizonyos enterovirális betegségekkel együttjáró pathognomicus szimptomatológia (például akut rhinitis/megfázás tünetek a nyár folyamán, bőrelváltozások a száj- és körömfájásos betegségekben, hólyagok a garatban vagy pleurodyniával együttjáró myalgia); (ii) az enterovirális fertőzés bizonyítása sejttenyésztési módszerek alkalmazásával végzett vírusizolálás útján; (iii) a virális genetikai anyag PCR (polimeráz láncreakciós) diagnózisa (például enterovirális aszeptikus meningitis esetén a cerebralis spinalis folyadékban); immunológiai technikák, például enzimhez kötött

fluoreszcens antitesttel végzett immunabszorbens módszerek; vagy az előbbiek kombinálása.

A hatékonyság értékelés

Az (I) képletű vegyület esetén az emberekben lévő enterovirális betegségekkel szemben kifejtett hatás értékelését a szimptomatológia és/vagy az olyan, virális szövetterhelés csökkenésének a mérésével végezzük, amely virális szövetterhelés egy egyedi enterovirális betegséghez kapcsolódik. Például a hatékonyság értékeléséhez – egyebek mellett – a következő paramétereket mérhetjük: (i) a nyári megfázással együttjáró tünetek csökkenése: a víruskibocsátás csökkenése, a váladék tömegének csökkenése, lázcsökkenés, valamint a myalgia csökkenése (összehasonlítva a placebóval kezelt egyedekkel); (ii) aszeptikus meningitis esetén: a kórházban töltött idő csökkenése, a fejfájás és a láz csökkenése, a normál neurológiai leletek eléréséhez szükséges idő csökkenése (összehasonlítva a placebóval kezelt egyedekkel); (iii) haemorrhagiás conjunctivitis esetén: látásjavulás, a conjunctiva sokkal gyorsabb kitisztulása, mint a placebóval végzett kezelés esetén. Egyéb enterovirális megbetegedések esetén a kezelést végző orvos döntése alapján további paraméterek klinikai tesztelésére lehet szükség az (I) képletű vegyület hatékonyságának megítéléséhez.

Az eredmények összefoglalása

A 15 leggyakrabban izolált enterovirális immuntípust reprezentáló 154 enterovírussal szemben az (I) képletű vegyület a plakk-vizsgálatban 0,98 µg/ml (2,31 µM) átlagos IC₅₀ értéket

(50 %-os gátlási koncentrációt) mutatott (3. táblázat). Harminc kevésbé gyakran izolált enterovírus és laboratóriumi enterovírus törzs, köztük poliovírus (polio) 1 és 2 típus esetén az átlagos IC_{50} értéke $0,97 \mu g/ml$ ($2,29 \mu M$) volt. Az MTT vizsgálat alkalmazásával tanulmányoztuk, hogy az (I) képletű vegyület nemfertőzött sejteken milyen káros hatásokat okoz, és megállapítottuk, hogy a tesztelt enterovírusok 75 %-ánál (184 vírusból, köztük gyakori klinikai izolátumokból és laboratóriumi enterovírus törzsekből 138 vírussal) az (I) képletű vegyület antivirális IC_{50} értékének 51-szeres vagy ennél nagyobb koncentrációjánál a sejttenyészetekben nem történt hátrányos effektus. Az (I) képletű vegyület antivirális aktivitása tehát nincs összefüggésben a vegyület citotoxikus hatásaival. A Picorna-vírusok egy másik genusát reprezentáló rhinovírusok esetén az (I) képletű vegyület a vizsgált rhinovírusok 38 %-ával szemben $10 \mu g/ml$ ($23,6 \mu M$) vagy ennél kisebb IC_{50} értéknek megfelelő aktivitást mutatott. A Picorna-vírusok egy harmadik genusát reprezentáló egyszálú hepatitis A vírust az (I) képletű vegyület $10,1 \mu g/ml$ ($23,8 \mu M$) IC_{50} érték mellett gátolta. Az (I) képletű vegyület ugyanakkor inaktívnak bizonyult más RNS vírusokkal vagy DNS vírusokkal szemben; ennek során tíz ilyen jellegű víruscsaládot teszteltünk, köztük a következőket: influenzavírus, humán immunhiányt okozó vírus, herpes simplex vírus, valamint adenovírus.

Az orálisan alkalmazott (I) képletű vegyület az egér/patkány modellben profilaktikusan (24 órával a fertőzés előtt) és terápiásan (3,5 órával a fertőzés után) egyaránt aktív volt az

ECHO-vírus 4, a Coxsackie-vírus A9 és a poliovírus 2 fertőzéssel szemben. Az (I) képletű vegyület a terápiás és a profilaktikus alkalmazás körülményei között egyaránt fokozott *in vivo* aktivitást mutatott, mivel a virális inokulum mérete csökkent és a vegyület a virális szöveti titer értékét is csökkentette egerekben.

Egyetlen orális dózis után az (I) képletű vegyület orális úton biológiailag hozzáférhető: olyan egerekben, amelyek 1 mg/kg dózist kaptak, az orális abszorpció értéke 78 % volt, és az orális út esetén a biológiai hozzáférhetőség abszolút értéke 50 %-nak bizonyult. Az egereknek történt orális beadás után az (I) képletű vegyület gátló koncentrációt ért el az agyban, azaz az egér/patkány modellekben a vírusos fertőzés elsődleges helyén. Az orális beadást követően egerekben, patkányokban, kutyákban és majmokban az (I) képletű vegyület vérkoncentrációja is eléri a kívánt értéket. A molekula felezési ideje a szérumban egerek esetén 4,7 óra, míg kutyákban ez az érték 26 órára nő.

Az (I) képletű vegyület sejtenyészetben és állatmodellekben mutatott antivirális aktivitása, valamint a molekula egereknek, patkányoknak, vadászkopóknak és makákómajmoknak történő orális beadását követő jelentős vér- és szöveti koncentráció kialakulása alapján várható, hogy az (I) képletű vegyület az emberek enterovirális fertőzéseinek terápiás és profilaktikus kezelésében is hatékonyan alkalmazható.

1. táblázat: A Picorna-víruscsalád rendszertana

Genus	Csoport vagy virális immuntípus	Alcsoport	A vírusok száma ^a	Vírustagok ^b
Enterovírus ^c	Coxsackie-vírusok	A	23	CVA1-22, 24
		B	6	CVB1-6
	ECHO-vírusok	-- ^d	30	ECHO 1-9, 11-27, 29-34
	enterovírusok	-- ^d	4	Entero 68-71
	poliovírusok	-- ^d	3	Polio 1-3
	Vilyuisk vírus	-- ^d	1	Vilyuisk
Rhinovírus	humán rhinovírus	A	33	-- ^f
		B	67	-- ^t
Hepatitis A	hepatitis A vírus	-- ^d	1	Hepatitis A
Apthovírus	száj- és körömfájás vírus ^g	-- ^d	7	FMDV A,C,O SAT 1,3,3, Asia-1
Kardiovírus	encephalomyocar- ditis (EMC) vírus ^h	EMC	6	EMC, MM mengo, ME, SK, Columbia
	Theiler-féle egér/patkány encephalomyelitis vírus (TMEV) ¹	TMEV	7	GDVII, FA DA, WW, TO4, Yale, BeAn 8366

Jelmagyarázat az 1. táblázathoz

a: A szám az alcsoportba tartozó vírusok vagy virális immu-

típusok számát jelenti

- b: A vírusok nevének rövidítését tüntetjük fel. Ahol a szám vagy a vírus hiányzik (például CVA23), az ilyen számozással ellátott vírusokat eredetileg hibásan sorolták az enterovírus genusba. Az átosztályozáskor ezeket a hibás besorolásból származó számokat kiejtették az osztályozási rendszerből (Rueckert, 1990).
- c: A nemhumán fajokat, mint természetes gazdaszervezeteiket fertőző enterovírusokat nem tüntettük fel ebben a felsorolásban.
- d: Virális alcsoportok nem léteznek.
- e: A Vilyuisk vírus egy szibériai emberekben előforduló neurodegeneratív betegséggel kapcsolatos vírus (Casals, 1963; Lipton et al., 1983).
- f: Jóllehet a humán rhinovírusoknak hivatalosan (International Committee on the Taxonomy of Viruses) 100 immuntípusát regisztrálták, már legalább 10 további rhinovíusról számoltak be a szakirodalomban. Az egyedi rhinovírusok A és B csoportba történő osztályozását Andries ismerteti (Andries et al., 1992).
- g: A száj- és körömfájás vírusa embereket nem fertőz.
- h: Az EMC vírusokat igen ritkán izolálták emberekből, ugyanakkor ezek a vírusok nem kapcsolódnak semmilyen nyilvánvaló betegséghez (Lipton and Rozhon, 1986).
- i: A Theiler-féle egér/patkány encephalomyelitis vírusok csak egereket fertőznek (Lipton and Rozhon, 1986).

2. táblázat: Az enterovirális betegségek klinikai spektruma^a

Betegség	Alapvető virális immuntípusok ^b
A bizonyítottan enterovírus által okozott betegségek	
légzőszervi betegségek (nyári megfázások; nyári grippe)	számos Coxsackie-vírus A és B, és ECHO-vírus immuntípusok
pneumonia, pneumonitis, bronchiolitis	CVA 9 és 16, CVB 4 és 5, ECHO 68
aszéptikus meningitis	CVA 1-11, 14, 16-18, 22, 24; CVB 1-6; valamennyi ECHO típus, kivéve a 24, 26, 29 és 32 típust; polio 1-3
meningoencephalitis	CVB 1-5, enterovírus 68-72 típus
encephalitis	CVA 2, 5, 6, 7, 9; CVB 1-3, 5, 6; ECHO 2, 6, 9, 19; más kevésbé gyakoriak
agammaglobulinaemiában előforduló krónikus fertőzés	ECHO 2, 3, 5, 9, 11, 19, 24, 25, 30, 33
poliomyelitis, paralysis, paralyticus myelitis	polio 1-3; CVA 4, 6, 7, 9, 11, 14, 21; CVB 1-6; ECHO 1-4, 6, 7, 9, 11, 16, 18, 19, 30; entero 70, 71
myocarditis, pericarditis, dilatált cardiomyopathia	CVB 1-5
bőrkiütések (rubeolaszerű, roseolaszerű, sömörszerű)	CVA 2, 4, 5, 9, 16; CVB 1, 3, 4, 5; ECHO 9, 16; egyéb kevésbé gyakori ECHO típusok
újszülöttekben és kisgyermekekben előforduló szepszis, szisztémás fertőzés	CVB 1-5; ECHO 6, 9, 11, 14, 19, 31; CVA 2, 9, 16; kevésbé gyakoriak

2. táblázat (folytatás)

Betegség	Alapvető virális immuntípusok ^b
Guillian-Barre-szindróma	ECHO 2, 6, 9, 19; egyéb lehetséges ECHO típusok
hepatitis, pancreatitis	CVA 4, 9; CVB 5; ECHO 4 és 9; ugyanazok a vírusok, amelyek kisgyermekben szisztémás fertőzést okoznak
herpangina	CVA 2-6, 8, 10, 22
haemorrhagiás conjunctivitis	enterovírus-70; CVA 24 variáns
epidemicus pleurodynia, myalgia, Bornholm-betegség	CVB 1-5; CVA 4, 6, 10 sporadikusan
száj- és körömfájás	CVA 5, 7, 9, 10, 16; enterovírus-71
lymphonodularis pharyngitis	CVA 10
epidemicus myalgia	ECHO 1, 6, 9
A feltételezhetően enterovírus által okozott betegségek	
neonatalis diarrhoea	CVA 18, 20-22, 24; számos ECHO típus
posztvírusos fáradtság szindróma	CVB immuntípusok
felnőtt (inzulinfüggő) diabetes mellitus roham	CVB immuntípusok

a: Abelman, W. H., The etiology, pathogenesis and physiology
of dilated cardiomyopathies. In: New Concepts in Viral

- Heart Disease (H. P. Schultheiss, ed.), pp. 3-21.
Springer-Verlag, Berlin, Germany (1988);
- Grist, N. R. and Reid, D., General pathogenicity and
epidemiology. In: coxsackieviruses - A General Update (M.
Bendinelli and H. J. Friedman, eds.), pp. 221-239. Plenum
Press, New York, New York, US (1988);
- Kaplan, M. H., Coxsackievirus infection in children under
three months of age. In: Coxsackieviruses - A General
Update (M. Bendinelli and H. J. Friedman, eds.), pp.
241-251. Plenum Press, New York, New York, US (1988);
- Kew, O. M., Nottay, B. K., HtCH, M. H., Hierholzer, J. C.,
and Obijeski, J. F., Oligonucleotide fingerprint analysis
of enterovirus 70 isolates from the 1980 to 1981 pandemic
of acute hemorrhagic conjunctivitis: evidence for a close
genetic relationship among Asian and American strains.
Infect. Immun, 41, 631-635 (1983);
- Melnick, J. L., Enteroviruses: polioviruses,
coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In:
Virology (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds.), pp.
549-605. Raven Press Ltd., New York, New York, US (1990);
- Modlin, J. F., Coxsackieviruses, echoviruses and newer
enteroviruses. In: *Principles and Practice of Infectious
Disease* (G. L. Mandell, R. G. Douglas, Jr., and J. E.
Bennet, eds.), pp. 1367-1383. Churchill Livingstone, Inc.,
New York, New York, US (1990);
- Sattar, S. A., Dimock, K. D., Ansari, S. A., and
Springthorpe, V. S., Spread of acute hemorrhagic

conjunctivitis due to enterovirus-70. J. Med. Virol., 25,
289-296 (1988);

Wagenkencht, L. E., Rosemon, J. M., and Herman, W. H.,
Increased incidence of insulin-dependent diabetes-mellitus
following an epidemic of coxsackievirus B5. Am. J.
Epidemiology, 133, 1024-1031 (1991);

Wright, P. W., Strauss, G. H., and Langford, M. P., Acute
hemorrhagic conjunctivitis. American Family Physician, 45,
173-178 (1991).

- b: Az ebben az oszlopban feltüntetett vírusok az ugyanazzal a
betegséggel diagnosztizált egyedekből izolált leggyakoribb
enterovírusokat reprezentálják, azonban más, a betegséggel
kapcsolatosan fel nem sorolt enterovírusok is képesek
ugyanannak a betegségnek a kiváltására.

3. táblázat: Az (I) képletű vegyületnek a 15 leggyakoribb
klinikai enterovírus-izolátummal szembeni
antivirális aktivitása

Enterovirális immuntípus ¹	IC ₅₀ (µg/ml) átlag ²
E3	0,40
E4	0,15
E5	0,93
E6	0,30
E7	0,16
E9	1,45
E11	0,08
E24	0,15
E30	0,42
CA9	0,73
CB1	3,02
CB2	0,31
CB3	0,58
CB4	0,19
CB5	2,80

1. E = ECHO-vírus immuntípus

CA = Coxsackie-vírus A immuntípus

CB = Coxsackie-vírus B immuntípus

2. Az antivirális aktivitást az előkeveréses plak-
vizsgálattal határoztuk meg (lásd az Anyagok és módszerek
című fejezetet)

4. táblázat: Az (I) képletű vegyületnek a 15 leggyakoribb enterovírussal és laboratóriumi enterovírustörzsekkel szembeni, sejttenyésztésen alapuló aktivitásai (összefoglalás)

Entero- vírus- -csoport	Tesztelt vírusok (darab)	$IC_{50} \leq 1$ $\mu g/ml$ (darab)	$IC_{50} \leq 10$ $\mu g/ml$ (darab)	IC_{50} átlag ^a	EC_{80} ^b
A 15 leggyakoribb izolátum ^c	158	125	155	0,98 $\mu g/ml$ 2,31 μM)	0,9 $\mu g/ml$ (2,12 μM)
Labortörzsek/ ritka izolátumok ^d	37	24	30	0,97 $\mu g/ml$ 2,29 μM)	0,8 $\mu g/ml$ (1,89 μM)

a: Az átlagos IC_{50} értékét a leggyakoribb enterovírusok izolátumcsoportjának 128 vírusával, valamint a laboratóriumi törzs 30 vírusával az előeveréses plakk-vizsgálatban nyert antivirális aktivitási adatokból számítottuk ki.

b: Az EC_{80} az (I) képletű vegyületnek azt a koncentrációját jelenti, amely az IC_{50} értékeik alapján a tesztelt vírusok 80 %-át gátolja.

c: A 15 leggyakoribb enterovirális izolátum felsorolása a 3. táblázatban található.

d: Köztük a polivírus 1-3 és az enterovírus-70.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. (I) képletű 1-[(4-[(2,6-diklór-fenoxi)-metil]-fenil)-metoxi]-2-klór-4-metoxi-benzolnak emberek enterovirális fertőzéseinek kezelésére és/vagy megelőzésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására történő felhasználása.

2. Az 1. igénypont szerinti felhasználás, ahol az emberek enterovirális fertőzéseit egy, a Coxsackie-vírus A és B, az ECHO-vírusok, az enterovírusok és a poliovírusok által alkotott csoportból kiválasztott enterovírus okozza.

3. Gyógyszerkészítmény emberek enterovirális fertőzéseinek szelektív kezelésére és/vagy megelőzésére, **azzal jellemezve**, hogy növényi olajban szuszpendálva 1-[(4-[(2,6-diklór-fenoxi)-metil]-fenil)-metoxi]-2-klór-4-metoxi-benzol enterovirális fertőzéssel szemben hatásos mennyiségét, és adott esetben a vegyületnek egy gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyagát tartalmazza.

4. A 3. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, **azzal jellemezve**, hogy adott esetben legfeljebb 10 % lecitint tartalmaz.

5. A 3. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, **azzal jellemezve**, hogy orális beadásra szolgáló, kukoricaolajos vagy mogyoróolajos szuszpenzió formájában van.

6. A 3. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, **azzal jellemezve**, hogy kapszulázva van.

7. A 3. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, **azzal jellemezve**, hogy gyógyszerészetileg elfogadható stabilizálószer és/vagy nemionos felületaktív anyagot is tartalmaz.

8. A 3. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, **azzal jellemezve**, hogy orálisan alkalmazzuk.

9. A 3. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, **azzal jellemezve**, hogy az (I) képletű vegyületre vonatkoztatva körülbelül 1 mg/kg/nap és körülbelül 60 mg/kg/nap dózisban alkalmazzuk.

A meghatalmazott:

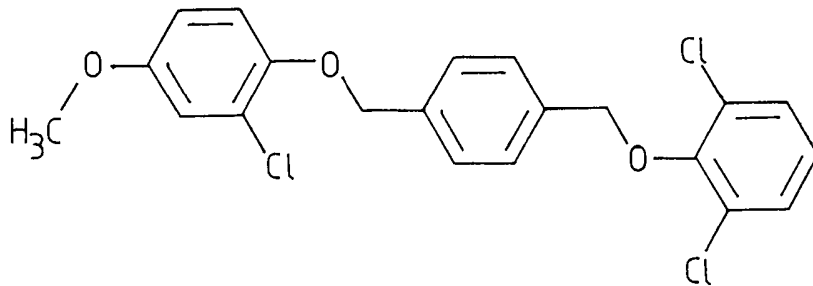
Bellózy László
szakdolgozó ügyvivő
az O.E.M. Kft. jogelődje
Szakdolgozó Irodája
H-1062 Budapest, Zrínyi út 113.
Telefon: 34-24-930, fax: 34-24-923

*1 lap van
fürtől*

2494/95

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

61147/B E
1/1



(I)

Beliczay László
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & V. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, fax: 34-24-323